



**Maira Camila Felix**

*Potencial imunogênico dos  
curativos bioativos: aspectos  
imunohematológicos e  
leucoplaquetários.*

**Botucatu – SP  
2009**

*Maira Camila Felix*

Potencial imunogênico dos curativos Bioativos:  
aspectos imunohematológicos e leucoplaquetários.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

*Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Rossi Ferreira*

*Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elenice Deffune*

Botucatu – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Felix, Maira Camila.

Potencial imunogênico dos curativos bioativos: aspectos  
imunohematológicos e leucoplaquetários / Maira Camila Felix. – Botucatu :  
[s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosana Rossi Ferreira

Co-orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elenice Deffune

Assunto CAPES: 21400000

1. Biotecnologia. 2. Ferimentos e lesões – Tratamento. 3. Imunologia.  
4. Imunohematologia.

CDD 620.8

Palavras chave: Aloimunização; Curativos bioativos; Feridas crônicas.

# *Homenagem aos pacientes*

Muitas vezes os ensinamentos obtidos pela experiência de vida são muito mais valiosos do que aqueles ensinados por livros ou professores. Agradeço a vocês, que em busca de amenizar o sofrimento, contribuíram muito na concretização desse sonho.

Muito obrigada!

# *Agradecimentos*

## ***A Deus***

“Uma noite eu tive um sonho... Sonhei que estava andando na praia com o Senhor, e através do céu, passavam cenas da minha vida. Para cada cena que se passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia, um era meu e outro era do Senhor. Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia, e notei que muitas vezes no caminho da vida havia apenas um par de pegadas na areia. Notei também que isto aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver.

Isso me aborreceu, então, perguntei ao Senhor: - Senhor, Tu me disseste que uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o meu caminho, mas notei que durante as maiores tribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que necessitava de Ti, tu me deixastes...

O Senhor respondeu: - Meu precioso filho, Eu Te Amo e jamais te deixaria nas horas de tua prova e de teu sofrimento. Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí, que Eu te carreguei nos braços.”

Obrigada meu Deus por estar sempre ao meu lado desde as minhas vitórias, para vibrar comigo, até as minhas derrotas, para me confortar. Obrigada por tudo que vi, ouvi e aprendi. Obrigada pela Vida!

## ***Ao meu pai, Antonio Carlos.***

Homem alegre e brincalhão, mas às vezes, silencioso e pensativo. Homem de fé e grande luta, sensível e generoso. Sempre com um abraço aconchegante a me acolher é meu conselheiro e leal amigo. Obrigada, pai, por orientar e acompanhar o meu caminho. Você é meu grande exemplo de vida, amo você!

## ***À minha mãe, Maria Geceni.***

Falar de mãe é falar de Deus, pois no coração delas está o verdadeiro amor. Amor que se dá sem pedir recompensa, sem cobrança, sem distinção e sem egoísmo. Obrigada, mãe, mesmo distante jamais se fez ausente o seu amor. Amo você!

***Á minha irmã, Fernanda.***

Por todo apoio e carinho. E também pela pessoa tão especial que você colocou em minha vida,  
o Igor! Amo vocês!

***Ao meu namorado, Alex.***

A vida é muito melhor se temos alguém para dividir nossos sonhos, nossas conquistas, nossas alegrias e também nossas angústias. Quando menos esperei Deus te colocou em meu caminho. E essa nova fase trouxe os meus sonhos de volta, pois ter você já significa a realização de um sonho. Obrigada por fazer parte da minha vida e torná-la tão bela. Você é muito especial para mim. Te amo!

***A minha família (Cunhado, avós, tios e primos).***

Mesmo não compreendendo minha ausência sempre me incentivaram e torceram muito por mim. Obrigada por tudo!

***A minha segunda família (Toninha, Antenor, Dri, Léca, Rodrigo e Lucas).***

Pela companhia, apoio e incentivo. E também pelos bons momentos que me proporcionaram. Vocês são muito especiais. Muito obrigada!

***A minha orientadora.***

Pela oportunidade de ingressar nessa fase importante e me acompanhar dando as coordenadas para chegar ao final. Obrigada por todo ensinamento e pelo grande exemplo de profissional! Admiro-te muito!

***A minha co-orientadora.***

Pelos ensinamentos e oportunidade! Muito obrigada por tudo!

***Aos meus amigos.***

As atuais e antigas amigas e companheiras de República (Ju, Rê Camargo, Rê Bueno, Rê Abdalah, Dani, Mara, Marilisa e Érica) – vocês foram como uma família para mim.

Amigos do trabalho (Dani, Pri, Fabi, Estela, Júlio, Dione, Rafa, Fádua, Dri, Dani-LAC, Rê, Léia).

Amigos do Hemocentro (Camila, Marina, Juliana, Pati, Ana Cláudia, Sandra, Chiara, Márjorie, Luciandro).

Amigos do Laboratório de Engenharia Celular (Priscila, Josi, Tata, Vitória, Daniel, Alexandro, Andrei, Valdir, Seu Alcides).

Alguns dizem que sempre levam um pouco de nós e deixam um pouco de si! A amizade é algo divino! Amigo... Palavra doce, que tem significado de aconchego e de porto-seguro! Amigo... Aquele que voa junto com você em seus sonhos e medos... Obrigada por tudo!

Em especial, a minha amiga Daniele, simplesmente Dani, companheira de muitos momentos e situações. Obrigada por todas as portas que você abriu e por tudo que você já me ensinou e ensina! Sou muito grata e admiro demais você!

A Camila por todo carinho, apoio e incentivo nesses anos! Sempre pronta a me ajudar! Valeu Cá, você é especial!

Ao Alexandro (Lê) por todo apoio e auxílio para que esse trabalho se concretizasse! Muito obrigada!

Ao corpo docente do Mestrado Profissionalizante pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Laboratório de Hemostasia: Delane, Iracema, Valter e Dr<sup>a</sup> Izolete Aparecida Thomazini dos Santos.

Á Márjorie, por todo apoio e análise dos resultados da Citometria de Fluxo!

Ao Dr<sup>o</sup> Daniel Ditzel pelo auxílio no *abstract*!

Á Cléo, recepcionista do Hemocentro, obrigada por toda energia positiva que você me passa!

Ao Hospital Estadual Bauru por acreditar em minha vontade de aprimorar meus conhecimentos e incentivar no que foi preciso!

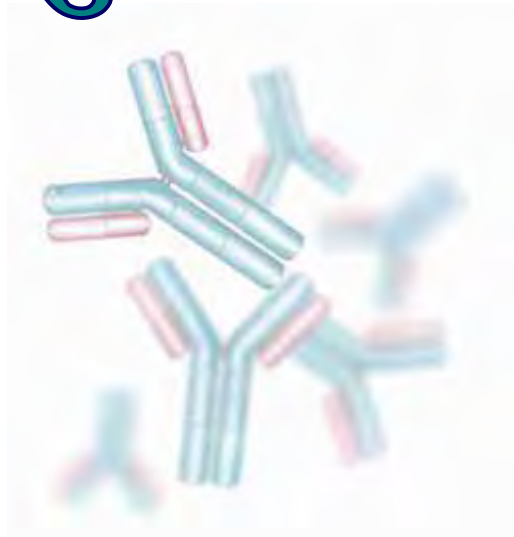
**Todo agradecimento por mais que se diga ou se escreva palavras maravilhosas será incapaz de expressar a sua verdadeira intensidade. A todos que diretamente ou indiretamente me apoiaram nessa caminhada: Muito obrigada!**

# *Epígrafe*

*O mundo é como um espelho que devolve a cada pessoa o reflexo de seus próprios pensamentos. A maneira como você encara a vida é que faz toda diferença.*

**Luís Fernando Veríssimo**

# *Resumo*

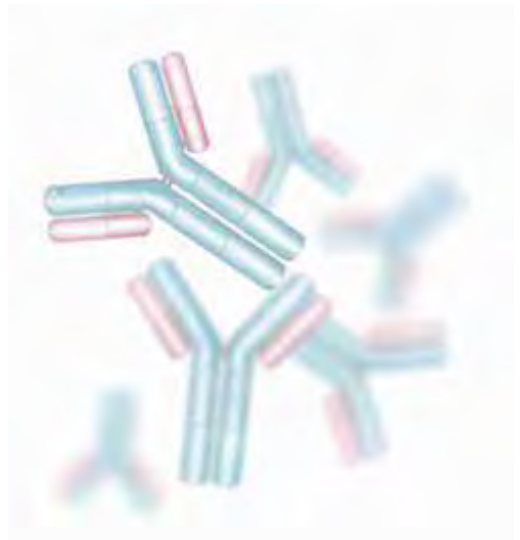


**Felix, M.C., Deffune, E., Ferreira, R.R. Potencial imunogênico dos curativos Bioativos: aspectos imunohematológicos e leucoplaquetários.**

As doenças crônico-degenerativas são caracterizadas por uma evolução lenta e progressiva, muitas vezes irreversível e por um longo período de latência. Resultam em alterações celulares que são importantes fatores de risco para a disfunção endotelial facilitando o desenvolvimento de úlceras venosas e/ou isquêmicas e "pé diabético". O antígeno K do sistema eritrocitário Kell constitui um potente peptídeo bioativo com várias funções biológicas, dentre elas a vasoconstrição que influenciam diretamente nas doenças vasculares. As plaquetas, quando ativadas, liberam fatores de crescimento que aceleram o processo de cicatrização. Na membrana plaquetária são expressos antígenos como os eritrocitários, o polimórfico HLA-classe I e antígenos específicos das plaquetas (HPA), e alguns deles possuem importante significância clínica. O conhecimento e a compreensão dos fatores de crescimento existentes nas plaquetas levaram o setor de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu ao desenvolvimento de produtos que utilizam plaquetas e plasma homólogos excedentes da rotina transfusional como princípios ativos na composição de um gel empregado na forma de curativos com o objetivo de acelerar o processo de reparo tecidual. Sabendo os efeitos benéficos dos curativos bioativos no processo de cicatrização e da variabilidade genética dos antígenos plaquetários, qualquer situação em que ocorra exposição a esses antígenos poderia levar a uma resposta imune humoral. Diante dessa assertiva o presente estudo teve por finalidade avaliar o potencial imunogênico desses curativos em pacientes submetidos a essa terapêutica. Foi realizado um estudo multicêntrico, onde um total de 198 pacientes que receberam os curativos bioativos foram fenotipados para presença do antígeno Kell. Dentre esses pacientes, 100 foram selecionados para avaliar a relação dos antígenos eritrocitários do sistema ABO e Rh no processo de cicatrização e aloimunização contra anticorpos eritrocitários. E também, 38 foram selecionados para avaliar o potencial imunogênico dos curativos bioativos através da pesquisa de anticorpos leucocitários e plaquetários. Nossos resultados apontam que o antígeno Kell possa ser um possível marcador preditivo de má-evolução de úlceras crônicas. Além disso, podemos inferir que a exposição a antígenos altamente imunogênicos a que esses pacientes foram submetidos levaram somente a aloimunização contra antígenos plaquetários, porém em um percentual abaixo daqueles encontrados pela transfusão endovenosa de concentrado de plaquetas, reforçando seus efeitos benéficos para o uso em feridas crônicas de origem multifatorial.

**Palavras-chave:** Aloimunização, Curativos bioativos, feridas crônicas.

# *Abstract*



**Felix, M.C., Deffune, E., Ferreira, R.R. Immunogenic potential of bioactive dressings: aspects immunohematology and evaluation of alloimmunization against erythrocyte, leucocyte and platelet antigens.**

The chronic-degenerative diseases are characterized by a slow and gradual evolution, often irreversible, and with a long period of latency. Resulting in cellular changes that are important risk factors for endothelial dysfunction facilitating the development of venous ulcers and/or ischemic and "diabetic foot." The antigens of the erythrocyte Kell is a potent bioactive peptide with various biological functions among which vasoconstriction that directly influence the vascular diseases. Platelets, when activated, release growth factors that accelerate the healing process. Platelet membrane express antigens as the erythrocyte, the polymorphic HLA class I-specific antigens and of platelets (HPA), and some have important clinical significance. Knowledge and understanding of the growth factors present in platelets led the biotechnology sector from the Bloodbank of Botucatu to develop products using platelets and plasma counterparts surplus of routine transfusion as active ingredients in the composition of a gel used as a dressing with the objective to accelerate the process of tissue repair. Given the beneficial effects of bioactive dressings in the process of healing and the genetic variability of platelet antigens, a situation occurs where exposure to these antigens could lead to a immune response. Given this assertion this study was to evaluate the potential immunogenic effect of these dressings in patients undergoing such therapy. This was a multicenter study, where a total of 198 patients who received the bioactive dressings were phenotyped for the presence of Kell antigen. Among these patients, 100 were selected to assess the relationship of erythrocyte antigens of the ABO and Rh in the process of healing and alloimmunization anti-erythrocyte. Also, 38 were selected to evaluate the immunogenic potential of bioactive dressings through the search of anti-HLA and -HPA alloimmunization. Our results indicate that the Kell antigen may be a possible predictive marker of poor progression of chronic ulcers. Moreover, we can infer that exposure to highly immunogenic antigens that these patients were only led to anti-HPA alloimmunization, but in a percentage lower than that found by intravenous transfusion of concentrated platelets, enhancing its benefits for use in wound chronicles of multifactorial origin.

