



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE MACEIÓ
PROGRAMA PROFISSIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE HUMANA E ANIMAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E
ANIMAL

VANESSA KARINE BISPO MACEDO

EFICIÊNCIA DO CONGELAMENTO DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS
UTILIZANDO DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

MACEIÓ – ALAGOAS

2024

VANESSA KARINE BISPO MACÊDO

EFICIÊNCIA DO CONGELAMENTO DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS
UTILIZANDO DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia na saúde Humana e Animal do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal. Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. PhD. Axel Helmut Rulf Cofré.

MACEIÓ – ALAGOAS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo SidUECE, mediante os dados fornecidos pelo(a)

Macedo, Vanessa Karine Bispo.

Eficiência do congelamento de concentrados de plaquetas utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) [recurso eletrônico] / Vanessa Karine Bispo Macedo. - 2024.

49 f. : il.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Mestrado Profissional - Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal, Maceió, 2024.

Orientação: Prof. Pós-Dr. Axel Helmut Rulf Cofré.

1. Concentrado de Plaquetas. 2. DMSO. 3. Banco de Sangue..
I. Título.

VANESSA KARINE BISPO MACEDO

EFICIÊNCIA DO CONGELAMENTO DE CONCENTRADOS DE PLAQUETAS
UTILIZANDO DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia na Saúde Humana e Animal do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal. Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 23 de janeiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. PhD. Axel Helmut Rulf Cofré. (Orientador)
Centro de Estudos Superiores de Maceió - CESMAC

Profa. Dra. Camila Calado de Vasconcelos
Centro de Estudos Superiores de Maceió - CESMAC

Prof. Dr. Moezio de Vasconcelos Costa Santos Filho
Centro de Estudos Superiores de Maceió – CESMAC

Dedicado aos meus filhos, que surgiram neste mundo durante a construção deste trabalho. Minha menina que está no céu e Davi que dá sentido a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Macedo e Cida, irmão Victor e cunhada Alana por todo o apoio e amor incondicional.

Ao meu esposo Jonas, pelo companheirismo desde o primeiro momento.

À inspiradora amiga Marylourdes Porto pelo aprendizado na hemoterapia e na vida.

Aos amigos e sócios Allan e Cláudio pelo incentivo constante.

Ao HEMOAL que inspira e apoia a produção científica em prol da hemoterapia.

Ao Laboratório Sabin de Patologia Clínica de Alagoas, muito bem representado pelo Dr. Denis Filho e Edna, por abrir as portas para as análises realizadas.

Ao Laboratório de Inovação Farmacológica (LaiF) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) por disponibilizar sua estrutura para o estudo.

Ao meu orientador, pela paciência e apoio nos momentos difíceis

À banca examinadora, pelas valiosas colaborações e sugestões.

RESUMO

Os hemocomponentes são derivados do sangue total, utilizados em transfusões para tratar diversas condições médicas. Dentre eles, as plaquetas desempenham um papel vital, atuando na coagulação e na prevenção de hemorragias. Contudo, sua vida útil nos hemocentros é notavelmente curta, apenas cinco dias, o que leva ao descarte desses valiosos componentes. Estudos voltados para a conservação de plaquetas são, portanto, de grande relevância, com o potencial de otimizar o uso e reduzir o desperdício. Neste estudo, o foco foi avaliar a eficiência do congelamento de concentrados de plaquetas utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) em 20% como meio de prolongar sua validade. Para conduzir esta análise, amostras de concentrado de plaquetas do Hemocentro de Alagoas foram utilizadas. Estas amostras foram divididas em alíquotas a partir de concentrados de plaquetas randômicas e submetidas a processo de congelamento em freezer em temperatura de -20°C , tanto com quanto sem a adição de DMSO. A pesquisa incluiu a contagem de plaquetas e leucócitos, dosagem de glicose, avaliação visual do *swirling*, e testes microbiológicos para verificar a esterilidade. Uma análise estatística utilizando testes T para amostras pareadas foi aplicada para avaliar as diferenças significativas nas variáveis estudadas. Os resultados demonstraram que o congelamento, particularmente com a adição de DMSO, é eficaz na preservação da viabilidade das plaquetas. Foi observado que o DMSO contribuiu para a redução do metabolismo glicolítico das plaquetas em 82,5% quando comparamos com a amostra sem a sua adição, sugerindo um benefício na manutenção da sua qualidade. Além disso, os testes indicaram que as amostras congeladas mantiveram a esterilidade e a viabilidade celular adequadas para o uso em transfusões. Este estudo reforça a ideia de que as plaquetas são hemocomponentes que podem ser eficientemente conservados por meio de congelamento, especialmente com o uso de DMSO. Essa abordagem representa um avanço significativo na gestão de estoques de plaquetas, contribuindo para a redução do descarte e otimização da disponibilidade desses componentes críticos para a hemoterapia.

Palavras-chave: Concentrado de Plaquetas; DMSO; Banco de Sangue.

ABSTRACT

Blood components are derived from whole blood, used in transfusions to treat various medical conditions. Among them, platelets play a vital role, acting in clotting and preventing bleeding. However, its useful life in blood centers is remarkably short, just five days, which leads to the disposal of these valuable components. Studies aimed at conserving platelets are, therefore, of great relevance, with the potential to optimize use and reduce waste. In this study, the focus was to evaluate the efficiency of freezing platelet concentrates using dimethyl sulfoxide (DMSO) at 20% as a means of extending their shelf life. To conduct this analysis, samples of platelet concentrate from the Hemocentro de Alagoas were used. These samples were divided into aliquots from random platelet concentrates and subjected to a freezing process in a freezer at a temperature of -20°C , both with and without the addition of DMSO. The research included platelet and leukocyte counts, glucose measurement, visual assessment of swirling, and microbiological tests to verify sterility. A statistical analysis using T tests for paired samples was applied to evaluate significant differences in the studied variables. The results demonstrated that freezing, particularly with the addition of DMSO, is effective in preserving platelet viability. It was observed that DMSO contributed to reducing platelet glycolytic metabolism by 82.5% when compared to the sample without its addition, suggesting a benefit in maintaining its quality. Furthermore, the tests indicated that the frozen samples maintained sterility and cell viability suitable for use in transfusions. This study reinforces the idea that platelets are blood components that can be efficiently preserved through freezing, especially with the use of DMSO. This approach represents a significant advance in the management of platelet stocks, contributing to reducing disposal and optimizing the availability of these critical components for hemotherapy.

Keywords: Platelet Concentrate; DMSO; Blood bank.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bolsas de concentrado de plaquetas randômicas cedidas para o estudo.....	26
Figura 2 – Separação das alíquotas realizada em cabine de segurança biológica nível A2.....	27
Figura 3 – Amostras em homogeneizador.....	28
Figura 4 – Concentrado de plaquetas randômicas apresentando swirling positivo.....	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Total de bolsas transfundidas, por hemocomponente, no Brasil, em 2020.....	18
Gráfico 2 -	Total de bolsas transfundidas, por hemocomponente, em Alagoas, em 2020.....	19
Gráfico 3 -	Análise comparativa entre amostras e controles tratados com DMSO.....	31
Gráfico 4 -	Consolidação dos resultados de contagem de plaquetas em amostras e controles com DMSO ao longo do tempo.....	32
Gráfico 5 -	Resultados de contagem de plaquetas de diferentes doadores agrupados.....	33
Gráfico 6 -	Resultados da dosagem de glicose ao longo do tempo em amostras e controles com DMSO.....	34
Gráfico 7 -	Resultados da dosagem de glicose de diferentes doadores agrupados.....	34
Gráfico 8 -	Resultados da contagem de leucócitos em amostras de concentrados de plaquetas e controles com DMSO.....	35
Gráfico 9 -	Resultados da contagem de leucócitos de diferentes doadores agrupados.....	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos principais distúrbios plaquetários.....	16
Quadro 2 - Resultados das culturas microbiológicas e avaliação visual dos concentrados de plaquetas.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH	Concentrado de Hemácias
CP	Concentrado de Plaquetas
CPDA	Citrato, fosfato, dextrose e Adenina
CPD	Citrato, fosfato e dextrose
DMSO	Dimetilsulfóxido
HEMOAL	Hemocentro de Alagoas
LaiF-UFAL	Laboratório de Inovação Farmacológica da Universidade Federal de Alagoas
NAT	Nucleic Acid Tests
PF	Plasma Fresco
PTI	Púrpura Trombocitopênica Imune
SAG-M	Soro fisiológico, Adenina, Glicose e Manitol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Características gerais das plaquetas.....	14
2.2	Funções das plaquetas.....	14
2.3	Desequilíbrios plaquetários e indicações de transfusão de plaquetas.....	15
2.4	Gestão dos estoques dos hemocomponentes.....	18
2.5	Exames laboratoriais obrigatórios.....	20
2.5.1	Exames imunohematológicos.....	21
2.5.2	Exames sorológicos.....	22
2.5.3	NAT (<i>Nucleic Acid Tests</i>).....	22
2.5.4	Liberação dos exames.....	22
2.6	Dimetilsufóxido (DMSO).....	23
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	Objetivos gerais	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4	METODOLOGIA.....	26
4.1	Obtenção do concentrado de plaquetas.....	26
4.1.1	Critérios de inclusão.....	26
4.2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	26
4.3	Análise experimental.....	27
4.4	Cultura microbológica.....	29
4.5	Contagem de leucócitos e contagem de plaquetas.....	29
4.6	Dosagem de glicose.....	29
4.7	Visualização do swirling.....	29
4.8	Análise estatística.....	30
5	RESULTADOS.....	31
5.1	Análise da contagem de plaquetas.....	31
5.2	Análise da glicose.....	33
5.3	Análise da contagem de leucócitos.....	35
5.4	Análise da cultura e avaliação visual.....	36

6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42
	APÊNDICE A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	46

1 INTRODUÇÃO

Os serviços de hemoterapia são cercados de desafios desde a captação de doadores de sangue até a efetiva ocorrência de uma transfusão segura e sem reações transfusionais. Existem as dificuldades sociais relativas ao reduzido tamanho da população doadora, mas também existem limitações técnicas e estruturais dos serviços no Brasil para garantir a manutenção dos estoques de bolsas de sangue de forma satisfatória atendendo a demanda dos serviços de saúde (BARBOSA, 2014).

