

Priscila Marques Donato

**Estudo da resposta de cultura utilizando-se soro
bovino fetal e soro de plasma rico em plaquetas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Botucatu – UNESP, Programa de
Pós- Graduação em Biotecnologia Médica
(Mestrado Profissionalizante) como requisito
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado

Co-orientadora: Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim

Botucatu
2011

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Donato, Priscila Marques.

Estudo da resposta de cultura utilizando-se soro bovino fetal e soro de plasma rico em plaquetas / Priscila Marques Donato. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Paulo Eduardo de Abreu Machado

Co-orientador: Márjorie de Assis Golim

Capes: 20601000

1. Fatores de crescimento de grânulos- α plaquetários.

Palavras-chave: Fatores de crescimento plaquetários; Grânulos- α ; Glutation; Grupo sulfidril; IGF; PDGF; TGF- β .

Dedicatória e Agradecimentos



Dedico a concretização deste sonho,

Aos meus pais Antonio & Ana Tereza,

*A vocês que me deram a vida e ensinaram-me
a vivê-la com dignidade, não bastaria um
muito obrigado.*

*Dedico-lhes esta conquista com a mais
profunda admiração, gratidão e respeito.*

A vocês todo o meu amor para sempre!

Meus sinceros agradecimentos,

A Deus, por me guiar nas alegrias, lutas, provas, vitórias, dores e em tantos momentos que a vida nos proporciona. “Tudo é do Pai, toda honra e toda glória, é Dele a vitória, alcançada em minha vida!”

Ao meu estimado orientador Prof. Dr. Paulo Eduardo de Abreu Machado, pelos preciosos ensinamentos e por todos os momentos de incansável dedicação em compartilhar comigo todo seu conhecimento. Seus exemplos de vida e profissionalismo jamais serão esquecidos.

À minha querida co-orientadora Profa. Dra. Márcia de Assis Gomes, pelo carinho, dedicação e incentivo. Minha gratidão pelos preciosos conselhos e meu reconhecimento por me preparar e capacitar para a pesquisa.

À querida Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, pelo acolhimento maternal e disponibilidade irrestrita. Agradeço imensamente seus ensinamentos. Obrigada por permitir que eu desfrutasse de sua presença, sabedoria, ânimo e proteção!

Ao Hemocentro de Botucatu, pela oportunidade de crescimento profissional e incentivo à pesquisa.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Hematologia, minha eterna gratidão pela compreensão das horas subtraídas da rotina laboratorial em função da execução do meu trabalho de mestrado.

Aos funcionários da Coleta e do Laboratório de Componentes Lábeis, a colaboração de vocês foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Imunologia do Instituto de Biociências, agradeço o acolhimento e auxílio na realização das culturas.

À Priscila Murador e Josy, por compartilhar experiências e conhecimentos. A disponibilidade de vocês foi fundamental para realização deste trabalho.

À querida amiga Mariana, pela disposição e dedicação. Meu profundo agradecimento pela preciosa colaboração neste trabalho e especialmente pela amizade sincera. A vida faz mais sentido quando temos amigos leais e companheiros. Quando temos em quem confiar!

À querida amiga Profa. Dra. Izolete, pelos ensinamentos, incentivo, amizade e conselhos oportunos.

À Maria Teresa Alves Gomes, por todo apoio, solicitude e cumplicidade.

Às queridas Tata e Léia, pelo bom humor contagiante, incentivo e amizade.

À querida Prof. Dra. Lúgia Niero, pelos seus ensinamentos durante todos estes anos de convivência, pelo carinho e incentivo.

Às bibliotecárias Meire e Sulamita pela disposição e profissionalismo.

Às queridas Janisse e Rita Alvarado pelo carinho, prontidão e paciência.

À querida amiga Eloísa, pelo apoio, amizade e por me encorajar nos momentos difíceis.

Ao meu querido irmão Marcelo e à minha cunhada Zenilda, por dividirem comigo momentos tão especiais de minha vida!

Ao meu querido sobrinho Miguel, responsável pelo meu melhor sorriso.

À minha avó Helena, por tanto amor dispensado a mim durante toda a vida. Sei que aí do céu continua olhando e cuidando de mim. Saudades.

A todos que integram o Hemocentro de Botucatu, pelo carinho oferecido diariamente.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e auxiliaram na minha formação profissional, manifesto a minha gratidão.

“Somos pérolas únicas no teatro da vida e não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

Epígrafe



Contrários

*Só quem já provou a dor, quem sofreu, se amargurou,
Viu a cruz e a vida em tons reais.
Quem no certo procurou, mas no errado se perdeu, precisou saber recomeçar.*

*Só quem já perdeu na vida sabe o que é ganhar.
Porque encontrou na derrota o motivo pra lutar.
E assim viu no outono a primavera.
Descobriu que é no conflito que a vida faz crescer.*

*Que o verso tem reverso, que o direito tem avesso.
Que o de graça tem seu preço, que a vida tem contrários.
E a saudade é um lugar, que só chega quem amou.
E que o ódio é uma forma tão estranha de amar.*

*Que o perto tem distâncias, e que esquerdo tem direito.
Que a resposta tem pergunta, e o problema solução.
E que o amor começa aqui, no contrário que há em mim.
E a sombra só existe quando existe alguma luz.*

*Só quem soube duvidar, pôde enfim acreditar.
Viu sem ver e amou sem aprisionar.
Quem no pouco se encontrou, aprendeu multiplicar.
Descobriu o dom de eternizar.*

*Só quem perdoou na vida sabe o que é amar.
Porque aprendeu que o amor só é amor,
Se já provou alguma dor, e assim viu grandeza na miséria,
Descobriu que é no limite que o amor pode nascer.*

Pe. Fábio de Melo

Sumário



Lista de Abreviaturas	12
Resumo	15
Abstract	17
Introdução	19
Objetivo	36
Material e Métodos	38
Resultados	53
Discussão e Considerações Finais	66
Conclusão	71
Referências Bibliográficas	73
Anexos	83

Lista de Abreviaturas



ADP –	adenosina difosfato
AM –	azul de metileno
AMP –	adenosina monofosfato
ATP –	adenosina trifosfato
AV –	anexina V
CP –	concentrado de plaquetas
D.O. –	densidade óptica
DMSO –	dimetilsulfóxido
DNA –	ácido desoxirribonucléico
EDTA –	ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC –	isotiocianato de fluoresceína
FSC –	forward scatter
G6PD –	glicose-6-fosfato desidrogenase
GSH –	glutation reduzido
GSSG –	glutation oxidado
IGF –	fator de crescimento similar à insulina
MTT -	3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NAD –	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH –	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP –	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH –	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
PBMC –	células mononucleares do sangue periférico

PDGF –	fator de crescimento derivado de plaquetas
PI –	iodeto de propídeo
POP –	procedimento operacional padrão
PPP –	plasma pobre em plaquetas
PRP –	plasma rico em plaquetas
PS –	fosfatidilserina
RPMI –	meio para cultura de células
SBF –	soro bovino fetal
SH –	radical sulfidril
SPRP –	soro de plasma rico em plaquetas
SPRPC –	soro de plasma rico em plaquetas concentrado
SPRPE –	soro de plasma rico em plaquetas estocado
SSC –	side scatter
TGF-β –	fator de crescimento transformador β

Resumo



As plaquetas são fragmentos do citoplasma do megacariócito e possuem papel fundamental na manutenção da hemostasia. Ao aderirem umas às outras, ativam-se, mudam de forma e liberam grânulos que contêm fatores de crescimento, proteínas que atuam na divisão celular. Os grânulos α -plaquetários secretam fatores de crescimento que regulam eventos, tais como, síntese de DNA, quimiotaxia e citodiferenciação. A estocagem prolongada das plaquetas a 22°C é prejudicial à viabilidade e à função, mesmo quando estocadas em condições adequadas nos bancos de sangue. Observa-se diminuição da concentração do glutathion intraplaquetário, representando diminuição da proteção contra o stress oxidativo, do qual resulta a perda do grupo sulfidril. As plaquetas desempenham funções com consumo de energia, como exemplo a diapedese, que pode ser recuperada após cinco dias de armazenamento pelo azul de metileno. Durante a divisão celular há necessidade de bloqueio das funções citoplasmáticas com aumento da produção de proteínas de adesão para que ocorra a fixação da célula que vai se dividir. Os resultados mostraram que quando adicionamos azul de metileno, a quantidade de células viáveis diminui com aumento de apoptose e necrose, muito provavelmente devido à liberação de energia.

Palavras-chave: fatores de crescimento plaquetários, grânulos- α , glutathion, grupo sulfidril, IGF, PDGF, TGF- β .

Abstract



Platelets are megakaryocyte cytoplasmic fragments that play a fundamental role in maintaining hemostasis. When they adhere to each other, they become activated, change shape and release granules containing growth factors, proteins involved with cell division. Platelet α -granules secrete growth factors that regulate events such as DNA synthesis, chemotaxis and cytodifferentiation. Long platelet storage at 22°C is harmful to their viability and function, even when they are stored under proper conditions at blood banks. A reduced concentration of intraplatelet glutathione is observed, representing decreased protection against oxidative stress, from which the loss of the sulfhydryl group results. Platelets perform actions with energy consumption, such as diapedesis, which can be recovered after five storage days by methylene blue. During cell division, cytoplasmic functions must be blocked by increased adhesion protein so that the fixation of the dividing cell can occur. Results showed that when methylene blue is added, the number of viable cells decreases with apoptosis and necrosis increase, which is very likely due to energy release.

Key words: platelet growth factors, α -granules, glutathione, sulfhydryl group, IGF, PDGF, TGF- β .

Introdução



O sangue é constituído de porção sólida e líquida. A fração sólida é formada pelos glóbulos vermelhos, cujas funções são: transportar oxigênio e atuar como sistema de óxido-redução; pelos glóbulos brancos e pelas plaquetas (Beutler et al., 2001).

Cada subtipo leucocitário detém funções específicas e distintas entre si, que, em conjunto, estruturam o sistema de defesa (Abbas et al., 2009).

Os leucócitos granulares são representados pelos neutrófilos, eosinófilos e basófilos. A função dos neutrófilos é fagocitar e digerir microrganismos, os eosinófilos têm função na mediação de processos imunoalérgicos e os basófilos na mediação de reações de hipersensibilidade imediata, pela liberação de histamina (Zago et al., 2004).

Leucócitos mononucleares são representados pelos linfócitos e monócitos, cuja finalidade é o reconhecimento e apresentação de antígenos aos linfócitos T e B, responsáveis pela imunidade mediada por células e imunidade humoral (Lee et al., 1998).

O plasma contém água, proteínas do sistema de coagulação, proteínas que intervêm na viscosidade do sangue, sais e eletrólitos e realiza o transporte de aminoácidos e detritos que devem ser eliminados pelos sistemas digestivo e urinário (Beutler, 2001).

Trombopoiese e Função Plaquetária

Megacariocitopoiese é o processo de proliferação e diferenciação dos megacariócitos, células responsáveis pela produção das plaquetas (Colman et al., 2006).

Todas as células do organismo possuem uma relação núcleo/citoplasmática própria, onde o citoplasma se desenvolve com suas

organelas até alcançar sua relação núcleo/citoplasmática (Junqueira & Carneiro, 2008).

A evolução do megacarioblasto para o megacariócito maduro envolve vários ciclos de duplicação do DNA sem a correspondente divisão celular (endomitose), levando a célula acumular DNA de ordem de 32-64n e aumento do volume do citoplasma celular (Schulze & Shivdasani, 2005).

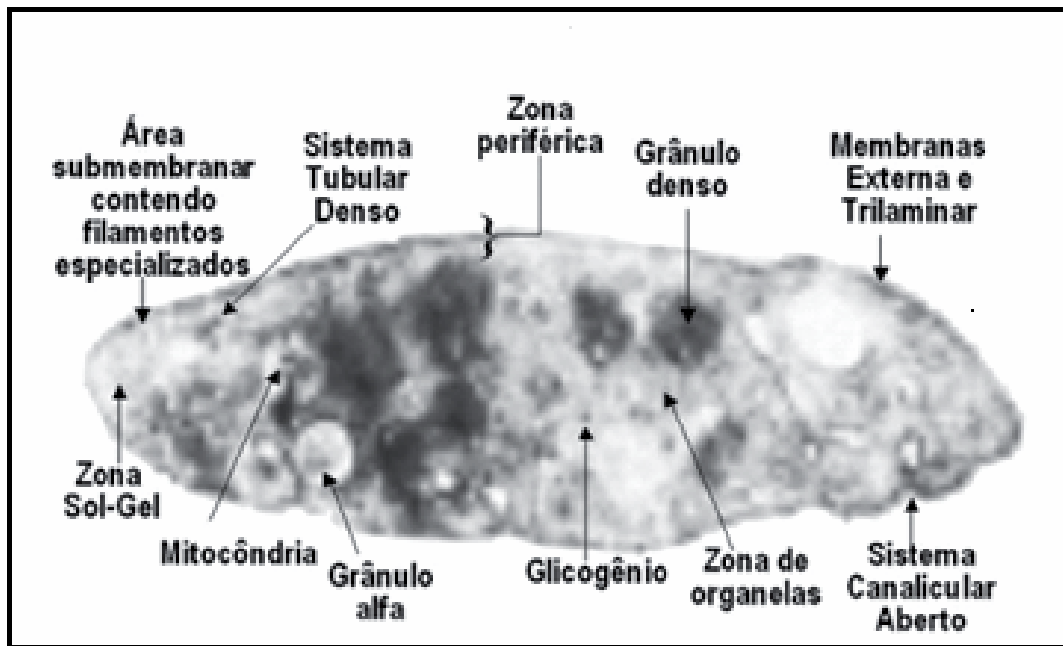
Na medula óssea a formação das plaquetas decorre de projeções citoplasmáticas do megacariócito através da barreira endotelial, atingindo a luz do sinusóide, onde as plaquetas são liberadas (Michelson, 2002).

A adequada concentração de plaquetas circulantes é mantida pela ação do fator estimulador de colônias megacariocíticas (CSF-Meg) induzindo a proliferação da stem cell pluripotente e pela trombopoetina, hormônio que influencia a maturação do megacariócito. A trombopoetina atua sinergicamente com outras citocinas, para aumentar o desenvolvimento do megacariócito (Wendling, 1999).

As plaquetas são fragmentos do citoplasma do megacariócito, de formato discóide, com diâmetro de 2,5µm e tamanho normal de 1,5 a 6,5µm, com vida média de 8-10 dias (Hartwing, 2002).

Quando vistas pela microscopia eletrônica, as plaquetas apresentam estrutura interna complexa, onde são reconhecidas três zonas estruturais, cada qual relacionada a um aspecto específico na função plaquetária (Castro et al., 2006).

A zona periférica está envolvida na adesão, a zona sol-gel na contração e a zona de organelas na secreção.

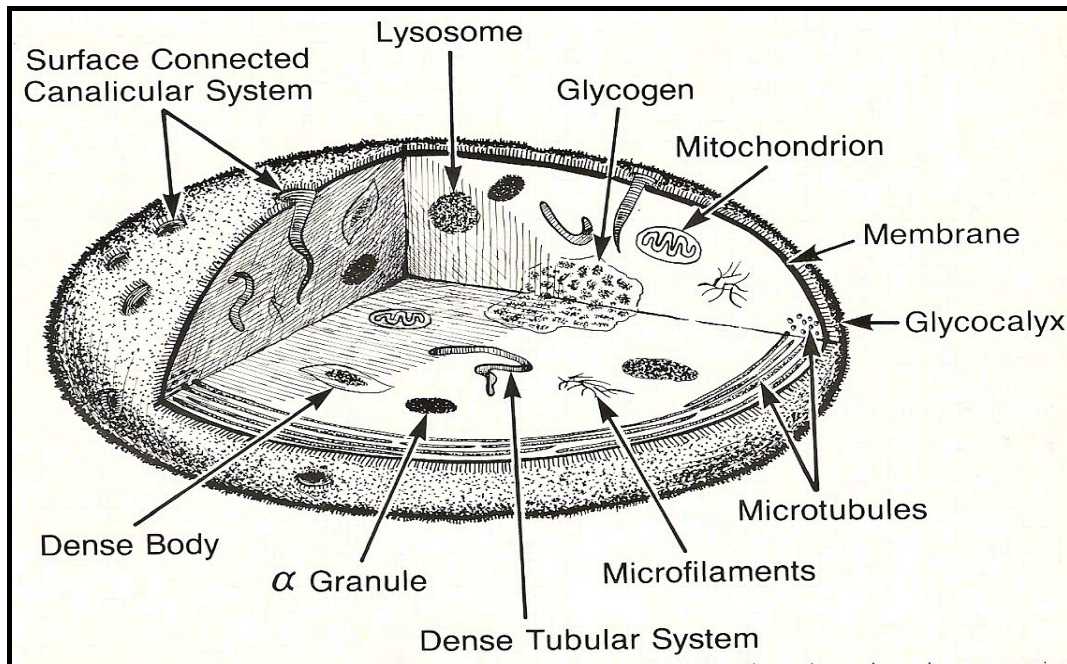


Fonte: Castro, H. C. et al., 2006.