**Keywords:** alloimmunization, bioactive dressings, chronic wounds

## *Lista de Abreviações e Símbolos*

$\alpha$	Alfa
+	positivo
Neg	negativo
°C	Grau Celsius
$\mu$ L	microlitro
$\mu$ m	micrômetro
kDa	Kilodalton
Ac	Autocontrole
ADP	difosfato de adenosina
AGH	Soro antiglobulina humana
ATP	trifosfato de adenosina
CD8+	linfócitos T citotóxicos
CIP	Coombs indireto plaquetário
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPH	complexo principal de histocompatibilidade humano
CTAP-III	quimiocina ou peptídeo ativador de tecido conjuntivo
DCD	doenças crônico-degenerativas
DOT PLOT	Diagrama de pontos
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
endotelina-3	peptídeo presente nas células endoteliais na isoforma 3
ET-3	forma bioativa da endotelina-3
EGF	fator de crescimento epidermal
FGF	fator de crescimento derivado de fibroblastos
FL1	Histograma
FSC X SSC	Tamanho X Granulosidade
FvW	fator de von Willebrand
GP	glicoproteína de membrana plaquetária

HAC –Jaú	Hospital Amaral Carvalho de Jaú
HC-FMB	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu
HLA	<i>Human Leucocytes Antigens</i>
HPA	<i>Human Platelet Antigens</i>
H.A.S.	Hipertensão Arterial Sistêmica
IAI	Identificação de anticorpo irregular
I.C.	Insuficiência cardíaca
I.V.	Insuficiência venosa
IVC	insuficiência venosa crônica
K	antígenos Kell
k	antígeno cellano
LDL	colesterol
mL	mililitro
MEC	matriz extracelular
PAI	pesquisa de anticorpos anti-eritrocitários irregulares ou pesquisa de anticorpos irregulares
PAF	fator de agregação plaquetário
PECAM-1	molécula endotelial de adesão plaquetária
PIFT	<i>Platelet immunofluorescence test</i>
PGDF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE <sub>2</sub>	prostaglandinas
PPT	púrpura pós-transfusional
PRA	Painel reativo de antígenos
PTAN	púrpura trombocitopênica aloimune neonatal
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	rotação por minuto
TXA <sub>2</sub>	tromboxano A <sub>2</sub>
TGF- $\beta$	fator transformador de crescimento $\beta$
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

## *Lista de Ilustrações*

- Figura 1** – Ilustração de feridas crônicas de membro inferior de pacientes da Unidade Básica de Saúde do Município de Maringá – Centro de Saúde Quebec II. Esses pacientes receberam o tratamento com os curativos bioativos e foram acompanhados no projeto de mestrado da aluna Illymack Ferreira Canedo de Araújo, cuja dissertação foi defendida em fevereiro de 2007 (ARAÚJO, 2007).....**29**
- Figura 2** – Ilustração dos componentes celulares das plaquetas e sua organização (CASTRO, 2006).....**32**
- Figura 3** – Ilustração dos receptores da membrana plaquetária (preto) e de seus agonistas (cinza) (CASTRO, 2006).....**32**
- Figura 4** – Ilustração da ativação plaquetária (A) e da liberação dos constituintes de seus grânulos  $\alpha$  e densos (B) que ficam localizados na zona das organelas.....**32**
- Figura 5** – Ilustração do cromossomo 6 e dos genes que codificam as moléculas do sistema HLA de classe I e II.....**34**
- Figura 6** – Ilustração dos complexos glicoproteicos Ia-IIa, Iib-IIIa e Ib-IX expressos na membrana plaquetária (METCALFE, 2003).....**36**
- Figura 7** – Ilustração do modo de classificação das reações de hemaglutinação pela técnica em tubo.....**46**
- Figura 8** – Ilustração do cartão para fenotipagem dos antígenos dos sistemas Rh e Kell. Cada microtubo contém o anticorpo contra o antígeno identificado para determinação da presença ou ausência do antígeno.....**50**

<b>Figura 9</b> - Ilustração do modo de classificação das reações de hemaglutinação em gel teste evidenciando a presença e ausência do antígeno a ser determinado.....	<b>51</b>
<b>Figura 10</b> - Diagrama de pontos (DOT PLOT) de Tamanho X Granulosidade (FSC X SSC). Aquisição: 10.000 eventos (esferas).....	<b>57</b>
<b>Figura 11</b> - Histograma (FL1) controle negativo. Percentual do <i>Gate</i> – 2,55%.....	<b>58</b>
<b>Figura 12</b> - Histograma (FL1) controle positivo. Percentual do <i>Gate</i> - 99,692%.....	<b>58</b>
<b>Figura 13</b> - Diagrama de pontos (DOT PLOT) de Tamanho X Granulosidade (FSC X SSC). O gráfico foi realizado em escala logarítmica para destacar a população de plaquetas (células de interesse) excluindo as hemácias (canto superior direito) e o <i>debris</i> (lixo celular no canto inferior esquerdo).....	<b>61</b>
<b>Figura 14</b> - Histograma (FL1) controle negativo. Percentual do <i>Gate</i> - 4,50%. (Tubo 2).....	<b>62</b>
<b>Figura 15</b> - Histograma (FL1) controle positivo. Percentual do <i>Gate</i> - 97,52% (Tubo 5).....	<b>62</b>
<b>Figura 16</b> – Percentual de pacientes por grupo de estudo.....	<b>64</b>
<b>Figura 17</b> – Percentual de pacientes em relação ao tempo de acompanhamento e o levantamento de outros fatores que levaram a não conclusão do tempo estabelecido.....	<b>65</b>
<b>Figura 18</b> – Gráfico evidenciando a distribuição de freqüência do sistema sanguíneo ABO que foi avaliada em 100 pacientes dos grupos de estudo I, III, IV e V. ....	<b>67</b>

**Figura 19** – Gráfico evidenciando a distribuição de freqüência dos antígenos D, C, c, E, e que foi avaliada em 100 pacientes dos grupos de estudo I, III, IV e V.....**68**

**Figura 20** - Gráfico de linha comparando o percentual de pacientes K+k+ nos doadores de sangue do Hemocentro da HC-FMB e nos pacientes portadores de feridas crônicas e suas co-morbidades associadas. O grupo F.C.+H.A.S. corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas associados com a hipertensão arterial sistêmica. O grupo F.C.+H.A.S.+Diabetes+I.C. corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas associados a H.A.S., *diabetes mellitus* e insuficiência cardíaca. O ultimo grupo (F.C.+I.V.) corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas decorrentes da insuficiência venosa isolada.....**72**

**Figura 21** - Gráfico de linha comparando a freqüência de pacientes portadores de feridas crônicas K+k+ e K-k+ em relação ao tempo de evolução da ferida.....**73**

**Figura 22** – Percentual de pacientes em relação ao tempo de acompanhamento para a aloimunização contra anticorpos anti-HLA de classe I.....**78**

**Figura 23** – Relação entre o número de pacientes que receberam a aplicação tópica dos curativos bioativos e foram monitorados por um tempo determinado (30 dias, 2 meses, 3 meses e mais de 6 meses) e o número de pacientes que se aloimunizaram contra anticorpos anti-HLA de classe I através do teste de ratreio FlowPRA® .....**79**

**Figura 24** – Percentual de pacientes em relação ao tempo de acompanhamento para a aloimunização contra anticorpos anti-HPA.....**80**

**Figura 25** – Relação entre o número de pacientes que receberam a aplicação tópica dos curativos bioativos e foram monitorados por um tempo determinado (30 dias, 2 meses, 3 meses e mais de 6 meses) e o número de pacientes que se aloimunizaram contra anticorpos anti-HPA através do teste de Coombs indireto Plaquetário.....**81**

## *Lista de Quadros*

- Quadro 1** – Identificação da origem do serviço dos pacientes estudados.....**40**
- Quadro 2** – Identificação da origem do serviço dos pacientes estudados e os parâmetros de avaliação.....**41**
- Quadro 3** – Classificação das reações de hemaglutinação conforme intensidade.....**46**
- Quadro 4** – Determinação da classificação ABO de acordo com a interpretação dos resultados de hemaglutinação.....**46**
- Quadro 5** – Classificação das reações de hemaglutinação conforme intensidade.....**47**
- Quadro 6** – Classificação para fenotipagem do sistema Rh(D).....**49**
- Quadro 7** – Classificação para fenotipagem do sistema Rh(D) após a pesquisa do Dfraco.....**50**
- Quadro 8** - O quadro demonstra o número de pacientes portadores de feridas crônicas fenotipados para os antígenos K (Kell) e k (cellano), suas co-morbidades associadas e o percentual representativo de pacientes K+k+ e K-k+ em cada grupo. O primeiro grupo de pacientes corresponde aos portadores de feridas crônicas associados H.A.S. O segundo grupo corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas associados a H.A.S., *diabetes mellitus* e I.C. O último grupo corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas decorrentes da I.V. isolada.....**70**

**Quadro 9** - Quadro comparativo da frequência do fenótipo K+k+ e K-k+ nos doadores de sangue do Hemocentro da HC-FMB em relação aos pacientes portadores de feridas crônicas e suas co-morbidades associadas. O grupo F.C.+H.A.S. corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas associados com H.A.S. O grupo F.C.+H.A.S.+Diabetes+I.C. corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas associados a H.A.S., *diabetes mellitus* e I.C. O último grupo (F.C.+I.V.) corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas decorrentes da I.V. isolada.....**71**

**Quadro 10** - Frequências absolutas e relativas do fenótipo K+k+ e K-k+ nos 198 pacientes portadores de feridas crônicas em relação ao tempo de evolução da ferida.....**73**

# Sumário

## *Resumo*

### **Abstract**

### **Lista de Abreviações e Símbolos**

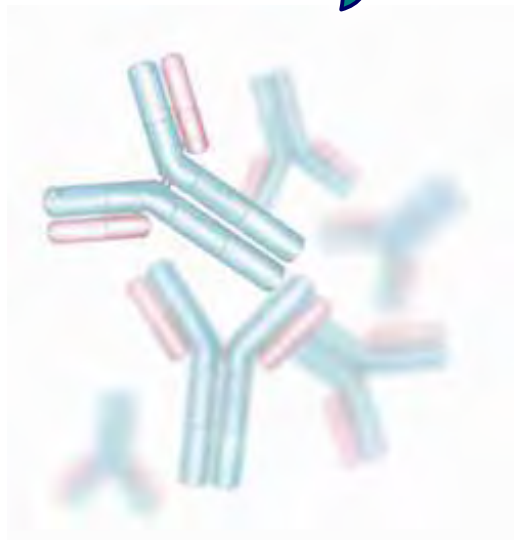
### **Lista de Ilustrações**

### **Lista de Quadros**

<b>1. Introdução</b>	<b>21</b>
<b>2. Revisão de Literatura</b>	<b>26</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>37</b>
<b>4. Casuística e Métodos</b>	<b>39</b>
1. GRUPOS DE ESTUDO	<b>40</b>
2. PARÂMETROS AVALIADOS	<b>41</b>
2.1 Fenotipagem eritrocitária	<b>42</b>
2.2 Tempo de evolução com ferida aberta	<b>42</b>
2.3 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação à formação de anticorpos anti-eritrocitários	<b>43</b>
2.4 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação à formação de anticorpos anti-leucocitários	<b>43</b>
2.5 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação à formação de anticorpos anti-plaquetários	<b>43</b>
3. METODOLOGIA UTILIZADA	<b>43</b>
3.1 Coleta de material biológico	<b>43</b>
3.2 Programação para coleta de amostras de sangue do paciente	<b>44</b>
3.3 Fenotipagem dos antígenos eritocitários	<b>45</b>
3.3.1 Fenotipagem do sistema ABO ou Tipagem direta	<b>45</b>
3.3.2 Pesquisa de Isoaglutininas ou Prova Reversa ou Tipagem Reversa	<b>47</b>

3.3.3 Fenotipagem do sistema Rh(D)	48
3.3.4 Pesquisa do D fraco	49
3.3.5 Fenotipagem eritrocitária para os antígenos C,c,E,e,K,k	50
3.4 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação aos antígenos eritrocitários	52
3.4.1 PAI em meio salino	52
3.4.2 PAI em meio de baixa força iônica	53
3.4.3 PAI em meio enzimático	54
3.4.4 Identificação de anticorpos irregulares (IAI)	54
3.5 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação aos antígenos leucocitários	55
3.5.1 FlowPRA® Screening Test (LOT 012)	55
3.6 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação aos antígenos plaquetários	58
3.6.1 Teste de Coombs indireto Plaquetário	59
<b>5. Resultados e Discussão</b>	<b>63</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>83</b>
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	<b>85</b>
<b>8. Apêndices</b>	<b>94</b>

# *1 - Introdução*



As doenças crônico-degenerativas (DCD) predominam na idade adulta, e sua incidência, prevalência e mortalidade se elevam à medida que aumenta a vida média da população (TOLEDO, 2003). Nesse período estabelecem-se hábitos e comportamentos que propiciam a aquisição dos chamados fatores de risco do estilo de vida ou do comportamento. E estes são os principais determinantes que predisõem o aparecimento de doenças cardiovasculares, patologias ou distúrbios metabólicos dentre estes a hipertensão arterial, o diabetes *mellitus*, a obesidade, a hiperlipidemia dentre outras (LESSA, 1998). Dentre as doenças crônico-degenerativas que podem passar despercebidas ou associadas a outras afecções estão as neoplasias (TOLEDO, 2003).

