

CARLOS EDUARDO SANDRINI DE CASTRO

**CONTROLE DE QUALIDADE DE PLAQUETAS EM
DOADORES DE SANGUE DO SERVIÇO DE
HEMOTERAPIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para a
conclusão no Curso de Graduação em
Medicina.**

FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA

1999

CARLOS EDUARDO SANDRINI DE CASTRO

**CONTROLE DE QUALIDADE DE PLAQUETAS EM
DOADORES DE SANGUE DO SERVIÇO DE
HEMOTERAPIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, para a
conclusão no Curso de Graduação em
Medicina.**

Coordenador do Curso: Prof. Dr. Edson José Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Jovino dos Santos Ferreira

**Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Terezinha de Jesus Carvalho Neiva
Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Paes Cavalcanti Ferreira**

FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA

1999

Castro, Carlos Eduardo Sandrini de

Controle de qualidade de plaquetas em doadores de sangue do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário. / Carlos Eduardo Sandrini de Castro - Florianópolis, 1999.

50p.

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, para conclusão do Curso de Graduação em Medicina. - Universidade Federal de Santa Catarina.

Título em Inglês: Platelets quality control of donors from blood bank of the University Hospital.

1. Bancos de Sangue 2. Plaquetas 3. Controle de Qualidade 4. Doadores de Sangue

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. JOVINO DOS SANTOS FERREIRA e à Prof^ª. Dr^ª. VERA LÚCIA PAES CAVALCANTI FERREIRA pela oportunidade, confiança e orientação durante a preparação deste trabalho.

À Prof^ª. Dr^ª. TEREZINHA DE JESUS CARVALHO NEIVA pelo apoio e orientação.

À meus pais, JOSÉ CARLOS DE CASTRO e MARIA LENITA SANDRINI DE CASTRO, meus primeiros professores, pelo exemplo e confiança durante todos estes anos.

À minha namorada, JANAÍNA CHAVES SCHATZ, pelo apoio e incentivo nestes últimos meses, fundamentais para a conclusão deste.

Aos DOADORES de sangue do Serviço de Hemoterapia do HU, que voluntariamente participaram deste trabalho, sem os quais este não poderia ser realizado.

Aos FUNCIONÁRIOS do Serviço de Hemoterapia do HU, sempre dispostos a esclarecer dúvidas, pelo auxílio neste trabalho.

Aos colegas da turma de Medicina 94.2, DANIEL, ÉVERSON, GABRIEL, GUILHERME, LUIZ, MÁRCIO, RAFAEL, RODRIGO e YGOR pela amizade, companheirismo e apoio nas horas mais difíceis, constituindo nestes anos que passamos juntos uma segunda família para mim.

Muito Obrigado.

ABREVIACÕES

ADN - Adrenalina

ADP - Adenosina-5-difosfato

CP - Concentrado(s) de Plaquetas

DP - Desvio Padrão

GP - Glicoproteína

h - horas

HU - Hospital Universitário

l - Litros

ml - Mililitros

mm - milímetros

pO₂ - Pressão de Oxigênio

pCO₂ - Pressão de Dióxido de Carbono

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

PPP - Plasma Pobre em Plaquetas

UCP - Unidades de Concentrado de Plaquetas

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1. ESTRUTURA PLAQUETÁRIA.....	04
2.2. FISILOGIA PLAQUETÁRIA.....	07
2.3. CONCENTRADO DE PLAQUETAS E ESTUDOS DA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA.....	10
3. OBJETIVO.....	13
4. MÉTODO.....	14
4.1. AMOSTRA.....	14
4.2. MATERIAIS.....	15
4.3. PROCEDIMENTOS.....	15
4.4. ESTATÍSTICA.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1. PRÉ-FRACIONAMENTO.....	19
5.2. CONCENTRADO DE PLAQUETAS.....	23
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÕES.....	35
8. REFERÊNCIAS.....	36
NORMAS ADOTADAS.....	40
RESUMO.....	41
SUMMARY.....	42
APÊNDICE.....	43
ANEXO 1.....	44
ANEXO 2.....	47

1. INTRODUÇÃO

A utilização de hemoderivados constitui-se atualmente uma modalidade terapêutica de fundamental importância no exercício da medicina atual. Podemos ter idéia de sua importância quando consideramos que, nos Estados Unidos, cerca de 22 milhões de diferentes hemoderivados são transfundidos por ano, sendo que deste total, cerca de 7 milhões são referentes a bolsas de concentrados de plaquetas ¹.

Os hemoderivados são obtidos a partir de doações de sangue voluntárias, coletadas e processadas em Serviços de Hemoterapia, distribuídos por todo o mundo, de forma padronizada com a metodologia mundialmente aceita. A partir do sangue humano, chegam-se aos hemocomponentes utilizados na hemoterapia moderna, que basicamente inclui o concentrado de hemácias, plasma, crioprecipitado e o concentrado de plaquetas ^{2,3}.

Atualmente, a produção e o controle de qualidade dos hemoderivados obtidos nos Serviços de Hemoterapia do Brasil obedecem as recomendações do Ministério da Saúde, descritas nas portarias nº 1.376 de 19/11/1993 e nº 121 de 24/11/1995, que preconizam a realização de uma triagem prévia (com um questionário padrão básico), testes sorológicos e determinação do padrão hematológico dos doadores, permitindo assim avaliar o estado de saúde destes, diminuindo em muito os riscos e as complicações relacionadas a hemotransfusões. No Anexo 1 observamos trechos destas portarias referentes à produção e armazenamento dos concentrados de plaquetas.

O processo de seleção dos doadores de sangue do Hospital Universitário (HU) inicia-se assim que o voluntário procura o Serviço de Hemoterapia e

manifesta o desejo de doar sangue. A partir daí, é submetido a um questionário padrão (Apêndice), que visa basicamente detectar fatores de risco para doenças sexualmente transmissíveis, bem como condições clínicas que possam alterar a viabilidade do sangue doado, garantindo assim, um doador potencialmente sadio, livre de enfermidades, uso de drogas ou medicamentos. Assim, as condições clínicas e o nível de hemoglobina são fatores determinantes para a aceitação do doador, e os testes sorológicos realizados visam detectar as doenças classicamente envolvidas na transmissão por hemotransfusões, que incluem sífilis, hepatites, doença de chagas bem como as imunodeficiências adquiridas relacionadas aos vírus HIV-1 e 2, e HTLV-I e II.

Dentre os diversos hemocomponentes que podem ser produzidos a partir do sangue coletado, temos as bolsas contendo plasma rico em plaquetas, ou concentrado de plaquetas, que constituem um hemoderivado de grande importância clínica, principalmente se considerarmos os distúrbios hemorrágicos trombocitopênicos, onde o seu uso pode ser o fator que irá determinar a vida ou a morte do paciente ^{4,5}.

Quando consideramos os concentrados de plaquetas (CP), há vários fatores que devem ser observados para que tenhamos um padrão de qualidade aceitável. Isto vai desde doadores com plaquetas viáveis para a preparação das bolsas dos concentrados, ou seja, com plaquetas em número e função dentro dos limites da normalidade, até a observação de vários parâmetros para seu armazenamento, que incluem temperatura ambiente, volume das bolsas, pH e avaliação quantitativa de plaquetas ⁶.

A viabilidade funcional dos CP dependem de vários fatores. Previamente ao seu preparo, sofrem influência direta de distúrbios da função plaquetária, sejam estes congênitos ou adquiridos, quando, por exemplo, do uso de medicamentos e bebidas alcoólicas por parte do doador. Já após a doação, a

viabilidade funcional é determinada basicamente por um correto processamento e armazenamento das bolsas ^{7,8}.

Estudos realizados utilizando-se CP demonstram que essas células perdem sua viabilidade muito rapidamente durante seu armazenamento, o que implica na necessidade de uma renovação constante nos seu estoque ⁸.

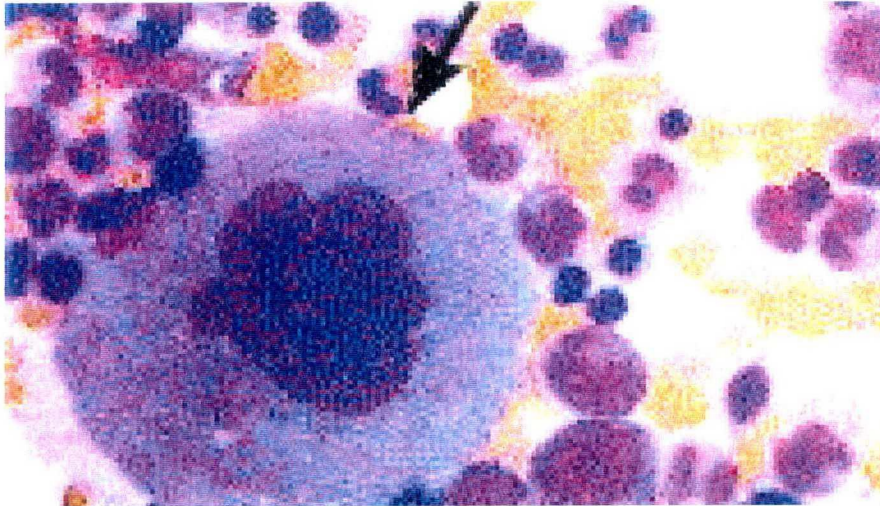
Os Serviços de Hemoterapia do Brasil ainda não realizam estudos rotineiros que permitam avaliar a função plaquetária no estágio inicial da doação, nem estudos funcionais de amostras dos concentrados de plaquetas durante o seu período de armazenamento. Apesar dessa avaliação não constituir uma obrigatoriedade legal, sabe-se que o monitoramento das plaquetas é fundamental para viabilidade e eficácia terapêutica destes hemocomponentes. Os estudos de agregação plaquetária constituem hoje o método de escolha para a avaliação da função dessas células.

Assim, nosso projeto nasceu da necessidade de uma avaliação interna do Serviço de Hemoterapia do HU, como forma de monitorar a qualidade dos CP utilizados nesta instituição.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRUTURA PLAQUETÁRIA

As plaquetas são classicamente descritas como fragmentos citoplasmáticos dos megacariócitos confinados a medula óssea e tem sua produção reguladas por citoquinas específicas e a trombocitopoetina (Figura 1).



2 a 4 μ , forma discóide, superfície lisa, com vida média no sangue entre 7 e 10 dias (Figura 2) ^{7,9}.

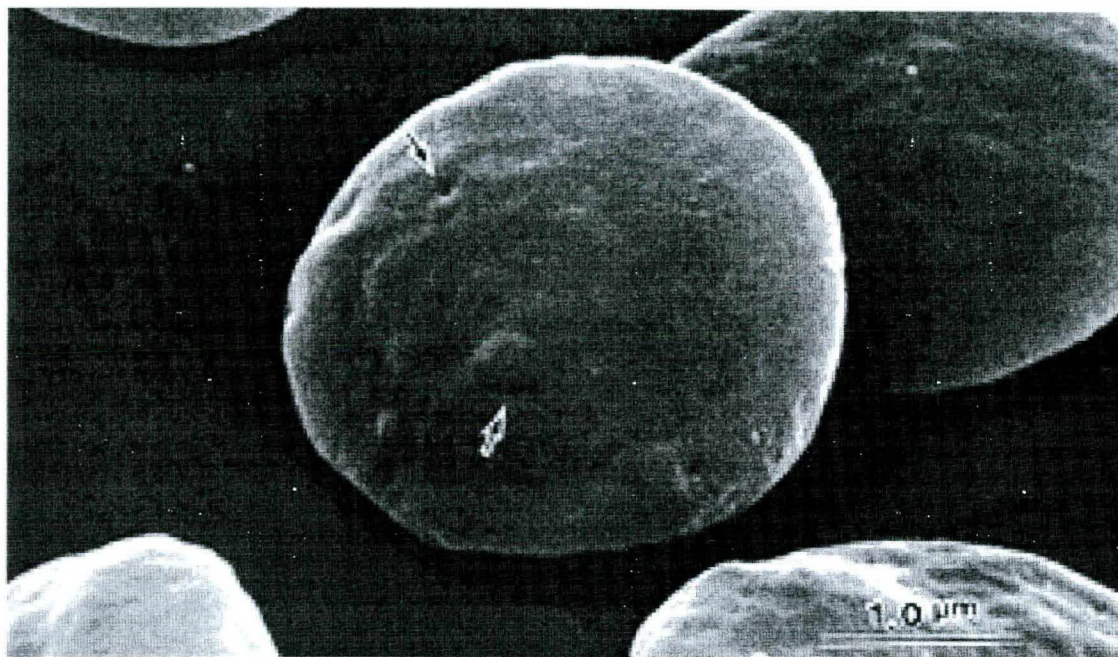


Figura 2 - Microfotografia eletrônica demonstrando uma plaqueta, não-ativada, na forma como circula no sangue periférico. As setas indicam o Sistema Canalicular Aberto. (Fonte: <http://www.rinshoken.or.jp/org/CR/photo-e.htm>)

A concentração de plaquetas no sangue periférico varia entre 150-400 x 10⁹/l. A alteração numérica de plaquetas para menos de 150 x 10⁹/l é dita trombocitopenia e para mais de 400 x 10⁹/l, trombocitose. Ambas as condições clínicas estão relacionadas com diversas doenças ⁹.