Cada hemocomponente (concentrado de hemácias, plasma fresco e concentrado de plaquetas) possui suas especificidades que exigem estrutura e logística específicos para manter-se em quantidade e qualidade seguros para uso. Especialmente quando falamos sobre o manejo do estoque de concentrados de plaquetas, um dos maiores desafios destes serviços (SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2015).

A doação dos concentrados de plaquetas pode ser de duas formas: através da doação do sangue total, onde obtemos o concentrado de plaquetas randômicas; e a doação de plaquetas por aférese, processo no qual há a extração do sangue total do doador através de um equipamento chamado aférese, que separa os componentes retornando ao doador suas hemácias e plasma e coletando apenas as plaquetas (SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2015). Esta última é um tipo de doação que oferece uma segurança maior para o receptor, visto que possui um volume suficiente para um paciente (evitando exposição a mais de uma bolsa de randômica) e já é filtrada para os indesejados leucócitos (principais causadores de reações transfusionais) (BARBOSA, 2014).

Cada tipo de doação de plaquetas possui suas características e desafios, mas ambas possuem apenas cinco dias de validade, graças a sua temperatura de armazenamento (20 a 24°C) e a ausência de conservantes nas bolsas (SILVA, 2019).

Além dos desafios relacionados a conservação; existem exames obrigatórios que devem ser realizados em amostras colhidas de todos os doadores, a cada doação de sangue. Exames imunohematológicos, sorológicos e moleculares. A realidade estrutural e tecnológica da maioria dos serviços, não permite a realização dos testes moleculares; sendo necessário a terceirização para outros estados. Conseqüentemente, as bolsas ficam em quarentena por dois a três dias; aumentando

a problemática em relação ao tempo de validade dos concentrados de plaquetas (PINTO, 2021).

Cada tipo celular possui suas características fisiológicas que permitiram o uso de conservantes ou o armazenamento a baixas temperaturas como práticas disseminadas nos serviços de hemoterapia. Entretanto, é evidente a escassez de estudos direcionados para soluções mercadologicamente viáveis para o incremento da validade dos concentrados de plaquetas (ROQUE, 2018).

Diante da necessidade de estudos em busca de soluções que possibilitem uma maior e melhor conservação de concentrado de plaquetas para fins transfusionais, o congelamento se mostrou como uma opção tecnológica e estruturalmente possível para os serviços. No entanto, há a necessidade da presença de um agente crioprotetor com propriedades como: pouca toxicidade, baixa incidência de contaminação microbiológica e baixo custo. O DMSO ou composto dimetilsulfóxido se apresentou como uma alternativa (ANGELINI, 1992).

O DMSO se apresenta no âmbito da pesquisa biomédica como um agente com características protetoras na preservação de células, sendo possível sua combinação com diversos tipos de ácidos, carboidratos, lipídios e outras substâncias biológicas sem modificar a composição das moléculas. (HORNSEY, 2008)

Com o objetivo de fortalecer os estoques de concentrado de plaquetas dos bancos de sangue, espera-se que com os resultados do presente estudo, o DMSO associado ao congelamento seja um aliado para os serviços, de forma a ter uma perspectiva prática dentro das suas realidades estruturais, humanas e financeiras mantendo a segurança e efetividade clínica para o paciente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais das plaquetas

As plaquetas, por definição, são consideradas produtos citoplasmáticos anucleados presentes no sangue e produzidos pelos megacariócitos, células presentes na medula óssea. As plaquetas produzidas estão presentes na circulação sanguínea (70%) e no baço (30%), possuindo meia vida de aproximadamente dez dias. Ao sinal de perda de função ou alteração morfológica, elas são retiradas da circulação pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado (VAN DER MEIJDEN, 2019).

Apesar da sua simplicidade, morfológicamente, as plaquetas possuem um aspecto granular discóide dividido em quatro camadas: zona periférica, zona sol-gel, zona de organelas e sistema membranal. O seu processo de produção pode ser dividido em megacariopoiese e trombopoiese (SCRIDON, 2022).

A Megacariocitopoiese é o processo de proliferação e maturação dos megacariócitos a partir de células progenitoras em tecidos hematopoiéticos na medula óssea. Ocorrendo a partir da multiplicação clonal, fatores de transcrição e citocinas, principalmente trombopoietina, culminando na produção de megacariócitos maduros (NOETZLI, 2019).

A trombopoiese, por sua vez, é o processo de produção das plaquetas a partir dos megacariócitos maduros; além da sua liberação para a circulação, sendo mediada principalmente pela citocina trombopoietina (SCRIDON, 2022). As plaquetas libertam-se dos megacariócitos maduros para a corrente sanguínea por fragmentação citoplasmática ou pela constrição periódica de pseudópodes citoplasmático megacariocíticos (GROZOVSKY, 2015).

O processo de trombopoiese acontece na medula óssea e em outros locais de hematopoiese como o baço. Porém, também ocorre nos pulmões, onde alguns megacariócitos maduros permanecem ao deixar a medula óssea. Cada megacariócito é capaz de produzir de 1000 a 3000 plaquetas (GROZOVSKY, 2015).

2.2 Funções das plaquetas

As funções das plaquetas vão além das funções hemostáticas. Elas desempenham também papel importante nos mecanismos de inflamação e cicatrização de lesões; interagindo com leucócitos e liberando catecolaminas, citocinas, mitógenos como o PGDF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas) e fatores de crescimento que promovem quimiotaxia, proliferação, diferenciação celular, angiogênese e deposição de matriz extracelular (KROUPENOVA, 2018).

Quando relatamos sobre as clássicas funções hemostáticas, estamos falando sobre o principal papel desempenhado auxiliando na reparação da lesão vascular participando da formação do tampão hemostático primário; prevenindo, assim, a ocorrência de hemorragia (MCARTHUR, 2018).

2.3 Desequilíbrios plaquetários e indicações de transfusão de plaquetas

Os desequilíbrios plaquetários na hemostasia podem ter causas relacionadas a anormalidades no número ou na composição das plaquetas. Alterações estas, que podem iniciar um desequilíbrio nas fases iniciais do sistema hemostático, podendo causar sangramentos. Entre as causas, podemos citar, principalmente, patologias relacionadas a defeitos nos receptores plaquetários, desordens granulares e deficiências de secreção, plaquetopenias por falência medular ou plaquetopenias imunes (Quadro 1) (SCRIDON, 2022).

Quadro 1 – Classificação dos principais distúrbios plaquetários

CLASSIFICAÇÃO	DISTÚRBIOS PLAQUETÁRIOS	TRANSFUSÃO CONCENTRADO DE PLAQUETAS
DEFEITOS NOS RECEPTORES PLAQUETÁRIOS	Trombastenia de Glanzmann	Indicado
	Síndrome de Bernard-Soulier	
DESORDENS GRANULARES	Síndrome de Hermansky-Pudlak	Avaliar custo-benefício
	Síndrome de Chediak-Higashi	
	Síndrome de Wiskott-Aldrich	
	Síndrome das plaquetas cinza	
	Desordem de Quebec	
DEFICIÊNCIAS DE SECREÇÃO	Anormalidades na transdução de sinal de membrana, vias metabólicas ou na secreção do conteúdo granular após a ativação plaquetária	Avaliar custo-benefício
FALÊNCIA MEDULAR	Doenças hematológicas	Indicado
PLAQUETOPENIAS IMUNES	Púrpura trombocitopênica imune (PTI)	Apenas em casos de sangramentos graves

Fonte: CASTRO, 2006

Dentre as patologias relacionadas aos defeitos nos receptores plaquetários temos como principais a trombostenia de Glanzmann e a síndrome de Bernard-Soulier (KRAUSE, 2023). A primeira é causada pela ausência ou diminuição nos receptores GpIIb-IIIa, sem alteração de número, tamanho, forma e meia vida das plaquetas. Não possui característica de sangramento ativo, porém, apresentando o tempo de sangramento invariavelmente prolongado, com retração do coágulo em nível fraco ou ausente (SOLH, 2015).

Já a síndrome de Bernard-Soulier é caracterizada por plaquetas maiores, mas em menor quantidade, tempo de sangramento prolongado e agregação anormal. A causa é a diminuição ou ausência de receptores para o FvW (GpIb-IX). Os sintomas variam muito de acordo com indivíduo (CASTRO, 2006).

As desordens granulares são caracterizadas por doenças em que a maior característica são anormalidades na capacidade das plaquetas em estocar moléculas dentro dos grânulos. Podendo ser associadas a desordens sistêmicas: síndrome de

Hermansky-Pudlak, síndrome de Chediak-Higashi e síndrome de Wiskott-Aldrich (CASTRO, 2006). Ou não associadas a desordens sistêmicas: síndrome das plaquetas cinza e desordem de Quebec (RONDINA, 2019).