As DCD são caracterizadas por uma evolução lenta e progressiva, irreversível, por um longo período de latência assintomático exigindo constante supervisão, observação e cuidado (TOLEDO, 2003). Podem resultar em alterações celulares irreversíveis que são importantes fatores de risco para a disfunção endotelial facilitando o desenvolvimento de úlceras venosas e/ou isquêmicas e "pé diabético". Assim, constitui um importante problema de saúde pública no nosso meio devido à alta morbidade e mortalidade (LESSA, 1998).

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra reconstituição do tecido. É um evento dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam harmoniosamente culminando com a restauração tecidual (MANDELBAUM, 2003).

A lesão endotelial expõe a matriz extracelular sub-endotelial altamente trombogênica (exposição de colágeno). As plaquetas ativadas se ligam ao colágeno diretamente através de glicoproteínas de membrana (GPIa) ou por meio do fator de von Willebrand (FvW) por ligação da glicoproteína (GPIIb) e esta união, FvW e GPIIb forma um canal de membrana plaquetária, permitindo o fluxo de íons cálcio para o interior da célula. Uma vez ativadas, as plaquetas alteram sua forma e liberam fatores de crescimento (D'AMICO, 2002).

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos caracterizados como receptores teciduais e atuam regulando as atividades celulares, enzimáticas, dentre

outras (BARBIERI, 2004). Estes mediadores se difundem pela matriz provisória formando um gradiente quimiotático que orienta a migração das células (tanto da circulação como das regiões adjacentes) envolvidas com a instalação da resposta inflamatória (BALBINO, 2005).

Dentre os fatores de crescimento e proteínas liberadas pelas plaquetas que ficam armazenados em seus grânulos podemos citar os metabólitos do ácido aracdônico, como: fator de agregação plaquetário (PAF), fator plaquetário 4, fator de crescimento derivado de plaquetas (PGDF); quimiocinas, como o CTAP-III, prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), tromboxano (TXA<sub>2</sub>); e também proteínas como fibrinogênio, fibronectina e tromboplastina (D'AMICO, 2002). Além do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento derivado de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) (LENHARO, 2004).

Estas substâncias tornam a cicatrização mais rápida e eficiente, favorecendo a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou de células de gordura, assim, caso as plaquetas sejam empregadas como fontes exógenas de fatores de crescimento, passará a existir um reforço das concentrações já existentes, formando um estímulo adicional para as atividades celulares, potencializando o reparo tecidual (LENHARO, 2004).

Chagas *et al.* (2004) descreveram outra fração plasmática extremamente importante nos processos de regeneração e reparação: o plasma fresco congelado, que mesmo pobre em plaquetas é rico em fibrinogênio. Na presença de cálcio a trombina transforma fibrinogênio em fibrina, formando uma matriz temporária quimiotática para células. Dentre elas neutrófilos e macrófagos que removem bactérias e desnaturam os componentes da ferida. Os macrófagos, os fibroblastos, as células endoteliais e os queratinócitos secretam fatores de crescimento que promovem epitelização, produzem componentes extracelulares, estimulam angiogênese e ajudam à formação de cicatriz.

Nas plaquetas há expressão de dois tipos distintos de antígenos de significância clínica. O primeiro compreende os antígenos eritrocitários e o polimórfico HLA (*Human Leucocytes Antigens*) de classe I, enquanto o segundo são antígenos específicos das plaquetas - HPA (*Human Platelet Antigens*) (SANTOSO, 2001).

Os antígenos ABO possuem baixa expressão nas plaquetas e localizam-se nas glicoproteínas intrínsecas da membrana plasmática, incluindo: GPIb, GPIIa, GPIIb, GPIV, GPV e na molécula endotelial de adesão plaquetária (PECAM-1) (SANTOSO, 2001). Em decorrência disso desempenham um importante papel na integridade, adesão e transporte tanto intra como intercelular, por atuarem nos receptores que controlam essas atividades. Destaca-se a adesão celular, pois a sua manutenção é primordial para o desempenho esperado dos processos fisiológicos e patológicos, como: inflamação, cicatrização de feridas e neoplasias (REID, 2001).

Os antígenos do sistema Kell são metaloendopeptidases que possuem função enzimática na conversão da endotelina-3 em sua forma bioativa (ET-3), que são potentes proteínas vasoativas envolvidas na regulação da vasoconstrição (LEE, 1999; REID, 2001). Devido a esse mecanismo a relação das endotelinas e seus efeitos no organismo já estão bem estabelecidos com as doenças coronarianas, vasculares e renais (LEE, 1999).

A presença dos antígenos HLA nas plaquetas é variada e são influenciados pela expressão genética e por outros fatores que ainda são desconhecidos (SANTOSO, 2001), resultando em diversos epítomos no complexo de glicoproteínas, tais como GPIa/IIa, GPIIb/IIIa e GPIb/V/IX (LEE, 1999).

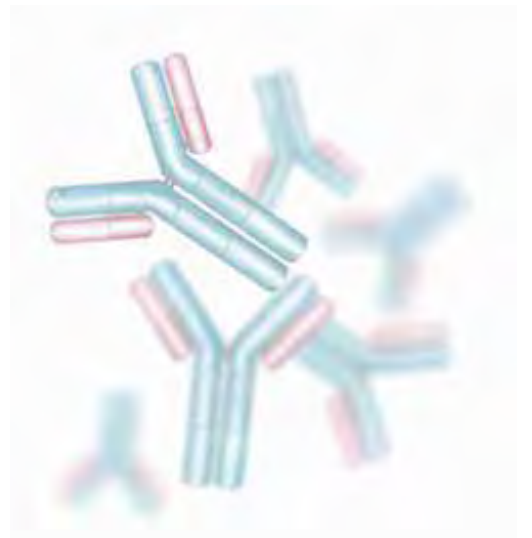
Devido à variabilidade genética, qualquer situação em que ocorra exposição a esses antígenos como: gravidez, transfusão alogênica e ocasionalmente transplante de medula óssea podem levar a uma resposta imune humoral (BLUMBERG, 2003; CARDONE, 2004; KIEFEL, 2001; SANTOSO, 2001). Os anticorpos dirigidos contra HPAs desempenham desordens plaquetárias imunomediadas (SANTOSO, 2001), dentre essas existem três com condições clínicas agravantes: trombocitopenia neonatal aloimune (PTAN), púrpura pós-transfusional (PPT) e refratariedade a transfusão de plaquetas (METCALFE, 2003; SANTOSO, 2001; TORALLES-PEREIRA, 2005; ZOTZ, 1997). Nessas condições clínicas os aloanticorpos são dirigidos contra os aloantígenos plaquetários (TORALLES-PEREIRA, 2005).

O conhecimento e a compreensão dos fatores de crescimento existentes nas plaquetas levaram o laboratório de Biocurativos do setor de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu ao desenvolvimento de produtos para utilização de concentrado de plaquetas e plasma homólogos excedentes da rotina transfusional na forma de curativos com o objetivo de acelerar o processo de reparo tecidual. Esses curativos foram denominados de curativos bioativos e possuem aprovação do CONEP para serem utilizados e intitulam-se: Biogel, Biofibrin e Gel Mix.

Como já demonstrado em trabalhos anteriores desenvolvidos neste laboratório, Garcia (2004) e Araújo (2007), esses curativos bioativos possuem ação potencializadora no reparo tecidual de feridas de diversas etiologias.

Sabendo dos efeitos benéficos dos curativos bioativos no processo de cicatrização e tendo conhecimento da exposição a antígenos altamente imunogênicos a que esses pacientes serão expostos, o presente estudo tem por finalidade avaliar o potencial imunogênico desses curativos em paciente submetidos a essa terapêutica e ampliar os estudos que apontam o antígeno eritrocitário Kell com um marcador preditivo da evolução de feridas crônicas.

# 2-Revisão de Literatura



## Revisão de Literatura

### Feridas crônicas

No Brasil, as feridas decorrentes das doenças crônico-degenerativas constituem um sério problema de saúde pública devido ao grande número de doentes com alterações na integridade da pele. O elevado número de pessoas com úlceras contribui para onerar o gasto público além de interferir na qualidade de vida da população (BRASIL, 2002). São mais frequentes na população entre os 15 e os 65 anos, idade em que o estilo de vida e o comportamento predispõem o aparecimento de doenças cardiovasculares, patologias ou distúrbios metabólicos dentre estes a hipertensão arterial, o diabetes *mellitus*, a obesidade, a hiperlipidemia dentre outras (LESSA, 1998).

Estas doenças caracterizam-se por possuírem longo curso clínico e resultarem em alterações celulares que são fatores de risco para a disfunção endotelial e consequentemente facilitam o desenvolvimento de úlceras venosas e/ou isquêmicas e "pé diabético" (LESSA, 1998).

A característica bioquímica do diabetes *mellitus* é uma hiperglicemia crônica devido a distúrbios metabólicos de etiologia múltipla, e clinicamente, pelo desenvolvimento de complicações relacionadas à angiopatia (DEALEY, 2001; DIAS, 2001). Ao descrever sobre as causas do "pé diabético", diversos autores destacam: a neuropatia, a doença vascular periférica e a infecção como as principais causas de gangrena e amputações (JORGE, 2003; LOPES, 2003; LOIOLA, 2001).

A importância socioeconômica da insuficiência venosa crônica (IVC) levou ao interesse tanto do conhecimento científico como clínico nas questões relacionadas a essa doença. A IVC caracteriza-se como uma anormalidade do funcionamento do sistema venoso causado por uma incompetência valvular associada ou não à obstrução do fluxo venoso que pode afetar tanto o sistema venoso superficial como profundo ou ambos. A IVC e suas complicações quase sempre estão relacionadas ao inadequado funcionamento de uma bomba muscular na panturrilha (LIMA, 2001).

Essa bomba muscular quando em perfeito funcionamento, força o sangue das veias profundas em direção ao coração levando a uma diminuição da pressão interior

do sistema venoso profundo. A lesão de qualquer componente dessa bomba muscular poderá ocasionar um refluxo ou uma insuficiência venosa (DEALEY, 2001; HESS, 2000). Mas o funcionamento deficiente poderá reduzir a pressão no sistema venoso profundo causando manifestações de várias doenças venosas inclusive veias varicosas, lipodermatosclerose aguda e crônica e úlceras venosas (GUYTON, 2002).

As úlceras venosas são consideradas uma complicação tardia da IVC (LIMA, 2001). A localização mais freqüente é a região do maléolo e terço distal da perna, em geral, de progressão lenta, bordas infiltradas, leito da ferida com fibrina e, quase sempre, acompanhada de infecção secundária. Surgem após trauma e, muitas vezes, são precedidas por episódio de erisipela, celulite ou eczema de estase (HESS, 2000; MAFFEI, 2002).