Uma quantidade normal de plaquetas no sangue já é atingida desde o nascimento, seja em recém nascidos a termo ou pré-termo, e esta chega a elevar-se em quase 50% na primeira semana pós-parto. Atualmente, vários trabalhos têm demonstrado que as plaquetas de recém nascidos saudáveis apresentam um padrão variado de reatividade quando os comparamos a indivíduos adultos normais ^{10, 11}.

Para estudar a fisiologia plaquetária, faz-se necessário conhecer sua estrutura. Didaticamente, reconhece-se numa plaqueta 4 zonas estruturalmente distintas: a zona periférica, zona sol-gel, zona das organelas e o sistema canalicular ^{12, 13}.

A zona periférica, além de responsável pela integridade celular, é onde se encontram os receptores celulares que controlam a função plaquetária. É nesta zona que encontra-se a membrana celular propriamente dita, formada por uma dupla camada de fosfolipídeos, com proteínas e glicoproteínas intercaladas em sua estrutura. Os fosfolipídeos, predominantemente com carga negativa, capazes de acelerar várias etapas da coagulação sangüínea, dispõem-se quase que exclusivamente na face interna da membrana plasmática plaquetária. Os fosfolipídeos de carga neutra encontram-se preferencialmente na face externa da membrana celular. As glicoproteínas, fundamentais para adesão e agregação plaquetária, desempenham a função de receptores da membrana plasmática das plaquetas. As principais glicoproteínas são listadas no Quadro I ¹³.

QUADRO I – Principais glicoproteínas de membrana Plaquetária e suas respectivas funções.

Glicoproteína	Função
GP Ib/IX	Receptor para o Fator de von Willebrand, sítio de ligação para trombina
GP Ia/IIa	Receptor para o colágeno
GP IIb/IIIa	Receptor para o fibrinogênio , ADP e sítio de ligação para fibronectina.
GP IV	Sítio de ligação para trombina

Fonte: CRAWFORD, N et al. 1994¹⁴.

É na zona de sol-gel que se encontram os microtúbulos, microfilamentos e proteínas, como a actina e miosina, envolvidas na mudança de forma, contração e secreção de substâncias, em resposta à ativação celular ¹².

Na zona das organelas é onde se encontram os elementos celulares existentes nas plaquetas, oriundos da célula progenitora, o megacariócito. Nesta zona encontram-se os grânulos, lisossomos, mitocôndrias, glicogênio e peroxissomos. Os grânulos contém substâncias envolvidas na hemostasia tais como: fator de von Willebrand, trombospondina, fibronectina, fator V da coagulação, cininogênio de alto peso molecular ADP, cálcio, fibrinogênio e albumina. Os lisossomos são sítios de armazenamento de enzimas como as fosfatases, catepsina e β -galactosidase ^{12, 15}.

O sistema canalicular é composto pelo sistema canalicular aberto e sistema tubular denso. O primeiro origina-se de invaginações da membrana plasmática que aumentam a superfície celular e facilitam a saída de produtos durante a fase secretória das plaquetas. Já o sistema tubular denso é tido como um remanescente do retículo endoplasmático liso dos megacariócitos, sendo este grande sítio de depósito intracelular de cálcio e de síntese de prostaglandinas e tromboxano ^{12, 13}.

2.2 FISILOGIA PLAQUETÁRIA

Didaticamente, divide-se a participação plaquetária na hemostasia em fases distintas, porém, sabe-se que elas ocorrem simultaneamente. A primeira resposta plaquetária ao trauma vascular é a adesão plaquetária, que se dá pela interação das plaquetas com o colágeno exposto pela lesão na parede do vaso.

Mediante este estímulo, as plaquetas ativadas mudam de forma, passando de discóide para uma estrutura disforme com vários pseudópodos, além de secretar vários mediadores químicos contidos em seus grânulos. A seguir, temos a agregação plaquetária, que é o processo através do qual as plaquetas interagem entre si, levando a formação de um tampão hemostático que é o mecanismo inicial de hemostasia. A agregação tem início com a formação de um complexo entre um receptor e seu agonista, que leva a ativação de um dos 3 mecanismos básicos de estimulação plaquetária: metabolismo do ácido araquidônico, liberação de ADP endógeno e síntese de fator ativador de plaquetas (PAF-acether) ^{7, 16}.

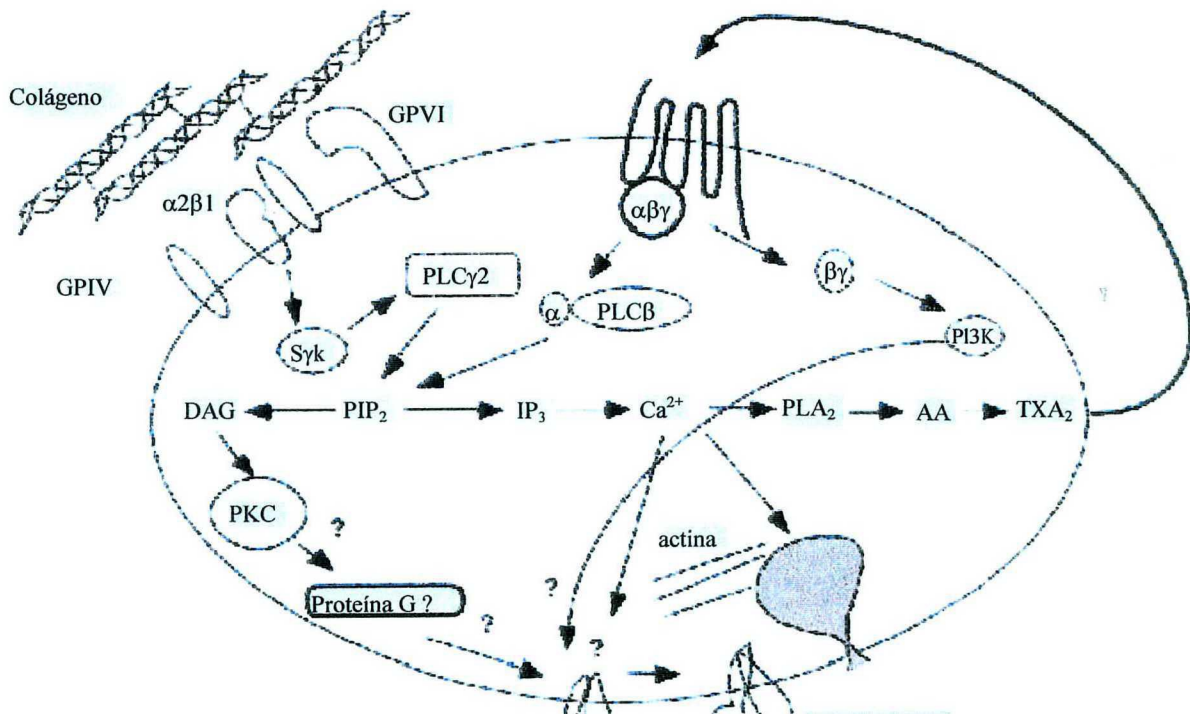
Como substâncias capazes de promover estimulação plaquetária, temos as exógenas como o colágeno, a adrenalina e a trombina e as endógenas, secretadas pelas próprias plaquetas, como o tromboxano A₂ e o ADP, que promovem um mecanismo de feedback positivo, permitindo o recrutamento de um número maior de plaquetas na área de formação do trombo hemostático. Estas substâncias, independentes de serem exógenas ou endógenas, atuam sobre a membrana celular estimulando receptores específicos, que irão desencadear a resposta esperada, a hemostasia ^{7, 17}.

A ativação plaquetária dá-se por alterações em sua morfologia, com alterações a nível de proteínas tubulares que culminam com a mudança de forma das plaquetas, alterações bioquímicas intra-plaquetárias, expressão de receptores de membrana e re-orientação dos fosfolípídeos de membrana¹⁷.

A reação de secreção de substâncias fisiologicamente ativas pelas plaquetas se inicia após a adesão plaquetária e se caracteriza pela liberação do conteúdo dos grânulos intra-plaquetários no meio extra-celular. Esta liberação se dá principalmente através da fusão da membrana dos grânulos com o sistema canalicular aberto que leva a extrusão do conteúdo deste nos canálculos. Este

processo é dependente de cálcio e energia e é diretamente proporcional a potência do estímulo conferido a plaqueta, pois sabe-se que diferentes grânulos necessitam de estímulos diferentes para liberarem seus conteúdos ¹⁵.

Para mediar a atividade plaquetária, além da ativação de segundos mensageiros intra-plaquetários, dos quais o mais importante é a adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que promovem reações que cursam com o bloqueio da ação de agonistas e inibição da ativação plaquetária, há a influência de substâncias exógenas que influenciam inibindo a atividade plaquetária. A fisiologia plaquetária é resumida na figura 3 ^{7, 12}.



2.3 CONCENTRADO DE PLAQUETAS E ESTUDOS DA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA

O grande impulso para o desenvolvimento da hematologia moderna, foram a I e II guerra mundial, sendo que o primeiro banco de sangue montado em Leningrado, em 1932. Com a evolução e o aprimoramento de novas técnicas de armazenamento e processamento do sangue, desenvolveu-se o fracionamento deste, levando a obtenção do plasma rico em plaquetas (concentrado de plaquetas). Este hemoderivado foi impulsionado por estudos do Instituto Nacional do Câncer, dos Estados Unidos, durante os anos 60, sendo que popularizou-se a partir de trabalhos de Gardner e Murphy demonstrando que as plaquetas armazenadas em temperatura ambiente permaneciam viáveis por alguns dias ¹⁸.

As plaquetas podem ser obtidas por doação basicamente de duas formas: por centrifugação do sangue coletado, também chamada “*random-donor*” e a aférese, também chamada “*single donor*” ¹⁹.

Pela técnica de centrifugação, uma unidade de CP é resultado da centrifugação de uma unidade de sangue total, coletado de um único doador, e deve possuir, de acordo com a literatura, 50 ml de plasma com uma concentração mínima de plaquetas em torno de $5,5 \times 10^{10}$ por unidades. A principal vantagem desta técnica é que a mesma não utiliza equipamentos especiais, podendo ser realizada em centrifugas simples, o que dispensa máquinas especiais. A desvantagem clássica é a necessidade de se administrar em um único receptor (paciente) plaquetas de doadores diferentes para que se consiga o efeito terapêutico desejado, que poderia ser obtido com uma única unidade de CP produzido por plaquetaférese ^{1, 3, 19}.