As deficiências de secreção são consideradas o maior grupo de deficiências do funcionamento das plaquetas. Podendo ser anormalidades na transdução de sinal de membrana, vias metabólicas ou na secreção do conteúdo granular após a ativação plaquetária (SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2015).

Quando analisamos a falência medular, estamos focando nas principais anormalidades que desencadeiam tratamentos de reposição como a transfusão sanguínea de concentrados de plaquetas. A falência medular pode ser causada por: doenças hematológicas e como consequência de métodos terapêuticos para doenças oncológicas ou onco-hematológicas como radioterapia e quimioterapia (GIRELLO, 2011).

As plaquetopenias imunes são caracterizadas pela destruição plaquetária por autoanticorpos antiplaquetas; sendo a mais comum a púrpura trombocitopênica imune (PTI). A terapêutica mais utilizada é com corticóides e imunoglobulina (BOSCHER, 2020).

Percebe-se que a transfusão de concentrado de plaquetas é a terapia ou tratamento para diversas desordens de ordem plaquetária, sejam qualitativas ou quantitativas (Quadro 1). Sendo consenso que o custo-benefício deve ser avaliado, pois a transfusão possui seus riscos que devem ser considerados pela equipe assistencial e pelo paciente no seu consentimento. De forma geral, desaconselha-se reposição de plaquetas por destruição periférica ou alterações congênitas de função plaquetária. Sendo mais bem indicado para casos de falência medular (SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2015).

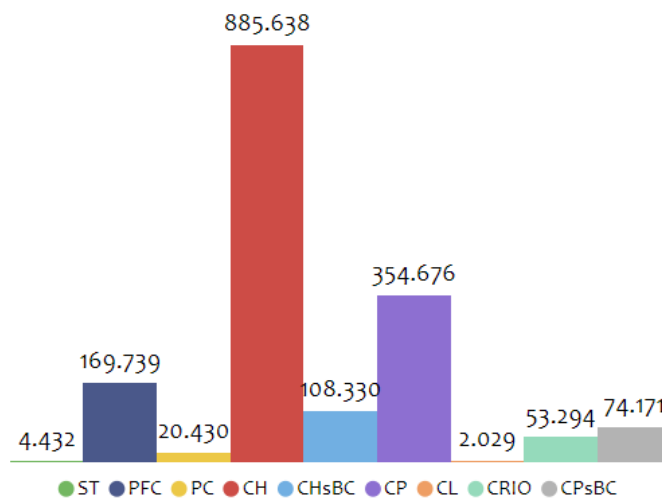
Quando indicada, a transfusão de CP, deve obedecer a alguns critérios para a sua plena efetividade. Para os concentrados de plaquetas randômicas, que possuem cerca de 70 ml, a indicação é que seja uma bolsa para cada 10 kg de peso do paciente. Enquanto para as plaquetas colhidas por aférese, que têm cerca de 200 ml, apenas uma unidade é o suficiente para um paciente de 60 kg. Além do peso corporal, outros fatores clínicos devem ser avaliados para a determinação da melhor indicação, como a contagem de plaquetas do paciente, por exemplo (BRASIL, 2017).

2.4 Gestão dos estoques de hemocomponentes

Uma das maiores preocupações quando há a indicação de transfusão de plaquetas nas diversas desordens plaquetárias é a disponibilidade destas bolsas nos estoques dos serviços de hemoterapia; devido à grande demanda de bolsas nas rotinas dos ambulatórios e hospitais e baixos índices de doações de sangue nos serviços de hemoterapia (MESQUITA, 2021).

De acordo com os últimos dados do HEMOPROD publicados pela ANVISA, em 2020 foram realizadas 1.672.739 transfusões no Brasil, destas, 25,6% (428.847 bolsas) foram transfusões de concentrados de plaquetas (Gráfico 1). No estado de Alagoas a proporção foi de 31,2% (6057 bolsas), maior que a média nacional (Gráfico 2) (ANVISA, 2022).

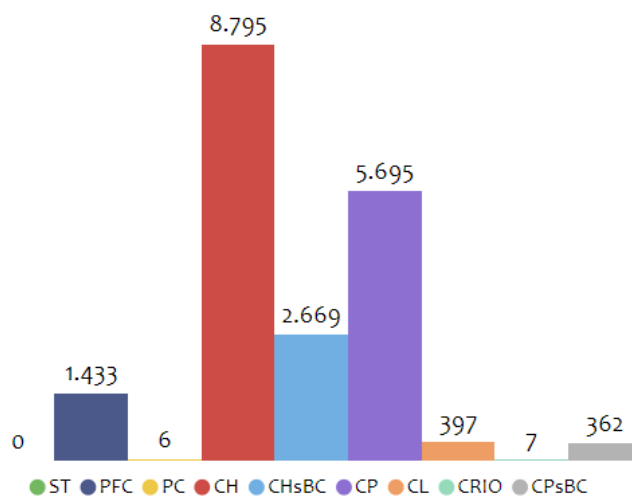
Gráfico 1 - Total de bolsas transfundidas, por hemocomponente, no Brasil em 2020.



ST: sangue total; PFC: plasma fresco congelado; PC: plasma comum; CH: concentrado de hemácias; CHsBC: concentrado de hemácias sem buffy coat; CP: concentrado de plaquetas; CL: concentrado de leucócitos; CRIO: crioprecipitado; CPsBC: concentrado de plaquetas sem buffy coat.

Fonte: ANVISA, 2022.

Gráfico 2 - Total de bolsas transfundidas, por hemocomponente, em Alagoas em 2020.



ST: sangue total; PFC: plasma fresco congelado; PC: plasma comum; CH: concentrado de hemácias; CHsBC: concentrado de hemácias sem buffy coat; CP: concentrado de plaquetas; CL: concentrado de leucócitos; CRIO: crioprecipitado; CPsBC: concentrado de plaquetas sem buffy coat.

Fonte: ANVISA, 2022.

Quando avaliamos o cenário de doações de sangue, podemos ver a grande divergência que existe. Em 2020, no Brasil, apenas 14,78 pessoas por 1.000 habitantes eram doadoras de sangue. Em Alagoas, 8,27 pessoas por mil habitantes (ANVISA, 2022).

Vários fatores podem influenciar a falta de expressividade no número de doadores no Brasil, principalmente fatores culturais como tabus relacionados ao sangue, questões religiosas, ausência de campanhas ou campanhas com fragilidades estratégicas, fragilidade do altruísmo na sociedade, entre outros motivos (ANVISA, 2022).

Superado o desafio da captação de doadores, os serviços de hemoterapia precisam dispor de uma cadeia fria estruturada e pessoal especializado para o armazenamento dos hemocomponentes. Os concentrados de hemácias possuem validade de 35 dias quando conservadas com CPDA-1 (citrato de sódio, potássio de sódio, dextrose e adenina) ou CPD (citrato de sódio, potássio de sódio, dextrose) e 42 dias quando conservadas com SAG-M (soro fisiológico adenina, glicose e manitol). A temperatura de armazenamento recomendada é de 2°C a 4°C em refrigerador próprio para o hemocomponente (SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2015).

Entretanto, existe a possibilidade do congelamento dos CH com a adição de glicerol como crioprotetor dos eritrócitos; técnica que encarece o processo mas conserva bolsas de concentrados de hemácias com fenótipos raros ou direcionados para doação autóloga em situações especiais. Neste caso, a validade chega a 10 anos. Infelizmente ainda é uma técnica disponível em poucos serviços (SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2015).

O plasma fresco congelado oferece uma flexibilidade maior em relação ao tempo de armazenamento, podendo chegar a 2 anos quando congelados a -30°C e 1 ano quando congelados a -20°C ; sendo esta última temperatura a mais utilizada nos serviços por questão estrutural. Não sendo necessária a utilização de conservantes (BRASIL, 2017).

Em especial, o gerenciamento do estoque de concentrados de plaquetas possui desafios adicionais quando comparados com os outros hemocomponentes. Principalmente o seu tempo de validade que, atualmente, é de 5 dias devido a sua temperatura de armazenamento ser ambiente (20 a 24°C) e a sua bolsa de armazenamento não possuir nenhum tipo de conservante. Além disso, é necessário que as bolsas permaneçam em homogeneização em agitador próprio permanentemente até o momento da transfusão, a fim de evitar agregações plaquetárias (SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, 2015).

Tendo em vista a grande demanda de transfusões de plaquetas, os bancos de sangue precisam manter um estoque mínimo disponível para o atendimento dos pacientes crônicos e atendimento de urgências e emergências. No entanto, a curta validade oferece um risco considerável de perdas, sendo necessário um equilíbrio nesta disponibilidade que é afetada, também, pelo tempo de quarentena necessário até a liberação dos exames imunohematológicos, sorológicos e do NAT (BARBOSA, 2014).

2.5 Exames laboratoriais obrigatórios

De acordo com a Portaria da Consolidação nº 5 de 2017 do Ministério da Saúde, todas as bolsas doadas devem ser submetidas a exames imunohematológicos, sorológicos e moleculares para antígenos determinados (NAT); independente da frequência de doação daquele indivíduo. No ato da doação,

amostras são colhidas a partir de dispositivo da própria bolsa de coleta (BRASIL, 2017).