Em relação às úlceras arteriais, Guyton e Hall (2002) a definem como o resultado da inadequada perfusão tecidual nos pés ou nas pernas devido ao bloqueio completo ou parcial do suprimento arterial para as pernas (GUYTON, 2002). De acordo com Hess (2000), a insuficiência arterial é a disfunção do fluxo sanguíneo arterial que conduz à isquemia tecidual. Essa disfunção pode ocorrer de forma aguda como em casos de traumatismo ou trombose. E também de forma crônica quando são secundárias a doenças como aterosclerose. Tanto uma como a outra podem causar a formação de úlceras de membros inferiores em consequência da isquemia tecidual (HESS, 2000).

Nos casos cujas úlceras arteriais secundárias a aterosclerose a cicatrização é difícil e há risco considerável de que se instale uma insuficiência vascular isquêmica aumentando a possibilidade de septicemia, pois a aterosclerose é um processo degenerativo que afeta as artérias devido ao acúmulo de colesterol LDL na parede das artérias, levando a uma obstrução progressiva e conseqüentemente a uma inadequada perfusão tecidual nos membros inferiores (DEALEY, 2001; JORGE, 2003; MAFFEI, 2002). Os principais fatores para o desenvolvimento da aterosclerose são: idade, história familiar, hipertensão, tabagismo, hiperlipidemia e o diabetes. Sendo os quatro últimos, frequentemente, denominados como principais fatores de risco (SCHCOEN, 2000; COTRAN, 2000).

As características principais das úlceras arteriais são: pequenas, redondas, com a margem lisa e bem demarcada. Possui leito de ferida pálido e não tem tecido de granulação. Podem ocorrer na parte distal do membro, principalmente nos maléolos laterais e dorso dos pés, geralmente são profundas e muito dolorosas (HESS, 2000).



**Figura 1** – Ilustração de feridas crônicas de membro inferior de pacientes da Unidade Básica de Saúde do Município de Maringá – Centro de Saúde Quebec II. Esses pacientes receberam o tratamento com os curativos bioativos e foram acompanhados no projeto de mestrado da aluna Illymack Ferreira Canedo de Araújo, cuja dissertação foi defendida em fevereiro de 2007 (ARAÚJO, 2007).

## **Pele e Cicatrização**

A pele é o mais extenso órgão do corpo humano e corresponde a aproximadamente 5% do peso total sendo considerado o principal meio de comunicação com o ambiente exterior. Constitui um limite anatômico e uma barreira de proteção contra ataques físicos, químicos e contra microorganismos. A sua existência é imprescindível à manutenção da vida, além de outras características peculiares que variam com sua localização conferindo-lhe funções específicas (MANDELBAUM, 2003).

Após uma lesão na pele inicia-se o processo de cicatrização, onde uma seqüência de eventos biológicos envolvendo inflamação, quimiotaxia, proliferação, diferenciação celular, remodelação tecidual culminam com a correção do defeito e a restauração da superfície da pele (CANDIDO, 2001; IRION, 2006). Os autores dividem esse processo em três fases, e enfatizam os aspectos macroscópicos e histológicos predominante em cada uma: 1ª fase – inflamatória ou inicial caracterizada pela hemostasia e pela resposta inflamatória; 2ª fase – intermediária descrita pela fibroplasia (formação do tecido de granulação e reepitelização) e de deposição da matriz extracelular (MEC); e na 3ª fase a remodelagem (BALBINO, 2005; MANDELBAUM, 2003).

As feridas decorrentes das doenças crônico-degenerativas, em relação ao comprometimento tecidual, são classificadas como feridas de espessura total, ou seja, afeta a derme completa e pode se estender ao tecido celular subcutâneo. Portanto, necessita da formação de um novo tecido, o tecido de granulação. A cicatrização também depende de vários fatores locais e gerais, como a localização anatômica, o tipo de pele e a raça (MANDELBAUM, 2003).

## **Plaquetas**

As plaquetas são pequenas células anucleadas e discóides, derivadas dos megacariócitos e possuem uma vida média de dez dias. Acredita-se que sua principal função é manter a integridade do sistema circulatório evitando a perda de sangue. Após a lesão na parede de um vaso ocorre a exposição de colágeno e, conseqüentemente, a adesão das plaquetas no local da injúria. Na presença de trombina ocorre, em seguida, a ativação plaquetária devido a uma mudança conformacional no receptor GPIIb/IIIa,

tornando-o apto a ligação de diferentes glicoproteínas como fibrinogênio, FvW, fibronectina e vitronectina possibilitando, assim, a agregação plaquetária. Finalmente, esta ativação catalisa a conversão de protrombina em trombina, uma enzima proteolítica que transforma fibrinogênio em fibrina, formando uma rede aderente que estabiliza o coágulo sangüíneo (GOMES, 2000).

Apesar de sua aparência simples no esfregaço de sangue periférico, onde se mostram como simples fragmentos citoplasmáticos de aspecto granular, para desencadear todo o mecanismo descrito acima as plaquetas possuem uma estrutura discóide complexa e sua estrutura interna é dividida em quatro zonas:

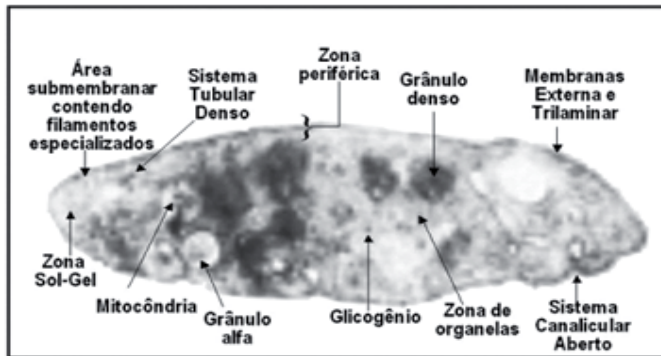
1. Zona periférica – compreende membranas externa e interna (trilaminar) e outras estruturas como o sistema de canais conectados à superfície (figura 2). Esse sistema de canais é denominado de sistema canicular aberto e são responsáveis pela troca de moléculas com o meio externo (CASTRO, 2006). A membrana da plaqueta (figura 3) é rica em glicoproteínas, que servem como alvos para as reações de adesão ou como receptores que desencadeiam a ativação plaquetária (figura 4) (YIP, 2005).

2. Zona sol-gel – Essa região se encontra abaixo da zona periférica (figura 2) e é composta de: a) citoesqueleto, que fornece a sustentação para a forma discóide da plaqueta; e b) do sistema contrátil, que quando ativada permite a mudança da forma discóide, o prolongamento de pseudópodes, a contração interna e a liberação dos constituintes granulares (TORTI, 1999).

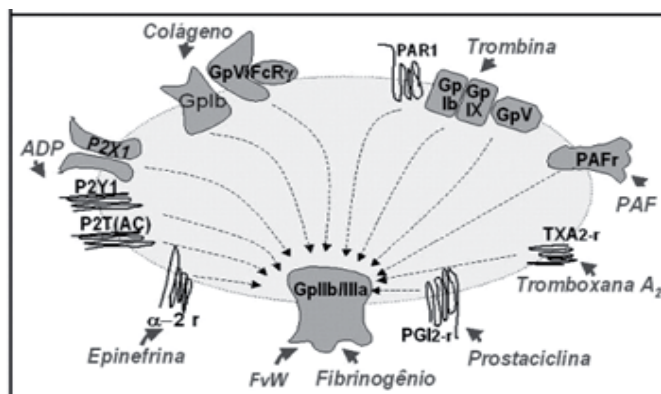
3. Zona de organelas – Essa região (figura 2) compreende os grânulos  $\alpha$ , que contêm: proteínas adesivas, FvW, trombospondina, vitronectina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator IV plaquetário, fatores da coagulação e inibidor do ativador plasminogênio. E também os grânulos densos, que contêm: trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), serotonina e cálcio. Além dos grânulos  $\alpha$  e densos possui componentes celulares, tais como lisossomos e mitocôndria que participam dos processos metabólicos da plaqueta e armazenam enzimas e outras moléculas essenciais para a função plaquetária (FLAUMENHAFT, 2003).

4. Sistema membranar – Essa zona inclui o sistema tubular denso (figura 2) onde se encontra íons cálcio concentrado, importante para desencadear os eventos contráteis e os sistemas enzimáticos (CASTRO, 2006).

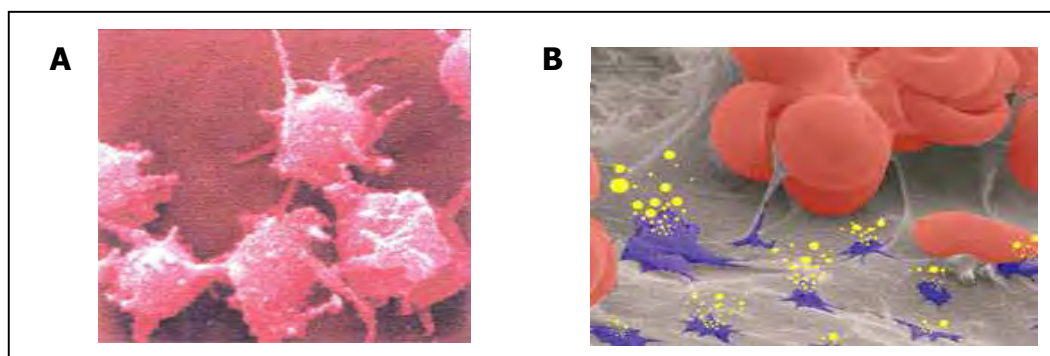
Na membrana plaquetária há expressão de dois tipos distintos de antígenos de significância clínica. O primeiro compreende os antígenos eritrocitários e o polimórfico HLA (*Human Leucocytes Antigens*) de classe I, enquanto o segundo são antígenos específicos das plaquetas - HPA (*Human Platelet Antigens*) (METCALFE, 1999; SANTOSO, 2001).



**Figura 2**– Ilustração dos componentes celulares das plaquetas e sua organização (CASTRO, 2006).



**Figura 3**– Ilustração dos receptores da membrana plaquetária (preto) e de seus agonistas (cinza) (CASTRO, 2006).



**Figura 4** – Ilustração da ativação plaquetária (A) e da liberação dos constituintes de seus grânulos α e densos (B) que ficam localizados na zona das organelas.

## **Aloantígenos expressos na membrana plaquetária**

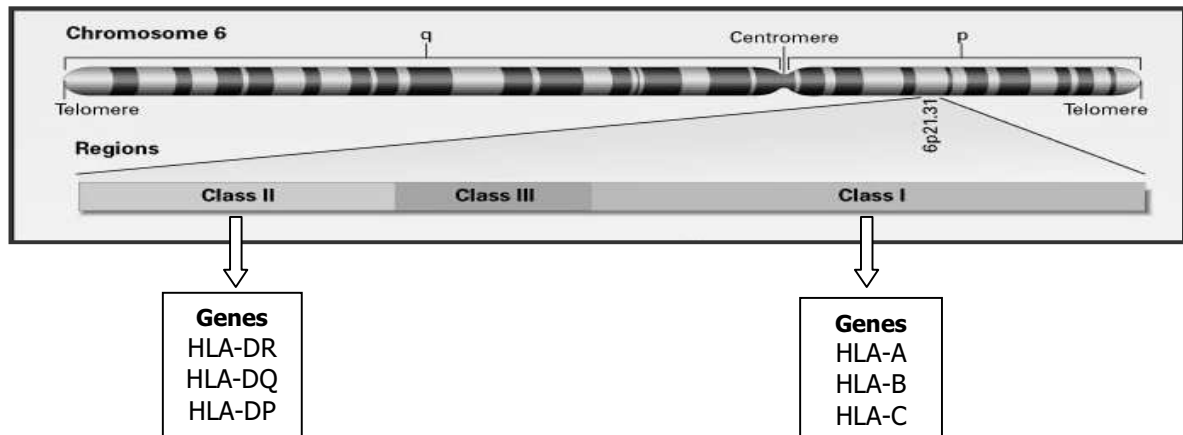
### Sistema Eritrocitário

As reações de aglutinação das hemácias por isoaglutininas do soro sanguíneo, observadas por Landsteiner no início do século XX, permitiram classificar os seres humanos para o primeiro sistema de grupo sanguíneos descoberto, o sistema ABO (BEIGUELMAN, 2003). Atualmente, são reconhecidos 29 sistemas de grupos sanguíneos os quais são herdados geneticamente e definidos por seqüência de aminoácidos específicos que constituem uma proteína ou um carboidrato expresso na membrana eritrocitária. O sistema Rh é um mosaico constituído por vários antígenos, entre eles: C, c, E e e (HARMERING, 2006).

Apesar da diversidade e complexidade dos sistemas sanguíneos eritrocitários que possuem extrema importância para medicina transfusional, nas plaquetas há somente a expressão dos antígenos do sistema ABO e em baixa quantidade. De acordo com Santoso (2001), esses antígenos estão localizados nas glicoproteínas intrínsecas da membrana plaquetária GPIb, GPIIa, GPIIb, GPIV, GPV (SANTOSO, 2001).

### Sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*)

O complexo principal de histocompatibilidade humano (CPH) ou sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) foi descoberto na década de 50, quando anticorpos leucoaglutinadores foram identificados no soro de pacientes politransfundidos e de mulheres múltiplas. Os genes que codificam as moléculas de histocompatibilidade estão localizados no braço curto do cromossomo 6 (figura 5) (OLIVEIRA, 2002).



**Figura 5** – Ilustração do cromossomo 6 e dos genes que codificam as moléculas do sistema HLA de classe I e II.

Didaticamente, o sistema HLA é dividido em três regiões: classe I, II e III, conforme sua localização cromossômica. Os loci HLA-A, -B, -C codificam a cadeia  $\alpha$  das moléculas HLA de classe I clássicas, e estão presentes em praticamente todas as células nucleadas. Os genes HLA-DR, -DQ e -DP codificam as moléculas do HLA de classe II presentes, principalmente, na superfície de células apresentadoras de antígenos, células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. A região de classe III possui genes que codificam componentes do complemento, das enzimas 21-hidroxilase, proteína do choque térmico e fator de necrose tumoral (ALVES, 2006).

As moléculas de classe I apresentam peptídeos virais aos linfócitos T citotóxicos (CD8+). Os antígenos virais produzidos pela degradação intracelular das proteínas do vírus infectante e conectados às moléculas HLA de classe I são reconhecidos pelos linfócitos CD8+ que promovem a lise das células por eles infectadas (ALVES, 2007). As moléculas HLA de classe II estão envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4+ que secretam citocinas e desempenham importante papel na rejeição de enxertos (LANDI, 1999).

Os genes do sistema HLA são os mais polimórficos dos mamíferos. É possível que o polimorfismo exista para garantir a sobrevivência das espécies, pois a herança de um haplótipo materno e paterno em co-dominância faz com que cada pessoa possa expressar em suas células diferentes moléculas de HLA, o que lhe confere a vantagem de apresentar mais peptídeos antigênicos às células T, e assim poder combater maior número de infecções. Quanto maior o polimorfismo do HLA numa população, maior será a probabilidade de herdar haplótipos diferentes e, portanto, ser heterozigoto para todos os loci (ALVES, 2005).

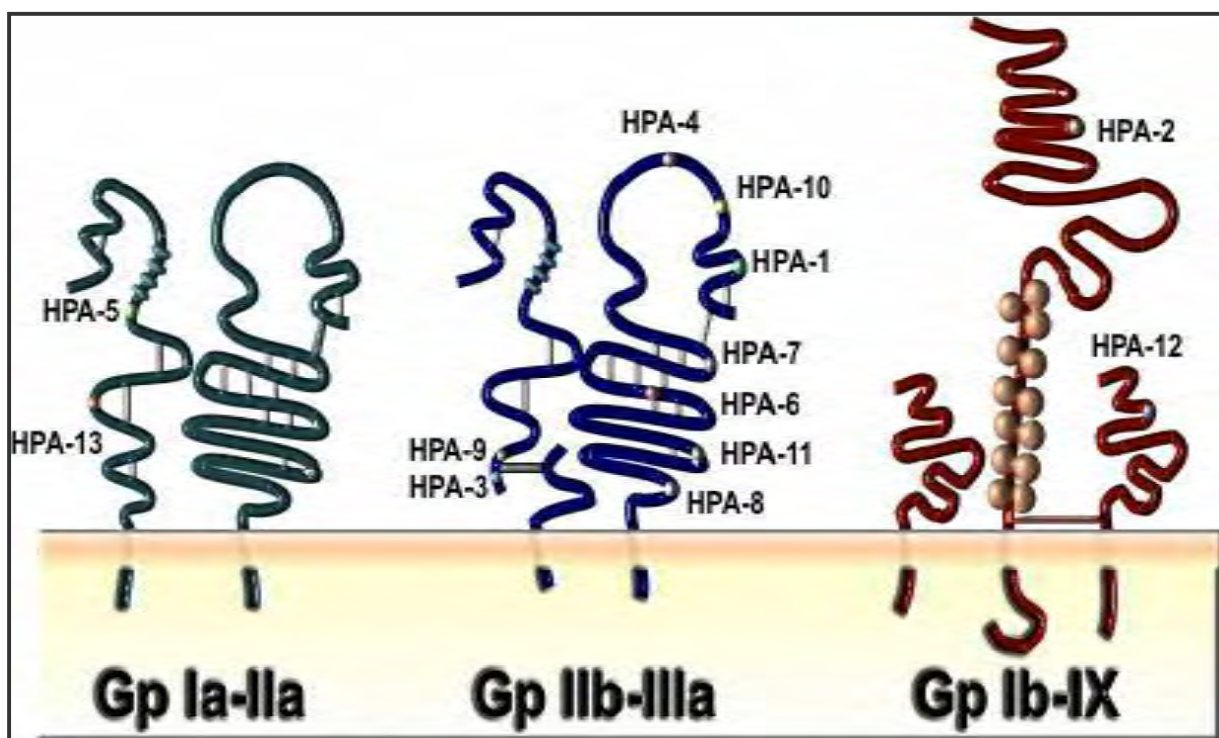
Aloimunização por HLA nas transfusões sanguíneas, ocorre quando as células alogênicas do doador que expressam as diferenças polimórficas dos alelos HLA são responsáveis pela sensibilização do receptor. Os linfócitos T CD4+ específicos recebem o primeiro sinal de ativação (via receptores de membrana) e outros estímulos complementares que levam à proliferação e à produção de citocinas. As citocinas induzem a expansão de clones de linfócitos T CD8+ alorreativos e/ou a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos. Os plasmócitos secretam anticorpos específicos para os determinantes antigênicos das moléculas HLA do doador. Paralelamente, células de memória, responsáveis pelas respostas anamnásticas, são formadas. A aloimunização pode ocorrer tanto pelos antígenos HLA classe I, presentes na superfície das plaquetas e leucócitos, quanto pelos antígenos HLA classe II, presentes na superfície de alguns leucócitos (OLIVEIRA, 2002).

#### Sistema HPA (*Human platelet antigen*)

Os antígenos plaquetários humanos (*Human platelet antigen* - HPA) são caracterizados por seqüências polimórficas de nucleotídeos nos genes que codificam diferentes aminoácidos que são expressos nas glicoproteínas da membrana plaquetária (figura 6) (ROBINSON, 2005; SHIH, 2003; WIWANITKIT, 2005). Esse polimorfismo pode resultar no desenvolvimento de aloimunização diante da incompatibilidade entre doador e receptor de plaquetas ou entre mães e fetos durante a gestação. Pois, os anticorpos anti-plaquetários resultantes da aloimunização levam à destruição das plaquetas e, conseqüente, plaquetopênia (CASTRO, 2004; PAVKOVIC, 2006).

A plaquetopênia decorrente da aloimunização pode resultar em doenças hemorrágicas graves como a púrpura trombocitopênica aloimune neonatal (PTAN) e a púrpura pós-transfusional (PPT). E também na resposta inadequada à transfusão de plaquetas, conhecida como refratariedade plaquetária (JONES, 2003; METCALFE, 1999; SANTOSO, 2001).

Atualmente, são conhecidos cinco sistemas aloantigênicos bialélicos (HPA-1 a -5) e 11 antígenos de baixa frequência (HPA-6W, etc.) localizados em cinco glicoproteínas da membrana plaquetária: GpIa, GpIba, GpIbb, GpIIb e GpIIIa. Os sistemas mais frequentemente envolvidos na aloimunização são o HPA-1 e 5, seguidos pelo HPA-3, HPA-2 e mais raramente o HPA-4 A (CASTRO, 2004).



**Figura 6** – Ilustração dos complexos glicoproteicos Ia-IIa, Iib-IIIa e Ib-IX expressos na membrana plaquetária (METCALFE, 2003).

# 3 - Objetivos



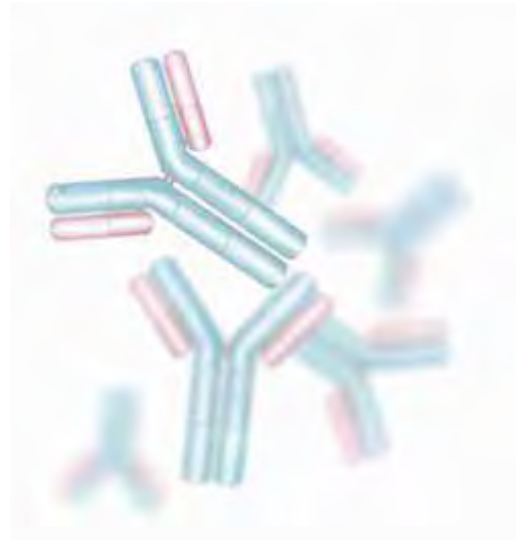
## **Objetivo geral**

Avaliar o potencial imunogênico dos curativos bioativos utilizados no tratamento de feridas de diversas etiologias.

## **Objetivos específicos**

- Ampliar os estudos que avaliam a correlação dos antígenos eritrocitários dos sistemas ABO e Rh no processo de saúde e doença, especificamente no processo de lesão ou cicatrização;
- Ampliar os estudos que apontam o antígeno eritrocitário Kell como um marcador preditivo da evolução de feridas crônicas;
- Ampliar a determinação do potencial imunogênico dos curativos bioativos monitorando a Pesquisa de anticorpos anti-eritrocitários;
- Determinar o potencial imunogênico dos curativos bioativos monitorando a Pesquisa de Anticorpos anti-HLA Classe I;
- Determinar o potencial imunogênico dos curativos bioativos monitorando a Pesquisa de Anticorpos anti-HPA.

# 4 - Casuística e Métodos



Este capítulo será didaticamente dividido em: 1. Constituição dos grupos de estudo; 2. Parâmetros avaliados; e 3. Metodologia utilizada. Nem todos os pacientes analisados para um parâmetro foram analisados para todos os demais. Os parâmetros analisados relacionaram-se a fenotipagem dos antígenos eritrocitários, pesquisa de anticorpos: anti-eritrocitários, anti-leucocitários e anti-plaquetários.

## 1. GRUPOS DE ESTUDO

Foi realizado um estudo multicêntrico onde um total 198 pacientes que receberam a aplicação dos curativos bioativos foi avaliado. No quadro abaixo segue uma relação do número de pacientes avaliados e do serviço ao qual pertencem:

**Quadro 1** – Identificação da origem do serviço dos pacientes estudados.

Grupo	Serviço	<i>n</i>
I	<b>Centro de Saúde Quebec II – Maringá (oriundos da Dissertação de Araújo, 2007)</b>	<b>62</b>
II	<b>Ambulatório de Dermatologia e Cirurgia Vascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB)</b>	<b>40</b>
III	<b>Ambulatório de Biocurativos do HC-FMB</b>	<b>72</b>
IV	<b>Hospital Amaral Carvalho de Jaú (HAC-Jaú)</b>	<b>15</b>
V	<b>Programa Saúde da Família de Brotas</b>	<b>09</b>
	<i>TOTAL</i>	<i>198</i>

Todos os pacientes em uso dos curativos bioativos que constituíram esses grupos de estudo tiveram os mesmo parâmetros de monitoramento e aplicação dos curativos como na metodologia utilizada para os pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os pacientes oriundos do grupo I são pertencentes a Unidade Básica de Saúde do Município de Maringá – Centro de Saúde Quebec II, foram acompanhados e monitorados pela aluna de mestrado Illymack Ferreira Canedo de Araújo, cuja dissertação de mestrado foi defendida em fevereiro de 2007.

Os pacientes descritos nos grupos II e III que são, respectivamente, do Ambulatório de Dermatologia e da Cirurgia Vascular do HC-FMB e também os pacientes do grupo V que são do Programa Saúde da Família de Brotas foram acompanhados pela Profª Drª Elenice Deffune, do Hemocentro do HC-FMB. Os pacientes do HAC-Jaú, grupo IV, foram acompanhados pela aluna de mestrado Rosemeire Simone Dellacrode Giovanazzi, cuja dissertação será defendida em 2009.

Os pacientes avaliados nesse estudo foram incluídos neste protocolo de pesquisa após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Este termo ficou sob a responsabilidade de cada pesquisador com o seu grupo de pacientes.

## 2. PARÂMETROS AVALIADOS

Os parâmetros avaliados relacionaram a fenotipagem dos antígenos eritrocitários, a presença do antígeno Kell no tempo de evolução com ferida aberta e a aloimunização contra antígenos eritrocitários, leucocitários e plaquetários.