Na técnica de aférese, a plaquetaferese é realizada por um equipamento específico para tal uso, através do qual 4 a 5 l de sangue do doador são processados para que se obtenha os CP. A principal vantagem deste método é a obtenção de CP contendo cerca de 3×10^{11} plaquetas em 200 ml de plasma, o que equivale a aproximadamente seis CP obtidos por centrifugação, com função plaquetária “in vitro” e “in vivo” equivalentes aos outros métodos. Esta técnica nos permite expor o receptor do CP a um número menor de doadores, podendo ser um único doador o que justifica o nome dado a técnica de “*single donor*”, diminuindo significativamente as reações transfusionais, com a mesma efetividade de CP obtidos por centrifugação²⁰.

Independente da técnica utilizada, durante o processo de preparação, há uma tendência das plaquetas perderem sua forma discóide, reduzindo o seu ciclo vital. Por isso, cuidados especiais devem ser tomados no seu fracionamento e armazenamento para garantir maior viabilidade e qualidade. Assim, as bolsas de concentrados de plaquetas devem ser armazenados a uma temperatura que varie no máximo entre 22 °C a 24 °C, em regime de lenta agitação, permanente, até o seu uso, por um período máximo de 5 dias^{2, 21}.

As plaquetas armazenadas, mesmo sobre temperatura controlada e agitação constante, passam por diversas reações bioquímicas e alterações em suas propriedades de membrana, que culminam com uma deterioração progressiva na sua função. Estas alterações sofridas pelas plaquetas durante o seu armazenamento podem ser monitoradas através de testes laboratoriais utilizados para controle de qualidade nos serviços de hemoterapia. Dentre os principais parâmetros utilizados temos a plaquetometria e medida de pH, pois estudos têm demonstrado que as alterações nestes dois parâmetros são fundamentais para avaliar a viabilidade plaquetária^{22, 23, 24}.

Para a finalidade de estudos sobre a função plaquetária, um dos testes classicamente utilizado é a mensuração da agregação plaquetária utilizando-se agregômetro, baseado na transmissão da luz através de plasma com plaquetas, estimulado por um agonista específico. O estudo da agregação plaquetária por esta técnica é utilizada de rotina em diversos estudos e bem aceita, apesar de suas limitações técnicas²².

Atualmente, existem vários outros testes que podem ser utilizados, dependendo da capacidade técnica e do material disponível para cada estudo. Um destes testes é a medição de substâncias secretadas pelas plaquetas, que é uma boa forma de se acessar a ativação plaquetária, uma vez que, de maneira geral, quanto mais estimulada uma plaqueta maior é a liberação de substâncias de seu interior^{22, 25}.

3. OBJETIVOS

Avaliar a função plaquetária de doadores de sangue do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário (UFSC).

Detectar a viabilidade funcional plaquetária dos concentrados de plaquetas produzidos no Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário (UFSC).

4. MÉTODO

No presente trabalho, desenvolvido junto ao Serviço de Hemoterapia do HU e Laboratório da Disciplina de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas, analisamos descritivamente, de forma prospectiva e transversal 120 amostras de sangue de doadores (pré-fracionamento) e das respectivas bolsas de CP.

4.1.AMOSTRA

Estudamos 120 indivíduos adultos de ambos os sexos que, após terem manifestado seu desejo de doar sangue, foram submetidos à triagem clínica e exames laboratoriais padrão de aprovação de doadores do serviço de hemoterapia do HU (Apêndice). Uma vez liberados para doação, os doadores eram selecionados aleatoriamente e informados da existência deste estudo e de sua importância, e sob seu consentimento, eram coletados 10 ml de sangue (pré-fracionamento), através de punção venosa, anticoagulado com citrato de sódio bicitratado numa concentração final de 0,38%.

Para os estudos de concentrado de plaquetas (CP), foram utilizadas no total 120 bolsas de CP do serviço de hemoterapia do HU. As bolsas eram preparadas a partir do sangue total de doadores previamente aprovados no processo de seleção, que incluía o questionário padrão (Apêndice) e os testes sorológicos, sendo 30 delas avaliadas logo após o seu preparo (Tempo 0), 30

após 24 h de armazenamento, 30 após 48h de armazenamento e 30 após 72 h de armazenamento.

4.2. MATERIAIS

4.2.1. Reagentes

ADP: Sigma;

ADN: Chrono-log;

Colágeno: Chrono-log;

Citrato de sódio dihidratado-3,8%: Merck

4.2.1 Equipamentos:

- Agregômetro , marca Net-Lab.
- Centrifugas, marca FANEM.
- Potenciômetro, marca CIBAS.
- Microscópio óptico, marca Studart.
- Câmara de Neubauer espelhada, marca FANEM.

4.3. PROCEDIMENTOS

A amostra dos doadores (pré-fracionamento) foi obtida junto ao Serviço de Hemoterapia do HU, simultaneamente a coleta, seguindo-se da rotina de

processamento para obtenção de plaquetas e demais hemoderivados, testes sorológicos e imuno-hematológicos, com liberação progressiva dos soronegativos e obtenção de amostras das bolsas de CP.

Os testes laboratoriais, específicos para nosso estudo foram: contagem de plaquetas, testes de agregação plaquetária, volume das bolsas e monitoração do pH, sendo realizados no Laboratório da Disciplina de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas.

4.3.1. Estudos pré-fracionamento

A partir de 10 ml de sangue coletado dos 120 voluntários, foram analisados a contagem plaquetária, de acordo com o método descrito classicamente por Brecher, G; Threatte, GA; Adrados, C et al.²⁶ e a agregação plaquetária de acordo com os métodos descritos por Born, G e Cross, MJ²⁷.

A concentração de plaquetas foi determinada de acordo com o método de Brecher, G et al.²⁶. Alíquotas de sangue foram diluídas em oxalato de amônio a 1 %, na proporção de 1 de sangue para 19 de oxalato. Após o preenchimento da câmara de Neubauer o material foi submetido a análise através de contagem em microscópio óptico.

As plaquetas foram isoladas por centrifugação do sangue total a 180 x g durante 6 min, à temperatura ambiente, para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) e por centrifugação a 900 x g para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). A partir do PRP e PPP foram realizados os testes de agregação plaquetária, descritos a seguir. A concentração de plaquetas no PRP foi posteriormente reajustada para 3×10^5 plaquetas/mm³ com solução fisiológica.

4.3.2. Estudos em Concentrados de Plaquetas

O estudo foi realizado em 120 bolsas de unidades de CP randomizadas nas seguintes condições: 30 bolsas de unidades de CP foram estudadas logo após sua preparação (tempo 0), 30 bolsas de unidades de CP 24 h após seu armazenamento, 30 bolsas de unidades de CP 48 h após seu armazenamento e 30 bolsas de unidades de CP 72 h após o seu armazenamento. Foram analisados o volume das bolsas, a concentração de plaquetas por bolsa, a função plaquetária e o pH.

A separação das plaquetas do sangue total iniciava-se com a centrifugação do sangue a 1800 x g, durante 8 min, à temperatura de 22 °C para obtenção do PRP. O PRP obtido era armazenado em uma segunda bolsa, separado aí das hemácias, e novamente centrifugado a 2400 x g, durante 8 min, à temperatura de 22 °C. Após esta última centrifugação separava-se o plasma sobrenadante (PPP) e o residual contendo plaquetas era ressuspenso em um volume de 50 ml do respectivo plasma. A bolsa contendo o concentrado de plaquetas (CP) era mantida em repouso por 1 h e posteriormente colocado em um agitador onde era armazenada e permanecia sob agitação constante até seu uso, sendo viável por até 5 dias. Ressalta-se aqui que o CP só é considerado como tal após 1h de repouso pós-centrifugação.

O volume das bolsas de concentrados de plaquetas foi estimado utilizando-se uma proveta laboratorial, própria para a medição, com escala lateral em ml.

A concentração de plaquetas foi determinada de acordo com o método de Brecher, G et al.²⁶. Alíquotas de PRP foram diluídas em oxalato de amônio a 1 %, na proporção de 1 de PRP para 19 de oxalato. Após o preenchimento da

câmara de Neubauer o material foi submetido a análise através de contagem em microscópio óptico.

Os estudos de agregação, foram realizados segundo o método descrito por Born, G e Cross, MJ²⁷ utilizando-se o agregômetro modelo Net-Lab. Os agentes indutores e suas respectivas concentrações finais foram : ADP 6,0 μM , ADN 6,0 μM e colágeno 2,0 $\mu\text{g/ml}$. Para cada teste foram utilizados 450 μl de PRP e a quantificação da agregação foi expressa em % de agregação após 5 min de estimulação (Anexo 2). Esse procedimento foi utilizado tanto para a triagem dos doadores, quanto para as amostras de bolsas de plaquetas, sendo que a concentração de plaquetas foi mantido constante em $3 \times 10^5/\text{mm}^3$.

A monitorização do pH foi feita a partir de amostras de 2 ml de plasma de CP utilizando-se um potenciômetro, em nosso trabalho modelo Cibas.

4.4. ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente de acordo com os testes de Mann-Whitney para dados não-paramétricos e análise de variância (ANOVA) para os valores obtidos. Adotamos como diferença significativa valores de $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

5. RESULTADOS

5.1. PRÉ-FRACIONAMENTO

Entre o 2º semestre de 1998 e o 1º semestre de 1999, foram estudados 120 doadores. Os resultados estão apresentados sob a forma de tabelas, gráficos e figuras.

5.1.1. Avaliação Quantitativa das plaquetas dos doadores do Serviço de Hemoterapia do HU

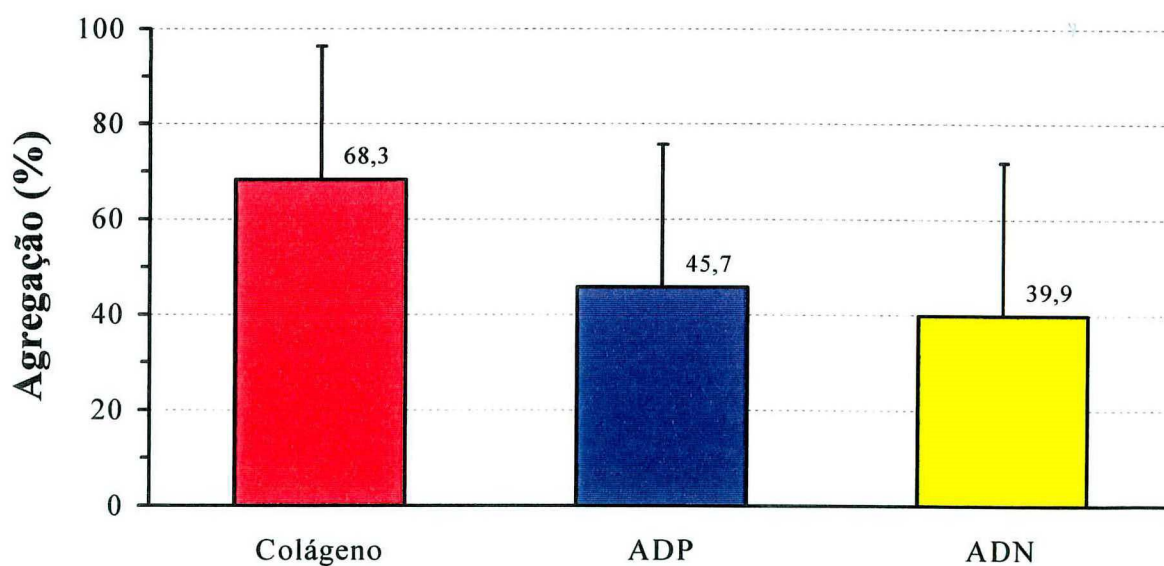
TABELA I – Quantificação de plaquetas pré-fracionamento no sangue dos doadores, expresso por mm^3 . (n=120)

Plaquetas	Média	DP
Quantificação	$1,76 \times 10^5$	$0,43 \times 10^5$

5.1.2. Avaliação funcional plaquetária dos doadores do Serviço de Hemoterapia do HU.

A avaliação funcional das plaquetas pré-fracionamento foi realizada em agregômetro, sob condições ideais, utilizando-se os reagentes Colágeno, Adenosina-5-difosfato (ADP) e Adrenalina (ADN). A média de agregação encontrada nos 120 doadores encontra-se representada no Gráfico I.