2.5.1 Exames imunohematológicos

Os testes imunohematológicos são testes que pesquisam antígenos eritrocitários, seus anticorpos e o significado clínico da presença, ausência e interações. Os testes estabelecidos como obrigatórios nas amostras dos doadores de sangue são: determinação do grupo sanguíneo, CDE, D fraco, pesquisa de anticorpos irregulares e pesquisa da hemoglobina S (GIRELLO, 2011).

A determinação do grupo sanguíneo é realizada através de duas metodologias; o teste direto, onde pesquisamos os antígenos eritrocitários dos sistemas sanguíneos ABO e Rh e o teste reverso (confirmatório), onde se pesquisa a presença de anticorpos naturais do sistema ABO. Cada teste deve ser feito, preferencialmente, por técnicos diferentes já que um resultado confirma o outro. É boa prática que um terceiro técnico interprete os dois resultados, confirmado sua congruência, liberando o resultado (SILVA, 2019).

Para a determinação do Rh, existem algumas especificidades. A pesquisa da presença do antígeno D é realizada no teste direto do grupo sanguíneo, sendo necessária a realização de um controle juntamente com o teste para a detecção de possíveis interferentes. Na ausência do antígeno D, é necessária a realização de dois testes adicionais confirmatórios: a pesquisa do D fraco (para detecção de baixa expressão fenotípica do antígeno D eritrocitário) e a pesquisa do CDE para a detecção dos antígenos C, D e E (que também fazem parte do sistema Rh) (BRASIL, 2017).

Percebe-se que não existe a realização do teste reverso para o sistema Rh, isso se deve a natureza irregular dos anticorpos deste sistema, ou seja, a sua presença indica exposição prévia. Por isso a importância da pesquisa da presença dos seus antígenos, que são altamente imunogênicos (GIRELLO, 2011).

Além do sistema Rh, outros sistemas sanguíneos também possuem características de imunogenicidade média a alta. Sendo necessária a pesquisa da presença destes anticorpos nas amostras de doadores de sangue; sendo chamada de Pesquisa de Anticorpos Irregulares ou Coombs Indireto (GIRELLO, 2011).

Os anticorpos irregulares são aqueles que não são naturais, ou seja, são produzidos a partir de exposição e sensibilização; a exposição pode ser através de transfusões sanguíneas anteriores e gestações. Nas situações em que os anticorpos irregulares estão presentes nas amostras dos doadores, o uso da bolsa de concentrado de plaquetas e plasma fresco não é recomendado, sendo motivo de descarte destes componentes (GIRELLO, 2011).

A pesquisa da hemoglobina S é importante para a detecção de doadores de sangue que possuem traço falciforme. Sabe-se que os indivíduos heterozigotos para a expressão da proteína S são assintomáticos, ou seja, não possuem a doença falciforme. Entretanto, existe uma produção, mesmo que reduzida, de drepanócitos; o que, naturalmente, vai constituir a bolsa doada e na proporção do concentrado de hemácias acaba assumindo um número grande de células (SILVA, 2019).

No caso da detecção da presença da hemoglobina S, as bolsas de CH são identificadas como tal e direcionadas para grupo de pacientes não crônicos. Para o concentrado de plaquetas e plasma fresco não há nenhum impacto (BRASIL, 2017).

2.5.2 Exames sorológicos

Os testes sorológicos são necessários devido ao risco de transmissão de doenças infecciosas através da transfusão sanguínea. As sorologias realizadas são aquelas provenientes de antígenos de importância epidemiológica na região. A maioria delas são assintomáticas em seu período inicial de infecção e o doador acaba descobrindo no processo de doação de sangue (SILVA, 2019).

A sorologias obrigatórias pelas diretrizes do Ministério da Saúde são para: doença de chagas, sífilis, hepatite B e C, HIV I/II e HTLV I/II. Em alguns estados também é necessária a realização da sorologia para a malária (BRASIL, 2017).

O resultado reagente, com confirmação, para qualquer sorologia realizada, indica necessidade de descarte imediato dos hemocomponentes doados (BRASIL, 2017).

2.5.3 NAT (*Nucleic Acid Tests*)

O NAT (*Nucleic Acid Tests*) ou Tecnologia de Amplificação de Ácidos Nucléicos, é um grupo de testes realizados pela metodologia de biologia molecular para os vírus HIV 1 e 2, HCV e HBV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Sua função é amplificar sequências de ácidos nucleicos derivados do genoma de vírus de interesse, cobrindo a janela imunológica que a sorologia possui (PINTO, 2021).

Devido a sua complexidade e custo, são realizados somente em grandes hemocentros e em alguns laboratórios particulares especializados; a maioria dos estados brasileiros os terceirizam (SILVA, 2019).

A grande problemática da disponibilidade das bolsas de concentrados de plaquetas é agravada pelo fato de que com a terceirização, os resultados demoram de dois a três dias para a sua liberação. Como as bolsas de CP tem 5 dias de validade, a realidade é que elas só estão disponíveis para uso por 2 a 3 dias (SILVA, 2019).

2.5.4 Liberação dos exames

A liberação dos hemocomponentes para uso, após a doação, depende obrigatoriamente de resultados de testes imunohematológicos, sorológicos e do NAT (*Nucleic Acid Tests*) determinados pelo Ministério da saúde (BRASIL, 2017).

Os testes imunohematológicos e sorológicos são testes que exigem nível considerável de investimento em equipamentos e profissionais especializados (GIRELLO, 2002). No entanto, os serviços devem dispor dessa estrutura *in loco*, possibilitando que os testes sejam realizados no mesmo dia da doação. Enquanto os testes NAT, como citado anteriormente, são terceirizados e acabam prolongando a quarentena dos hemocomponentes (BRASIL, 2017).

A dificuldade na captação de doadores, coleta e manejo do estoque, tempo para a liberação dos testes laboratoriais e validade dos concentrados de plaquetas são fatores que dificultam a efetiva cobertura do atendimento das solicitações de transfusão. Visto isso, é de grande importância para os serviços que exista a possibilidade de um tempo de viabilidade maior deste hemocomponente para a garantia da assistência aos pacientes e aproveitamento dos recursos do serviço (MESQUITA, 2021).

2.6 Dimetilsufóxido (DMSO)

O DMSO ou composto dimetilsulfóxido é um veículo com características apróticas e anfipáticas; comumente utilizado no âmbito da pesquisa biomédica, sendo possível sua combinação com diversos tipos de ácidos, carboidratos, lipídios e outras substâncias biológicas sem modificar a composição das moléculas. Possui características protetoras na preservação de células, pouco tóxica, baixa incidência de contaminação microbiológica e possui um baixo custo (HORNSEY, 2008).

O DMSO e a água são miscíveis. Quando misturadas, têm pontos de fusão mais baixos. Seu uso é interessante pois, quando adicionado, desordena as redes de ligação hidrogênio da água evitando a formação de cristais de gelo que podem danificar biomoléculas, células e tecidos celulares através do cisalhamento mecânico e o estresse osmótico (LEE, 2022)

As propriedades do DMSO possibilitam que, quando presente em amostras biológicas, a membrana celular se torne mais permeável e flexível ficando menos suscetível a ruptura; contribuindo para seus efeitos crioprotetores (VERHEIJEN, 2019).

Estudos relacionando aos efeitos do DMSO nas células sanguíneas e endoteliais mostraram que a agregação plaquetária *in vivo* foi inibida pelo DMSO de forma dose-dependente. No entanto, concluiu que mais investigações são necessárias para entender melhor a influência do DMSO nestas células, pois não foi possível separar completamente as reações adversas relacionadas ao uso de DMSO e as reações adversas relacionadas a outros medicamentos, uma vez que as reações adversas como náuseas, vômitos, cefaleia etc. não são específicas apenas para DMSO (XIAOYANG *et al*, 2017).

Diante da necessidade de fortalecer os estoques de concentrado de plaquetas dos bancos de sangue, espera-se que com os resultados do presente estudo o DMSO associado ao congelamento seja um aliado para os serviços, de forma a ter uma perspectiva prática dentro das suas realidades estruturais, humanas e financeiras mantendo a segurança e efetividade clínica para o paciente.

3. Objetivo

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da adição de dimetilsulfóxido (DMSO) associado a congelamento e preservação a -20°C na estabilidade e viabilidade de concentrados de plaquetas.

3.2 Objetivos Específicos

Analisar a eficácia do DMSO na estabilização das contagens de plaquetas em amostras armazenadas em diferentes intervalos de tempo, comparando com amostras sem DMSO.

Verificar o efeito do DMSO na manutenção dos níveis de glicose nas amostras de concentrado de plaquetas.

Determinar o impacto do DMSO na contagem de leucócitos nas amostras de concentrado de plaquetas.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do concentrado de plaquetas

Para o presente estudo, quantitativo experimental, foram cedidas 5 bolsas de concentrados de plaquetas remanescentes do estoque de hemocomponentes do Hemocentro de Alagoas (Hemoal); sem prejuízo aos pacientes transfusionais visto que seriam descartadas por limite de validade. As amostras foram nomeadas D1 a D5 e seus respectivos tratamentos D1 DMSO a D5 DMSO.

Figura 1 – Bolsas de concentrado de plaquetas randômicas cedidas para o estudo



Fonte: Elaborada pelo autor

4.1.1 Critérios de Inclusão

A origem das bolsas vem de doadores, de ambos os sexos, aptos conforme triagem clínica realizada; ou seja, sem aspectos clínicos que comprometam a qualidade dos hemocomponentes estudados.

4.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Comitê de Ética

Todos consentiram a coleta e o uso de seu material sanguíneo através de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido próprio e aplicado pelo hemocentro.