Tendo em vista os custos do projeto, a determinação do "n" foi diferente em relação ao parâmetro de avaliação, como pode ser visto na descrição de cada grupo de estudo (quadro 2).

**Quadro 2** – Identificação da origem do serviço dos pacientes estudados e os parâmetros de avaliação.

Grupo	N	A	B	C	D	E	F
		Fenotipagem ABO/Rh	Fenotipagem Kell	Tempo de evolução	PAI	Anti-HLA	Anti-HPA
<i>I</i>	<b>62</b>	X	X	X	X		
<i>II</i>	<b>40</b>		X	X			
<i>III</i>	<b>58</b>		X	X			
	<b>14</b>	X	X	X	X	X	X
<i>IV</i>	<b>15</b>	X	X	X	X	X	X
<i>V</i>	<b>09</b>	X	X	X	X	X	X
<i>TOTAL</i>	<b>198</b>	<b>100</b>	<b>198</b>	<b>198</b>	<b>100</b>	<b>38</b>	<b>38</b>

**A** - Fenotipagem para os antígenos do sistema ABO, Rh (D,C,c,E,e); **B**- Fenotipagem para o antígeno Kell (K) e celano (k); **C**- Tempo de evolução com ferida aberta; **D**- Pesquisa de anticorpos eritrocitário ou pesquisa de anticorpos irregulares (PAI); **E**- Pesquisa de anticorpos leucocitários (anti-HLA de classe I); e **F**- Pesquisa de anticorpos plaquetários (anti-HPA).

## **2.1 Fenotipagem eritrocitária**

Quanto à fenotipagem eritrocitária foi realizada a determinação dos antígenos do sistema ABO, Rh (D,C,c,E,e) e Kell (K,k). O intuito foi de relacionar algum antígeno eritrocitário como marcador preditivo de evolução das feridas crônicas como havia sugerido a dissertação defendida por Araújo em 2007.

A fenotipagem para o sistema ABO e Rh (D,C,c,E,e) foi realizada em 100 pacientes, conforme assinalado no quadro acima, e a fenotipagem para o antígeno Kell (K,k) foi realizada nos cinco grupos de estudos, totalizando 198 pacientes.

Os resultados da fenotipagem ABO e Rh serão discutidos levando em consideração os relatórios de frequência do Estado de São Paulo descritos no livro de Beiguelman (2003). Já os resultados da fenotipagem para o sistema Kell serão discutidos levando-se em consideração os relatórios de fenotipagem de doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu. Nesta etapa, o grupo controle foi constituído por doadores de sangue do Hemocentro do HC-FMB, cujo "n" correspondeu a 13.450 indivíduos e foi efetuada apenas a fenotipagem para os antígenos Kell (K) e cellano (k) do sistema Kell.

## **2.2 Tempo de evolução com ferida aberta**

Quanto à avaliação do tempo de evolução com ferida aberta os dados foram agrupados em três classes:

- 1 a <5 anos;
- 5 a <20 anos; e
- 20 anos ou mais.

O intuito da avaliação do tempo de evolução com ferida aberta foi de relacionar o antígeno eritrocitário Kell como marcador preditivo de má-evolução das feridas crônicas como havia sugerido a dissertação defendida por Araújo em 2007. O acompanhamento do tempo de evolução foi realizado nos 198 pacientes estudados.

### **2.3 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação à formação de anticorpos anti-eritrocitários.**

A realização da pesquisa de anticorpos anti-eritrocitários irregulares ou simplesmente pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) foi instituída com objetivo de analisar o potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação aos antígenos eritrocitários sabendo-se que alguns destes antígenos encontram-se solúveis no plasma. A PAI foi realizada nos grupos I, III, IV e V totalizando 100 pacientes. Os resultados deste trabalho fazem uma análise comparativa àqueles obtidos preliminarmente por Araújo (Grupo I), com os executados nesta nova etapa do projeto (Grupo III, IV e V).

### **2.4 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação à formação de anticorpos anti-leucocitários.**

A realização da pesquisa de anticorpos anti-leucocitários foi instituída com objetivo de analisar o potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação aos antígenos HLA-classe I. Esses resultados foram executados nesta nova etapa do projeto (Grupo III, IV e V).

### **2.5 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação à formação de anticorpos anti-plaquetários.**

A realização da pesquisa de anticorpos anti-plaquetários foi instituída com objetivo de analisar o potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação aos antígenos expressos nas plaquetas (*Human Platelet Antigens* – HPA). Esses resultados foram executados nesta nova etapa do projeto (Grupo III, IV e V).

## **3. METODOLOGIA UTILIZADA**

### **3.1 Coleta de material biológico**

Após a seleção e classificação o paciente foi submetido à coleta de sangue periférico. Esse procedimento foi realizado somente após a verificação de dados que confirmassem a identificação do paciente. A coleta de sangue foi realizada através do

garroteamento rápido do braço do paciente, assepsia com álcool 70° e a seguir a venopunção (todo o procedimento de coleta foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido no hospital em questão).

Para a coleta do sangue foi utilizado Vacuette<sup>®</sup>, sistema de coleta de sangue a vácuo, em dois tubos distintos: tubo EDTA Vacuette<sup>®</sup> contendo solução EDTA, essa solução se liga aos íons cálcio, bloqueando assim, a cascata de coagulação para obtenção de sangue total e/ou plasma. O outro tubo utilizado foi Sorologia VACUETTE<sup>®</sup>, que são revestidos internamente com partículas de sílica micronizada, as quais ativam a coagulação quando os tubos são gentilmente invertidos. Além disso, contêm uma barreira de gel presente no fundo do tubo, e este material possui densidade intermediária entre o sangue coagulado e o soro e durante a centrifugação, a barreira de gel move-se para cima posicionando-se entre o soro e o coágulo, formando uma barreira estável que separa o soro dos outros componentes celulares.

As amostras foram corretamente identificadas (nome, registro e data da coleta) como ilustra a etiqueta abaixo:

Nome Completo: _____
Registro: _____ Data: ____/____/____

Após a retração do coágulo as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 3200rpm e alíquotadas em microtubos tipo Eppendorf de 1,5mL para o armazenamento em freezer -80°C.

### 3.2 Programação para coleta de amostras de sangue do paciente

Os pacientes foram submetidos à coleta de amostras nos seguintes tempos:

- **D<sub>0</sub>** – Antes de iniciar o tratamento com os curativos bioativos.
- **D<sub>30</sub>** – Trinta dias após o início do tratamento.
- **D<sub>60</sub>** – Sessenta dias após o início do tratamento.

### **3.3 Fenotipagem dos antígenos eritrocitários**

Essa avaliação foi realizada somente no momento  $D_0$  para levantar os parâmetros imunohematológicos de cada paciente.

#### **3.3.1 Fenotipagem do sistema ABO ou Tipagem direta**

Para a determinação do sistema ABO foi aplicado a técnica de hemaglutinação em tubo utilizando anticorpos monoclonais comerciais anti-A, anti-B e anti-AB (Diamed<sup>®</sup>).

##### **3.3.1.1 Preparo da suspensão de hemácias a 5%**

Foram diluídos em tubo de hemólise;

- 50 $\mu$ L de concentrado de hemácias do paciente;
- 950 $\mu$ L de solução fisiológica 0,9%.

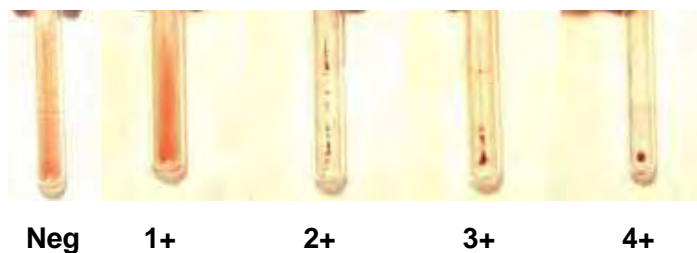
##### **3.3.1.2 Realização do teste**

- Foram nomeados três tubos de hemólise com: anti-A, Anti-B e Anti-AB;
- Adicionados 50 $\mu$ L do respectivo anticorpo monoclonal;
- Acrescentado 50 $\mu$ L da suspensão de hemácias em cada tubo;
- Homogeneizados;
- Submetidos a uma centrifugação por 20 segundos a 3400rpm;
- A leitura foi realizada utilizando aglutinoscópio.

### 3.3.1.3 Interpretação dos Resultados

**Quadro 3** – Classificação das reações de hemaglutinação conforme intensidade.

<b>INTENSIDADE DE HEMAGLUTINAÇÃO</b>	<b>PARÂMETROS DE OBSERVAÇÃO</b>
4+	Botão sólido
3+	Aglutinados em grumos grandes
2+	Aglutinado em grumos pequenos
1+	Aglutinado em grumos menores
W (WEAK – FRACO)	Sem grumos a olho nu
Neg	Hemácias livres e suspensas pelo tubo



**Figura 7** – Ilustração do modo de classificação das reações de hemaglutinação pela técnica em tubo.

### 3.3.1.4 Classificação dos Resultados

**Quadro 4** – Determinação da classificação ABO de acordo com a interpretação dos resultados de hemaglutinação.

<b>SISTEMA SANGUÍNEO ABO</b>	<b>Anti-A</b>	<b>Anti-B</b>	<b>Anti-AB</b>
<b>A</b>	<b>+</b>	<b>Neg</b>	<b>+</b>
<b>B</b>	<b>Neg</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>AB</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>O</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>

### 3.3.2 Pesquisa de Isoaglutininas ou Prova Reversa ou Tipagem Reversa

De acordo a Resolução RDC 153 de 14 de Junho de 2004, a tipagem reversa deve sempre ser realizada para confirmação do grupo sanguíneo ABO, testando o soro ou plasma com uma suspensão de hemácias conhecidas A<sub>1</sub> e B e, opcionalmente A<sub>2</sub> e O. Foi realizado pela técnica de hemaglutinação em tubo com hemácias comerciais A<sub>1</sub> e B (Diamed®).

#### 3.3.2.1 Realização do teste

- Foram nomeados dois tubos de hemólise com: A<sub>1</sub> e B;
- Adicionados 50µL da respectiva hemácia comercial;
- Acrescentado 100µL do soro do paciente em cada tubo;
- Homogeneizados;
- E submetidos a uma centrifugação por 20 segundos a 3400rpm;
- A leitura foi realizada utilizando aglutinoscópio.

#### 3.3.2.2 Interpretação dos Resultados

- Os resultados foram interpretados de acordo com o item 3.3.1.3.

#### 3.3.2.3 Classificação dos Resultados

**Quadro 5** – Classificação das reações de hemaglutinação conforme intensidade.

SISTEMA SANGUÍNEO ABO	HEMÁCIA A <sub>1</sub>	HEMÁCIA B
<b>A</b>	<b>Neg</b>	<b>+</b>
<b>B</b>	<b>+</b>	<b>Neg</b>
<b>AB</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>
<b>O</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

### **3.3.3 Fenotipagem do sistema Rh(D)**

A presença ou ausência do antígeno D foi realizada pela técnica de hemaglutinação em tubo utilizando anticorpo monoclonal comercial anti-D (Diamed®). De acordo com a Resolução RDC 153 de 14 de Junho de 2004, a presença do antígeno D deve ser determinada colocando-se os eritrócitos a serem testados em contato com anticorpos anti-D, e em paralelo deve sempre efetuar um controle de Rh, utilizando-se para isto soro-controle de Rh do mesmo fabricante do soro anti-D.

Se a reação for negativa para a presença do antígeno D, deve ser efetuada técnica para a exclusão de D-fraco. Quando a prova para D ou a prova para D-fraco resultar positiva deve ser rotulado como "Rh positivo". Quando ambas as provas resultarem negativas deve ser rotulado como "Rh negativo".

Se a reação com o soro-controle de Rh for positiva, a tipagem Rh é considerada inválida e testes adicionais são necessários para resolução do problema. Uma alternativa é realização do teste de antiglobulina direto (TAD) para verificar a presença de anticorpos ligados a hemácias o que facilitariam a aglutinação espontânea.

#### **3.3.3.1 Preparo da suspensão de hemácias a 5%**

- Conforme descrito no item 3.3.1.1.

#### **3.3.3.2 Realização do teste**

- Foram nomeados dois tubos de hemólise com: anti-D e controle de Rh;
- Adicionados 50µL do anticorpo no primeiro tubo e 50µl do controle de Rh no segundo;
- Acrescentado 50µL da suspensão de hemácias em cada tubo;
- Homogeneizados;
- Submetidos a uma centrifugação por 20 segundos a 3400rpm;
- A leitura foi realizada utilizando aglutinoscópio.