GRÁFICO I – Avaliação funcional das plaquetas, pré-fracionamento, utilizando os reagentes Colágeno, ADP e ADN, expresso em porcentagem de agregação (%). (n=120)



5.1.3. Distribuição dos doadores do Serviço de Hemoterapia, segundo a função plaquetária.

Nas Figuras 4, 5 e 6 distribuimos os 120 doadores em duas classes distintas para cada reagente. Os “normoagregantes”, compreendem os doadores cuja agregação plaquetária encontrava-se dentro dos limites da normalidade para aquele reagente, e a segunda classe, “hipoagregantes”, os doadores cuja agregação encontrava-se abaixo do esperado para aquele reagente.

FIGURA 4 – Distribuição dos doadores utilizando-se o Colágeno como reagente. (n=120)

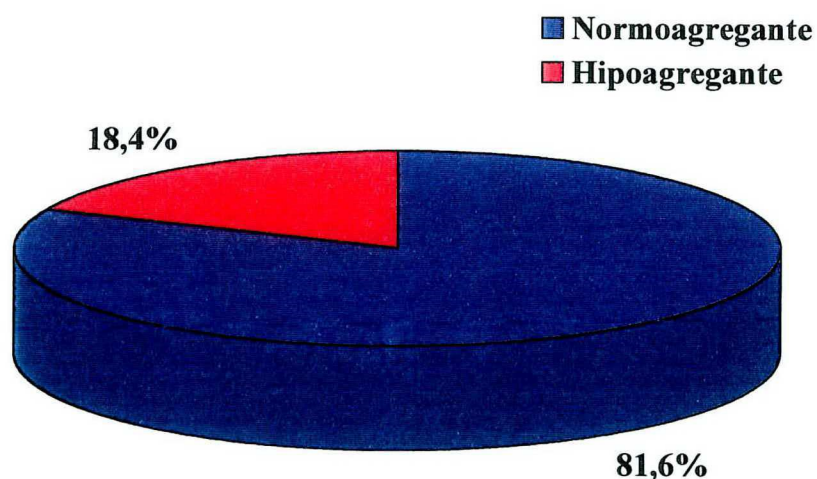


FIGURA 5 – Distribuição dos doadores utilizando-se o ADP como reagente.
(n=120)

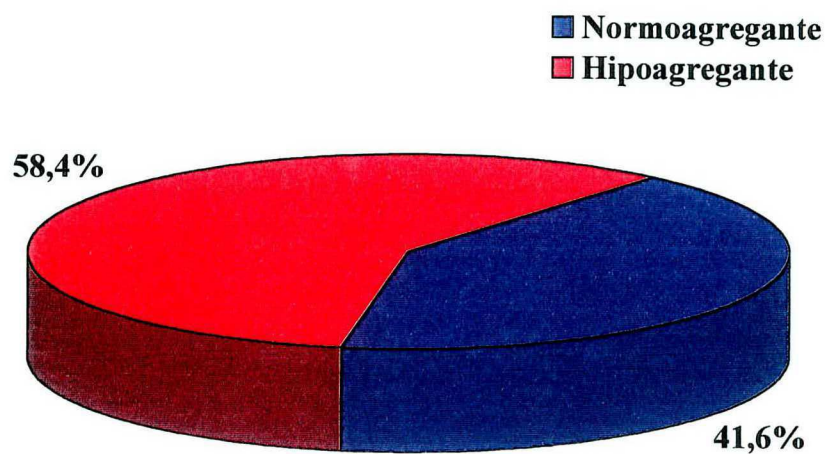
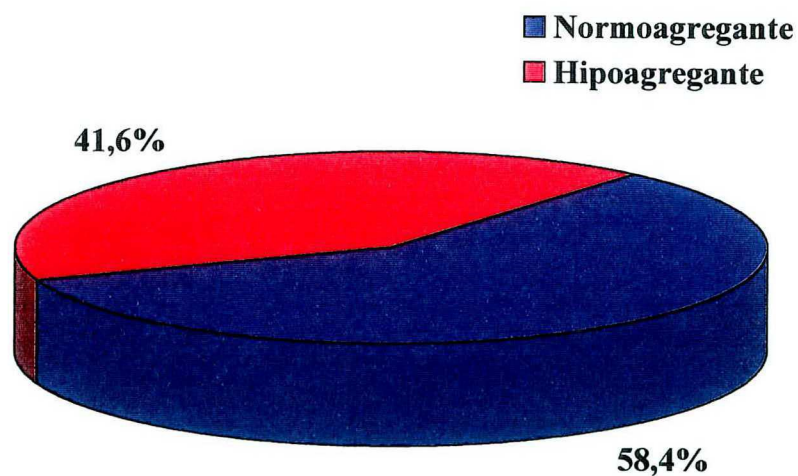


FIGURA 6 – Distribuição dos doadores utilizando-se a Adrenalina como reagente. (n=120)



5.2. CONCENTRADO DE PLAQUETAS

Nesta segunda fase de nosso estudo, são apresentados os resultados obtidos com os estudos realizados sobre as 120 bolsas de concentrados de plaquetas (CP), que incluem o volume das bolsas, pH das bolsas e testes de agregação plaquetária realizados nos tempos específicos.

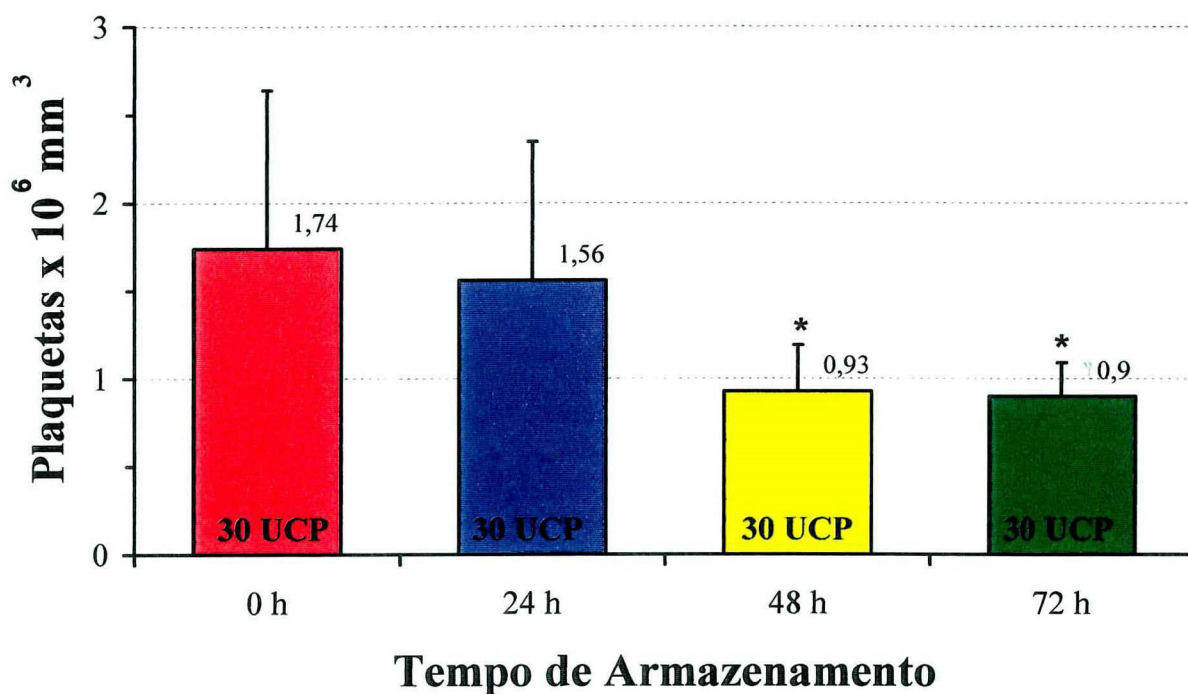
5.2.1. Volume nas bolsas de CP.

TABELA II – Volume médio de plasma nas bolsas de concentrado de plaquetas, expresso em ml. (n=120)

Plasma	Média	DP
Volume das bolsas	50,9	4,4

5.2.2. Concentração das plaquetas nas bolsas de CP.

GRÁFICO II – Concentração das plaquetas, nas unidades de Concentrados de Plaquetas (UCP), obtidos após seu fracionamento (tempo 0 h, 24 h, 48 h e 72 h) durante o armazenamento, por mm^3 de plasma. (n=120)

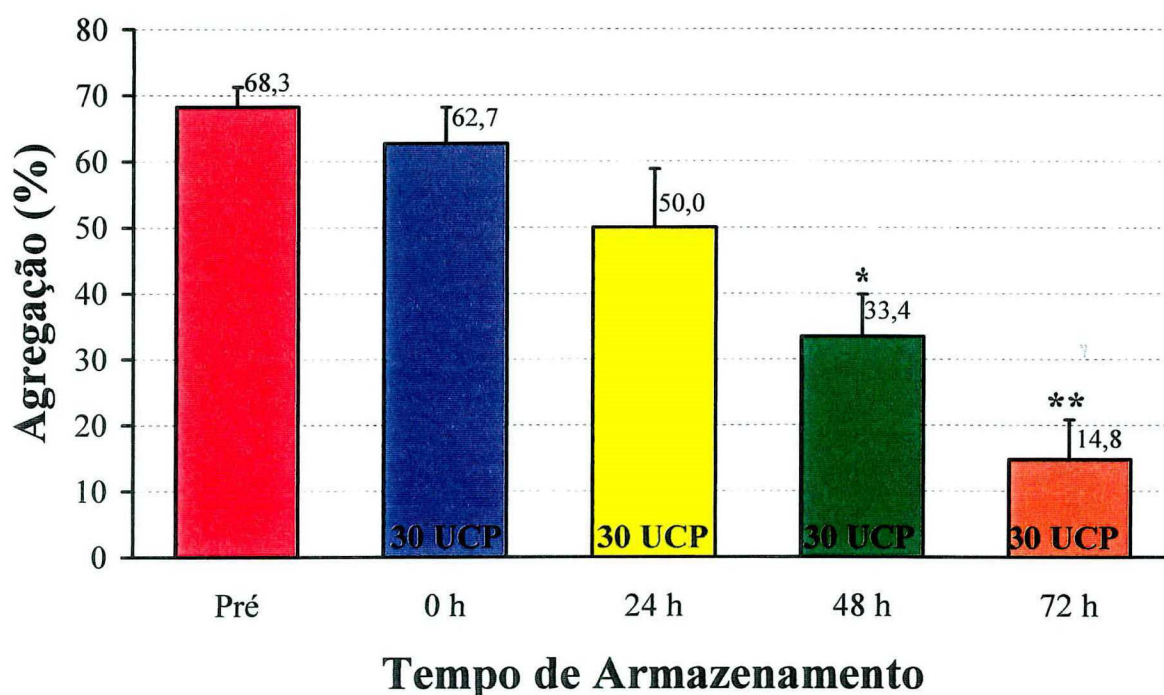


Análise Estatística:

- ANOVA: $p < 0.05^*$

5.2.3. Avaliação da função plaquetária nas bolsas de CP

GRÁFICO III – Avaliação da função plaquetária, utilizando-se o Colágeno como reagente, no pré-fracionamento e nas Unidades de CP (UCP), após o armazenamento (Tempo 0 h, 24 h, 48 h e 72 h), expressos em % de agregação. (n=120)