Figura 1: Componentes e organização da plaqueta

A membrana celular lipoprotéica é composta por fosfolipídios, entre os quais se encontram colesterol, glicolipídios e glicoproteínas. O citoesqueleto contribui para manter a forma discóide das plaquetas não ativadas, sendo composto por um sistema circunferencial de microtúbulos de constituição protéica e por filamentos de actina (Hartwing, 2002; Castro et al., 2006).

O citoplasma contém organelas: mitocôndrias, lisossomos e grânulos denominados corpúsculos densos e grânulos- α . Os principais constituintes dos corpúsculos densos são: adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e cálcio; os grânulos- α secretam proteínas de coagulação e adesão, fatores de crescimento e proteases inibitórias envolvidas nos mecanismos hemostáticos: primário e secundário (Harrison et al., 1993; Reed, 2004).

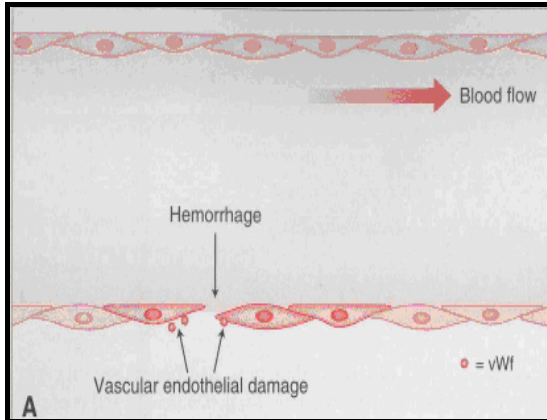


Fonte: Michelson, A.D., 2002.

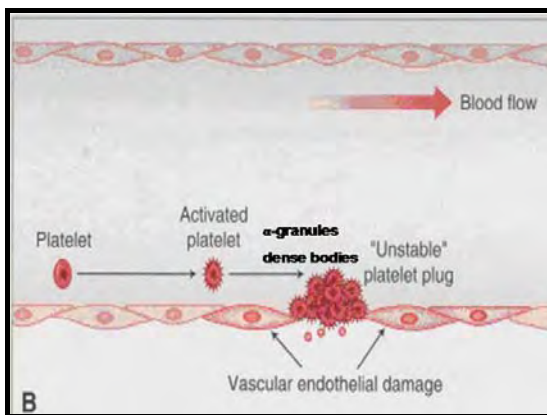
Figura 2: Estrutura Plaquetária

Quando um vaso sanguíneo é lesado as plaquetas ficam expostas ao colágeno e ocorre secreção de fator de von Willebrand que irá se ligar a uma proteína presente na membrana superficial das plaquetas, glicoproteína (GPIb). O fator de von Willebrand serve como ponte de ligação entre as plaquetas e o endotélio (Colman, 2006; Armitage, 2008).

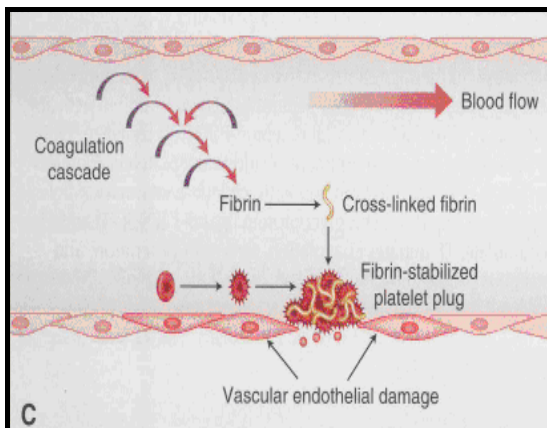
Após a adesão das plaquetas ao subendotélio novas plaquetas são ativadas e acabam aderindo-se umas as outras. Durante esta ativação, as plaquetas mudam sua forma, emitem pseudópodes e se agregam liberando grânulos plaquetários. Os grânulos α – plaquetários são responsáveis pela liberação dos fatores de crescimento (McNicol et al., 1999; Armitage, 2008).



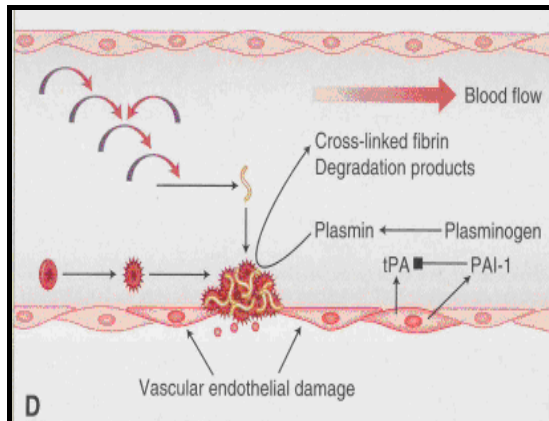
A - Adesão Plaquetária: em consequência de uma lesão vascular, as plaquetas rapidamente se ligam ao colágeno subendotelial exposto e ao fator de von Willebrand.



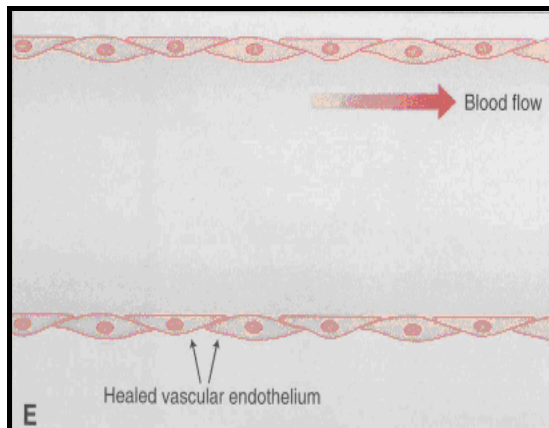
B – Ativação Plaquetária: depois de aderir ao local da lesão, as plaquetas são estimuladas por vários agonistas (colágeno, trombina, epinefrina, ADP e tromboxane A_2) a liberar seus grânulos- α e grânulos densos, o que promove mais recrutamento, ativação e agregação plaquetária.



C - Hemostasia Secundária: uma série de reações (cascata de coagulação) são desencadeadas concomitantemente com a formação do tampão plaquetário, resultando na geração de um coágulo de fibrina que estabiliza o tampão plaquetário.



D e E – O sistema fibrinolítico endógeno produz plasmina que degrada o coágulo de fibrina, limita o tamanho do trombo e degrada-o restabelecendo a integridade do vaso.



Fonte: Modificado de Armitage, J.O., 2008.

Figura 3: Clássico processo da hemostasia normal

No início dos experimentos com culturas de células a composição variável dos meios de cultura impedia a realização de repetidos experimentos nas mesmas condições (Helgason & Miller, 2005).

O primeiro meio quimicamente definido era constituído de sais, vitaminas, aminoácidos e carboidratos. Este meio era incapaz de garantir o crescimento celular sendo necessário a presença de fatores séricos. Nesta época acreditava-se que o soro era necessário para fornecer algum tipo de nutriente. Posteriormente descobriu-se que a função do soro no meio de cultura era fornecer fatores de crescimento, enquanto os nutrientes eram fornecidos pela parte quimicamente definida do meio de cultura (Armelin, 1975).

O soro bovino fetal é utilizado na realização de cultura de células “*in vitro*”. Os lotes de soros são originados de sangue total coagulado de lotes de abatedores oficiais. Cada soro produzido é testado como suplemento promotor do crescimento para meios definidos. A escolha de soro está relacionada com o tipo de linhagem celular, tipo de cultura, composição química do meio e objetos da investigação ou utilização (Armelin, 1975; Assis, et al., 2002).

A cultura celular é importante para a ciência e para o estudo de várias doenças, pois permite conhecer o comportamento e a função de populações isoladas de células (Assis et al., 2002).

Os fatores de crescimento regulam eventos como, síntese de DNA, quimiotaxia e citodiferenciação. O soro obtido do plasma rico em plaquetas é rico em fatores de crescimento originários dos grânulos α – plaquetários, uma vez que é liberado pela agregação e ativação das plaquetas (Anitua, 1999; Marx et al. 1998).

Fatores de crescimento constituem um conjunto de substâncias de natureza protéica, que regulam a proliferação celular. Esta regulação se dá

através do controle externo do ciclo celular, mediante abandono da quiescência celular (G0) e entrada da célula na fase G1 da mitose (Silva, 2009).

A função dos fatores de crescimento não é somente estimular a proliferação celular, mas também manter a sobrevivência celular, estimular migração celular, diferenciação celular e também apoptose. Atuam unindo-se a receptores situados na membrana celular, que transmitem o sinal do exterior para o interior da célula. O transporte ocorre sem consumo de energia, sendo passivo facilitado por sinalizadores celulares (Alberts, 2002).

Dentre os fatores de crescimentos derivados dos grânulos α -plaquetários destacam-se: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) e fator de crescimento similar à insulina (IGF) (Weibrich et al.; 2002).

✓ **P.D.G.F.**

PDGF é o principal fator de crescimento das plaquetas, por ser o primeiro a estar presente na ferida e guiar a revascularização, a síntese de colágeno e a regeneração óssea. Atua como importante mitogênico para a citodiferenciação e cicatrização de feridas. Este polipeptídeo é sintetizado, primariamente pelas granulações α – plaquetárias, embora possa ser produzido e secretado por macrófagos, células endoteliais, monócitos, fibroblastos e matriz óssea (Green, 1997; Kilian et al., 2004).

✓ **T G F – β**

Os fatores de crescimento de transformação beta (β) constituem família de mediadores locais que regulam a proliferação e as funções da maioria das células dos vertebrados (Lucarelli et al., 2003).

Seus efeitos nas células são variados, dependendo do tipo de célula afetada podem: suprimir proliferação celular, estimular síntese da matriz extracelular, estimular formação óssea ou atrair células por quimiotaxia (Koveker, 2000).

Os cinco membros desta família (TGF – β 1 a β 5) são proteínas com estruturas e funções semelhantes. As TGFs existentes e mais comuns no plasma rico em plaquetas são as TGF- β 1 e TGF- β 2, que são fatores de crescimento ligados com a cicatrização do tecido conjuntivo e a regeneração do tecido ósseo (Fréchette et al., 2005).

Este fator de crescimento tem similaridade de até 72% entre as estruturas β 1 e β 2. A estrutura β 1 é encontrada com abundância nas plaquetas, nos linfócitos e neutrófilos. O tipo β 2 é encontrado nos extratos ósseos, plaquetas e neutrófilos. As principais funções do TGF β 1 e β 2 são a quimiotaxia e a mitogênese dos osteoblastos precursores estimulando a formação óssea (Anitua, 1999; Marx, 2004).

✓ **I G F**

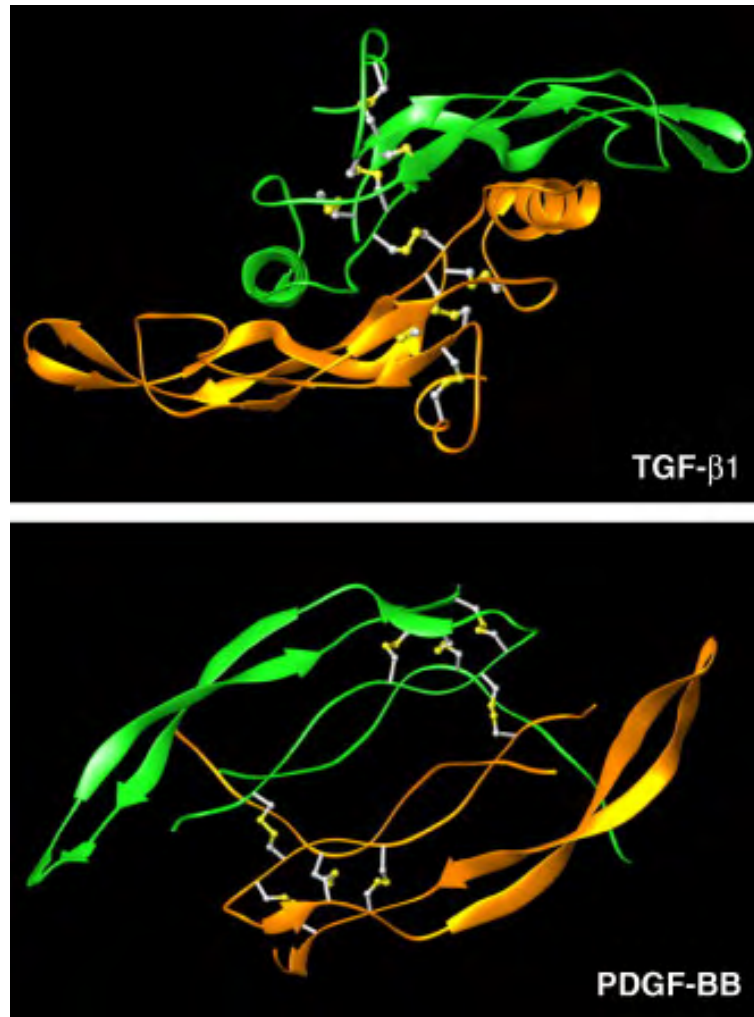
São fatores de crescimento secretados pelos osteoblastos durante a formação óssea para aumentar a osteogênese e acelerar a deposição óssea. Difere-se dos outros fatores de crescimento porque possui efeito endócrino similar aos da pró-insulina (Heldin, 1999).

Exercem efeitos sobre o metabolismo ósseo, tais como: promovem deposição de matriz óssea, estimulam mitogênese das células osteoblásticas, possuem atividade quimiotática para fibroblastos, osteoblastos e células progenitoras dos osteoclastos (Panagakos, 1993).

O PDGF e TGF são dímeros polipeptídicos que apresentam similaridade entre suas cadeias, as quais são unidas por pontes dissulfeto inter e intramoleculares (Alberts, 2002).

O PDGF apresenta-se com diferentes isoformas de pontes dissulfeto homo ou heterodímeras de cadeias polipeptídicas A e B. As cadeias contêm oito resíduos de cisteína e não é possível demonstrar grupos –SH livres na moléculas (Andersson et al., 1992).

O PDGF-B contêm três pontes dissulfeto intramoleculares, enquanto o dímero TGF- β contêm apenas uma única ponte dissulfeto intermolecular (Borkham-Kamphorst, et al., 2005).



Fonte: Kamphorst, E.B. et al., 2005.

Figura 5: Estrutura do TGF-β1 e PDGF-BB humano. As estruturas das subunidades individuais são mostradas em verde ou laranja e as pontes dissulfeto inter e intramoleculares são mostradas em branco e amarelo.

Estocagem Plaquetária

A estocagem prolongada das plaquetas a 22 °C são sabidamente prejudiciais à viabilidade e à função; mesmo quando estocadas em condições adequadas nos bancos de sangue estas sofrem transformações na morfologia com evidências de lesões na função e também na transformação da forma discóide para a forma esférica com diminuição das proteínas de adesão (Bunescu et al., 2001, Guerin & Burtet, 2006).

Plaquetas estocadas são utilizadas na transfusão para manter a hemostasia prevenindo hemorragias em pacientes com trombocitopenia, em pacientes em quimioterapias ou com defeito na função plaquetária (Rebulla, 2001).

Durante o período de estocagem observa-se perda gradual da função plaquetária, apresentando decréscimo da concentração do *glutathione* intraplaquetário em aproximadamente 50% em dois dias (Botchway et al., 2000).

Holme et al. em 1978 já correlacionavam quantidade de plaquetas discóides presentes no CP com a viabilidade plaquetária. Este teste foi descrito por Bertolini & Murphy em 1994, como *swirling*, cujo princípio é a reflexão da luz pelas plaquetas discóides.

Wagner & Robinette, 1996, descreveram o *swirling* como um raio de luz que incide sobre as plaquetas, sendo este refletido pelas plaquetas discóides. Os fatores que realizam as transformações das plaquetas da forma discóide para a esférica são: estocagem prolongada a 22 °C, exposição a pH abaixo de 6,7 e temperatura abaixo de 18 °C; estes fenômenos são redutores da viabilidade plaquetária (Murphy & Gardner, 1975 ; Holme et al., 1978).