### 3.3.3.3 Interpretação dos Resultados

- Os resultados foram interpretados conforme descrito no item 3.3.1.3.

### 3.3.3.4 Classificação dos Resultados

**Quadro 6** – Classificação para fenotipagem do sistema Rh(D).

	<b>Anti-D</b>	<b>Controle de Rh</b>
<b>Rh(D) positivo</b>	<b>+</b>	<b>Neg</b>
<b>Rh(D) negativo</b>	<b>Neg*</b>	<b>Neg*</b>

\* **Necessário pesquisa para investigação do D fraco (item 3.3.4).**

### 3.3.4 Pesquisa do D fraco

- Foram nomeados dois tubos de hemólise com: anti-D e controle de Rh;
- Adicionados 50µL do anticorpo no primeiro tubo e 50µL do controle de Rh no segundo;
- Acrescentado 50µL da suspensão de hemácias em cada tubo;
- Homogeneizados;
- Submetidos a uma centrifugação por 20 segundos a 3400rpm;
- Realizado a leitura utilizando aglutinoscópio;
- Após a leitura e interpretação dos resultados os tubos foram levados para incubação em banho-maria (37°C) por 15 minutos;
- Após o período de incubação foram submetidos a uma centrifugação por 20 segundos a 3400rpm;
- Foi realizada a leitura e interpretação dos resultados;
- As hemácias foram lavadas três vezes com 5mL de solução fisiológica 0,9%;
- Na última lavagem o sobrenadante foi totalmente desprezado e ao botão de hemácias acrescentados 100µL de soro de Coombs poliespecífico ou soro antiglobulina humana (AGH) comercial (anti-IgG, IgM e C<sub>3</sub>d (Diamed®));

- Os tubos foram homogeneizados;
- Submetidos a uma centrifugação por 20 segundos a 3400rpm;
- E foi realizada a leitura.

#### 3.3.4.1 Interpretação dos Resultados

- Os resultados foram interpretados conforme descrito no item 3.3.1.3.

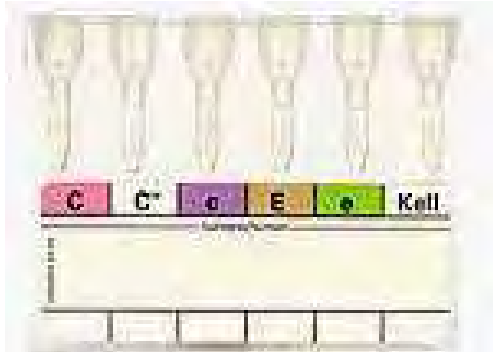
#### 3.3.4.2 Classificação dos Resultados

**Quadro 7** – Classificação para fenotipagem do sistema Rh(D) após a pesquisa do Dfraco.

Fase	Temperatura Ambiente	37°C	AGH
<b>Rh(D) positivo fraco</b>	Neg	+	+
	Neg	Neg	+
<b>Rh(D) negativo</b>	Neg	Neg	Neg

#### 3.3.5 Fenotipagem eritrocitária para os antígenos C,c,E,e,K,k

Para determinação da presença dos antígenos C, c, E, e, K, k foi utilizado a técnica de gel centrifugação (ID-Micro Typing System (Diamed®)). O gel teste é um método para microtipagem de grupos sanguíneos e também para pesquisa e identificação de anticorpos irregulares. Essa metodologia apresenta uma forma assertiva de leitura das reações de aglutinação, sem dúvidas de interpretações, com resultados eficientes e seguros. Cada microtubo contém em seu interior gel Sephadex que não permite a passagem de hemácias quando aglutinadas.



**Figura 8** – Ilustração do cartão para fenotipagem dos antígenos dos sistemas Rh e Kell. Cada microtubo contém o anticorpo contra o antígeno identificado para determinação da presença ou ausência do antígeno.

### 3.3.5.1 Preparo da suspensão de hemácias a 1%

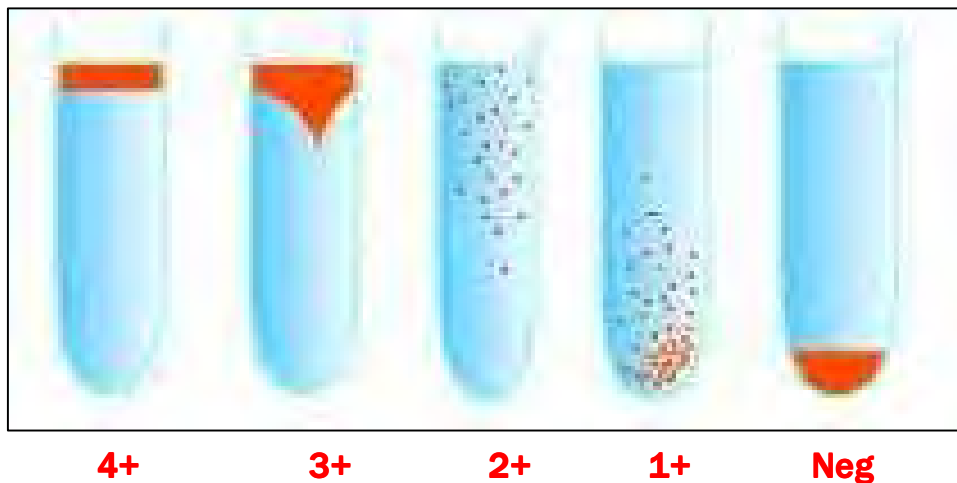
Foram diluídos em tubo de hemólise

- 25µL de concentrado de hemácias;
- 500µL de ID-Diluyente 1 (Solução de Bromelina - Diamed<sup>®</sup>);
- Deixar a diluição em repouso por no máximo 10 minutos a temperatura ambiente.

### 3.3.5.2 Realização do teste

- O cartão foi identificado com nome e registro do paciente;
- Foi adicionado em cada microtubo 12,5µL da diluição descrita no item 3.3.5.1;
- Submetidos a uma centrifugação de 1075rpm por 10 minutos em ID- Centrífuga 12S II (Diamed<sup>®</sup>).

### 3.3.5.3 Interpretação dos Resultados



**Figura 9** - Ilustração do modo de classificação das reações de hemaglutinação em gel teste evidenciando a presença e ausência do antígeno a ser determinado.

### **3.4 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação aos antígenos eritrocitários.**

Para análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação aos anticorpos anti-eritrocitários foi realizada a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), para isso hemácias comerciais (Diamed<sup>®</sup>) previamente fenotipadas foram utilizadas para a detecção de anticorpos irregulares clinicamente significativos. Para detecção de anticorpos em meio salino e em meio de baixa força iônica foi utilizado o kit DiaCell I+II. Para detecção de anticorpos em meio enzimático foi utilizado o kit DiaCell I+II+III-P (hemácia papainizadas). Essa pesquisa foi realizada em três metodologias distintas devido as características de reação dos anticorpos das classes IgM e IgG. E também, pelo fato de alguns anticorpos potencializarem sua ação ou serem destruídos na presença da enzima papaína.

Esta análise foi realizada no momento D<sub>0</sub> para identificar a pré-existência desses anticorpos antes do início do tratamento específico e o re-monitoramento dos dias +30 e +60 para verificar se o tratamento com os curativos bioativos pode induzir a aloimunização anti-eritrocitária.

#### **3.4.1 PAI em meio salino**

A PAI em meio salino foi realizada para verificar a presença de anticorpos anti-eritrocitários da Classe IgM através de reação de hemaglutinação pela técnica em tubo.

##### **3.4.1.1 Realização do teste**

- Foram nomeados três tubos de hemólise com: I, II e Ac (autocontrole);
- Nos tubos nomeados com I e II foram adicionados 50µL da respectiva hemácia;
- No terceiro tubo foi adicionado 50µL da hemácia do paciente diluídas de acordo com o item 3.3.1.1,
- A todos os tubos foram acrescentados 100µL de soro ou plasma;
- Homogeneizados;

- Deixados à temperatura ambiente por 30 minutos;
- E foi realizada a leitura utilizando aglutinoscópio.

#### 3.4.1.2 Interpretação dos Resultados

Os testes foram interpretados seguindo a descrição do item 3.3.1.3.

### **3.4.2 PAI em meio de baixa força iônica**

A PAI em meio de baixa força iônica foi realizados para verificar a presença de anticorpos da Classe IgG através de reação de hemaglutinação pela técnica em tubo.

#### 3.4.2.1 Realização do teste

- Foram nomeados três tubos de hemólise com: I, II e Ac (autocontrole);
- Nos tubos nomeados com I e II foram adicionados 50µL da respectiva hemácia;
- No terceiro tubo foi adicionado 50µL da hemácia do paciente diluídas de acordo com o item 3.3.1.1;
- A todos os tubos foram acrescentados 100µL de soro ou plasma;
- Homogeneizados e submetidos a uma centrifugação por 20 segundos a 3400rpm;
- Foi realizada a leitura e feito anotação dos resultados;
- Aos tubos foram acrescentado 200µL de DiaLiss<sup>®</sup> (Diamed<sup>®</sup>);
- Levados ao banho-maria 37°C por 5 minutos;
- Após a incubação foram adicionados 5 mL de solução fisiológica 0,9% e submetidos a uma centrifugação por 60 segundos a 3400rpm;
- O último passo descrito foi repetido por mais 2 vezes;
- O sobrenadante da última lavagem foi desprezado totalmente por inversão e adicionados 100µL de soro de Coombs poliespecífico (Diamed<sup>®</sup>);

- Homogeneizados e submetidos uma centrifugação por 20 segundo a 3400rpm;
- Foi realizada a leitura e aos tubos cujo resultado foram negativos foi adicionado hemácias controle revestidas com IgG.

#### 3.4.2.2 Interpretação dos Resultados

Os testes foram interpretados seguindo a descrição do item 3.3.1.3.

#### **3.4.3 PAI em meio enzimático**

Em meio enzimático pode ocorrer a potencialização ou destruição das reações antígeno-anticorpo. Se a reação for potencializada é facilitada a detecção de alguns anticorpos, principalmente daqueles dirigidos contra o sistema Rh. A técnica utilizada foi método de gel centrifugação (ID-Micro Typing System (Diamed<sup>®</sup>)).

##### 3.4.3.1 Realização da Técnica

- Foram nomeados três microtubos do cartão de NaCl (cartão neutro) com os números: I, II e III;
- A cada microtubo foi adicionado 50µL da respectiva hemácia de triagem e 25µL de soro ou plasma do paciente;
- O cartão foi levado a incubadora 37°C (ID-Incubadora) por 15 minutos;
- Após o término da incubação foi submetido a uma centrifugação de 1075rpm por 10 minutos em ID- Centrífuga 12S II (Diamed<sup>®</sup>);
- Ao término foi realizada a leitura conforme item 3.3.5.3.

#### **3.4.4 Identificação de anticorpos irregulares (IAI)**

Quando detectado a presença de anticorpo na PAI foi realizados a identificação em painel de hemácias (Diamed<sup>®</sup>) nas mesmas técnicas onde a PAI foi positiva.

### **3.5 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação aos antígenos leucocitários.**

Antígenos leucocitários humanos de classe I podem também estar solúveis no plasma e estão relacionados na literatura como tendo um importante papel na imunomodulação. Estes antígenos podem ser dosados por diferentes técnicas, incluindo as técnicas de ELISA. No entanto como nesta etapa do trabalho o foco foi a análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos, a metodologia delineada foi a pesquisa anticorpos anti-leucocitários pelo método de citometria de fluxo utilizando kit FlowPRA<sup>®</sup>. Esta análise foi realizada no momento D<sub>0</sub> para identificar a pré-existência desses anticorpos antes do início do tratamento específico e o re-monitoramento dos dias +30 e +60 para verificar se o tratamento com uso de biocurativos pode induzir a aloimunização anti-leucocitária.

#### **3.5.1 FlowPRA<sup>®</sup> Screening Test (LOT 012)**

Foi realizado o teste de rastreio FlowPRA<sup>®</sup>, que são reagentes de citometria de fluxo para detecção de anticorpos de reação ao painel (PRA) relativos aos antígenos HLA de Classe I. O teste consistiu na análise do soro do paciente quando colocados em contato com esferas FlowPRA<sup>®</sup>, que são micro partículas (2 a 4 µm de diâmetro) revestidas com antígeno HLA classe I purificado. A leitura foi feita em Citômetro *BD FACS Calibur* no laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu.

De acordo com a descrição do fabricante (One Lambda, Inc.) as vantagens desse teste é a exclusão de antígeno não-HLA evitando, assim reações falso-positivas. Além de ser um teste de rastreio altamente sensível e reprodutível.