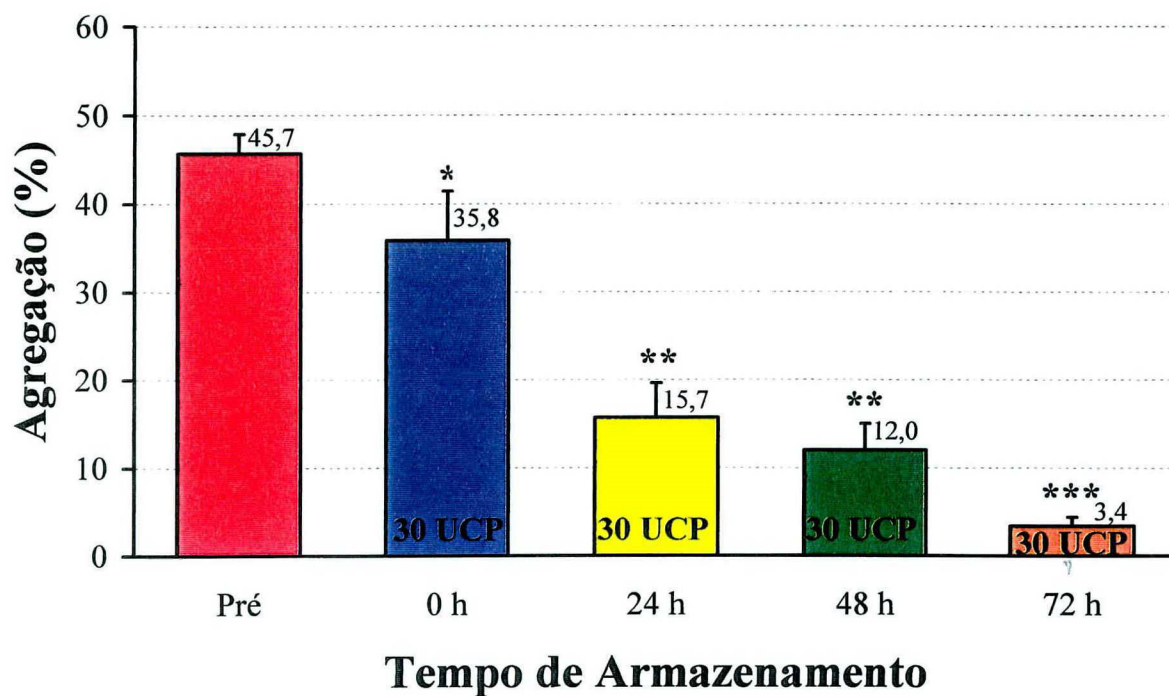


Análise Estatística:

ANOVA: $p < 0.05^*$

Mann-Whitney: $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$

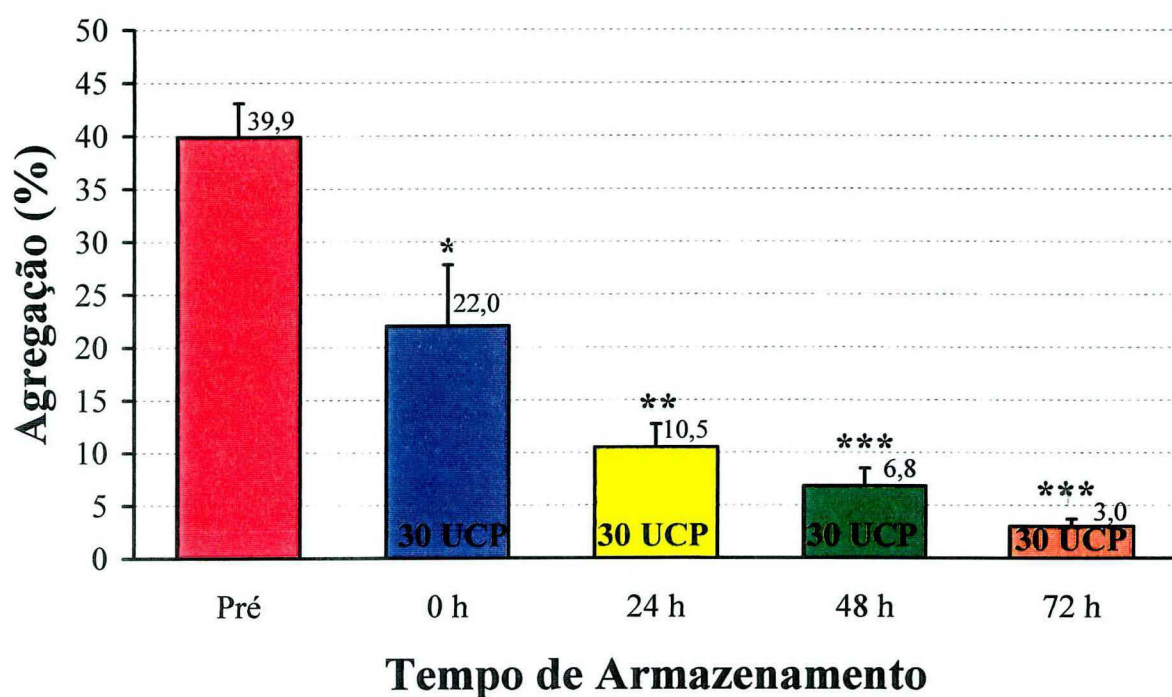
GRÁFICO IV – Avaliação da função plaquetária, utilizando-se a Adenosina-5-difosfato (ADP) como reagente, no pré-fracionamento e nas Unidades de CP (UCP), após o armazenamento (Tempo 0 h, 24 h , 48 h e 72 h), expressos em % de agregação. (n=120)



Análise Estatística:

- ANOVA: $p < 0.05^*$
- Mann-Whitney: $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$

GRÁFICO V – Avaliação da função plaquetária, utilizando-se a Adrenalina (ADN) como reagente, no pré-fracionamento e nas unidades de CP (UCP), após o armazenamento (Tempo 0 h, 24 h, 48 h e 72 h), expressos em % de agregação. (n=120)

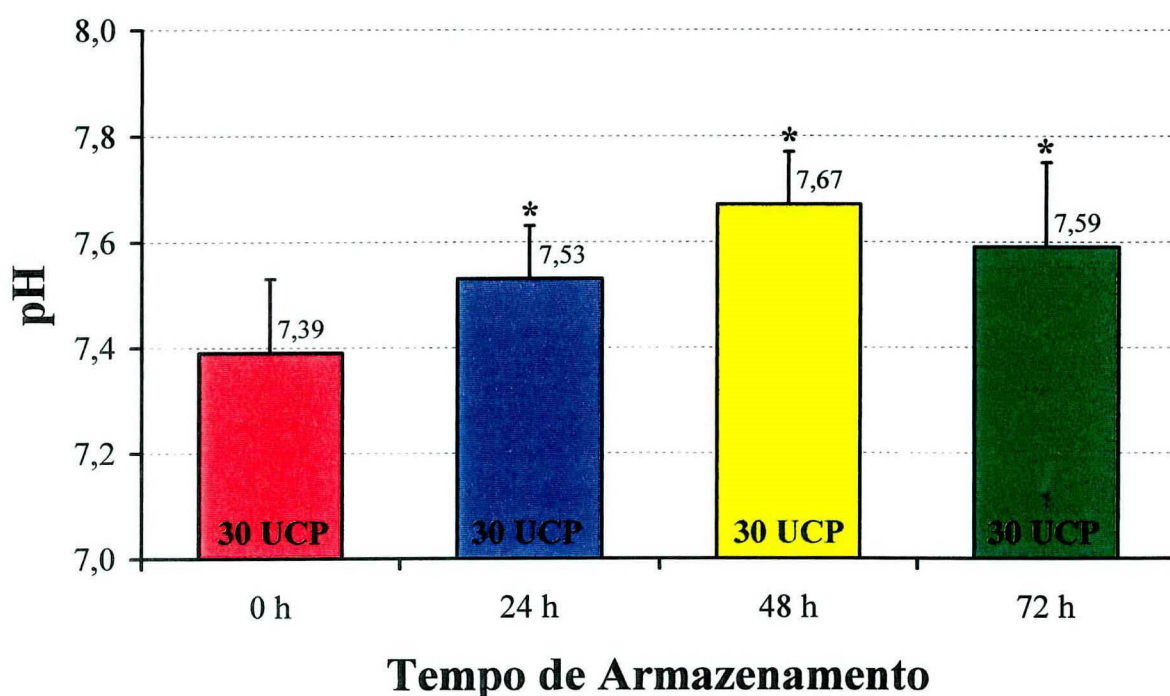


Análise Estatística:

- ANOVA: $p < 0.05^*$
- Mann-Whitney: $p < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$

5.2.4. Medida do pH nas bolsas de CP

GRÁFICO VI – Estudo do pH das unidades de CP (UCP) após fracionamento
(Tempo 0 h, 24 h, 48 h e 72 h). (n=120)



Análise Estatística:

- ANOVA: $p < 0.05^*$
- Mann-Whitney:

0 & 24hs: $p < 0.05^*$	24 & 48hs: $p > 0.05$ n.s.
0 & 48hs: $p < 0.05^*$	24 & 72hs: $p > 0.05$ n.s.
0 & 72hs: $p < 0.05^*$	48 & 72hs: $p > 0.05$ n.s.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, a amostra de doadores foi selecionada a partir de voluntários aptos a doar sangue com base no questionário aplicado e nos resultados sorológicos. Estes, quando positivos, descartam a doação e fazem com que o voluntário seja encaminhado ao ambulatório de doador.

Para fins didáticos, separamos a apresentação dos resultados em duas categorias distintas, pré-fracionamento e concentrados de plaquetas (CP), sendo que inicialmente, observamos no estudo da quantidade de plaquetas dos doadores admitidos na triagem (Tabela I), um valor médio de $1,76 \times 10^5/\text{mm}^3$ (DP $0,43 \times 10^5$) que está dentro dos limites propostos pela literatura como normal para a população geral ($1,5 - 4,0 \times 10^5/\text{mm}^3$). Nossos resultados apontam quantitativamente uma média satisfatória de plaquetas, sendo que somente 2 doadores tiveram uma contagem de plaquetas abaixo do normal para população, com $1,3 \times 10^5/\text{mm}^3$ e $1,19 \times 10^5/\text{mm}^3$ de plaquetas ⁹.

Os dados obtidos nos estudos de agregação durante o pré-processamento, antes da preparação das bolsas, demonstraram um padrão variado de respostas frente aos estímulos utilizados (Gráfico I e Figuras 4 - 6). Observamos uma maior resposta de agregação quando utilizamos o Colágeno como agonista em relação a ADN e ADP. Segundo Holmsen, H ²⁸ e Parise, LV ²⁹ isto se deve as características individuais dos estímulos estudados, já que os agonistas ADP e ADN induzem a agregação predominantemente por secreção (degranulação) de substâncias endógenas, sendo considerados agonistas fracos. Já o colágeno, é responsável pela ativação de diversos sistemas metabólicos intracelulares, além da secreção de ADP, o que o faz ser considerado um agonista forte ^{28, 29}.

A distribuição dos doadores, quanto a função plaquetária, em hipoagregantes e normoagregantes, utilizando-se o Colágeno como agonista, nos leva a um total de 22 (18,38 %) doadores na condição de hipoagregantes. Se observarmos os resultados obtidos com ADP e ADN, temos respectivamente 70 (58,37 %) e 48 (39,99 %) doadores hipoagregantes (Figuras 4-6). Esta diferença entre os reagentes era esperada, se considerarmos que o colágeno é um agonista forte e ADP e ADN são agonistas fracos, segundo a literatura^{28, 29}.

Avaliando a quantidade de doadores classificados como hipoagregantes, independente do reagente utilizado, podemos considerar que os CP produzidos a partir do sangue destes doadores já iniciará seu período de armazenamento com uma hipofunção importante. Se somarmos a este fato a queda progressiva da função plaquetária, descrita por McCullough, J¹⁹ e Schroeder, ML³⁰, que ocorre durante o período de armazenamento, podemos inferir que as plaquetas destes doadores perderão sua viabilidade antes mesmo do período de 5 dias (prazo de validade)^{19, 30}.