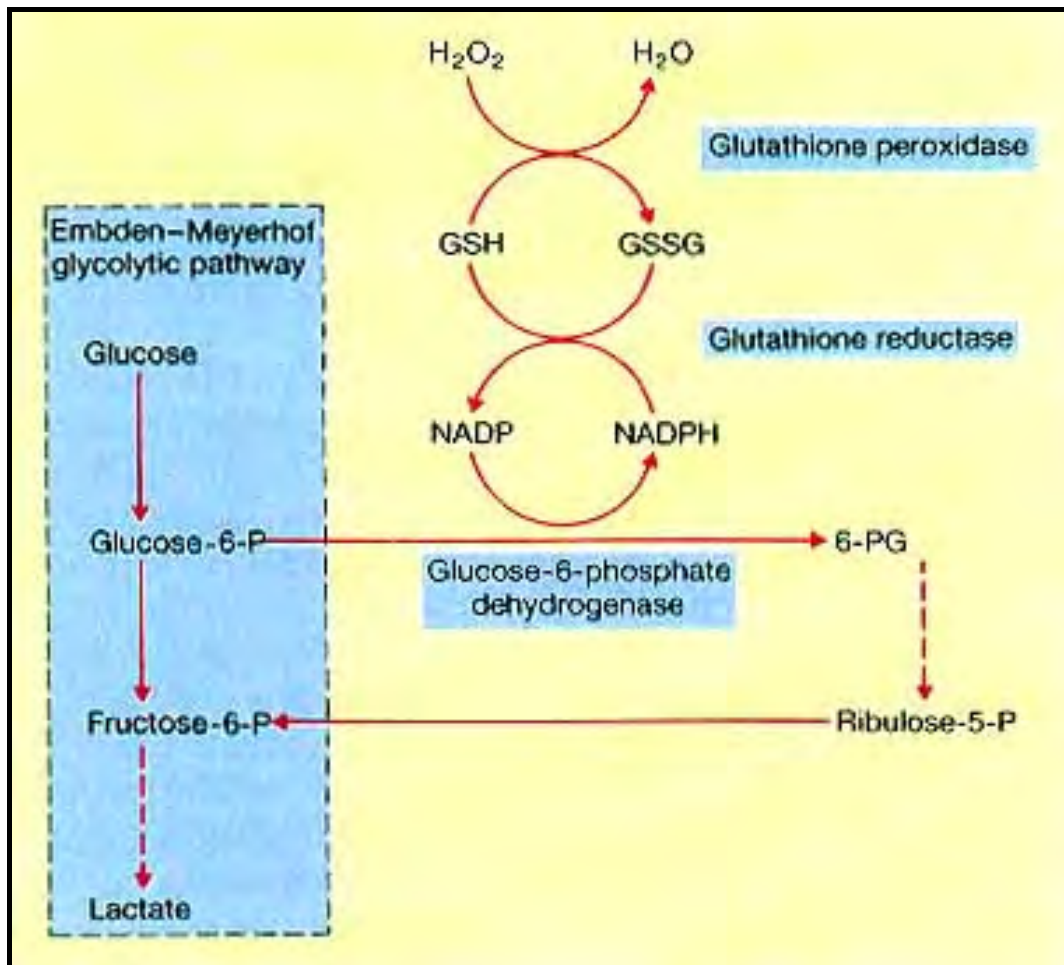
As lesões das plaquetas por estocagem podem depender de vários fatores biológicos; um destes fatores pode ser a perda do *glutation*, resultante da diminuição da proteção antioxidante das mesmas (Buchignani, 2002).

Nas plaquetas não estocadas estima-se que aproximadamente 95% do *glutation* plaquetário está na forma reduzida, representando proteção contra o stress oxidativo do qual resulta a perda do grupo –SH (Herving et al., 2001).

Durante a estocagem o –SH livre de superfície perde o H⁺ e forma pontes dissulfeto, devido a diminuição do *glutation* reduzido (Botchway et al., 2000; Herving, et al., 2001).

O *glutation* é um tripeptídeo constituído de glutamato, cisteína e glicina; possui atividade química através do grupo –SH. Apresenta-se normalmente na forma reduzida, porém pode oxidar-se formando pontes dissulfeto entre duas moléculas (Barraviera, 1987).

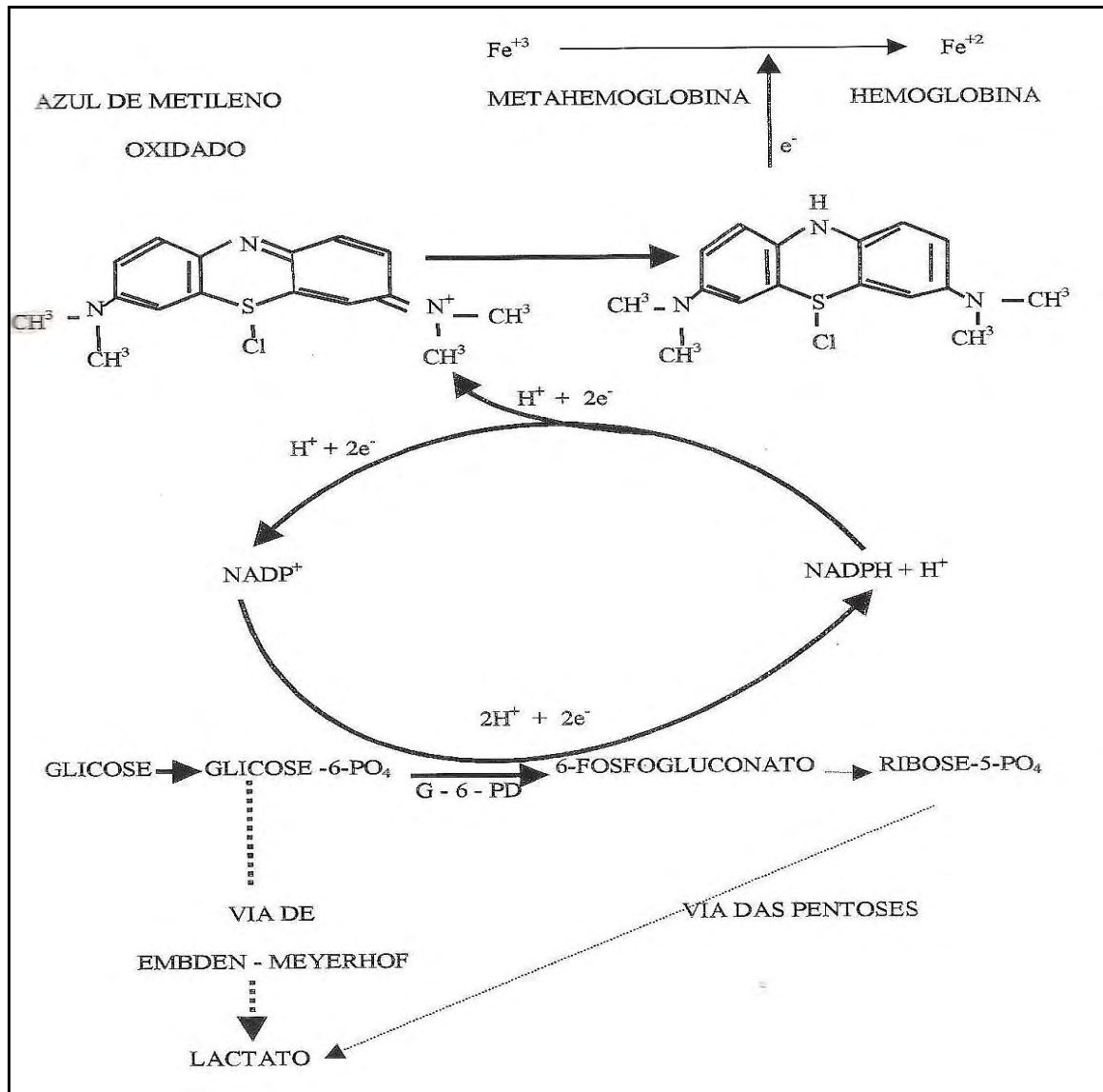
Têm como função manter intactos os grupamentos SH reativos das proteínas intraeritrocitárias. Para exercer sua atividade é necessário que se mantenha na forma de *glutation* reduzido (GSH), mas pode oxidar-se transformando em *glutation* oxidado (GSSG), sendo a *glutation* redutase enzima responsável pela transformação do GSSG em GSH através do *shunt* das pentoses (Beuzard, 1978; Machado, 1979).



Fonte: www.ciencianews.com.br/doencaeritro

Figura 6: Vias metabólicas do eritrócito: via aeróbica de Embden-Meyerhof e shunt das pentoses.

Nos glóbulos vermelhos o azul de metileno estimula a via das pentoses na redução do NADP em NADPH transformando-se em branco de metileno, sendo a glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) a porta de entrada para esta via de glicólise anaeróbica – via das pentoses (Barraviera, 1984).



Fonte: Barraviera, B., 1984.

Figura 7: Esquema da redução da metahemoglobina pelo azul de metileno.

A adição de azul de metileno nos concentrados de plaquetas leva a um aumento do *swirling* e conseqüentemente a um aumento da função plaquetária com resposta positiva ao teste de agregação pelo ADP (Buchignani, 2002).



swirling positivo: intensidade +



swirling positivo: intensidade ++



swirling positivo: intensidade +++



swirling positivo: intensidade ++++

Fonte: Buchignani, M.R., 2002

Figura 8: Bolsas de concentrado de plaquetas com *swirling* positivo em diferentes intensidades.

Objetivo



Verificar a eficácia do soro proveniente de plasma rico em plaquetas, estocado ou não, em relação ao soro bovino fetal.

Material e Métodos



Culturas de células mononucleares do sangue periférico foram realizadas utilizando-se como fonte de fatores de crescimento soro proveniente de plasma rico em plaquetas e soro bovino fetal, com o intuito de verificar a eficácia do soro rico em plaquetas em relação ao soro bovino fetal.

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram escolhidas para este estudo por se tratar de células de fácil obtenção, no intuito de investigar os efeitos dos fatores de crescimento derivados de plaquetas na proliferação celular.

1) Coleta de sangue e obtenção do PRP

Indivíduos saudáveis, doadores de sangue, com idade entre 20 e 30 anos, após explicação e aceitação do termo de consentimento livre e esclarecido (aprovado pelo CEP – nº protocolo 3536-2010) foram submetidos à doação de sangue para obtenção do PRP e SPRP.

A coleta de sangue consiste na retirada de cerca de 450ml de sangue com uso de material descartável e estéril. As bolsas de sangue total coletadas foram processadas de acordo com a Resolução da Anvisa RDC nº 24, de 24 de janeiro de 2002.

O processamento das bolsas foi realizado de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) das seções de Coleta e Componentes Lábeis descrevendo processos que minimizam a contaminação dos hemocomponentes, obtidos por centrifugação separando sangue total em hemocomponentes eritrocitários, plasmáticos e plaquetários.

Em função das diferentes densidades e tamanhos das células sanguíneas, o processo de centrifugação possibilita a separação do sangue total em camadas, sendo que as hemácias ficam depositadas no fundo da bolsa. Acima delas forma-se o *buffy coat*, ou seja, uma camada de leucócitos. Acima do *buffy coat* fica a camada de plasma que contém plaquetas dispersas.

O PRP extraído em bolsa satélite foi subdividido em 3 frações: uma foi recalcificada imediatamente para obtenção do soro; a outra foi estocada por cinco dias para a etapa de recuperação das plaquetas e a terceira parte foi centrifugada novamente para concentração de plaquetas e em seguida recalcificada para obtenção do soro.

2) Recalcificação para obtenção do Soro de Plasma Rico em Plaquetas (SPRP)

O plasma rico em plaquetas obtido pela coleta do sangue total é coagulado para obter o soro de plasma rico em plaquetas. Este processo é chamado recalcificação do plasma.

Em capela de fluxo laminar o PRP de cada doador é transferido para tubos cônicos de 50ml e o conteúdo dividido em três partes.

O primeiro terço é recalcificado imediatamente. O segundo é estocado a 22°C (temperatura meio ambiente) sob agitação constante por cinco dias e o terceiro centrifugado a rotação de 6.000rpm por 5 minutos a 22 °C para concentrar plaquetas e logo em seguida recalcificado.

Retira-se 2/3 do sobrenadante (PPP) resultando numa concentração três vezes maior no número de plaquetas. As contagens de plaquetas dos

PRP e dos PRP concentrados foram realizadas em analisador hematológico automatizado - PENTRA DX 120 (HORIBA).

A recalcificação do plasma consiste em adicionar 1ml de solução de cloreto de cálcio 2M para cada 100ml de plasma. O plasma é homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 12 horas e em seguida mais 12 horas em geladeira 2-6°C.

Após incubação os tubos foram centrifugados a 5.000rpm (*Sanyo Mistral*) por 10 minutos a 4°C. Em seguida o soro foi aliquotado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80 °C.

3) Recuperação das plaquetas

Após cinco dias de estocagem o plasma rico em plaquetas sofreu revitalização com azul de metileno para recuperação da função plaquetária.

A dose utilizada no experimento foi à mesma utilizada no trabalho de Buchignani, 2002. Adiciona-se 10µl de azul de metileno 0,015% para cada 500µl do PRP e os tubos permanecem incubados em estufa a 37°C durante noventa minutos.

Após incubação realizou-se a recalcificação do plasma rico em plaquetas conforme descrito acima.

4) Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico

As culturas foram realizadas diferenciando-se umas das outras em relação ao suplemento promotor de fatores de crescimento ao meio de cultura celular. Soro bovino fetal e soro de plasma rico em plaquetas com diferentes concentrações de fatores de crescimento foram testados.

4.1) Obtenção de células mononucleares para cultura

Um volume de 20ml de sangue periférico foi colhido por punção venosa e colocado em tubo estéril contendo 20µl de heparina (Liquemine-Roche). O procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar na sua totalidade para evitar contaminação das culturas.

As células mononucleares foram obtidas por meio de separação em gradiente de Ficoll-Hypaque, segundo técnica descrita por Boyum et al. (1967).

O sangue é inicialmente centrifugado a 1500rpm por 10 minutos; o plasma desprezado e a camada de glóbulos brancos e pequena porção de glóbulos vermelhos transferidas para tubo cônico estéril.

Adiciona-se 3ml de meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) às células, seguido de homogeneização suave. Paralelamente em outro tubo cônico estéril são adicionados 3ml de Histopaque (SIGMA Chemical, Co., Mo., USA) e com auxílio de uma pipeta Paster adiciona-se lentamente pela parede do tubo o sangue acrescido de RPMI, até atingir o dobro do volume do Histopaque. A amostra é centrifugada a 1800rpm por 15 minutos.

Após centrifugação retira-se o anel de células formado na interfase Histopaque-RPMI, colocando-o em novo tubo cônico estéril. Completa-se o volume com RPMI para 14ml e as células são centrifugadas novamente por 10 minutos a 1800rpm.

O sobrenadante é desprezado e o *pellet* desagregado por agitação manual. Acrescenta-se 1ml de RPMI ao *pellet* acompanhado de homogeneização suave. Para avaliar a viabilidade celular as células (PBMC) foram contadas com Azul Tripan em diluição de 1:5 em RPMI.

Adiciona-se 200µl de meio RPMI em 50µl das células (*pellet* + RPMI) e 50µl de azul tripan em microtubo de 1,5ml; incuba-se por 2 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as células são colocadas em câmara Neubauer e avalia-se a viabilidade. A concentração das PBMC é ajustada para 2×10^6 /ml em meio RPMI.

Em seguida são colocadas 100µl das células em cada poço de placa de cultura de 96 poços, juntamente com os variados tipos de soro + meio RPMI, perfazendo um volume final de 200µl em cada poço, de acordo com o esquema abaixo:

Esquema 1: Representação das culturas realizadas em placas de 96 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
B	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
C	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%
D	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%
E	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
F												
G												
H												

SBF		SPRP		SPRPE		SPRPC
-----	--	------	--	-------	--	-------

5% - 10µl soro + 90µl RPMI

10% - 20µl soro + 80µl RPMI

20% - 40µl soro + 60µl RPMI

40% - 80µl soro + 20µl RPMI

50% - 100µl soro

As placas foram incubadas por 72 horas a 37 °C e 5% CO₂. Ao final do segundo dia de incubação adicionou-se 1µg/mL de MTT (SIGMA Chemical, Co., Mo., USA) em cada poço e incubou-se *overnight* a 37 °C e 5% CO₂.

No dia seguinte as placas foram centrifugadas a 1500rpm, o sobrenadante retirado e adicionado 0,1ml de DMSO (SIGMA Chemical, Co., Mo., USA) para solubilizar as células. As placas foram agitadas suavemente por aproximadamente 5 minutos para a solubilização total dos cristais de *formazan* e foi realizada a leitura das densidades ópticas em espectrofotômetro (MD5000, Dynatech Lab. Inc., Chantilly, USA) a 540nm.