O estudo foi avaliado pelo CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) e aprovado sob nº 6.191.900.

4.3 Análise experimental

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Inovação Farmacológica da Universidade Federal de Alagoas (LaiF-UFAL) em cabine de segurança biológica nível A2. O setor de dispensação do Hemoal disponibilizou as bolsas para estudo em janeiro de 2023. Imediatamente após a coleta, o material foi levado ao laboratório para processamento.

Figura 2 – Separação das alíquotas realizada em cabine de segurança biológica nível A2



Fonte: Elaborada pelos autores

As bolsas de concentrados de plaquetas estavam no seu sexto dia de vida, a contar a partir do seu dia de coleta. O objetivo era analisar a sua estabilidade e segurança em um intervalo de tempo curto, visto que atualmente a validade permitida é de cinco dias sem conservantes. Então, os testes foram feitos no dia 6 (seis dias após coleta), dia 9 (nove dias após coleta) e dia 12 (doze dias após coleta)

Foram realizadas 6 alíquotas para cada bolsa (3 para amostras com DMSO e 3 para amostras controle), uma para cada dia de análise (6, 9 e 12). As amostras foram colocadas em tubos cônicos do tipo Falcon de 15 mL com um volume de 8 mL de concentrado de plaquetas e 2mL de DMSO, concentração de 20%, e armazenadas a -20°C (temperatura dos freezers já disponíveis nos serviços de hemoterapia)

Figura 3 – Amostras em homogeneizador



Fonte: Elaborada pelo autor

Nos dias de estudo, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório Sabin de Patologia Clínica de Maceió, para a realização dos testes laboratoriais. No

transporte, as amostras foram acondicionadas em caixa térmica mantendo a temperatura de 20 a 24°C, para manutenção da sua estabilidade.

4.4 Cultura microbiológica

De acordo com o cronograma do estudo, as alíquotas foram submetidas a culturas microbiológicas. A metodologia utilizada foi a tradicional hemocultura; onde foi inoculado 5ml da amostra no frasco de hemocultura e observados a cada 24 horas por três dias. Esta metodologia é amplamente utilizada no diagnóstico de septicemia e recomendada para testes de controle de qualidade de hemocomponentes (BRASIL, 2017).

4.5 Contagem de leucócitos e contagem de plaquetas

A contagem de leucócitos e a contagem de plaquetas das amostras estudadas foi realizada em equipamento hematológico que utiliza metodologia de citometria de fluxo fluorescente com laser semiconductor e foco hidrodinâmico, possibilitando uma diferenciação celular com alta sensibilidade em baixas contagens.

Em um tubo de vidro de 5ml identificado, é pipetado 2 mL da respectiva alíquota; este é posicionado no local adequado de forma que a agulha do equipamento consiga aspirar sem contaminação e entrada de bolhas de ar. O resultado das contagens de plaquetas e leucócitos é evidenciado quantitativamente e em forma de gráfico.

4.6 Dosagem de glicose

A dosagem de glicose foi realizada no equipamento AU400 da Olympus que utiliza medições turbidimétricas e espectrofotométricas. As alíquotas foram distribuídas em cubetas próprias do equipamento para a realização do teste. Previamente foram realizados todos os testes de controles internos de qualidade feitos rotineiramente.

4.7 Visualização do *swirling*

O teste de visualização do *swirling*, ou "*swirling test*" em inglês, é uma técnica experimental usada para observar e analisar o comportamento de fluidos. O *swirling* é considerado presente quando se visualiza uma nuvem turva no conteúdo da bolsa de concentrado de plaquetas, sobretudo quando colocamos contra a luz. Não necessitando do uso de equipamentos ou visualizadores próprios.

Figura 4 – Concentrado de plaquetas randômicas apresentando swirling positivo



Fonte: Elaborado pelo autor

4.8 Análise estatística

Para fazer o teste de diferença de média foi utilizado o teste T para amostras pareadas, pois, são os mesmos casos observados em períodos diferentes. O teste t indica se a média das diferenças entre duas amostras pareadas difere de zero. O software utilizado para a realização dos testes estatísticos foi o Microsoft Excel. Todos os testes atendem ao pressuposto de normalidade da diferença. O teste t foi realizado para três variáveis numéricas: Contagem de Plaquetas, Contagem de Leucócitos e Glicose.

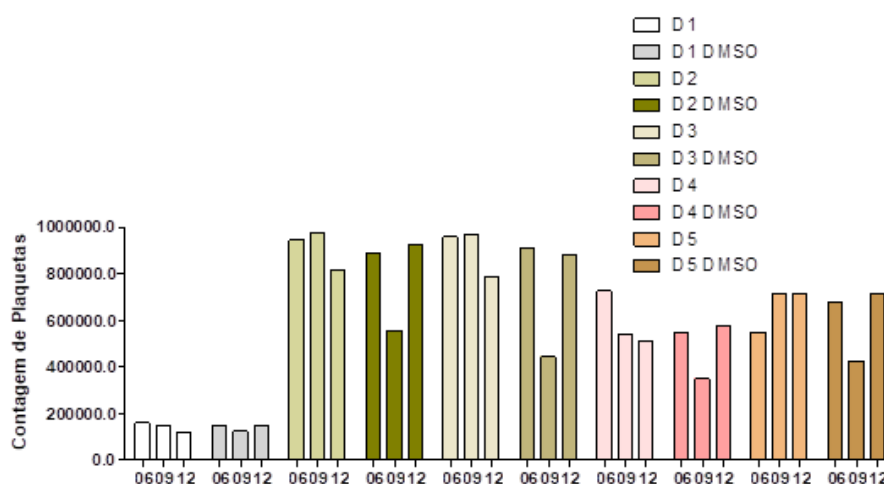
5 RESULTADOS

5.1 Análise de contagem de plaquetas

A análise dos dados apresentados na Gráfico 3 sugere uma tendência geral de decréscimo nas contagens de plaquetas ao longo do tempo, tanto para as amostras quanto para os controles. Intrigantemente, a comparação entre as amostras e seus respectivos controles com DMSO revela que o solvente pode ter um papel na estabilização ou mesmo no aumento da contagem de plaquetas, como evidenciado pelo comportamento da amostra D1.

No entanto, a influência do DMSO não é consistente em todas as condições experimentais, como demonstrado pelo aumento atípico na contagem de plaquetas no controle D2 DMSO, diferindo do comportamento observado nas demais amostras. Embora uma análise estatística formal não seja aplicável devido à natureza dos dados, que aparentam ser medições únicas, essas observações destacam pontos de interesse que merecem atenção adicional e possivelmente investigação futura para esclarecer os efeitos observados.

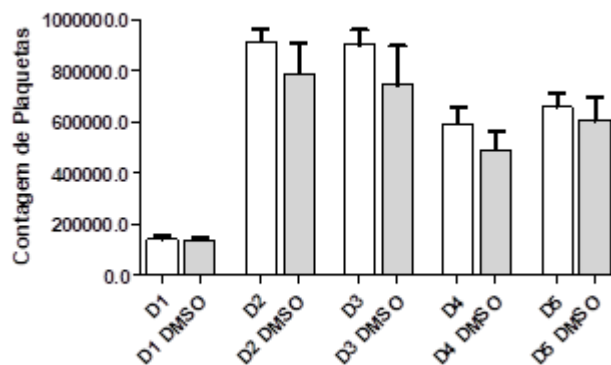
Gráfico 3 - Análise comparativa entre amostras e controles tratados com DMSO



Observa-se uma tendência geral de decréscimo nas contagens de plaquetas ao longo do tempo, tanto para as amostras quanto para os controles.

Ao consolidar os dados ao longo do tempo e aplicar análises estatísticas, observa-se que, para a contagem de plaquetas, não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e os tratados com DMSO em nenhuma das cinco amostras analisadas (Gráfico 4). Esse resultado sugere que, sob as condições experimentais específicas deste estudo, o DMSO não exerce um efeito distinto sobre a viabilidade ou a proliferação das plaquetas em comparação aos controles não tratados. Isso indica que o DMSO, na concentração usada (20%), pode ser considerado neutro em relação à contagem de plaquetas.

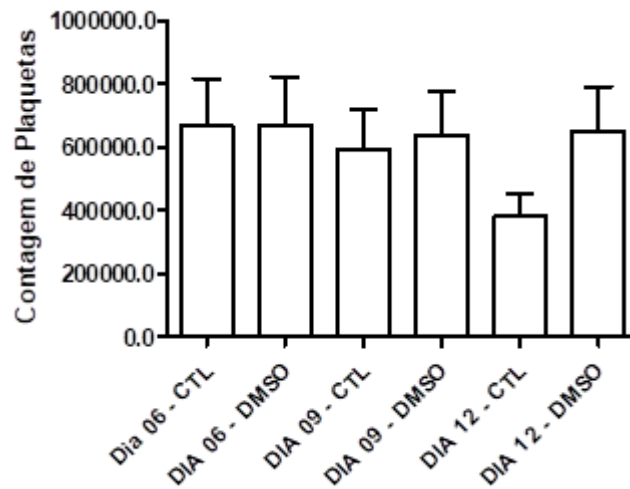
Gráfico 4 - Consolidação dos resultados de contagem de plaquetas em amostras e controles com DMSO ao longo do tempo



Ao consolidar os dados ao longo do tempo e aplicar análises estatísticas, observa-se que, para a contagem de plaquetas, não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e os tratados com DMSO em nenhuma das cinco amostras analisadas.