Conforme Lusher, JM⁸ e Levine, SP³¹ diversas condições diferentes, que modifiquem a estrutura ou o metabolismo plaquetário, alteram os testes de agregação plaquetária. Por exemplo, doenças hereditárias que levem a alterações diretas na estrutura plaquetária, como a Síndrome de Bernard-Soulier (congenita), e doenças sistêmicas, como a Insuficiência Renal (adquirida), que alterem o metabolismo plaquetário irão cursar com alteração na função plaquetária e hipoagregação. Além das entidades clínicas, medicamentos utilizados no dia-a-dia do médico, como o ácido acetil salicílico, antiinflamatórios, penicilinas e cefalosporinas também alteram o metabolismo, determinando hipofunção plaquetária^{8, 31}.

Se considerarmos a população de doadores do HU, onde predominam estudantes e funcionários da UFSC, podemos sugerir que o principal

responsável pelas alterações presentes em nossos testes de agregação é a automedicação. Segundo Heinisch, LMM ³² em sua Dissertação de Mestrado, “Uso e abuso de substâncias para o alívio imediato da cefaléia”, 89,9 % dos pacientes que procuravam o ambulatório de cefaléia do Hospital Universitário - UFSC haviam utilizado algum tipo de medicação sem critério médico. Sendo assim, a automedicação é um fato constatado, cultural e deve ser avaliado na triagem dos doadores de sangue, especialmente nos doadores de plaquetas.

O questionário aplicado na triagem (Apêndice), que aborda fatores como doenças e medicamentos, está de acordo com as determinações do Ministério da Saúde (Anexo 1), porém o principal detalhe deste sistema de questionário é que o doador muitas vezes não considera drogas utilizadas com certa rotina, como dipirona, aspirina e paracetamol, como medicamentos e acaba não declarando no questionário. Isto nos parece claro se considerarmos que de todos os 120 doadores estudados no pré-fracionamento somente 1 (um) declarou ter utilizado medicamentos (antibiótico), mesmo assim 2 semanas antes da doação. Aliado a isso, temos o fato das determinações do Ministério da Saúde, de 1993, liberando para a preparação de concentrado de plaquetas o sangue de doadores que utilizaram medicamentos, 3 dias após o uso. Considerando-se que a literatura descreve medicamentos que alteram, significativamente, a função plaquetária, por até 2 semanas após o seu uso, sugerimos a necessidade de uma atualização nas normas preconizadas pelo Ministério de Saúde a nível nacional ^{29, 31}.

Após realizada a doação do sangue, e seu processamento com o fracionamento dos hemoderivados, iniciava-se a segunda fase de nosso estudo, que compreendia a avaliação das unidades de CP.

Inicialmente, foi avaliado o volume médio de plasma nas unidades de CP (Tabela II), com 50,9 ml (DP 4,4 ml), que além de ser o volume preconizado pela literatura é também o que está descrito nas portarias nº 1.376 de

19/11/1993 e nº 121 de 24/11/1995 (Anexo 1), como sendo o volume esperado para as unidades de CP ^{5,30}.

A concentração de plaquetas encontrada nas bolsas (Gráfico II), após o fracionamento, foi de $1,74 \times 10^6$ plaquetas/mm³, sendo que a mesma diminuiu progressivamente em 24 h ($1,56 \times 10^6$), 48 h ($0,93 \times 10^6$) e 72 h ($0,9 \times 10^6$) de armazenamento. Estes valores nos mostram uma redução quantitativa de 46,5 % em 48 h e 48,2 % em 72 h. Os estudos estatísticos (ANOVA e Mann-Whitney) aplicados sobre estes resultados mostram uma diferença significativa na redução do número de plaquetas que ocorre de 0 a 48 h de armazenamento, porém não há alteração significativa de 48 à 72 h (Gráfico II).

As plaquetas, armazenadas sob a forma de bolsas de CP, estão expostas a diversas reações químicas e físicas, que, com o passar do tempo, produzem lesões irreversíveis nestas estruturas, estas são denominadas de “lesões de armazenamento”. Muitas destas reações levam a alterações plaquetárias, que podem ser irreversíveis. Uma delas é a lesão da membrana celular plaquetária, que se traduz em nosso estudo como uma diminuição progressiva no número de plaquetas, com o passar do tempo de armazenamento. De acordo com Schroeder, ML³⁰ e Rivera, J; Lozano, ML; Corral, J et al.³³ considera-se como sendo normal e aceitável uma redução em torno de 40 % do número de plaquetas, após 72 horas de armazenamento. Em nosso estudo a redução de 46,5 % nas primeiras 48 h e 48 % em 72 h, apontam para uma tendência de manutenção numérica ^{30,33}.

Analisando os estudos de agregação plaquetária em bolsas de CP, utilizando-se o colágeno como reagente (Gráfico III), observamos uma queda significativa na agregação 48 h ($p < 0,05$) e 72 ($p < 0,01$) após a preparação das bolsas. Se considerarmos como reagente o ADP (Gráfico IV), observamos que a queda se inicia logo após a preparação da bolsa, ou seja, a queda observada na

agregação plaquetária já é significativa no tempo 0 ($p < 0,05$) e continua a aumentar com 24 ($p < 0,01$), 48 ($p < 0,01$) e 72 h ($p < 0,001$). Os resultados não são muito diferentes se considerarmos a ADN (Gráfico V) como reagente, pois temos uma queda também significativa no tempo 0 ($p < 0,05$) e 24 ($p < 0,01$), 48 ($p < 0,001$) e 72 h ($p < 0,001$) após a preparação da bolsa.

Os resultados de agregação, demonstrando uma redução progressiva da função plaquetária, que é descrita também na literatura, deve-se provavelmente a dois fatores principais. O primeiro é devido ao processo de preparação das plaquetas, nas quais o sangue é centrifugado duas vezes, inicialmente de forma mais branda que separa as hemácias do plasma, e posteriormente de forma mais “pesada” que separa as plaquetas do plasma. Sabe-se que este processo é extremamente agressivo, levando possivelmente a uma degranulação plaquetária durante a sua realização, apesar disto este é o método aceito e preconizado mundialmente. Além da aférese, com suas vantagens descritas na introdução, diversos métodos diferentes para separar as plaquetas do sangue vem sendo estudados, mas carecem de resultados e estudos subseqüentes para que sejam avaliados e difundidos a nível mundial. O segundo fator é devido a uma perda da viabilidade natural das plaquetas, durante o armazenamento, visto que as mesmas se encontram em um meio diferente do fisiológico, o que leva a ativação plaquetária progressiva, com produção de mediadores e degranulação, que com o tempo leva a redução numérica e disfunção plaquetária^{34, 35}.

A monitorização do pH (Gráfico VI), que logo após o fracionamento (tempo 0) era 7,39, mostrou uma variação significativa quando comparado com 24 h (7,53), 48 h (7,67) e 72 h (7,59) após o armazenamento das bolsas, para um $p < 0,05$. Apesar de estatisticamente significantes, os resultados obtidos mostram-se de acordo com o estabelecido pela literatura, onde se preconiza um pH não-ácido, superior a 7,00 como condições mínimas para o armazenamento

das plaquetas, isto também está de acordo com a portaria nº121 de 24/11/95 (Anexo 1) que regulamenta os serviços de hemoterapia no Brasil^{5,30}.

Todavia, a significativa variação observada no pH em nosso estudo é sugerida pela literatura como sendo consequência das “lesões de armazenamento” pelas quais as plaquetas estão sujeitas, e não como causa das alterações plaquetárias, desde que este se mantenha em níveis mínimos aceitáveis. O aumento do pH, segundo a literatura, provavelmente deve-se a trocas gasosas, que são maiores no período inicial de armazenamento e tendem a se estabilizar posteriormente, porém tais conclusões só poderão ser firmadas com estudos posteriores que monitorizem os níveis de bicarbonato, pCO₂ e pO₂^{35,36}.

Segundo Norol, F; Kuentz, M; Cordonnier, C et al.³⁷ de todas as plaquetas transfundidas em um paciente (receptor) somente 66 ±8 % destas circulam livremente, pois cerca de 30 a 40 % ficam retidas no baço, e vários fatores do receptor podem vir a afetar a função das plaquetas recém transfundidas, como por exemplo infecções e uso de antibióticos. Isto nos faz concluir que é de fundamental importância termos no Serviço de Hemoterapia do HU um controle de qualidade rigoroso sobre os CP³⁷.

Futuros estudos são necessários para que se aperfeiçoe cada vez mais o processo de elaboração dos CP, desde a triagem inicial, apontando soluções claras, que possam ser postas em prática adequando melhor a qualidade deste produto específico, em benefício imediato para com os doentes que necessitam deste hemoderivado em nosso Hospital. Finalizando, é imperativo a aquisição de uma máquina de aférese em nosso hospital, não só para implementar a terapêutica transfusional plaquetária, mas como ferramenta de aperfeiçoamento de nosso Serviço de Hemoterapia.

7. CONCLUSÕES

- Quantitativamente as plaquetas encontram-se dentro dos limites da normalidade no pré-fracionamento, ou mesmo nos 3 dias que seguem seu processamento.

- Estudando-se os doadores (pré-fracionamento), utilizando-se o colágeno como estímulo indutor de agregação, 79,8% apresentaram um perfil normal de agregação. Com ADP e ADN, os resultados foram respectivamente 42,6% e 59,7%.

- Quanto ao volume e pH as unidades de CP encontram-se dentro dos padrões preconizados.

- Observou-se uma queda progressiva na função plaquetária nas unidades de CP, diretamente proporcional ao tempo de armazenamento.

8. REFERÊNCIAS

1. Practice guidelines for blood component therapy. *Anesthesiology* 1996;84(3):732-47
2. Office of Medical Applications of Research. National Institutes of Health: Platelet transfusion therapy. *JAMA* 1987;257:1777-80.
3. Catherine SM. What's new in transfusion medicine?. *Pediatr Clin North Am* 1996;43(3):793-808.
4. Parker RI. Etiology and treatment of acquired coagulopathies in the critically ill adult and child. *Crit Care Clin* 1997;13(3):591-612.
5. Aubuchon JP. Platelet transfusion therapy. *Clin Lab Med* 1996;16(4):797-816.
6. Holme S, Sawyer S, Heaton A. Studies on platelets exposed to or stored at temperatures below 20 degrees C or above 24 degrees C. *Transfusion* 1997;37:5-11.
7. Ashby B, Daniel JL, Smith JB. Mechanisms of platelet activation and inhibition. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990;4(1):1-19.
8. Lusher JM. Screening and diagnosis of coagulation disorders. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175(3):778-86.
9. Abelson HT, Walters MC. Interpretation of the complete blood count. *Pediatr Clin North Am* 1996;43(3):599-622
10. Homans A. Thrombocytopenia in the neonate. *Pediatr Clin North Am* 1996;43(3):737-56.

11. Rajasekhar D, Kestin AS, Bednarek FJ, Ellis PA, Barnard MR, Michelson AD. Neonatal platelets are less reactive than adult platelets to physiological agonists in whole blood. *Thromb Haemost* 1994;72(6):957-63.
12. Schafer AI. The platelet life cycle: normal function and qualitative disorders. In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP. *Blood: principles and practice of hematology*. 1 ed. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1995.p.1095-112.
13. Ware AJ, Collier BS. Platelet morphology, biochemistry and function. In: Beutler E. *William's: Hematology*. 5 ed. New York: McGraw-Hill; 1995.p.1161-201.
14. Crawford N, Scrutton MC. Biochemistry of the blood platelet. In: Bloom AL. *Haemostasis and Thrombosis*. 3 ed. Edinburg:Churchil Livingstone; 1994.p.89-114.
15. Lemons PP, Chen D, Bernstein AM, Bennett MK, Whiteheart SW. Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery. *Blood* 1997;90(4):1490-500.
16. Jung SM, Moroi M. Platelets interact with soluble and insoluble collagens through characteristically different reactions. *J Biol Chem* 1998;273(24):14827-37.
17. Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. *J Biol Chem* 1998;273(4):2024-9.
18. McCullough J. History. In: McCullough J. *Transfus Med*. New York: McGraw-Hill;1998.p.1-11.
19. McCullough J. Preparation, storage & characteristics of blood components and plasma derivatives. In: McCullough J. *Transfusion medicine*. New York: McGraw-Hill;1998.p.67-99.