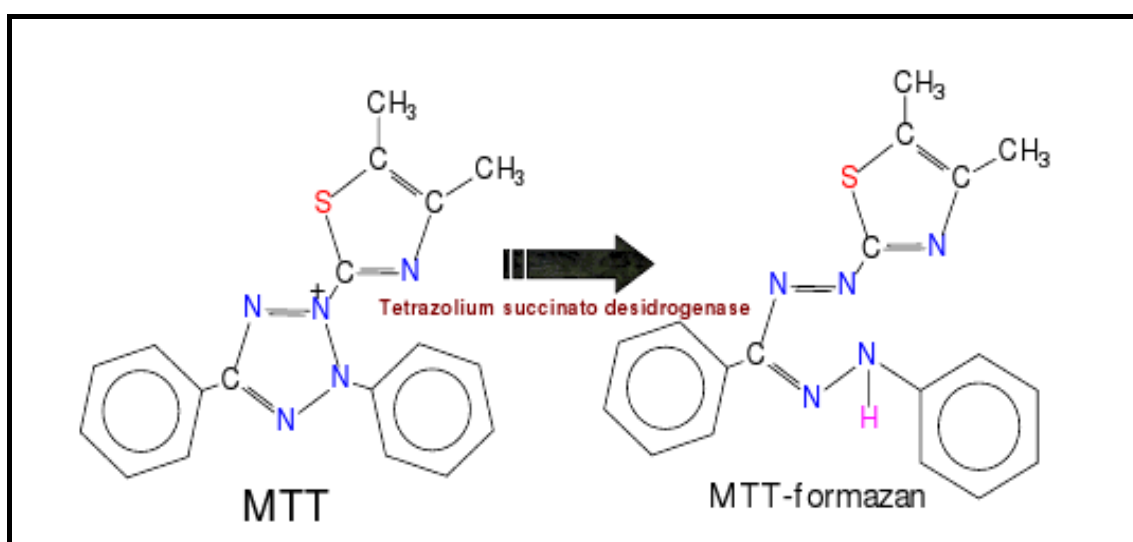
4.2) Avaliação da viabilidade, apoptose e necrose celular

Para avaliação da proliferação celular das culturas utilizou-se o método 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), que tem capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula; e a técnica de citometria de fluxo, para avaliação de morte celular (apoptose e necrose) por meio de marcadores celulares (Berridge et al., 1996).

O teste do MTT é um método colorimétrico proposto por Mosmann (1983), cujo princípio baseia-se na redução do sal brometo de 3-(4,5-

dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em um produto de coloração azul escuro-arroxeadado (MTT-*formazan*) pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato desidrogenase (Maciel, 2002).

A conversão ocorre somente em células viáveis e a quantidade do produto MTT-*formazan* é proporcional ao número de células vivas presentes (Vistica et al., 1991).



Fonte: Maciel, E.V.M., 2002.

Figura 9: Redução do MTT a MTT-*formazan* através da enzima tetrazolium-succinato desidrogenase.

Citometria de Fluxo consiste em tecnologia que mede e analisa simultaneamente características físicas e biológicas de partículas individuais, geralmente células, à medida que as mesmas passam por um feixe de luz através de um meio fluido (Bacal & Falhauer, 2003).

Os parâmetros verificados são: *FSC* (*Forward Scatter*) – ângulo de dispersão frontal, que caracteriza o tamanho celular; *SSC* (*Side Scatter*) – ângulo de dispersão lateral, que confere informações sobre a complexidade interna da célula (Loken et al, 2000).

Estes parâmetros permitem que sejam formados *dot plots* (gráficos de pontos) avaliando tamanho celular *versus* complexidade interna. Desta forma pode-se distinguir populações celulares, selecionando apenas a(s) população(ões) de interesse, para posterior verificação da expressão de fluorescência emitidas pelas mesmas (Golim, 2004).

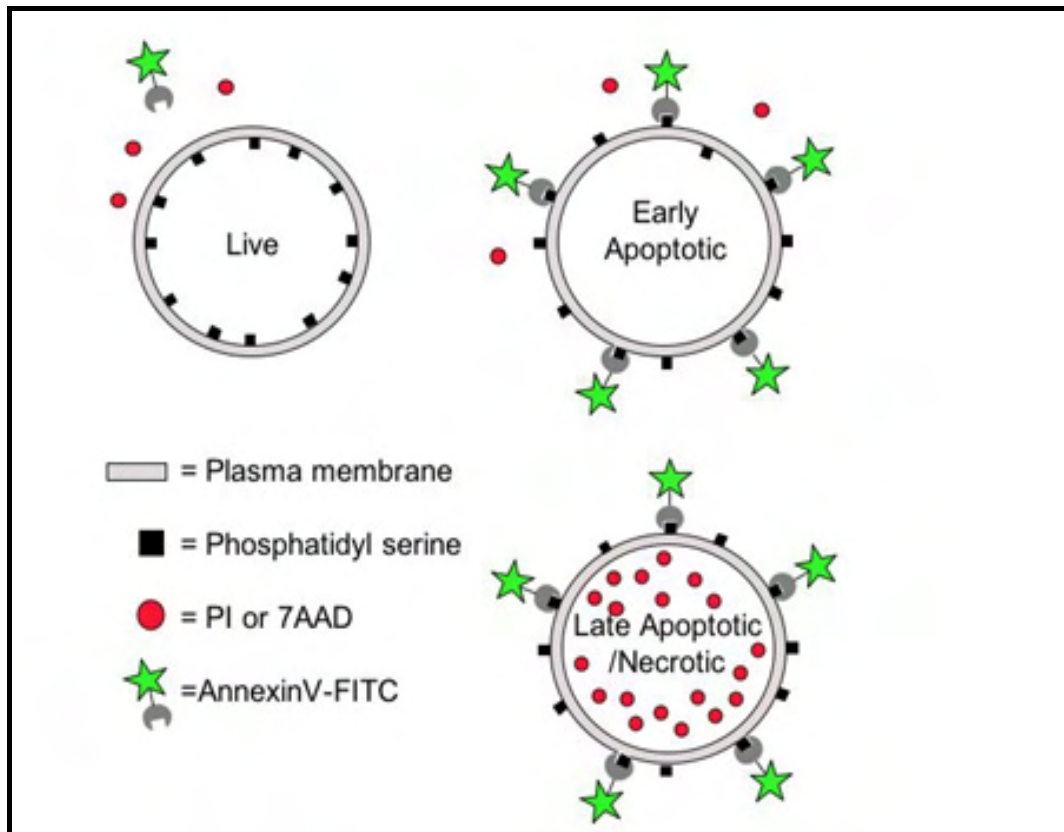
Quando células são mantidas em cultura à medida que os nutrientes do meio vão diminuindo com o decorrer do tempo sem que haja reposição do mesmo, ocorre diminuição do aporte energético e dos estímulos, sendo observada morte celular (Silva, 1994).

Na fase inicial da morte celular por apoptose a membrana celular permanece intacta. A necrose por outro lado é acompanhada pelo aumento da permeabilidade de membrana e edema celular com perda da integridade da membrana celular e fuga dos constituintes celulares para o meio extracelular (Span et al., 2002).

Nos estágios iniciais da apoptose ocorrem alterações na superfície da célula. Uma destas alterações é a translocação da fosfatidilserina (PS) do lado interno da membrana plasmática para o lado externo (Gerke et al., 2002).

A anexina V é uma proteína com propriedade biológica de ligação a fosfolípidos de maneira cálcio dependente. Por esta razão esta proteína pode ser utilizada como uma sonda sensível para detectar fosfatidilserina exposta na membrana celular (Seaton et al., 1998). Acoplando um fluorocromo, como isotiocianato de fluoresceína (FITC) à Anexina V, esta ao ligar-se à fosfatidilserina na membrana das células em fase inicial de apoptose, forma um complexo útil na identificação deste processo (Vermees et al., 1995).

O iodeto de propídeo, composto naturalmente fluorescente, tem a capacidade de integrar-se às bases moleculares do DNA, corando o núcleo celular. Assim, é possível distinguir células com membrana degradada, pois o corante terá acesso ao DNA para ligar-se, de células integras, nas quais o corante não entrará (Span et al., 2002).



Fonte: www.proto.ufsc.br/downloads/citometria_de_fluxo_curso_verao_pdf.

Figura 10: Esquema do ensaio de Anexina/Iodeto de Propídeo por citometria de fluxo para identificação de estágios iniciais de apoptose celular.

As culturas para a realização dos testes de apoptose e necrose por citometria de fluxo foram preparadas de acordo com o descrito no esquema nº1, exceto o fato de serem realizadas em tubos específicos para leitura em citômetro.

As culturas preparadas em tubos foram incubadas 72 horas a 37 °C e 5% CO₂. Ao final do terceiro dia de incubação, as amostras foram lavadas diretamente com 200µl de tampão de Anexina e centrifugadas a 1700rpm por 10 minutos. Em seguida retirou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em 100µl do mesmo tampão de ligação.

Posteriormente adicionou-se 5µl de Anexina V e 5µl de Iodeto de Propídeo. Os tubos foram vortexados e incubados por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente.

Acrescentou-se 400µl do mesmo tampão de ligação de Anexina e realizou-se leitura no citômetro de fluxo.

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur™ (BD) constituído de laser de íon argônio (488nm) fazendo uso do programa CellQuest™ (BD). A população celular de interesse (linfócitos) foi selecionada em gráficos *dot plot* pelos parâmetros de FSC (*Forward Scatter*) versus SSC (*Side Scatter*), seguindo à análise das fluorescências em *dot plot* de FL1 (detector de fluorescência verde – Anexina) versus FL3 (detector de fluorescência vermelha – PI). Os resultados são expressos em percentual de fluorescência positiva, distinguindo células viáveis (AV⁻/PI), células em processo inicial de apoptose (AV⁺/PI⁻); células em necrose ou em apoptose tardia (AV⁺/PI⁺).

5) Avaliação da viabilidade celular (MTT), apoptose e necrose celular (Anexina V/Iodeto Propídeo) com variação do tempo de incubação com azul de metileno

Foram coletados 450ml de sangue total de dois indivíduos jovens por método convencional de doação de sangue. O conteúdo da bolsa de PRP foi

distribuído em tubos cônicos de 50ml de tal modo num total de sete alíquotas. A primeira parte foi recalcificada imediatamente e as outras seis alíquotas incubadas com azul de metileno em diferentes tempos, conforme ilustrado abaixo:

- 1º tempo incubação: 1 hora e meia.
- 2º tempo incubação: 3 horas.
- 3º tempo incubação: 4 horas e meia.
- 4º tempo incubação: 6 horas.
- 5º tempo incubação: 7 horas e meia.
- 6º tempo incubação: 24 horas.

Após incubação com azul de metileno foi realizada recalcificação de todas as amostras conforme protocolo já descrito.

Os soros obtidos foram colocados em cultura em paralelo com soro bovino fetal, em placas de 96 poços, conforme o esquema a seguir:

Esquema 2: Representação das culturas realizadas em placas de 96 poços.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
B	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%
C	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
D												
E	SBF			SPRPE S/ AM			SPRPE 1.5h			SPRPE 3h		
F	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%	10%
G	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%	20%
H	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
SPRPE 4,5h				SPRPE 6h			SPRPE 7,5h			SPRPE 24h		

10% - 20µl soro + 80µl RPMI

20% - 40µl soro + 60µl RPMI

50% - 100µl soro

Paralelamente foram preparadas culturas em tubos para a realização dos testes de apoptose e necrose por citometria de fluxo.

6) Estocagem dos soros com hemácias e azul de metileno

O sistema de óxido-redução está ausente no soro, função exercida pelo azul de metileno. Desta forma hemácias foram adicionadas aos soros para realizar oxido-redução e liberar elétrons para redução das pontes dissulfeto.

Para realização desta etapa foram coletados 15ml de sangue em tubo com EDTA de um indivíduo saudável e o hematócrito ajustado para 20%. A quantidade de sangue correspondente ao hematócrito de 20% foi colocada em seis tubos. Posteriormente os tubos foram centrifugados à baixa rotação para sedimentar as hemácias.

O sobrenadante é retirado, permanecendo somente as hemácias no fundo do tubo. O volume final de 5ml é completado com soro bovino fetal, soro rico em plaquetas e soro estocado, respectivamente.

Acrescenta-se azul de metileno e os tubos são incubados por 1 hora e meia e 7 horas e meia.

Após incubação os tubos são novamente centrifugados e o sobrenadante congelado para realização das culturas, conforme o esquema:

Esquema 3: Representação de cultura realizada em placa de 96 poços

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10%	10%	10%		10%	10%	10%		10%	10%	10%	
B	20%	20%	20%		20%	20%	20%		20%	20%	20%	
C	50%	50%	50%		50%	50%	50%		50%	50%	50%	
D	SBF				SBF 1,5h				SBF 7,5h			
E												
F	10%	10%	10%		10%	10%	10%		10%	10%	10%	
G	20%	20%	20%		20%	20%	20%		20%	20%	20%	
H	50%	50%	50%		50%	50%	50%		50%	50%	50%	
	SPRP				SPRP 1,5h				SPRP 7,5h			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10%	10%	10%		10%	10%	10%		10%	10%	10%	
B	20%	20%	20%		20%	20%	20%		20%	20%	20%	
C	50%	50%	50%		50%	50%	50%		50%	50%	50%	
D												
E												
F												
G												
H												
	SPRPE				SPRPE 1,5h				SPRPE 7,5h			

10% - 20µl soro + 80µl RPMI

20% - 40µl soro + 60µl RPMI

50% - 100µl soro

Paralelamente foram preparadas culturas em tubos, seguindo o mesmo modelo acima, para realização do teste de apoptose e necrose pelo método de citometria de fluxo.

Resultados



1) Viabilidade celular em resposta ao SBF

Foram realizadas culturas de células mononucleares do sangue periférico de jovens saudáveis com idade entre 20 - 30 anos, utilizando-se soro bovino fetal em diferentes concentrações.

As médias das densidades ópticas obtidas dos experimentos pelo método do MTT foram registradas em gráfico de coordenadas cartesianas, sendo as concentrações do SBF na abscissa e a D.O. no eixo das ordenadas.

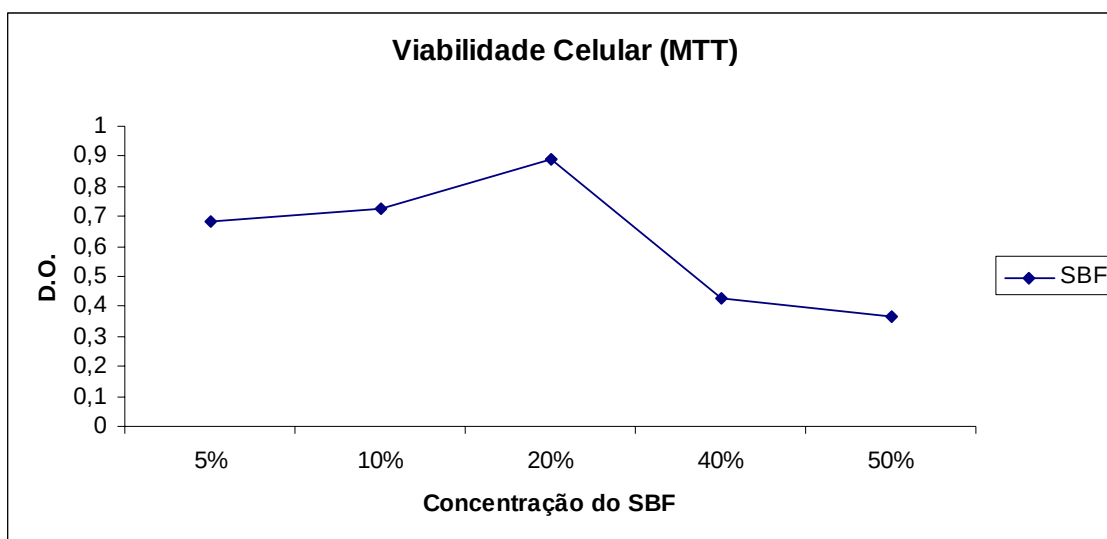


Gráfico 1: Ensaio de 72 horas realizado em quadriplicata com células sanguíneas mononucleares de doador jovem utilizando-se SBF em diferentes concentrações. ($\bar{x}$ dos resultados de D.O.)

2) Morte celular e apoptose em diversas concentrações do SBF

Avaliou-se apoptose e morte celular de cultura de células obtidas de doador jovem, faixa etária 20-30 anos, pelo método de citometria de fluxo com Anexina V e Iodeto de Propídeo.