Agrupando os dados entre os diferentes doadores e submetendo-os à análise estatística, constata-se que não há diferença significativa nas contagens de plaquetas ao longo do tempo (Gráfico 5). Isso pode reforçar a validade do tratamento em análise, ao mostrar que os efeitos observados são consistentes e replicáveis entre diferentes indivíduos.

Gráfico 5 - Resultados de contagem de plaquetas de diferentes doadores agrupados

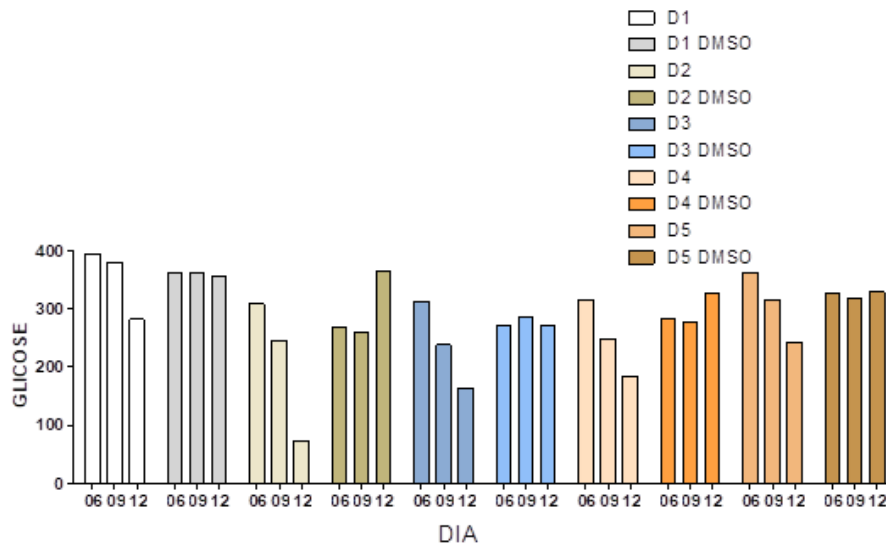


Agrupando os dados entre os diferentes doadores e submetendo-os à análise estatística, constata-se que não há diferença significativa nas contagens de plaquetas ao longo do tempo

5.2 Análise de glicose

A análise dos dados apresentados no Gráfico 6 sugere uma tendência geral de decréscimo na concentração de glicose ao longo do tempo para as amostras que não foram tratadas com DMSO. Intrigantemente, a comparação entre as amostras e seus respectivos controles tratados com DMSO revela que o solvente pode ter um papel na estabilização ou mesmo na preservação dos níveis de glicose, como evidenciado pelo comportamento de todas as amostras tratadas com DMSO.

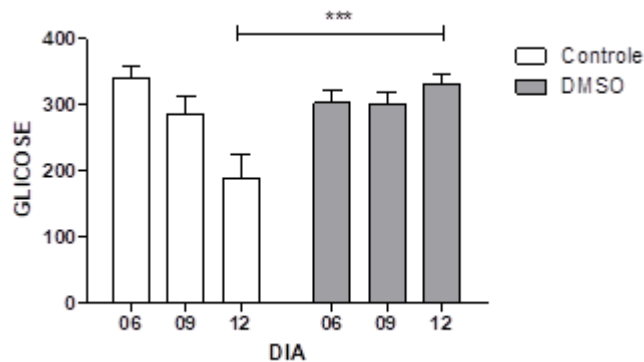
Gráfico 6 - Resultados da dosagem de glicose ao longo do tempo em amostras e controles com DMSO



Observa-se uma tendência geral de decréscimo na concentração de glicose ao longo do tempo para as amostras que não foram tratadas com DMSO

Quando os dados são agrupados levando em consideração os diferentes doadores, a análise estatística mostra uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) na preservação da glicose em amostras de concentrado de plaquetas mantidas congeladas com DMSO, em comparação com as amostras que não foram tratadas com este solvente (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Resultados da dosagem de glicose de diferentes doadores de forma agrupada



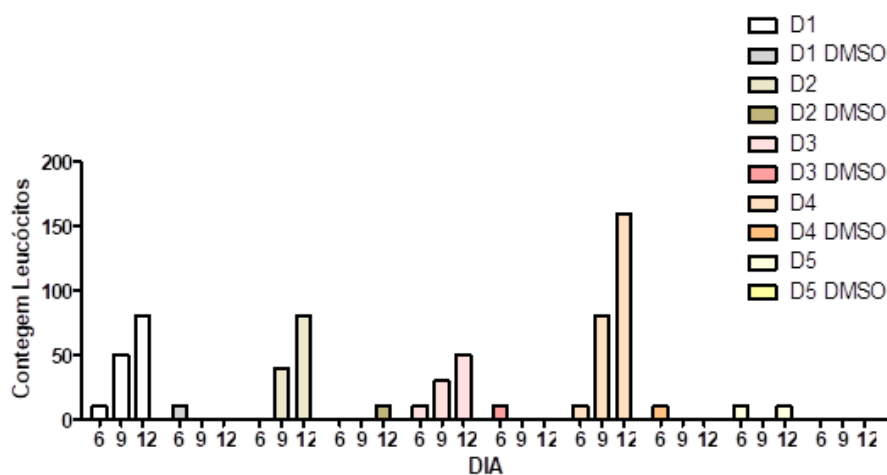
A análise mostra uma diferença estatisticamente significativa na preservação da glicose em amostras de CP mantidas congeladas com DMSO, em comparação com as amostras controle.

5.3 Análise de contagem de leucócitos

A análise dos dados apresentados no Gráfico 8 indica uma tendência geral de aumento na contagem de leucócitos ao longo do tempo para as amostras de concentrado de plaquetas que não foram tratadas com DMSO. Notavelmente, os dados sugerem que o DMSO pode desempenhar um papel crucial na estabilidade ou até mesmo na supressão da contagem de leucócitos, como evidenciado pelo comportamento de quase todas as amostras tratadas com o solvente, que mantiveram uma contagem nula em quase todos os pontos temporais.

Além disso, o congelamento das plaquetas sem a utilização de um conservante parece estar associado a um aumento significativo na contagem dos leucócitos ao longo do tempo, como pode ser observado em 4 das 5 amostras analisadas.

Gráfico 8 - Resultados da contagem de leucócitos em amostras de concentrados de plaquetas e controles com DMSO

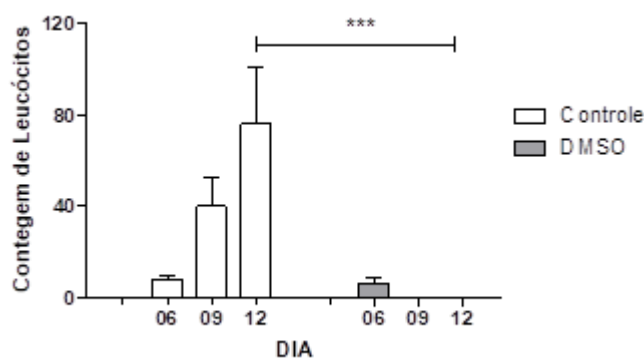


Observa-se uma tendência geral de aumento na contagem de leucócitos ao longo do tempo para as amostras de concentrado de plaquetas que não foram tratadas com DMSO.

Ao agrupar os dados dos diferentes doadores e realizar uma análise estatística dos quantitativos de leucócitos, observa-se que há uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,001$) nas contagens de leucócitos no Dia 12 quando comparamos as amostras de concentrado de plaquetas congeladas com e sem DMSO (Gráfico 9).

As amostras tratadas com DMSO apresentam uma contagem significativamente menor de leucócitos em comparação com seus controles não tratados. Este resultado enfatiza o papel do DMSO na redução da presença de leucócitos ao longo do tempo em amostras congeladas, sugerindo que o DMSO contribui para a inibição da proliferação de leucócitos ou para a sua melhor preservação nas condições de armazenamento utilizadas.

Gráfico 9 - Resultados da contagem de leucócitos de diferentes doadores agrupados



Observa-se que há uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,001$) nas contagens de leucócitos no Dia 12 quando comparamos as amostras de concentrado de plaquetas congeladas com e sem DMSO.

5.4 Análise de cultura e avaliação visual

Quanto às variáveis qualitativas do exame de cultura microbiológica e avaliação visual, não cabem testes estatísticos uma vez que são, na verdade, constantes para os casos em análise.

No exame de cultura microbiológica, todas as amostras pesquisadas tiveram ausência de crescimento bacteriano; significando que sua esterilidade foi preservada, conforme Tabela 1.

No exame visual, todas as amostras sem DMSO tiveram *swirling* positivo. As amostras com DMSO tiveram *swirling* positivo no primeiro dia; no segundo e terceiro dia o aspecto visual mudou para *swirling* positivo com discreta turbidez.