20. McCullough J. Production of components by apheresis. In: McCullough J. Transfusion medicine. New York: McGraw-Hill;1998.p.119-49.
21. Seghatchian J, Krailadsiri P. Current methods for the preparation of platelet concentrates: laboratory and clinical aspects. *Transfus Sci* 1997;18(1):27-32.
22. Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Haas NF, Taite BB, Szalony JA, Page JD, et al. Platelet function and monitoring with long-term inhibition of the glycoprotein IIb/IIIa receptor with oral antagonists. *Am Heart J* 1998;135(5):170-8.
23. Estebanell E, Diaz-Ricart M, Lozano M, Mazzara R, Escolar G, Ordinas A. Cytoskeletal reorganization after preparation of platelet concentrates, using the buffy coat method, and during their storage. *Haematologica* 1998;83(2):112-7.
24. Jung F, Blasi U, Radtke H, Mrowietz C, Pindur G. Plateletpheresis-induced increase in platelet reactivity using different cell separators. *Infusiotherapy Transfus Med* 1995;22(4):237-43.
25. Goto S, Ykeda Y, Saldívar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest* 1998;101(2):479-86.
26. Brecher G, Threatte GA, Adrados C, Ebbe S. Mean platelet volume: the need for a reference method. *Am J Clin Pathol* 1984.81(6):769-72.
27. Born G, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963.70(1):178-95.
28. Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. In: Colman W. Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice. 3 ed. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1994.p.524-56.
29. Parise LV, Boudignon-Proudhon C, Keely PJ, Naik UP. Platelets in hemostasis and thrombosis. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F,

- Greer JP, Rodgers GM. Wintrobe's: Clinical hematology. 10 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999.p.661-83.
30. Schroeder ML. Principles and practice of transfusion medicine. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. Wintrobe's: Clinical hematology. 10 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999.p.817-74.
31. Levine, SP. Qualitative disorders of platelet function. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. Wintrobe's: Clinical hematology. 10 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999.p.1661-81.
32. Heinisch, LMM. Uso e abuso de substâncias para o alívio imediato da cefaléia[Tese de Mestrado]. Florianópolis: UFSC, 1996.89p.
33. Rivera J, Lozano ML, Corral J, Connor J, Gonzalez-Conejero R, Ferrer F, et al. Quality assessment of platelets concentrates supplemented with second messenger effectors. *Transfusion* 1999;39(2):135-43.
34. Rebullá P. In vitro and in vivo properties of various types of platelets. *Vox Sang* 1998.74(2):217-22.
35. Rudderow D, Soslau G. Permanent lesions of stored platelets correlate to pH and cell count while reversible lesions do not. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998.217(2):219-27.
36. Moroff G, Friedman A, Robkin-Kline L. Factors influencing changes in pH during storage of platelet concentrates at 20-24 degree C. *Vox Sang* 1982.42(1)33-45.
37. Norol F, Kuentz M, Cordonnier C, Beaujean F, Haioun C, Vernant JP, et al. Influence of clinical status on the efficiency of stored platelet transfusion. *Br J Haematol* 1994.86(1):125-9.

NORMAS ADOTADAS

O presente trabalho adotou a “Normatização para os Trabalhos de Conclusão do Curso de Graduação em Medicina”, resolução nº 001/99 do colegiado do curso de graduação em Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Nos Estados Unidos, cerca de 22 milhões de diferentes hemoderivados são transfundidos por ano, sendo que cerca de 7 milhões são bolsas de concentrados de plaquetas (CP), cujo controle de qualidade é fundamental para que eficácia terapêutica quando da sua utilização.

MÉTODO: Estudamos as plaquetas de 120 indivíduos adultos, na triagem, após serem selecionados para doar sangue. Realizamos a contagem de plaquetas e testes de agregação com colágeno, ADP e ADN. Estudamos também 120 bolsas de CP, divididas em grupos de 30 bolsas, respectivamente 0h, 24h, 48h, e 72h após sua preparação. Nas bolsas analisamos o volume, a contagem plaquetária, pH e testes de agregação com os reagentes citados.

RESULTADOS: Na triagem, a média de plaquetas foi $1,76 \times 10^5 / \text{mm}^3$. Os testes de agregação com colágeno, ADP e ADN demonstraram respectivamente 18,38%, 58,37% e 39,99% de doadores “hipoagregantes”. Nas bolsas de CP, encontramos um volume médio de 50,9mL, com concentração plaquetária inicial de $1,74 \times 10^6 / \text{mm}^3$, reduzindo 48,2% em 72h. A agregação plaquetária reduziu significativamente para o colágeno em 48h, para o ADP em 24h e para a ADN em 24h. O pH das bolsas, inicialmente 7,39, alterou-se significativamente em 24h, porém manteve-se dentro dos limites normais.

CONCLUSÃO: Quantitativamente as plaquetas encontram-se normais em todas as fases do processo. A triagem apresenta uma parcela significativa de doadores com agregação abaixo do normal. O pH, o volume das bolsas e a queda na agregação plaquetária dos CP estão de acordo com os padrões internacionais.

SUMMARY

INTRODUCTION: In the United States of America, about 22 million different hemoderived products are transmerged each year, in which 7 million are platelets concentrate (PC), whose quality control is essential to assure its therapeutical efficacy when it is used.

METHOD: We had studied the platelets of 120 adult persons, in the selection, after than they were chosen to donate blood. We performed the platelets counting and agregation tests with collagen, ADP and Epinephrine. We also had studied 120 platelets concentrate bags , shared into groups of 30 bags , respectively 0h, 24h, 48h and 72h after its preparation. In the bags, we checked the volume, the platelets counting, the pH and the agregation tests with the mentioned reagents.

RESULTS: In the selection, the platelets average was $1,76 \times 10^5 / \text{mm}^3$. The agregation tests with collagen, ADP and Epinephrine, demostrated respectively 18,38%, 58,37% and 39,99% of hipoagregants donators. In the CP bags, we found an average volume of 50,9 ml, having an initial platelets concentration of $1,74 \times 10^6 / \text{mm}^3$, decreasing 48,2% in 72h. The platelets agregation reduced significantly for the collagen in 48h, for the ADP in 24h and for the Epinephrine in 24h. The bags pH, initially 7.39, decreased considerably in 24h, however it was kept into its normal limits.

CONCLUSION: quantitatively, the platelets rate is normal during all the process steps. The selection shows a significant share of donators having agregation below than what is normal. The pH, the bags volumes and the reduction in the platelets agregation of the PC are according to the international standards.

APÊNDICE

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO - COLETA EXTERNA FICHA DE DOAÇÃO VOLUNTÁRIA

CÓDIGO: _____

IDENTIFICAÇÃO

NOME: _____
 IDADE: _____ SEXO: _____ COR: _____ ESTADO CIVIL: _____
 DATA DE NASCIMENTO: _____ NATURALIDADE: _____
 DOCUMENTO (CI / CT): _____
 NATURAL DE : _____ PROCEDENTE: _____
 ENDEREÇO: _____ CEP: _____ FONE: _____
 ESCOLARIDADE: _____ CURSO: _____
 PROFISSÃO: _____ LOCAL TRABALHO: _____ FONE: _____

DADOS

PESO: _____ ESTATURA: _____ Nº SANGUE: _____
 T ax: _____ PA: _____ Hb: _____ PULSO _____
 TIPAGEM SANGUÍNEA PRELIMINAR: ABO: _____ Rh: _____ SEGMENTO: _____

TRIAGEM

	S	N		S	N
01. Já doou sangue? Há quanto tempo?			19. Já teve desmaio e/ou convulsão?		
02. Teve recusa / Teste alterado em doação?			20. Tem doença do sangue ou hemorragia?		
03. Alimentou-se hoje?			21. Aborto ou parto há menos 3 meses?		
04. Repousou durante a noite?			22. Está menstruada?		
05. Ingeriu bebida alcoólica nas últimas 24h?			23. Está grávida ou amamentando?		
06. Costuma beber diariamente?			24. Perda de peso e/ou íngua pelo corpo?		
07. Está resfriado?			25. Teve diarreia nos últimos 15 dias?		
08. Está com febre?			26. Alguma doença de pele, manchas?		
09. Medicação nos últimos 15 dias?			27. Lesões esbranquiçadas na boca/ garganta?		
10. Vacina no último ano ou após um parto?			28. Portador ou já teve sífilis?		
11. Já fez algum tratamento com acupuntura?			29. Alergias?		
12. Já fez tatuagem?			30. Já foi preso? Já foi internado em clín. Recuperação ?		
13. Já teve hepatite ou contato com doente?			31. Utilizou ou utiliza algum tipo de droga?		
14. Teve malária ou esteve em zona endêmica?			32. Teve relação com o mesmo sexo?		
15. Teve ou tem alguma doença?			33. Parceiros sexuais diferentes no último ano?		
16. Já esteve internado?			34. Já teve relação sexual com prostituta?		
17. Já fez alguma cirurgia? Quando?			35. VEIO PARA FAZER O EXAME PARA AIDS ?		
18. Já recebeu transfusão de sangue / derivados?					

OBS: _____

AVALIAÇÃO

APTO: _____ INAPTO DEFINITIVO: _____ INAPTO TEMPORÁRIO: _____

ASSINATURA DO ENTREVISTADOR: _____

DATA DA DOAÇÃO: _____ ASSINATURA DO DOADOR: _____

ANEXO 1

- Transcrição de Trechos da **Portaria 1.376**, de 19 de novembro de 1993, publicada no Diário Oficial nº229, de 02 de dezembro de 1993.
(...) - indica trechos da portaria suprimidos.

ANEXO NORMAS TÉCNICAS EM HEMOTERAPIA

1. A doação de sangue deve ser altruísta, voluntária e não gratificada direta ou indiretamente.
(...)
8. Visando a avaliação de sua eficácia recomenda-se que os órgãos executores da atividade hemoterápica desenvolvam e participem de programas externos de controle de qualidade.

II. DO DOADOR

1. O doador deve ser submetido a triagem clínica no dia da doação. Esta deverá ser realizada por profissional de saúde qualificado e capacitado, sob orientação e supervisão médica, em local com condições de privacidade. As informações obtidas devem constar de fichas de triagem padronizadas, preenchidas pelo entrevistador, onde constem as perguntas realizadas, as respostas obtidas e a assinatura do doador autorizando a doação e assumindo a responsabilidade pelas informações fornecidas. Devem ser questionados e verificados itens que garantam a segurança do doador e do receptor, conforme mencionadas a seguir. A coleta de sangue deverá ser feita de tal forma que do ato de doar não avenha ao doador conseqüências outras que as derivadas da retirada de volume de sangue compatível com a manutenção de sua condição hígida.

2. Proteção ao Doador

2.1. Doenças: Candidatos com história de doença hematológica, cardíaca, renal, pulmonar, hepática, autoimune, diabetes, hipertireoidismo, hanseníase, tuberculose, câncer, sangramento anormal, convulsão após a infância ou epilepsia devem ser convenientemente avaliados e podem ser excluídos da doação temporária ou definitivamente.