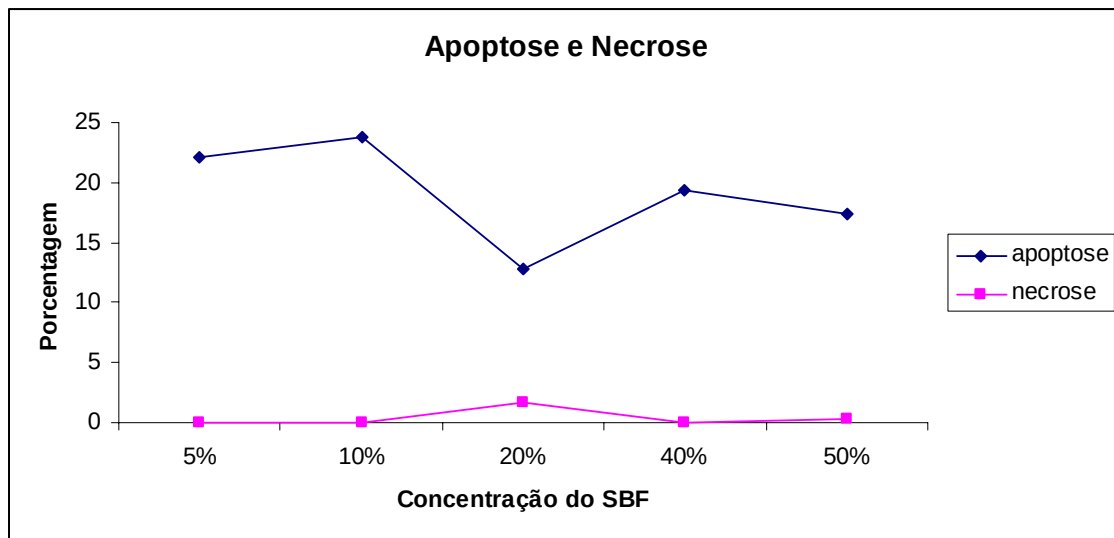


Gráfico 2: Ensaio de 72 horas realizado em quadriplicata com células sanguíneas mononucleares de doador jovem utilizando-se SBF em concentrações diferentes. ($\bar{x}$ do percentual de apoptose e necrose celular)

Após estes ensaios foram realizadas culturas de células mononucleares de sangue periférico de doadores jovens, utilizando-se diferentes tipos de soros, autólogos ou homólogos, em concentrações variadas.

As PBMC foram colocadas em cultura utilizando-se soro bovino fetal (SBF), soro de plasma rico em plaquetas (SPRP), soro de plasma rico em plaquetas concentrado (SPRPC) e soro de plasma rico em plaquetas estocado (SPRPE) incubado com azul de metileno.

As culturas foram autólogas, soros e células obtidos de uma mesma pessoa, ou homólogos, soro de uma pessoa e células de outra da mesma faixa etária.

As densidades ópticas obtidas pelo método do MTT e a porcentagem de células mortas obtidas pela técnica de citometria de fluxo para estes experimentos foram registradas nos gráficos 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

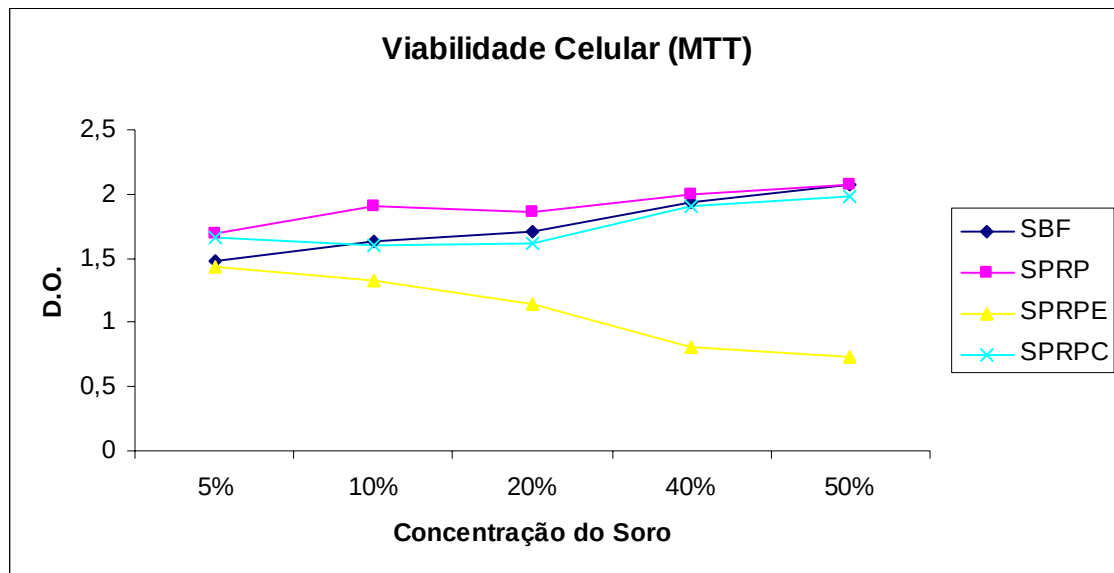


Gráfico 3: $\bar{X}$ das densidades ópticas dos ensaios autólogos realizados em triplicata com 72 horas de incubação.

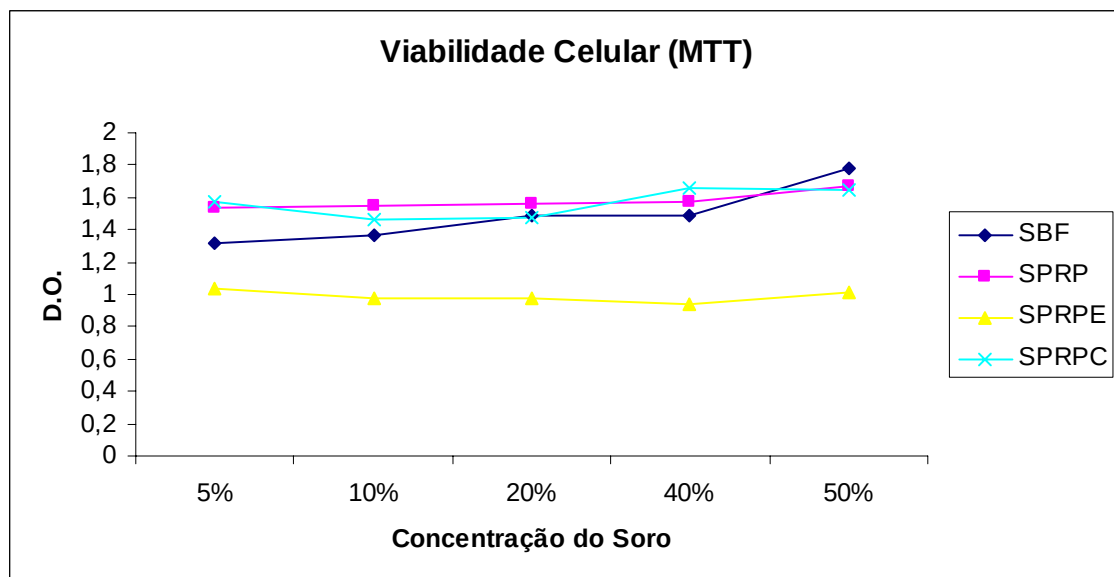


Gráfico 4: $\bar{X}$ das densidades ópticas dos ensaios homólogos realizados em triplicata com 72 horas de incubação.

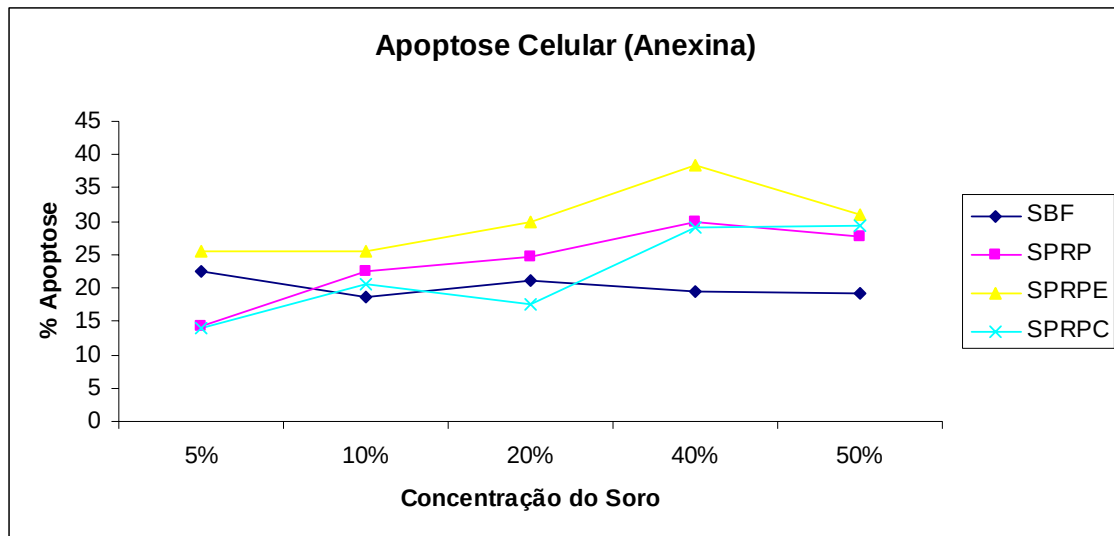


Gráfico 5: $\bar{X}$ de eventos de apoptose celular dos ensaios autólogos realizados em duplicata com 72 horas de incubação.

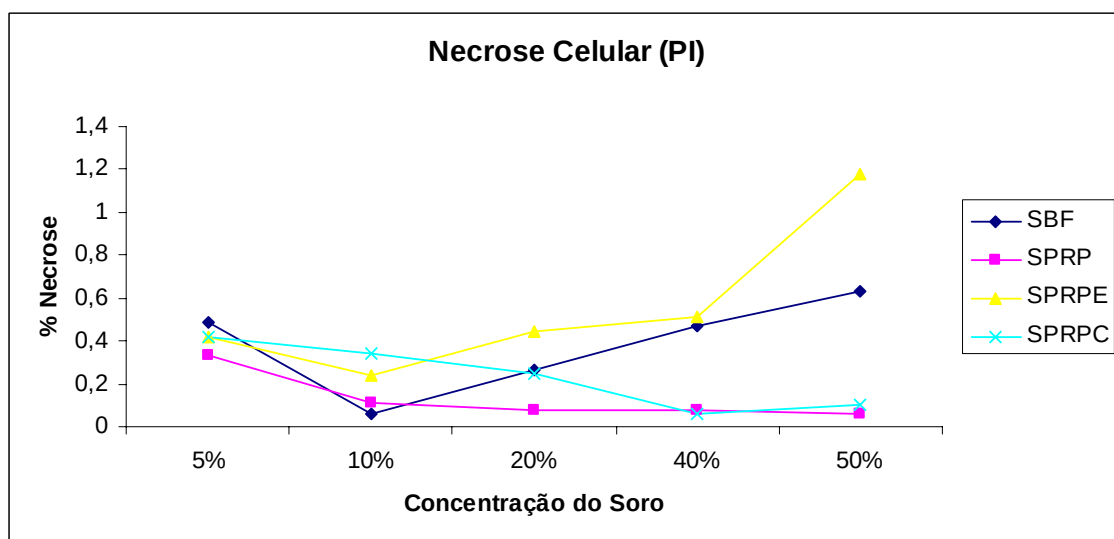


Gráfico 6: $\bar{X}$ de eventos de necrose celular dos ensaios autólogos realizados em duplicata com 72 horas de incubação.

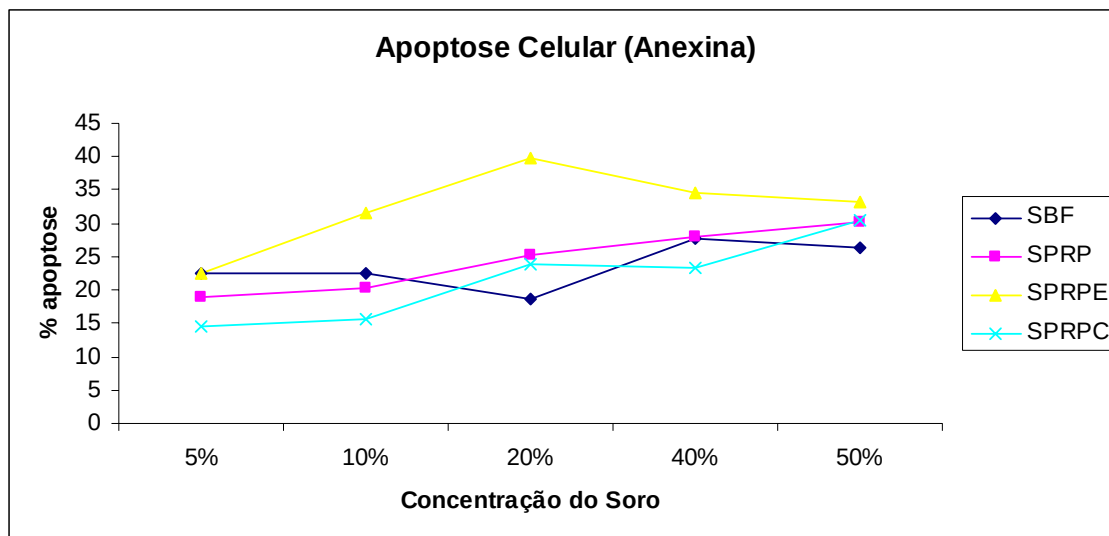


Gráfico 7: $\bar{X}$ de eventos de apoptose celular dos ensaios homólogos realizados em duplicata com 72 horas de incubação.

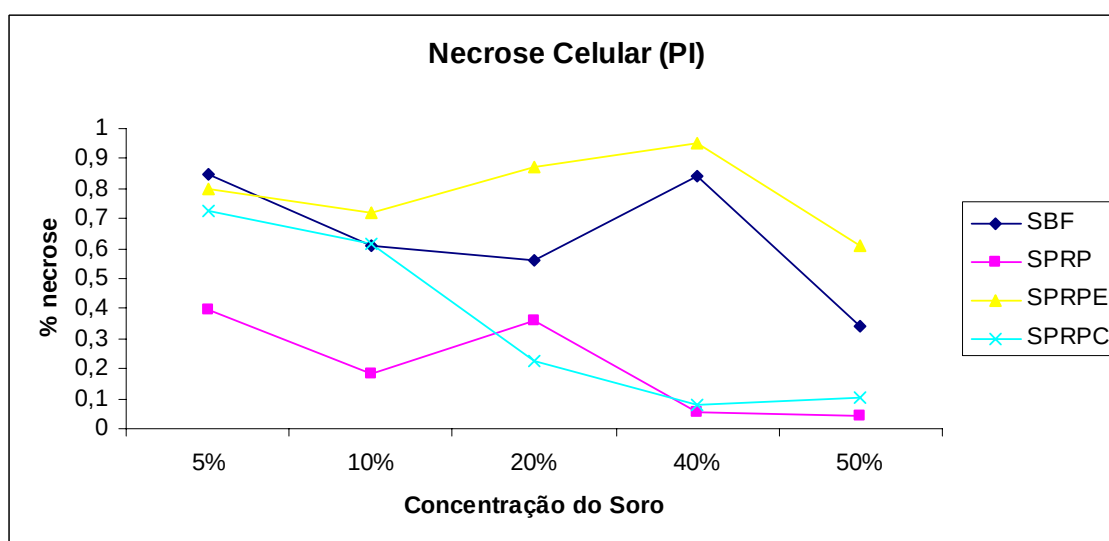


Gráfico 8: $\bar{X}$ de eventos de necrose celular dos ensaios homólogos realizados em duplicata com 72 horas de incubação.

Realizou-se posteriormente ensaio de cultura celular utilizando-se soro bovino fetal (SBF), soro de plasma rico em plaquetas estocado (SPRPE) em paralelo com soro de plasma rico em plaquetas estocado (SPRPE) incubado com azul de metileno.

Neste ensaio incubou-se o soro de plasma rico em plaquetas estocado por cinco dias com azul de metileno em tempos diferentes para observação do desempenho das células viáveis, apoptose e necrose na cultura de PBMC.

Os resultados são observados nos gráficos 9, 10 e 11.

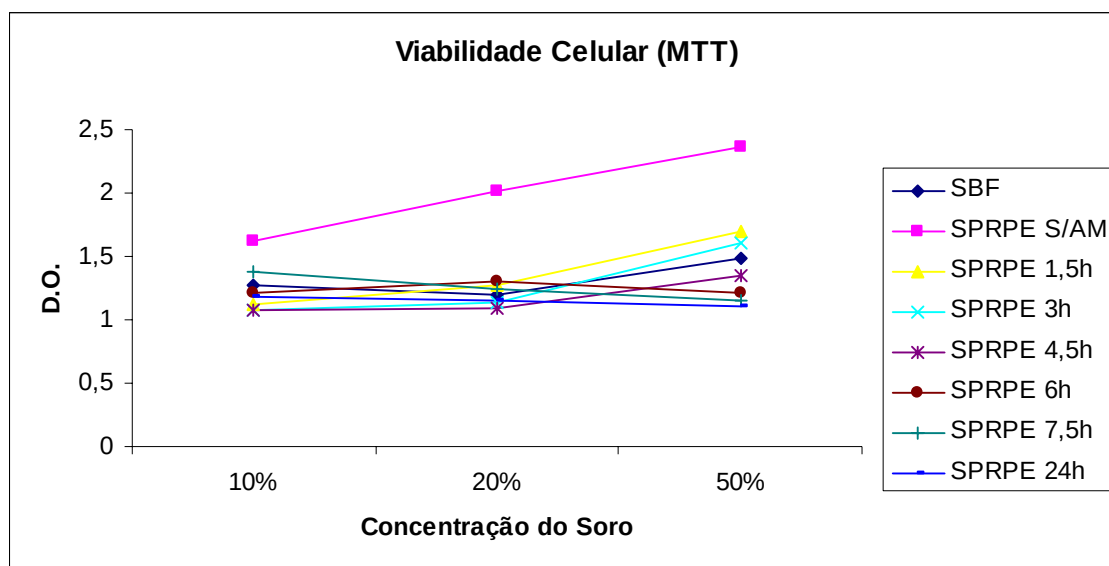


Gráfico 9: $\bar{X}$ das densidades ópticas de ensaio realizado em triplicata utilizando-se SBF, SPRPE sem incubação com azul de metileno e SPRPE com incubação com azul de metileno.