Quadro 2 - Resultados das culturas microbiológicas e avaliação visual dos concentrados de plaquetas

AVALIAÇÃO VISUAL			
DIAS	CULTURA	SWIRLING POSITIVO	SWIRLING POSITIVO + TURBIDEZ
DIA 06	Negativo para todas as amostras	Todas as amostras	Nenhuma amostra
DIA 09	Negativo para todas as amostras	Todas as amostras controles (D1, D2, D3, D4 e D5)	Todas as amostras com DMSO (D1 DMSO, D2 DMSO, D3 DMSO, D4 DMSO e D5 DMSO)
DIA 12	Negativo para todas as amostras	Todas as amostras controles (D1, D2, D3, D4 e D5)	Todas as amostras com DMSO (D1 DMSO, D2 DMSO, D3 DMSO, D4 DMSO e D5 DMSO)

6 DISCUSSÃO

O estudo observou um decréscimo notável na contagem de plaquetas em ambos os grupos, tratados e não tratados com DMSO, ao longo do tempo. Esta tendência de decréscimo é consistente com a literatura sobre a degradação natural das plaquetas durante o armazenamento (ROQUE, 2018). As plaquetas são estruturas extremamente sensíveis, com uma vida útil limitada, o que representa um desafio constante em transfusões e armazenamento de sangue (MCARTHUR *et al*, 2018). Portanto, entender os fatores que influenciam a viabilidade das plaquetas é crucial para otimizar as práticas de armazenamento e transfusão.

A adição de DMSO mostrou algum potencial em estabilizar as contagens de plaquetas, embora os resultados não tenham sido uniformemente consistentes em todas as amostras. O DMSO é conhecido por suas propriedades crioprotetoras (HORNSEY, 2008), sendo comumente usado para preservar células em aplicações de criopreservação (ANGELINE *et al*, 1992). A presença deste composto pode ajudar a manter a integridade das membranas celulares das plaquetas durante o armazenamento, potencialmente retardando os processos de degradação.

No entanto, o impacto variável do DMSO observado neste estudo sugere a presença de fatores adicionais que podem influenciar a eficácia do DMSO como um estabilizador de plaquetas. Estes podem incluir a concentração de DMSO (menores a 20%), as condições de armazenamento (temperaturas inferiores a -20°C), tempo de armazenamento, e as características intrínsecas das amostras de plaquetas. A variação entre as amostras indica a necessidade de uma análise mais aprofundada para determinar as condições ótimas sob as quais o DMSO pode ser mais eficaz.

No que diz respeito à manutenção dos níveis de glicose observou-se que as amostras tratadas com DMSO mantiveram níveis mais estáveis de glicose em comparação com as amostras não tratadas (figuras 4 e 5). É importante ressaltar que a glicose é um nutriente essencial para a manutenção da viabilidade e função das plaquetas (HO-TIN-NOE *et al*, 2018). A depleção de glicose durante o armazenamento é uma preocupação conhecida, pois pode levar à perda da funcionalidade das plaquetas e, conseqüentemente, afetar sua eficácia em aplicações clínicas (LEE, 2018).

A capacidade do DMSO de estabilizar os níveis de glicose nas plaquetas pode ser atribuída a várias de suas propriedades. Primeiramente, o DMSO é

conhecido por sua capacidade de penetrar nas membranas celulares, o que pode facilitar a retenção de glicose dentro das células (ROQUE, 2018). Além disso, o DMSO pode atuar na modulação do metabolismo celular, potencialmente influenciando a forma como as plaquetas consomem e armazenam glicose (HORNSEY, 2008).

Nosso estudo apresentou resultados relevantes no que diz respeito à cultura microbiológica e à avaliação visual das amostras de plaquetas, tanto tratadas quanto não tratadas com DMSO. Todas as amostras mantiveram a esterilidade ao longo do período de estudo, independentemente do tratamento com DMSO. Este achado é crucial, pois a contaminação microbiológica é uma das principais preocupações no armazenamento de componentes sanguíneos, podendo levar a complicações graves em transfusões (VIANA, 2018). Esse é um aspecto importante, especialmente se considerado a potencial implementação do DMSO em práticas clínicas de armazenamento de plaquetas.

Em relação à avaliação visual, as amostras tratadas com DMSO mostraram uma alteração para *swirling* positivo com discreta turbidez. Embora esta mudança visual possa inicialmente suscitar preocupações, é essencial interpretá-la no contexto da função e viabilidade das plaquetas. O fenômeno de *swirling* é frequentemente associado à qualidade e integridade das plaquetas. A presença de *swirling* positivo nas amostras tratadas com DMSO pode, portanto, indicar a manutenção da funcionalidade das plaquetas, apesar da alteração na aparência (SILVA et al, 2019).

No entanto, é importante notar que alterações visuais em preparações de plaquetas podem influenciar a percepção clínica de sua qualidade (ROQUE, 2018). Portanto, é fundamental que qualquer mudança visual induzida pelo DMSO seja profundamente analisada quanto as implicações para a função das plaquetas.

Em conjunto, o estudo sugere que o DMSO não apenas ajuda a preservar a integridade física das plaquetas durante o armazenamento, mas também pode contribuir para a manutenção de um ambiente metabólico adequado. Isso é de grande importância, pois garante que as plaquetas retidas para transfusões mantenham não apenas sua viabilidade física, mas também sua funcionalidade metabólica. Além disso, o estudo demonstra que o DMSO tem potencial para conservar plaquetas, enfatizando a necessidade de explorar outros meios de conservação que possam oferecer benefícios semelhantes com potenciais menos tóxicos.

Este trabalho revela implicações práticas e clínicas significativas para o campo da hemoterapia e da medicina transfusional. O uso do DMSO como um aditivo no armazenamento de concentrados de plaquetas pode representar um avanço importante na preservação da viabilidade e funcionalidade dessas células durante períodos prolongados. Isso é particularmente relevante considerando a vida útil limitada das plaquetas (QUACH, 2018) e a demanda constante por transfusões em diversos contextos clínicos (MESQUITA, 2021).

É crucial compreender os mecanismos exatos pelos quais o DMSO exerce esse efeito estabilizador das plaquetas. Estudos adicionais são necessários para explorar em detalhe essas interações, o que pode incluir investigar a concentração ideal de DMSO e as condições específicas de armazenamento sob as quais esse efeito é maximizado.

Além disso, é importante considerar o equilíbrio entre os benefícios potenciais do DMSO e qualquer possível efeito adverso que possa ter nas plaquetas ou no receptor de uma transfusão. Enquanto o DMSO pode ajudar a manter a viabilidade das plaquetas, seu impacto no funcionamento das plaquetas e na resposta imune do receptor ainda precisa ser completamente elucidado.

7 CONCLUSÃO

Este estudo forneceu informações valiosas sobre o uso de dimetilsulfóxido (DMSO) no armazenamento de concentrados de plaquetas, demonstrando o potencial deste aditivo em estabilizar as contagens de plaquetas e manter os níveis de glicose, enquanto minimiza a contagem de leucócitos.

As análises indicaram que, sob condições específicas de armazenamento, o DMSO pode contribuir significativamente para a preservação da viabilidade e funcionalidade das plaquetas, um aspecto crucial para melhorar a eficácia das transfusões de plaquetas.

A esterilidade das amostras foi mantida, e as alterações visuais observadas não comprometeram a qualidade das plaquetas. Estes resultados enfatizam a importância de continuar explorando aditivos e métodos de armazenamento para otimizar a conservação de hemocomponentes, com um impacto potencialmente significativo na prática transfusional e na gestão de recursos em bancos de sangue.

REFERÊNCIAS

- ANGELINI, A. *et al.* Evaluation of four different methods for platelet freezing. In vitro, and in vivo studies. **Vox Sang**, Itália, 1992. v.62, 146-51 p. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1376948/>. Acesso em: 30 out. 2022.
- ANVISA. **9º Boletim de Produção Hemoterápica do Brasil**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiMWM4MDQzNDMtYjZjZC00ZTBhLWFkOTctODdiZjE2ODQ4YTJkIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWMzZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVIZGQ4MSJ9>. Acesso em: 02 set. 2022.
- BALDUINI, C.L. *et al.* Cryopreservation of human platelets using dimethyl sulfoxide and glycerol-glucose: effects on "in vitro" platelet function. **Haematologica**, Italia, 1993. 101-4 p. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/8349184>. Acesso em: 23 out. 2022.
- BARBOSA, M. H. Risk factors associated with the occurrence of adverse events in plateletpheresis donation. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Uberaba, 2014. v. 36, n. 3, 191-195 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.03.008> . Acesso em: 16 nov. 2022.
- BOSCHER, J. Blood platelet formation at a glance. **Journal of Cell Science**, França, 2020. v. 133, n. 20. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jcs/article/133/20/jcs244731/226385/Blood-platelet-formation-at-a-glance>. Acesso em: 17 nov. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação nº5, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 set. 2017.
- BUORO, S.; MECCA, T.; SEGHEZZI, M. Assessment of blood sample stability for complete blood count using the Sysmex XN-9000 and Mindray BC-6800 analyzers. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Itália, 2016. v38, n. 3, 225-239 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.05.010>. Acesso em: 17 nov. 2023.
- CAMPANA, A. O. Metodologia da investigação científica aplicada à área biomédica – 2. Investigações na área médica. **Jornal de Pneumologia**, São Paulo, 1999. 25 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-35861999000200005> . Acesso em: 17 nov. 2023.
- CASTRO, H. C. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, 2006.321–332 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442006000500004>. Acesso em: 18 nov. 2023.

Ministério da Saúde. **DATASUS**. Tabnet. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/>. Acesso em: 02 set. 2022.

GIRELLO, A. L., KUHN, T. I. B. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. 3 ed. São Paulo: Senac, 2011.

GROZOVSKY, R. Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, Boston, 2015. 1877-1884 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-569129> Acesso em: 22 jan. 2023.

HO-TIN-NOÉ, B.; BOULAFTALI, Y.; CAMERER, E. Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, França, 2018. 277-288 p. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/131/3/277/38337/Platelets-and-vascular-integrity-how-platelets>. Acesso em: 23 jan. 2023.