2.2. Medicamentos: História terapêutica recente deve merecer avaliação especial por parte de um médico, de vez que a indicação clínica do tratamento pode motivar a rejeição da doação. Cada medicamento deve ser avaliado individualmente e em conjunto, e registrado na ficha de triagem. Os medicamentos abaixo listados, quando em uso pelo candidato, são motivo de rejeição temporária:

- Antibióticos e quimioterápicos antibacterianos;
- Corticosteróides;
- Anticoagulantes orais;
- Agentes hipoglicemiantes;
- Antipsicóticos.

(...)

2.9. Níveis de Hemoglobina/Hematócrito: É obrigatória a demonstração de que os níveis de hemoglobina e/ou hematócrito sejam iguais ou superiores a:

Hemoglobina 12,0g / 13,0g (respectivamente para mulheres/homens);

Hematócrito: 38% / 40% (respectivamente para mulheres/homens);

Candidatos com níveis hematimétricos abaixo dos acima citados não devem ser aceitos para doação.

(...)

3. Proteção ao Receptor:

O sangue coletado não deverá representar para o receptor da transfusão outro risco senão o inerente a própria terapêutica.

3.1. Aparência Geral: deve ser de um indivíduo sadio

(...)

3.6. Drogas e medicações: são definitivamente excluídos como doadores os usuários de drogas intravenosas que possam causar dependência, sejam toxicômanos ou não. No momento da triagem clínica ambos os braços devem ser examinados para verificar a presença de sinais de uso repetido de drogas intravenosas.

Medicamentos utilizados pelo doador usualmente não levam a problemas no receptor. Entretanto a indicação clínica para seu uso pode ser causa de recusa, e deve ser avaliada individualmente. Candidatos que nos últimos 3 dias tenham usado medicamentos que interfiram com a função plaquetária (P.e. ácido acetilsalicílico) podem doar sangue total. Entretanto não deve ser preparado concentrado de plaquetas de sua doação e não devem ser aceitos como doadores de plaquetas por aférese.

(...)

IV. DOS EXAMES LABORATORIAIS NO SANGUE DO DOADOR:

1. Obrigações e recomendações: é obrigatória, em todas as unidades coletadas, a determinação do grupo ABO, do tipo Rh₀ (D), do antígeno D fraco (D⁰) nas Rh₀ (D) negativas, e dos testes para exclusão das hepatites do tipo B e C, doença de Chagas, Sífilis, SIDA/AIDS, dos anticorpos anti-HTLV I/II e anti-HBc. Devem ser realizados testes para a pesquisa de anticorpos irregulares e dosagem de TGO/TGP. Recomenda-se a realização de testes para a exclusão de malária, falcização e detecção de hemoglobinas anormais.

(...)

VI. DAS CONDIÇÕES DE PREPARO, ESTOCAGEM, TRANSPORTE E VALIDADE DO SANGUE E SEUS COMPONENTES:

(...)

1.8. Concentrado de Plaquetas (CP):

1.8.1. É a suspensão de plaquetas em plasma, obtida a partir do plasma rico em plaquetas, proveniente de uma unidade de sangue total (exceto quando preparado por aférese).

1.8.2. A unidade de ST destinada ao preparo de CP deve estar entre 20° e 24°C positivos, por até 8 horas após a coleta. Fora deste prazo, ou em outra temperatura, a unidade não é adequada para preparação de CP.

1.8.3. Pelo menos 75% das unidades de CP testadas no último dia de estocagem devem conter um mínimo de 5.5×10^{10} ou mais plaquetas.

1.8.4. As plaquetas devem estar suspensas em um volume suficiente de plasma de forma a permitir a adequada manutenção do pH acima de 6,0 nas unidades testadas no último dia de estocagem permitido para o produto.

1.8.5. As unidades que apresentem agregados plaquetários visíveis não devem ser utilizados para transfusão.

1.8.6. Se preparados por aférese, pelo menos 75 % das unidades testadas devem conter um mínimo de $3,0 \times 10^{11}$ plaquetas.

- Transcrição de Trechos da **Portaria 121**, de 24 de novembro de 1995, publicada no Diário Oficial nº22, de 30 de novembro de 1995.
(...) - indica trechos da portaria suprimidos.

ANEXO I

ROTEIRO DE INSPEÇÃO EM UNIDADES HEMOTERÁPICAS

(...)

Após a coleta, as bolsas de sangue devem ficar estocadas entre 2° a 6° C, com exceção das unidades destinadas ao preparo de plaquetas que devem ficar em temperatura de 20° a 24°C.

Nos casos do ser coletado em Posto de Coleta ou outra Unidade Hemoterápica que necessitem de enviá-las a um laboratório de processamento, estas bolsas coletadas devem ficar estocadas em refrigeradores que mantenham a temperatura, conforme descrito acima. Temperaturas abaixo de 20°C e acima de 24°C reduz a sobrevivência e funcionalidade das plaquetas.

(...)

O PROCESSO PRODUTIVO DOS HEMOCOMPONENTES

(...)

Concentrado de Plaquetas: Podem ser obtidas a partir de plasma rico em plaquetas ou camada leucoplaquetária, proveniente de uma unidade de sangue total (exceto quando preparado por aférese).

Algumas Unidades Hemoterápicas podem realizar o Pool de plaquetas. Este procedimento deve estar descrito no Manual de Procedimentos. O rótulo deste produto deve conter informações sobre o número de doadores que o compõem, bem como o número que os relacione com a ficha de triagem, voto de auto-exclusão, exames sorológicos e exames imunohematológicos das bolsas coletadas.

Os testes de controle de qualidade devem ser realizados a cada mês, e incluir a contagem de plaquetas, determinação do pH, medidas de volume plasmático e temperatura de estocagem.

No caso de controle de qualidade não ser realizado sobre supervisão e controle da Unidade Hemoterápica inspecionada, deverá ser verificado o local onde os testes estão sendo efetuados, como são realizados e também verificar os resultados obtidos e as medidas corretivas, no caso de não adequação do produto, de acordo com as normas estabelecidas pela instituição.

(...)

Os concentrados de plaquetas devem ser mantidos em sala com temperatura entre 20° e 24°C ou entre 1° e 6°C, de acordo com a indicação no rótulo de estocagem.

(...)

ANEXO II NORMAS GERAIS DE GARANTIA DE QUALIDADE EM UNIDADES HEMOTERÁPICAS

(...)

6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Hemocomponente	Temperatura (°C)	Validade (dias)	Conservante
Concentrado de Plaquetas	20 a 24	3 a 5*	Plasma/SAP**
Concentrado de Plaquetas - Aférese	20 a 24	1 a 5***	ACD

*Depende do tipo de bolsa utilizada: bolsa confeccionada com TOTM (5 dias); bolsa confeccionada com DEHP (3 dias); bolsa confeccionada com poliolefina (5 dias).

**SAP - Solução Artificial para Conservação de Plaquetas na ausência de plasma.

***Processamento em Sistema Aberto - Prazo de validade de 1 dia (24 h após o início do procedimento); Processamento em Sistema Fechado - Prazo de validade de 3 a 5 dias, dependendo do tipo de bolsa utilizada (conforme anteriormente mencionado).

(...)

6.2. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DOS HEMOCOMPONENTES

CONCENTRADO DE PLAQUETAS:

Parâmetros	Características
Volume (ml)	50 a 70
Contagem de plaquetas/unidade	$> 5,5 \times 10^{10}$
Contagem de leucócitos/unidade	$< 1,0 \times 10^8$
pH	$> 6,0^*$

* Em qualquer momento dentro do período de validade

CONCENTRADO DE PLAQUETAS - AFÉRESE:

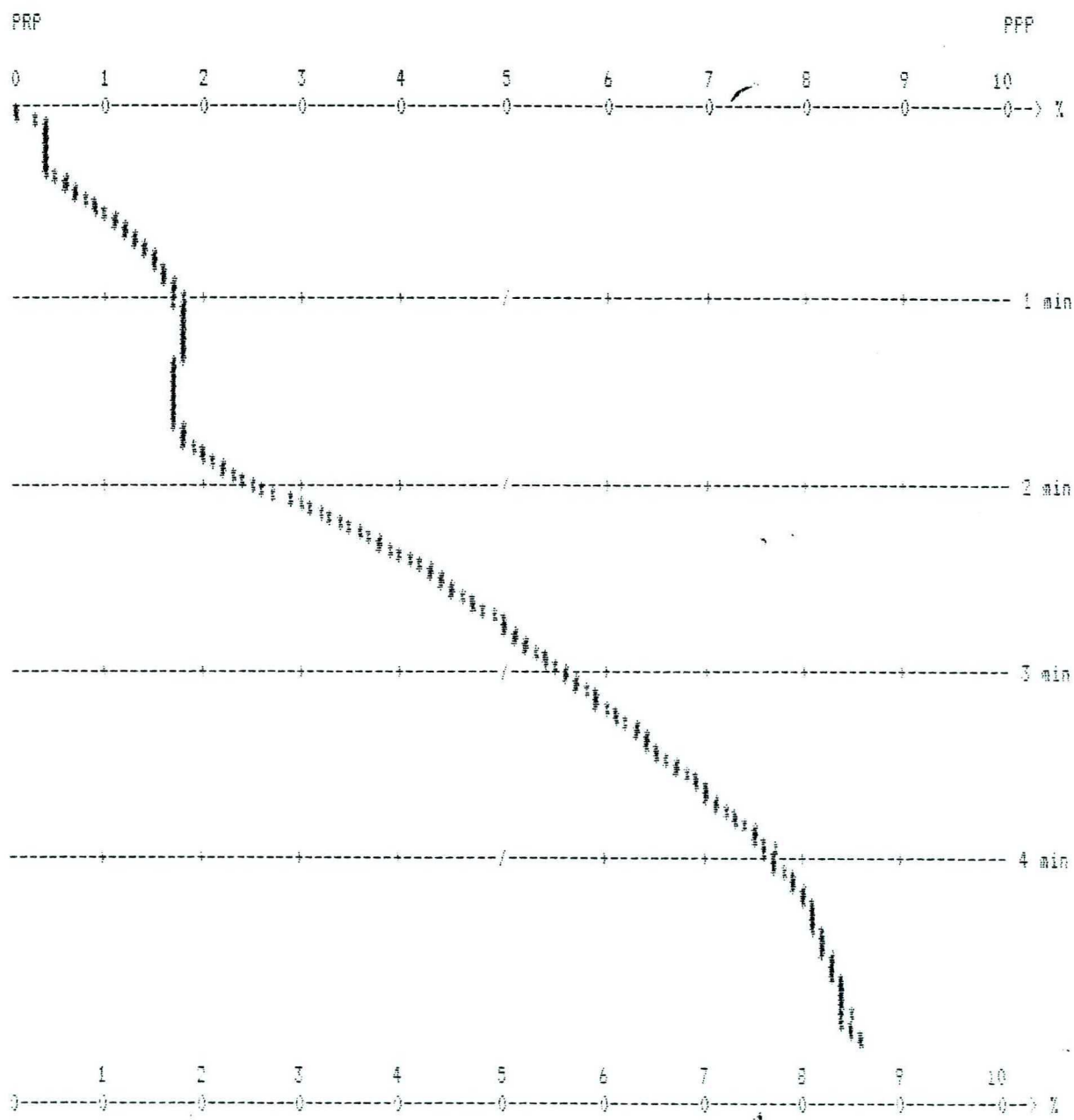
Parâmetros	Características
Volume (ml)	200 a 350
Contagem de plaquetas/unidade	$> 2,5 \times 10^{11}$
Contagem de leucócitos/unidade	$< 1,0 \times 10^7$ (depende do equipamento)
pH	$> 6,0^*$

* Em qualquer momento dentro do período de validade

ANEXO 2

Agregação Plaquetária

Esponânea () ADP () ADM () Ristocetina () Colageno () Epinefrina ()



Agregação Final 86%

**TCC
UFSC
CM
0429**

N.Cham. TCC UFSC CM 0429
Autor: Castro, Carlos Edu
Título: Controle de qualidade de plaquet



972808354

Ac. 253578

Ex.1

Ex.1 UFSC BSCCSM