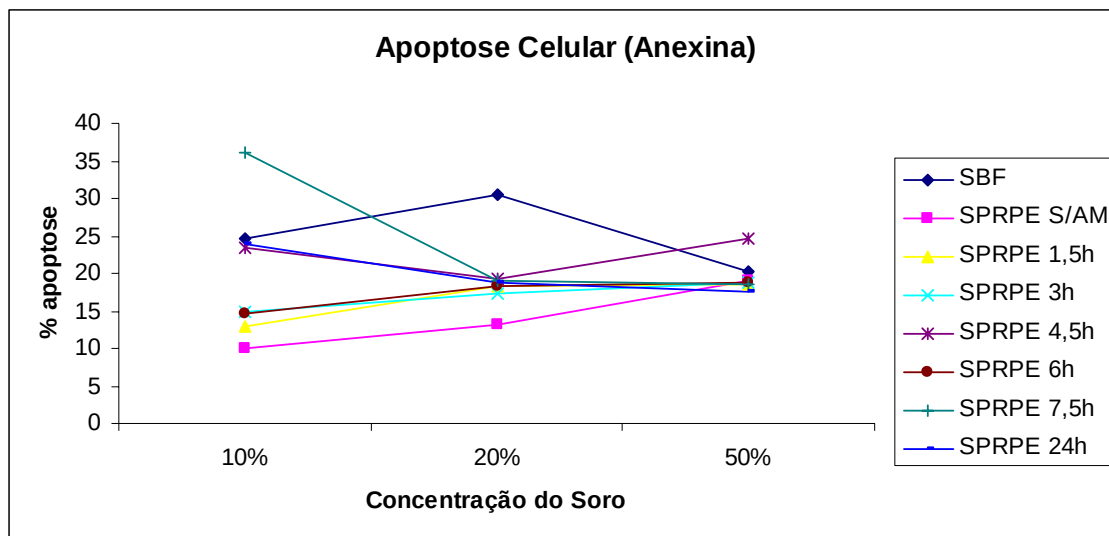


Gráfico 10: $\bar{X}$ de eventos de apoptose celular de ensaio realizado em duplicata utilizando-se SBF, SPRPE sem incubação com azul de metileno e SPRPE com incubação com azul de metileno.

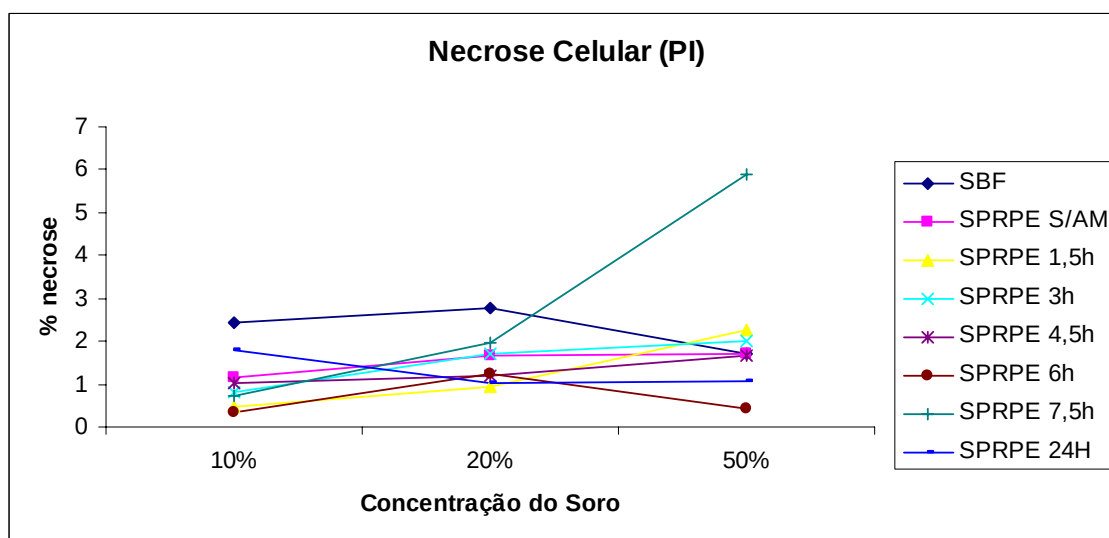


Gráfico 11: $\bar{X}$ de eventos de necrose celular de ensaio realizado em duplicata utilizando-se SBF, SPRPE sem incubação com azul de metileno e SPRPE com incubação com azul de metileno.

Optou-se por realizar culturas com soro bovino fetal, soro de plasma rico em plaquetas estocado por cinco dias e soro de plasma rico em plaquetas incubado com hemácias e azul de metileno a fim de observar melhor ação dos fatores de crescimento em plaquetas que recuperaram sua função de agregação.

A viabilidade celular das culturas foi analisada pelo método MTT; apoptose e necrose celular por citometria de fluxo e os resultados registrados nos gráficos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20.

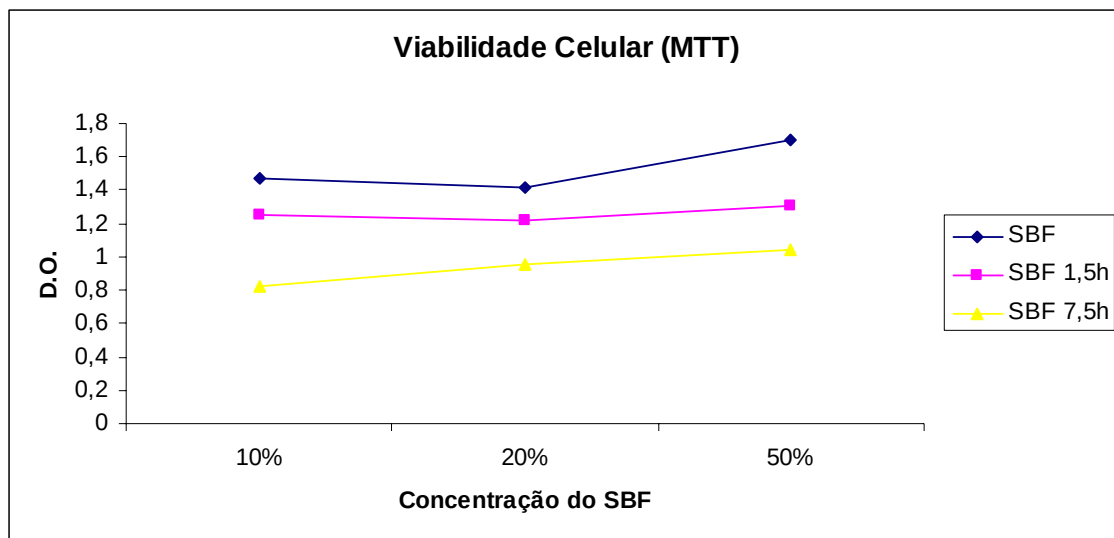


Gráfico 12: $\bar{X}$ das densidades ópticas de ensaio utilizando-se SBF e SBF incubado com hemácias e azul de metileno por 1 hora e meia e por 7 horas e meia.

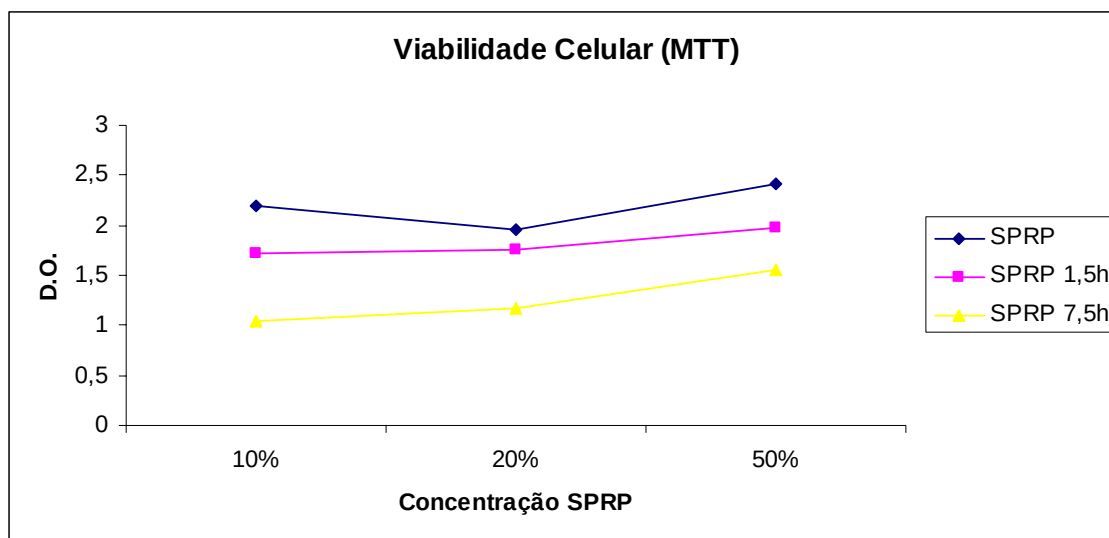


Gráfico 13: $\bar{X}$ das densidades ópticas de ensaio utilizando-se SPRP e SPRP incubado com hemácias e azul de metileno por 1 hora e meia e por 7 horas e meia.

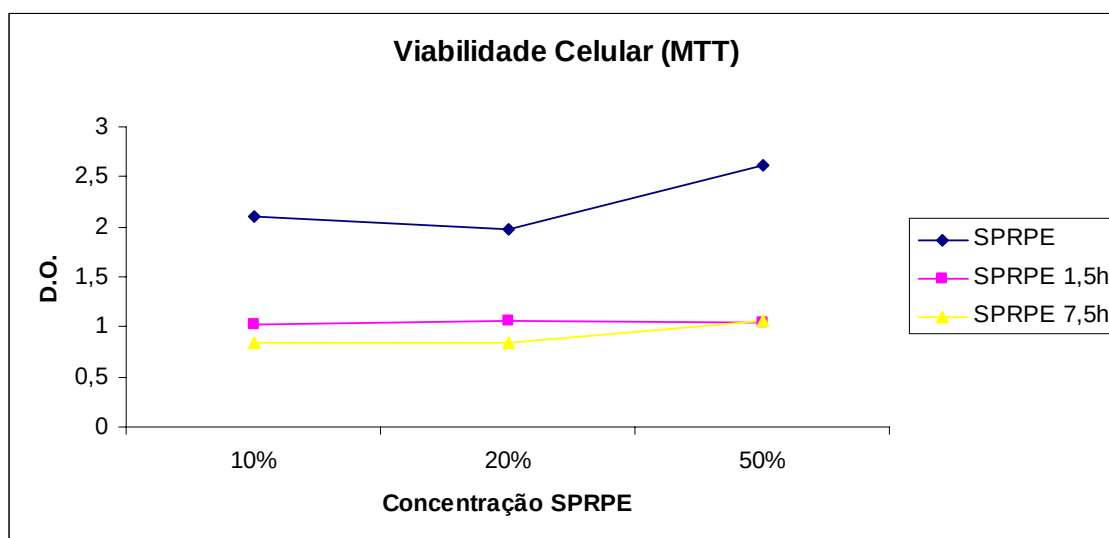


Gráfico 14: $\bar{X}$ das densidades ópticas de ensaio utilizando-se SPRPE e SPRPE incubado com hemácias e azul de metileno por 1 hora e meia e por 7 horas e meia.

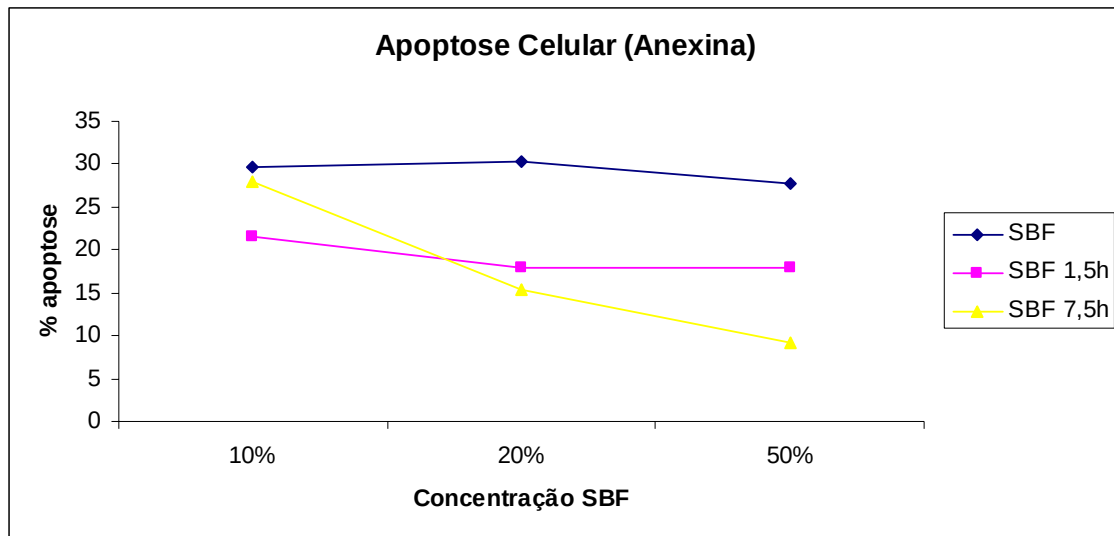


Gráfico 15: $\bar{X}$ de eventos de apoptose celular de ensaio utilizando-se SBF e SBF incubado com hemácias e azul de metileno por 1 hora e meia e por 7 horas e meia.

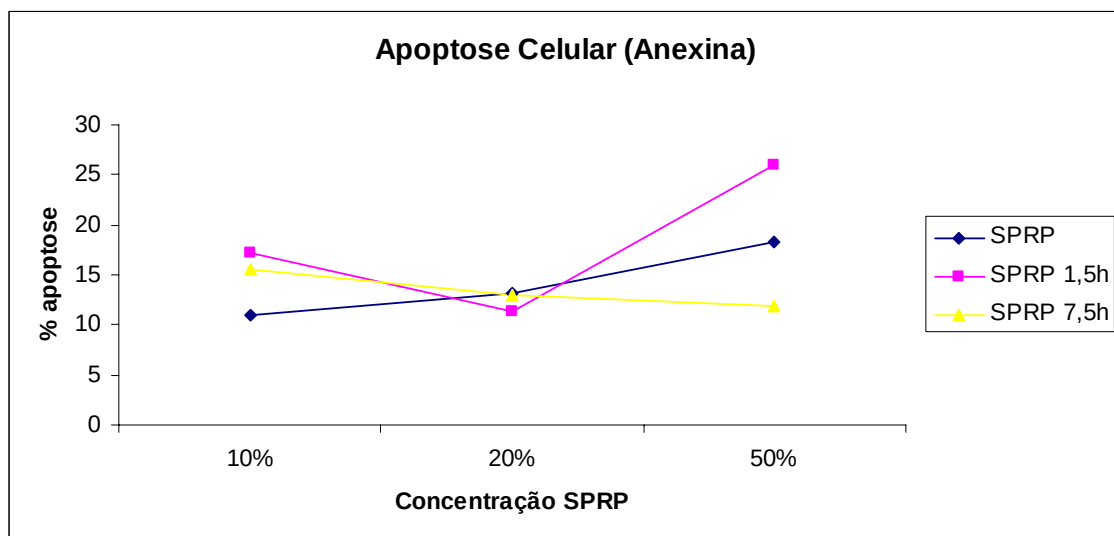


Gráfico 16: $\bar{X}$ de eventos de apoptose celular de ensaio utilizando-se SPRP e SPRP incubado com hemácias e azul de metileno por 1 hora e meia e por 7 horas e meia.