HORNSEY, V. S. Freezing of buffy coat-derived, leukoreduced platelet concentrates in 6 percent dimethyl sulfoxide. **Transfusion**, Edinburgh, 2008. 2508-2514p. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01884.x>. Acesso em: 23 out. 2022.

KOUPENOVA, M. Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis. **Circulation research**, USA, 2018. 337-351 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5777300/>. Acesso em: 12 out. 2022.

KRAUSE, K. A.; GRAHAM, B. C. Glanzmann Thrombasthenia. **StartPeals**, San Antonio, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538270/>. Acessado em: 22 jan. 2022.

LEE, E.; BAIZ, C.R. How cryoprotectants work: hydrogen-bonding in low-temperature vitrified solutions. **Journal Chemical Science**, USA, 2022. 34. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/sc/d2sc03188d>. Acessado em > 20 nov. 2023.

LEE, A.; POON, M.-C. Inherited platelet functional disorders: General principles and practical aspects of management. **Transfusion and Apheresis Science**, Calgary, 2018. 494–501 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2018.07.010>. Acesso em: 20 jan. 2022.

MCARTHUR, K.; CHAPPAZ, S.; KILE, B. T. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, Austrália, 2018. 605-610 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-742684>. Acesso em: 10 out. 2022.

MESQUITA, B. A. Evolução dos índices de doadores de reposição do banco de sangue São Paulo. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, São Paulo, 2021.

344-345 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.585>. Acesso em: 07 abr. 2023.

SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE (Brasil); MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para uso de hemocomponentes**, DF, Ed 2, 2015.

NOETZLI, L. J.; FRENCH, S. L.; MACHLUS, K. R. New Insights Into the Differentiation of Megakaryocytes From Hematopoietic Progenitors. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Boston, 2019 1288–1300 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/atvbaha.119.312129>. Acesso em: 20 fev. 2023.

OLIVEIRA, Raimundo Antonio Gomes. **Avaliação de métodos automatizados e manuais para contagem de plaquetas em pacientes plaquetopênicos**. 2000. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. Disponível em: doi:10.11606/D.9.2020.tde-10032020-144624. Acesso em: 30 setembro 2023.

PINTO, D. A. O advento do teste de ácido nucléico (nat) no rastreio de doenças infecciosas e as restrições atuais para a doação de sangue no brasil: aspectos laboratoriais e bioéticos. **Revista Multidisciplinar Humanidades e Tecnologia**, Minas Gerais, 2021. Disponível em: http://revistas.icesp.br/index.php/FINOM_Humanidade_Tecnologia/article/view/1639/1202. Acesso em: 20 jan. 2023.

QUACH, M. E.; C., Wenchun; LI, R.. Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, Atlanta, 2018. 1512-1521 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-743229>. Acesso em: 15 dez. 2022.

RONDINA, M. T.; ZIMMERMAN, G. A. The role of platelets in inflammation. In: Platelets. **Academic Press**, Sheffield, 2019. 505-522 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1160/th14-12-1067>. Acesso em: 20 jan. 2023.

ROQUE, Leticia Sarni. **Criopreservação do concentrado de plaquetas com uso de DMSO à 5%**. 2018. Dissertação (Mestrado em Hemoterapia e Medicina Transfusional) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. Disponível em: doi:10.11606/D.17.2018.tde-19072018-140901. Acesso em: 30 setembro 2022.

SCRIDON, A. Platelets and Their Role in Hemostasis and Thrombosis: From Physiology to Pathophysiology and Therapeutic Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, Romania, 2022. 12772 p. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms232112772>. Acesso em: 23 out. 2022.

SILVA, M. R. S. **Hemoterapia Essencial**. 1 ed. Maceió: Ed. EdUneal, 2019.

SOLH, M.; SOLH, T.; BOTSFORD, A. Glanzmann's thrombasthenia: pathogenesis, diagnosis, and current and emerging treatment options. **Journal of Blood Medicine**,

USA, 2015. 219 p. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/jbm.s71319>. Acesso em: 10 set. 2022.

SZALAI, G.; WATSON, D.K. Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. **Journal Cellular and Molecular Life Sciencis**, Charleston, 2016. 2460-2476 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6190-8>. Acesso em: 23 out. 2023.

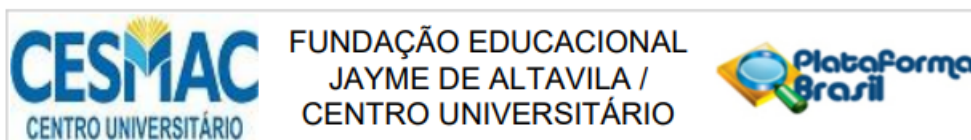
VAN DER MEIJDEN, P. E. J.; HEEMSKERK, J. W. M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. **Nature Reviews Cardiology**, USA, 2018. 166–179 p. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41569-018-0110-0>. Acesso em: 05 dez. 2023.

VERHEIJEN, M.; LIENHARD M. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic in vitro. *Scientific Reports*, EUA, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-40660-0>. Acessado em: 05 dez. 2023.

VIANA, Jacqueline Duarte. **Detecção de contaminação bacteriana em bolsas de plaquetas por método de amplificação molecular**. 2018. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Saúde Internacional) - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: [doi:10.11606/D.99.2018.tde-03052018-092801](https://doi.org/10.11606/D.99.2018.tde-03052018-092801). Acesso em: 30 set. 2023.

XIAOYANG, Y.; *et al.* Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. *FEBS Open Bio*, USA, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5377396/>. Acesso em: 20 set. 2013.

APÊNDICE A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PRESERVAÇÃO DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS COM SOLUÇÕES ADITIVAS

Pesquisador: Axel Helmut Rulf Cofré

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 69106823.2.0000.0039

Instituição Proponente: Centro Universitário Cesmac

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

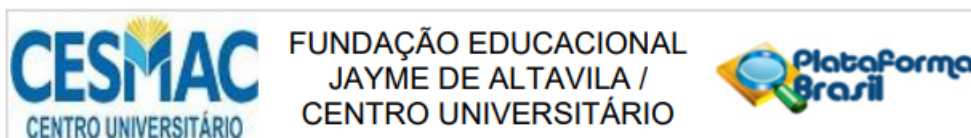
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.191.900

Apresentação do Projeto:

Diante de toda dificuldade na captação de doadores, coleta e manejo do estoque, a validade dos concentrados de plaquetas só dificulta a efetiva cobertura do atendimento das solicitações de transfusão. Visto isso, é de grande importância para os serviços que exista a possibilidade de um tempo de viabilidade maior deste hemocomponente para a garantia da assistência aos pacientes e aproveitamento dos recursos do serviço. As amostras de concentrado de plaquetas serão obtidas do Hemocentro de Alagoas (HEMOAL). Cada bolsa de plaqueta possui um compartimento separado e uma pequena amostra de plaquetas é armazenada. Essa amostra é utilizada para a realização dos testes de viabilidade e não é utilizado para fins transfusionais. Os concentrados de plaquetas que serão utilizados neste estudo são derivados dessa bolsa auxiliar e não compromete o volume de plaquetas usadas nas transfusões. Serão obtidas 05 amostras de concentrados de plaquetas por aférese remanescentes de controle de qualidade realizado no setor de fracionamento do HEMOAL. As amostras serão transportadas do Hemoal em caixa térmica para o Laboratório de Inovação Farmacológica da Universidade Federal de Alagoas em caixa térmica para a realização da adição de DMSO nas amostras. As amostras serão divididas em dois grupos: Tratamento e Controle. alíquotadas em 3 partes iguais. Seguindo a seguinte metodologia de análise:1) Alíquota A: Será analisada no dia da coleta (Dia 0) sem a adição do DMSO;2) Alíquota B: Será criopreservada sem a adição do DMSO e será analisada no Dia 05;3) Alíquota C: Será criopreservada com a adição do DMSO e será analisada no Dia 05;4) Alíquota D: Será criopreservada sem a adição do DMSO e

Endereço: Rua Cônego Machado nº 984, Campus I, Ed. Eduardo Almeida
Bairro: Farol **CEP:** 57.051-160
UF: AL **Município:** MACEIO
Telefone: (82)3215-5062 **Fax:** (82)3215-5262 **E-mail:** coepe.cesmac@cesmac.edu.br



Continuação do Parecer: 6.191.900

O cronograma previsto para a pesquisa será executado caso o projeto seja APROVADO pelo Sistema CEP/CONEP, conforme Carta Circular nº. 061/2012/CONEP/CNS/GB/MS (Brasília-DF, 04 de maio de 2012).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2021836.pdf	06/07/2023 14:02:11		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Plaquetas_V2.docx	06/07/2023 14:01:54	Axel Helmut Rulf Cofré	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_PLAQUETAS_2.doc	06/07/2023 14:01:27	Axel Helmut Rulf Cofré	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Vanessa_CEP.docx	30/05/2023 15:24:39	Axel Helmut Rulf Cofré	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_LAIF.pdf	16/03/2023 16:53:53	Axel	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	16/03/2023 16:52:32	Axel	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CESMAC_AUTORIZACAO_PLAQUETAS.pdf	15/03/2023 13:57:20	Axel	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Cônego Machado nº 984, Campus I, Ed. Eduardo Almeida
Bairro: Farol **CEP:** 57.051-160
UF: AL **Município:** MACEIO
Telefone: (82)3215-5062 **Fax:** (82)3215-5262 **E-mail:** coepe.cesmac@cesmac.edu.br