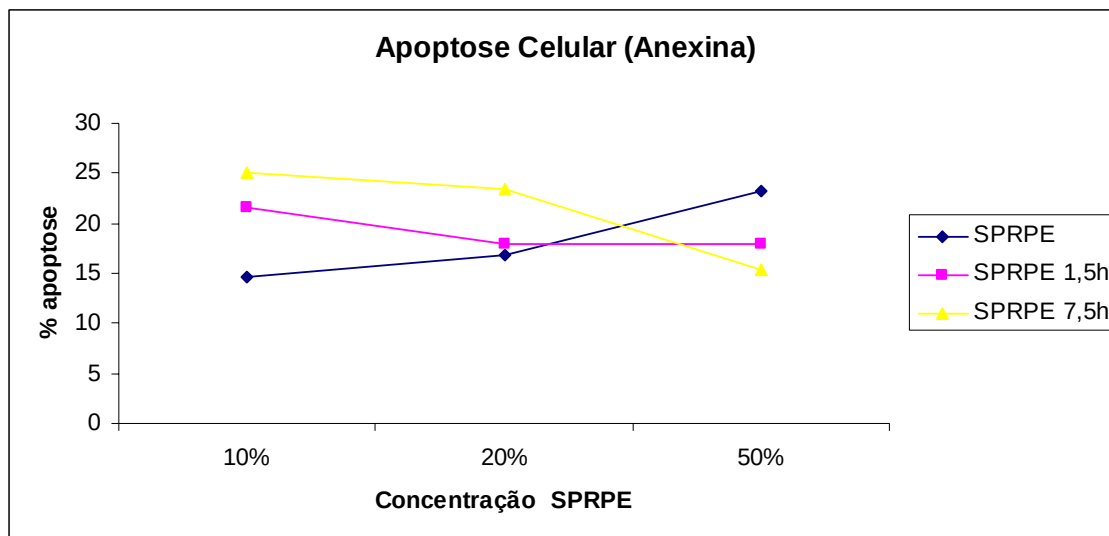


Gráfico 17: $\bar{X}$ de eventos de apoptose celular de ensaio utilizando-se SPRPE e SPRPE incubado com hemácias e azul de metileno por 1 hora e meia e por 7 horas e meia.

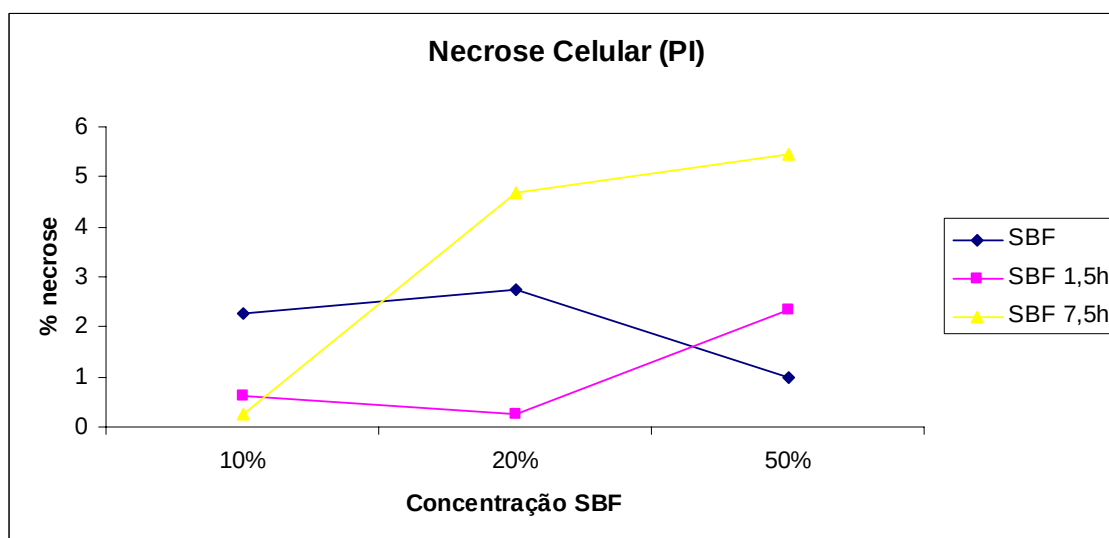


Gráfico 18: $\bar{X}$ de eventos de necrose celular de ensaio utilizando-se SBF e SBF incubado com hemácias e azul de metileno por 1 hora e meia e por 7 horas e meia.

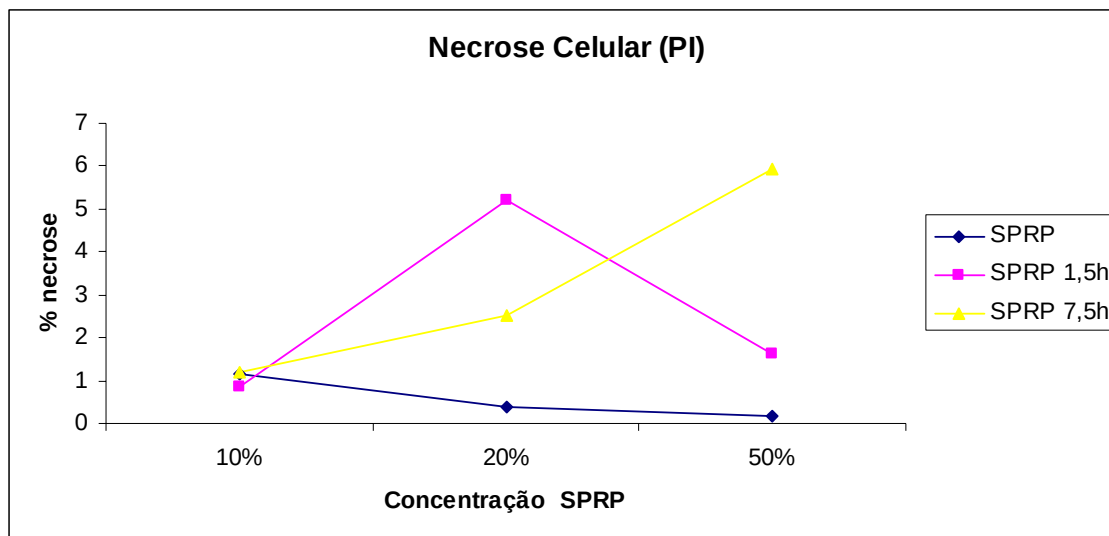


Gráfico 19: $\bar{X}$ de eventos de necrose celular utilizando-se SPRP e SPRP incubado com hemácias e azul de metileno por 1 hora e meia e por 7 horas e meia.

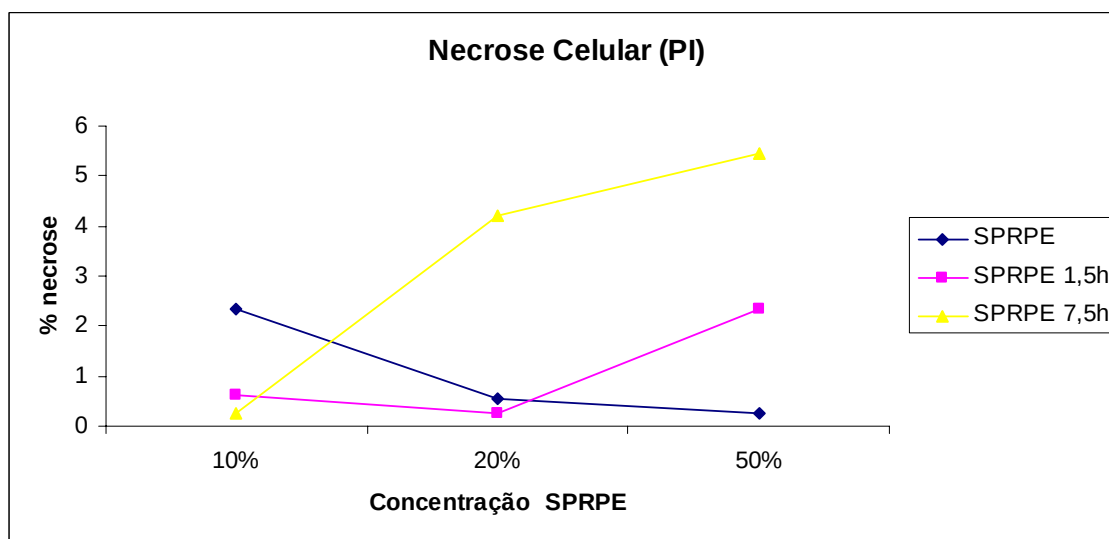


Gráfico 20: $\bar{X}$ de eventos de necrose celular de ensaio utilizando-se SPRPE e SPRPE incubado com hemácias e azul de metileno por 1 hora e meia e por 7 horas e meia.

Discussão e Considerações Finais



Independente da concentração de SBF na cultura de PBMC, não nota-se diferença no percentual de apoptose e praticamente ausência de necrose, ou seja, existem fatores de crescimento suficientes para os receptores de superfície celular, porém a viabilidade decai com o aumento da concentração do fator de crescimento (vide gráfico 1 e 2).

Os gráficos 3 e 4 mostram que a viabilidade celular é melhor nos experimentos autólogos que em homólogos, apresentando diferenças na quantidade de células viáveis.

Nos gráficos 5 e 7, observa-se aumento de apoptose com aumento da concentração dos soros, sendo mais sensível no SPRPE, porém os gráficos 6 e 8 nos mostram que a necrose está abaixo de 2%, ou seja, praticamente inexistente.

O aumento da apoptose poderia ser explicado com aumento de energia que indicaria aparecimento de morte programada, com intuito de destruir células com defeito em DNA, relacionado com aumento da concentração de fatores de crescimento.

No gráfico 9 observa-se que a viabilidade celular quando incubamos o SPRPE com azul de metileno diminui sensivelmente com o tempo de incubação, melhor observado na concentração de SPRPE de 50%. Já a necrose celular mantém-se constante e abaixo dos 5% com exceção no tempo de incubação de 7 horas e meia (vide gráfico 11).

Desta forma a necrose parece aumentar com o tempo de incubação assim como a apoptose, enquanto a viabilidade celular diminui, inferindo que a diminuição da viabilidade ocorre com o aumento de apoptose e por último da necrose.

Os experimentos 9, 10 e 11 demonstram que nos soros com fatores de crescimento incubados com azul de metileno, o sistema de óxido-redução NADPH dependente não está agindo, não existe a liberação de elétrons.

Nos gráficos 12, 13 e 14 observa-se sensível diminuição da viabilidade celular quando colocamos além do azul de metileno, uma fonte de elétrons a partir de glóbulos vermelhos, seja no SBF, SPRP e SPRPE.

Verifica-se diminuição de apoptose no SBF, SPRP e SPRPE incubados com azul de metileno e hemácias por 7 horas e meia.

Nos gráficos 18, 19 e 20, observa-se nítido aumento de necrose celular com variação seja no tempo de incubação ou na concentração do soro.

Assim funcionaria como aumento de agentes oxidantes e eventual presença de elétrons desapareados, que através de reação de Fenton promovem lesões de membrana e morte celular não programada (Aguiar et al, 2007; Xia & Cooks, 2010).

Durante o processo de armazenamento, as plaquetas são mantidas a temperatura ambiente (22°C), sob agitação, processo este que oxida o NADH, gerando energia pela fosforilação transformando ATP —► ADP —► AMP fazendo que seu metabolismo seja menor com perda do *swirling* e sujeita a contaminação devido processos de edema de membrana que se rompe e liberam grânulos- α . Este processo permite que estoque plaquetas por até cinco dias quando perdem as atividades de agregação (Klinger, 1996; Tostes et al., 2008).

Assim as atividades metabólicas das plaquetas durante os cinco dias de armazenamento garantem a viabilidade necessária para que suas atividades hemostáticas se mantenham adequadas.

As plaquetas desempenham funções com consumo de energia, ou seja, são NAD dependentes. Como exemplo de gasto de energia pode-se citar a diapedese, proveniente do deslizamento dos microfilamentos de actina e moléculas de miosina, responsáveis pela contração e relaxamento permitindo a formação de prolongamentos (pseudópodes) e contração das plaquetas (Pollard & Borisy, 2003).

Segundo Buchignani o teste de *swirling* é um exemplo de função plaquetária NAD dependente que pode ser recuperada após os cinco dias de armazenamento pelo azul de metileno, através do rompimento das pontes dissulfeto e restauração dos radicais sulfidril (-SH), que funcionam na retração da miosina permitindo a diapedese.

Nesta sequência, embora a redução das pontes dissulfeto não necessitem de energia, ou seja, são processos NADPH dependentes, reagem sob estímulos, gerando reativos sulfidril, essenciais para as reações de contração e relaxamento de actina-miosina que consomem energia gerada pela transformação do ATP $\longrightarrow$ ADP $\longrightarrow$ AMP com oxidação do NADH (Beutler, 2001).

As plaquetas estocadas recuperadas passam a ter resposta aos testes de agregação plaquetária em resposta aos estímulos de colágeno e ADP (Buchignani, 2002).

Durante a divisão celular há necessidade de bloqueio das funções citoplasmáticas, com aumento da produção de proteínas de adesão para que

ocorra a fixação da célula que vai se dividir, ou seja, em princípio a divisão celular ocorre em estado de oxidação (Junqueira & Carneiro, 2008).

Como vimos, os grânulos- α , ricos em fatores de crescimento são liberados após a ruptura da plaqueta, decorrente de processo traumático seguido de bloqueio pelas plaquetas (coágulo branco) e recomposição do tecido, cicatrização.

A maioria das proteínas que trabalham no meio extracelular contêm pontes dissulfeto, as quais são ligações covalentes entre pares de resíduos de cisteína (Hogg, 2003).

As pontes dissulfeto intracadeias mantêm unidas cadeias polipeptídicas dos fatores de crescimento derivados de plaquetas numa conformação estável. Os radicais $-SH$ na superfície dos fatores de crescimento ainda não foram demonstrados (Baorkham-Kamphorst et al., 2005).

Sabemos que tanto o PDGF como o TGF apresentam pontes dissulfeto intramolecular com função de estabilizar a molécula e pontes dissulfeto intermolecular, ou seja, na face externa, que possivelmente são assim mantidas sem radical sulfidril livre como são demonstrados nos trabalhos (Haniu et al., 1993; Baorkham-Kamphorst et al., 2005).

Assim podemos observar que quando utilizamos o azul de metileno, a quantidade de células viáveis diminui com aumento de apoptose e necrose, muito provavelmente devido liberação de energia que é típica à recuperação da diapedese.

Conclusão



A ação plaquetária requer alta quantidade de energia enquanto o processo de multiplicação celular necessita de baixa quantidade de energia.

O presente trabalho abre leque de perspectivas de novas investigações, sobre a ação dos grânulos- α plaquetários no processo de cicatrização e sua relação com a idade das pessoas, quantidade de fatores de crescimento e quantidade de receptores celulares.

Referências Bibliográficas



ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia básica**. 3.ed. São Paulo: Elsevier, 2009.328p.

AGUIAR, A. et al. Mecanismo e aplicação da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Quím. Nova**, v.30, p.623-628, 2007.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science, 2002. 786p.

ANDERSSON, M. et al. Assignment of interchain disulfide bonds in platelet-derived growth factor (PDGF) and evidence for agonist activity of monomeric PDGF. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.11260-11266, 1992.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, v.14, n.4, p.529-535, 1999.

ARMELIN, H.A. Hormones and regulation of cell division: mammalian cell cultures as an experimental approach. In: LITWACK, G. **Biochemical actions of hormones**. New York: Academic Press, 1975. p.1-21.

ARMITAGE, J.O. **Atlas of clinical hematology**. Part II. 2.ed. New York: Springer Science, 2008. 222p.

ASSIS, M.F.L. et al. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. **Cad. Saúde Colet.**, v.15, n.3, p.425-432, 2002.

BACAL, N.S.; FAULHABER, M.H.W. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. São Paulo: Atheneu, 2003.

BARRAVIERA, B. **Malária pelo *P. falciparum* e avaliação indireta da atividade da Glutation Redutase e da deficiência da riboflavina, por meio da redução da Metahemoglobina pela Cistamina**. 1984. 104f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1984.

BARRAVIERA, B.; MACHADO, P.E.A. Glutationa redutase e grupos SH reativos intra-eritrocitários. **Arq. Bras. Med.**, v.61, n.6, p.399-403, 1987.

BENESCU, A. et al. Platelet storage in PAS-2 or autologous plasma: impact on functional parameters. **Transfus. Med.**, v.11, p.105-110, 2001.

BERRIDGE, M.V. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v.4, p.14-19, 1996.

BERTOLINI, F.; MURPHY, S. A multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates. **Transfusion**, v.34, p.796-801, 1994.

BEUTLER, E. et al. **Williams hematology**. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 1755p.

BEUZARD, Y. Inhibition of sickling by cystamine In: CAUGHEY, W.S. **Biochemical and clinical aspects of hemoglobin abnormalities**. New York: Academic Press, 1978. p.237-249.

BORKHAM-KAMPHORST, E. et al. Disruption of intermolecular disulfide bonds in PDGF-BB dimmers by N-acetyl-L- cysteine does not prevent PDGF signaling in cultured hepatic stellate cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.338, p.1711-1718, 2005.

BOTCHWAY, A.N.S. et al. Storage pool defect in pooled buffy coat platelet concentrates within the shelf-life period. **Clin. Lab. Haematol.**, v.22, p.21-27, 2000.

BOYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.21, p.77-79, 1968.

BUCHIGNANI, M.R. **Avaliações de parâmetros que conferem qualidade ao concentrado de plaquetas.** 2002. 113f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

CASTRO, H.C. et al. Platelets: still a therapeutical target. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.42, n.5, p.321-332, 2006.

COLMAN, R.W. et al. **Hemostasis and trombosis basic principles and clinical practice.** 5.ed. Philadelphia: J.B.Lippincott Company, 2006. 1827p.

FRÉCHETTE, J.P.; MARTINEAU, I.; GAGNON, G. Platelet-rich plasmas : growth factor content and roles in wound healing. **J. Dent. Res.**, v.84, p.434-439, 2005.

GERKE, V.; MOSS, S.E. Annexins: from structure to function. **Physiol. Rev.**, v.82, p.331-371, 2002.

GOLIM, M.A. **Desenvolvimento de Controle Isotópico Fluoresceinado para uso em citometria de fluxo**. 2004. 77f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

GREEN, R.J. et al. Immunolocalization of platelet-derived growth factor A and B chains and PDGF – alpha and beta receptors in human gingival wounds. **J. Periodontal Res.**, v.32, p.209-214, 1997.

GUERIN, G.D.; BURTET, L.P. Avaliação de concentrados plaquetários produzidos pelo serviço de Hemoterapia do Hospital Santo Ângelo: implantação de um sistema de controle de qualidade. **RBAC**, v.38, n.4, p.287-292, 2006.

HANIU, M.; ROHDE, M.F.; KENNEY, W.C. Disulfide bonds in recombinant human platelet-derived growth factor BB dimer: characterization of intermolecular and intramolecular disulfide linkages. **Biochemistry**, v.32, p.2431-2437, 1993.

HARRISON, P.; CRAMER, E.M. Platelet α -granules. **Blood**, v.7, p.52-62, 1993.

HARTWIG, J.H. Platelet structure In: MICHELSON, A.D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002. p.45-73.

HELDIN, C.H.; WESTERMARK, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. **Physiol. Rev.**, v.79, n.4, p.1283-1316, 1999.

HELGASON, C.D.; MILLER, C.L. **Basic cell culture protocols methods in molecular biology**. 3.ed. New York: Humana Press, 2005.384p.

HERVING, T.; MANSOOR, M.A.; FARSTAD, M. Endogenous glutathione and platelet function in platelet concentrates stored in plasma or platelet additive solution. **Transfus. Med.**, v.11, p.97-104, 2001.

HOGG, P.J. Disulfide bonds as switches for protein function. **Trends Biochem. Sci.**, v.28, p.210-214, 2003.

HOLME, S.; VAIDJA, K.; MURPHY, S. Platelet storage at 22 °C: effect of type of agitation on morphology, viability, and function in vitro. **Blood**, v.52, p.425-435, 1978.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

KILIAN, O. et al. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. **Eur. J. Med. Res.**, v.9, p.337-344, 2004.

KLINGER, M.H.F. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects. **Ann. Hematol.**, v.73, p.103-112, 1996.

KOVEKER, G.B. Growth factors in clinical practice. **Int. J. Clin. Pract.**, v.54, p.590-593, 2000.

LEE, G.R. et al. **Wintrobe hematologia clínica**. São Paulo: Manole, 1998. 2623p.

LOKEN, M.; GREEN, C.L.; WELLS, D.A. Immunofluorescence of surface markers. In: ORMEROD, M.G. **Flow cytometry: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 2000. p.61-82.

LUCARELLI, E. et al. Platelet derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. **Biomaterials**, v.24, p.3089-3095, 2003.

MACHADO, P.E.A. **Cistamina, agente tiol com efeito antifalcizante in vitro. Estudo da redução do complexo hemoglobina-cistamina pelo eritrócito in vitro**. Estudo da ação da Cistamina e Glutation oxidado sobre a tradução protéica in vitro. 1979. 137f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1979.

MACIEL, E.V.M. **Determinação do efeito mitogênico das lectinas de *Cratylia mollis* sobre linfócitos humanos utilizando um método colorimétrico**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

MARX, R.E. et al. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.

MARX, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.62, p.489-496, 2004.

McNICOLS, A.; ISRAELS, S. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. **Thromb. Res.**, v.95, p.1-18, 1999.

MICHELSON, A.D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002.1376p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MURPHY, S.; GARDNER, H. Platelet storage at 22 °C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. **Blood**, v.46, p.209-218, 1975.

PANAGAKOS, F.S. Insulin-like growth factor I and II stimulate chemotaxis of osteoblasts isolated from fetal rat calvaria. **Biochimie**, v.75, n.11, p.991-994, 1993.

POLLARD, T.D.; BORISY, G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v.112, p.453-465, 2003.

REBULLA, P. Revisitation of the clinical indications for the transfusion of platelet concentrates. **Rev. Clin. Exp. Hematol.**, v.5, n.3, p.288-310, 2001.

REED, G. L. Platelet secretory mechanisms. **Semin. Thromb. Hemost.**, v.30, n.4, p.441-450, 2004.

SCHULZE, H.; SHIVDASANI, R.A. Mechanisms of thrombopoiesis. **J. Thromb. Haemost.**, v.3, n.8, p.1717-1724, 2005.

SEATON, B.A.; DEDMAN, J.R. Annexins. **BioMetals**, v.11, p.399-404, 1998.

SILVA, B.V. et al. Kinase protein: structural features and chemical inhibitors. **Quím. Nova**, v.32, n.2, p.453-462, 2009.

SILVA, H.F. **Ácido desoxirribonucleico e ciclo celular de clone tumoral murino NSI/1 por citometria de fluxo**. 1994. 66f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1994.

SPAN, L.F.R. et al. The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. **Cytometry**, v.47, p.24-31, 2002.

TOSTES, M.A. et al. Influência da coleta, da produção e da estocagem na qualidade dos concentrados de plaquetas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.30, p.367-373, 2008.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J. Immunol. Methods**, v.184, p.39-51, 1995.

VISTICA, D.T. et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res.**, v.51, p.2515-2520, 1991.

WAGNER, S.J.; ROBINETTE, D. Evaluation of swirling, pH, and glucose tests for the detection of bacterial contamination in platelet concentrates. **Transfusion**, v.36, p.989-993, 1996.

WEIBRICH, G. et al. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. **J. Cranio-Maxillofac. Surg.**, v.30, p.97-102, 2002.

WENDLING, F. Thrombopoietin: its role from early hematopoiesis to platelet production. **Haematologica**, v.84, p.158-166, 1999.

XIA, Y.; COOKS, R.G. Plasma induced oxidative cleavage of disulfide bonds in polypeptides during nanoelectrospray ionization. **Anal. Chem.**, v.82, p.2856-2864, 2010.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2004.1043p.

Anexos



COLETA DE SANGUE DE DOADOR

1. Objetivo

Obter hemocomponentes para transfusão, livres de contaminação, através da coleta de sangue de doadores.

2. Responsabilidade

Enfermeiro, Auxiliar e Técnico de enfermagem.

3. Definições

- A coleta de sangue do doador deve ser efetuada antissépticamente, através de uma punção venosa, utilizando-se sistema fechado de bolsas plásticas destinadas para este fim, descartável, apirogênico e estéril.
- A coleta de sangue deve ser realizada por auxiliares e/ou técnicos treinados e capacitados, trabalhando sob supervisão de enfermeiro.
- Para a punção da veia, dê preferência para as veias da dobra do cotovelo: basílica, mediana e cefálica.

Esquema topográfico da face ventral das veias em Membro Superior



-
- O sítio de flebotomia deve estar livre de quaisquer lesões cutâneas, os quais podem causar contaminação para o doador e para o hemocomponente.
 - A venopunção deve ser realizada colocando o polegar da mão livre abaixo da região preparada e manter a pele esticada. Com a agulha em um ângulo de 45° com a pele, fazer uma punção rápida e segura. Uma vez na pele, reduzir o ângulo da agulha para 10° a 20°. Oriente o alinhamento da veia e faça uma segunda pressão para atravessar a parede da veia; insira a agulha por mais de 2 cm para auxiliar e manter a agulha.
 - A veia não deve ser palpada após a preparação do campo para punção, entretanto, se houver necessidade, isto deve ser realizado somente após a agulha haver ultrapassado a pele.
 - A “cronometragem” do tempo de coleta é imprescindível para o Setor de Componentes Lábeis. O sangue coletado com mais de 8 minutos não pode ser utilizado para Concentrado de Plaquetas.
 - O local de coleta deve ser limpo, confortável, agradável, de modo a possibilitar que o doador se sinta bem e não sinta a apreensão que o ato de doar possa vir a causar-lhe.
 - A temperatura ambiente da sala de coleta deve estar entre 20° e 24°C positivos.

NOTA: Se for necessária realização de mais de uma punção deve-se utilizar novo material de coleta.

4. Procedimento

4.1. Material

- Bolas de algodão secas;
- Solução de álcool 70°;
- Bolsas duplas ou triplas para coleta de sangue;
- Caixa cirúrgica com tesoura e pinça hemostática para antissepsia;
- Fita crepe;
- Homogeneizador para bolsa de sangue;
- Pacotes de gaze esterilizada;
- Pares de luvas;
- Relógio;
- Torniquete (garrote);
- Tubos para coleta de amostras de sangue;
- Curativo compressivo.

4.2. Técnica

1. Lave as mãos.
 2. Coloque as luvas.
 3. Separe um pedaço de fita crepe para posterior fixação da agulha.
 4. Chame o doador por seu nome completo na ficha de triagem.
 5. Faça identificação positiva.
 6. Dê uma olhada nos dois braços do doador para verificar a melhor veia. Quando a pessoa já for doadora e tiver veia boa nos dois braços, poderá perguntar em que braço costuma doar ou se tem preferência.
 7. Solicite e oriente o doador a lavar com água corrente e sabão, e secar a região do braço a ser puncionada.
 8. Posicione o doador confortavelmente na cadeira.
-

9. Realize identificação positiva do doador - cheque nome do doador, numeração de bolsa e tubos.
10. Ligue o homogeneizador (botão na parte posterior). Espere até aparecer a tela:

FRESENTUS

KABl

11. Coloque a bolsa principal e as bolsas secundárias sobre a bandeja oscilante.
12. Passe o tubo de coleta da bolsa principal pelo estrangulador.
13. De nó frouxo no seguimento entre a agulha e a bolsa principal.
14. Garanta um desnível de no mínimo 40 cm entre o braço do doador e o equipamento.
15. Pressione Enter.
16. O homogeneizador solicitará o VOLUME (em ml) da doação.
17. Digite o volume solicitado utilizando o display numérico
18. Entre com o valor e tecle Enter.
19. O clamo irá fechar.
20. O homogeneizador mostrará:

PUNCIONE E ENTER

21. Selecione a veia a ser puncionada.
22. Coloque o torniquete acima da região antecubital, sem compressão exagerada.
23. Realize antissepsia circular ampla ou em sentido único no sentido do retorno venoso, quantas vezes forem necessárias, com algodão

embebido em álcool 70°, com o auxílio de uma pinça hemostática.

24. Coloque gaze dobrada logo abaixo do local de punção.
25. Verifique se a região de punção já secou.
26. Abra o lacre da agulha, delicadamente.
27. Realize a venipunção.
28. Cubra o local de inserção da agulha com a gaze estéril.
29. Fixe a agulha com fita crepe.
30. Logo após puncionada a veia, aperte Enter no homogenizador.
31. Peça ao doador para fazer movimentos de abrir e fechar a mão, suavemente, até o término do procedimento. Isto facilita a saída do sangue para a bolsa.
32. Anote na ficha de triagem o horário de início da coleta e braço coletado.
33. Monitore o doador quanto aos sinais de uma reação adversa.
34. Ao atingir o volume solicitado ou o tempo máximo de doação programado, o tubo da bolsa será estrangulado interrompendo o fluxo de sangue e disparando alarme sonoro. Surgirá no display a mensagem:

FIM DE COLETA

35. De o nó que estava frouxo, este deve ser dado a 15 cm do local de punção.
 36. Pressione Check, para verificar tempo total de doação e peso coletado.
 37. Pressione Enter. No display aparecerá a mensagem:
-

ENCERRANDO...

38. Anote o horário de término da coleta na ficha de triagem em local determinado.
39. Libere o tubo da bolsa do estrangulador.
40. Quebre o lacre do holder e colete as amostras de sangue em sistema a vácuo. Comece coletando o tubo com anticoagulante – agite – tubo seco para tipagem e por último os 2 tubos com gel.
41. Desafrouxe o torniquete.
42. Retire a agulha do braço do doador, utilizando o sistema de segurança da agulha.
43. Pressione o local com gaze esterilizada e instrua para que o doador continue pressionando.
44. Descarte a agulha em *container* rígido.
45. Coloque a ficha de triagem, a bolsa e tubos na bancada.
46. Ordene e homogenize três vezes a bolsa.
47. Sele manguito da bolsa 03 vezes, mantendo distância de 1 cm entre uma selada e outra.
48. Assine e carimbe a ficha de triagem no campo “Responsável coleta”
49. Faça o registro da doação.
50. Coloque os tubos nas grades de exames.
51. Coloque a bolsa na caixa térmica.
52. Guarde a ficha de triagem na gaveta da bancada destinada a esse fim.
53. Coloque curativo compressivo no local da punção.
54. Oriente o doador quanto às recomendações pós-doação.
55. Encaminhe-o para tomar lanche.

ATRIBUIÇÕES TÉCNICAS DO LABORATÓRIO DE COMPONENTES LÁBEIS:

- Objetivo:

- Realizar processamento, armazenamento, liberação, estoque e procedimentos hemoterápicos de hemocomponentes com eficiência e qualidade de acordo com as normas técnicas do Ministério da Saúde vigente.

- Atividades:

- Recebimento de bolsas de sangue da sala de coleta.
 - Checagem dos números das bolsas e pesagem.
 - Ler as bolsas e registrar os dados no sistema computadorizado.
 - Centrifugação das bolsas de acordo o hemocomponente desejado.
 - Registro no sistema computadorizado dos hemocomponentes adquiridos.
 - Armazenamento adequado dos hemocomponentes.
 - Liberação para estoque dos hemocomponentes.
 - Realização de procedimentos hemoterápicos.
 - Coleta de amostras para controle.
 - Checagem de temperatura de geladeiras, freezers e ambiente – 4 vezes ao dia.
 - Envio de hemocomponentes para outros hospitais.
 - Descarte de materiais biológicos.
-

OBTENÇÃO DO PRP

⇒ Pesagem

- Pesar as bolsas contendo o Sangue Total;
- Proceder a identificação informatizada: Análise dos Componentes, Peso e Separação

Para Centrifugação:

- Colocar as bolsas nas caçapas (uma bolsa para cada caçapa);
 - Equilibrar diametralmente o peso das bolsas nas caçapas (devem ser colocadas para centrifugação as caçapas de mesmo peso uma de frente para a outra).
 - Para obtenção de Concentrado de Plaquetas, centrifugar o Sangue Total (ST) em temperatura entre 20° e 24°C ou a 4°C caso ST tenha sido previamente refrigerado;
 - Utilizar centrifugação e tempo validados no Serviço
 - Retirar as caçapas da centrífuga com gesto suave e movimentos delicados;
 - Retirar cuidadosamente a bolsa da caçapa;
 - Colocar a bolsa principal/primária (mãe) no Extrator de Plasma, com rótulo voltado para trás, para permitir a visualização da separação das hemácias e do plasma;
-

MÉTODO MANUAL PARA SEPARAÇÃO

- Em se tratando de bolsa TRIPLA localizar a bolsa que irá receber o plasma rico em plaquetas;
 - Quebrar o lacre de transferência, localizada na bolsa principal/primária (mãe);
 - Deixar fluir o plasma para a bolsa satélite;
 - Manter, na bolsa principal/primária (mãe), 3 - 4 centímetros de plasma;
 - Retirar a bolsa do extrator;
 - Fechar a bolsa através da selagem dos tubos (3 selagens);
 - Reservar a bolsa de Plasma Rico em Plaquetas, para segunda centrifugação, se esta se tratar de bolsa TRIPLA, para obtenção do Concentrado de Plaquetas.
-

TÉCNICA DE RECALCIFICAÇÃO DO PRP

Preparo da Solução de Cloreto de Cálcio 2M

- pesar 22,2g de cloreto de cálcio e completar o volume de 100ml com água destilada.
- armazenar em geladeira.

PREPARO DA SOLUÇÃO DE AZUL DE METILENO

Solução de azul de metileno a 0,0015%

Cloreto de azul de metileno triidratado.....0.15gramas

Água destilada.....1000 ml

A solução deve ser conservada a 4°C.