As esferas FlowPRA<sup>®</sup> I são compostas por um agrupamento de 30 esferas da classe I, cada uma dessas esferas estão revestidas com diferentes antígenos HLA purificados da classe I. Todos os antígenos comuns HLA, bem como muitos antígenos raros então representados no agrupamento. A percentagem de anticorpos de reação ao painel é representada pelo percentual de esferas que reagem de forma

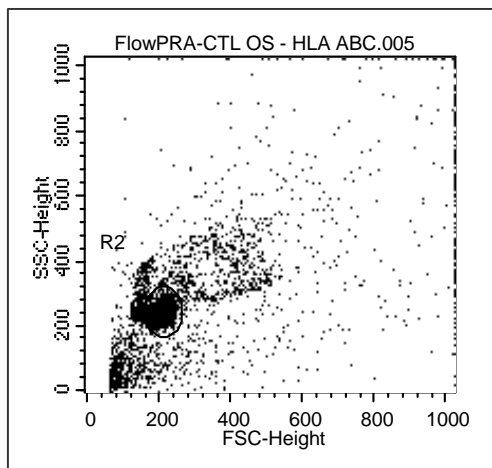
positiva ao soro. Por isso, permitiu não somente saber a positividade ou a negatividade, mas também o percentual de PRA.

#### 3.5.1.1 Realização do teste

- As esferas foram homogeneizadas no agitador vortex;
- 20µL de soro do paciente foi incubado com 5µL de esferas FlowPRA em Eppendorf de 1,5mL por 30 minutos sob agitação no escuro entre 20 e 25°C;
- Finalizado o tempo de incubação foi adicionado 150µL do tampão de lavagem a cada Eppendorf,
- Submetido à agitação em vortex e centrifugado a 3075rpm por 2 minutos;
- O sobrenadante foi aspirado e lavagem repetida mais uma vez;
- Foi seguido de coloração com 100µL de anticorpo IgG anti-humano (Fab') conjugado com FITC (marcação fluorescente);
- Submetido à agitação em vortex e incubados por 30 minutos sob agitação no escuro entre 20 e 25°C;
- Finalizado o tempo de incubação foi adicionado 0,5mL de solução fixante a cada tubo e realizado a leitura;
- Paralelamente foram testados soros controle positivo e negativo;
- O controle positivo foi realizado através de uma amostra integrante do kit e também pela incubação das esferas FlowPRA com anticorpo HLA-ABC anti-human (BD Pharmingen™ FITC anti-human HLA-A,B,C/Lote 0000053110/Cat nº 555552);
- O controle negativo foi realizado através de soro de doador de sangue do tipo AB com PAI negativo. Apesar da PAI ser um teste de avaliação da presença de anticorpos contra antígenos eritrocitários, para realização de um controle negativo esse tipo de amostras é selecionada para minimizar a interferência dos anticorpos naturais (anti-A e anti-B) que podem ser tanto da classe IgM como IgG com alto título em indivíduos do grupo "O" e também de outros anticorpos com significado clínico.

### 3.5.1.2 Aquisição de dados

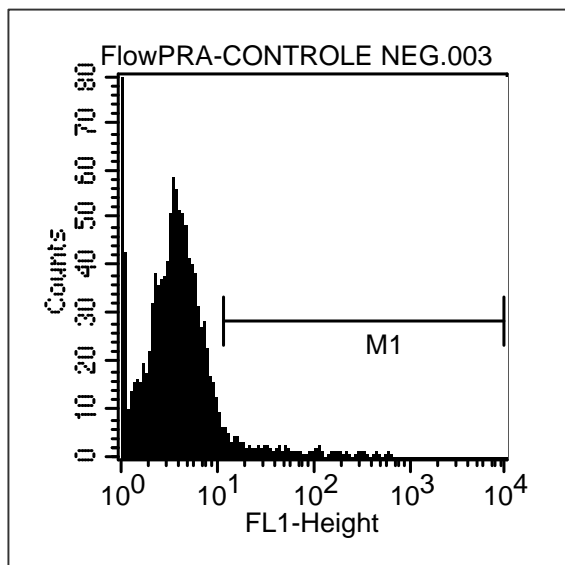
- Foi mensurada a fluorescência verde de 10.000 eventos para cada amostra;
- A maior população de esfera FlowPRA foi selecionada no diagrama por pontos FSC vs. SSR (tamanho x granulosidade) e obtido um histograma FL1 para cada amostra.



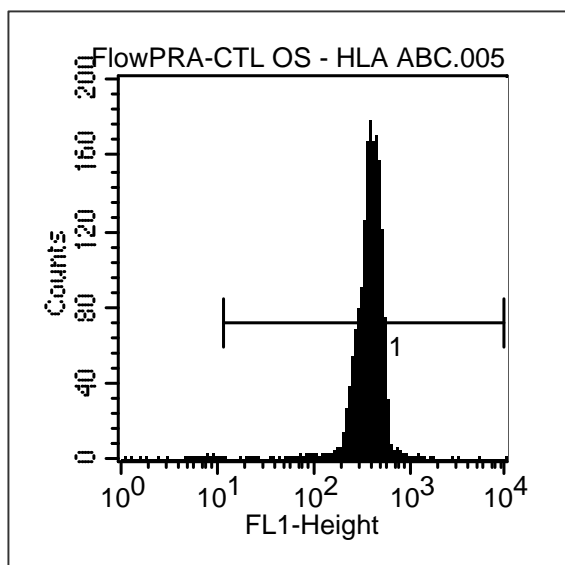
**Figura 10** - Diagrama de pontos (DOT PLOT) de Tamanho X Granulosidade (FSC X SSC). Aquisição: 10.000 eventos (esferas).

### 3.5.1.3 Análise de dados

- Foram utilizados soros de controle positivo e negativo para definir os pontos de corte no histograma FL1. O percentual de reações positivas foi medido pelos eventos deslocados à direita do ponto de corte.
- De acordo com as descrições do fabricante os soros positivos podem gerar um pico de deslocação único ou múltiplos picos. Quando o percentual de PRA fosse inferior a 10% o histograma deveria ser cuidadosamente analisado.
- Além disso, as amostras que apresentarem um segundo pico distinto na região positiva deveriam ser consideradas positivas, pois os soros negativos geram, normalmente, um pico único.



**Figura 11** - Histograma (FL1) controle negativo.  
 Percentual do *Gate* – 2,55%.



**Figura 12** - Histograma (FL1) controle positivo.  
 Percentual do *Gate* - 99,692%

### 3.6 Análise do potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação aos antígenos plaquetários

As plaquetas expressam uma heterogeneidade antigênica importante como descrito na Introdução desta dissertação. Antígenos plaquetários solúveis são descritos, e isto pode, de um lado, determinar a aloimunização e por outro, exacerbar uma aloimunização pré-existente. Um dos antígenos solúveis plaquetários mais relacionados com a resposta imune é a proteína transmembranária de tipo II, com 33 kDa de peso molecular conhecida como CD154. Originariamente são identificadas como ativadoras

dos linfócitos T e ligantes para CD40, molécula esta de ativação das células B e das células apresentadoras de antígeno. Células marcadas com CD154 têm sido relacionadas com mediadores de células endoteliais. Diante destas constatações, estabeleceu-se um protocolo para avaliar o potencial imunogênico pesquisando a eventual formação de anticorpos que reconheçam plaquetas humanas normais. Esta metodologia é conhecida como PIFT (*platelet immunofluorescence test*), realizada por citometria de fluxo e trata-se do teste de Coombs indireto plaquetário (CIP).

Esta análise foi realizada no momento D<sub>0</sub> para identificar a pré-existência desses anticorpos antes do início do tratamento específico e o re-monitoramento dos dias +30 e +60 para verificar se o tratamento com os curativos bioativos pode induzir a aloimunização contra anticorpos anti-plaquetários.

### **3.6.1 Teste de Coombs indireto Plaquetário (CIP)**

O teste de Coombs indireto plaquetário é um método sorológico onde as plaquetas são incubadas com o soro de interesse, posteriormente lavadas, incubadas com anti-IgG humana marcada e lidos em Citômetro *BD FACS Calibur*, no laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu.

#### **3.6.1.1 Preparação das amostras**

- Foram separados concentrados de plaquetas de doadores (O+) e realizados *pool* para aumentar a diversidade dos antígenos plaquetários;
- Esse *pool* de plaquetas (PRP) foi submetido a uma centrifugação a 4000rpm por 5 minutos;
- O sobrenadante foi desprezado e o botão plaquetário foi lavado em PBS-EDTA 0,1% por 2 vezes;
- A concentração plaquetária foi ajustada entre 100 a 150.000/mm<sup>3</sup>.
- Foi separado o soro de doador de sangue AB com PAI negativo para realizar o controle negativo (detalhes item 9.1.1);
- O tampão PBS-EDTA 0,1% foi preparado do seguinte modo:
  - NaCl = 4,06g

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = 0,049813g

- Na<sub>2</sub>EDTA = 0,0099635g

Dissolvidos em 1 litro de água estilada.

### 3.6.1.2 Realização do teste

- 3 tubos Eppendorf foram separados e nomeados com os números 1, 2 e 5 para realização dos controles;
- 2 tubos Eppendorf foram separados por paciente e nomeados com o número de 3 e 4;
- Nos tubos 1 e 2 foram adicionados 100µL do pool de plaquetas e 100µL de soro AB reservado;
- Nos tubos 3 e 4 foram adicionados 100µL do pool de plaquetas e 100µL de soro do paciente;
- No tubo 5 foi adicionado 100µL de soro do paciente;
- Todos os tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C;
- Após o período de incubação foi realizado uma lavagem com 500µL de PBS-EDTA 0,1% a 4200rpm por 10 minutos;
- O sobrenadante da última lavagem foi retirado com muito cuidado para não perder as plaquetas;
- Posteriormente foi realizada a incubação com o respectivo anticorpo por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro:

**TUBO 1:** 10µL de anti-human MsIgG FITC

(clone BIDU-38-116A10BB produzido "in house")

**Controle negativo do teste**

**TUBO 2:** 10µL de anti-human IgG (Fab) FITC

(Polyclonal Rabbit anti-human IgG/FITC F(ab')<sub>2</sub> - DAKO)

**Controle negativo do teste**

**TUBO 3:** 10µL de anti-human MsIgG FITC

(clone BIDU-38-116A10BB produzido "in house")

**Controle negativo do teste do paciente**

**TUBO 4:** 10µL de anti-human IgG (Fab) FITC

(Polyclonal Rabbit anti-human IgG/FITC F(ab')<sub>2</sub> - DAKO)

**TESTE DO PACIENTE**

**TUBO 5:** 10µL de anti-human CD41 FITC

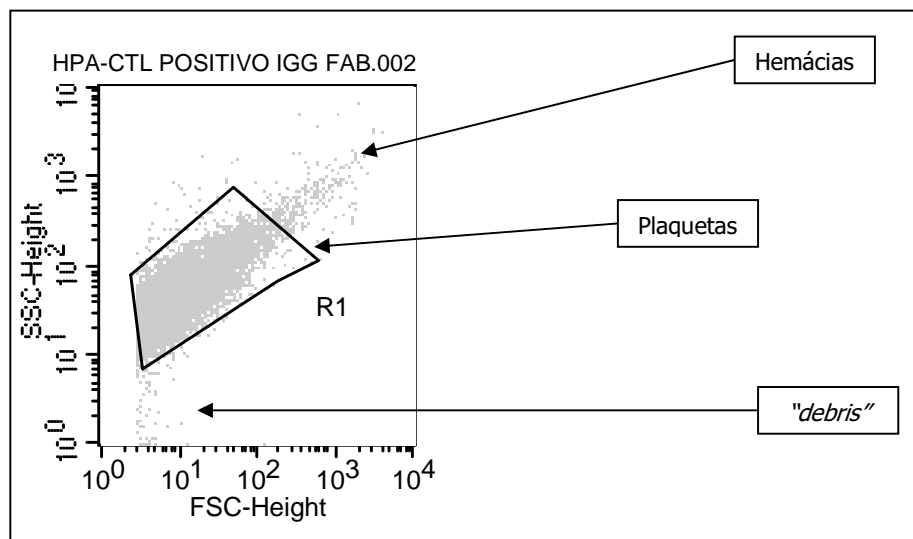
(Monoclonal mouse anti-human CD41, Platelet Glycoprotein IIb/FITC – clone 5B12)

**Controle positivo do teste**

- Após o período de incubação os tubos foram ressuspensos com 500µL de PBS-EDTA 0,1% para realização da leitura.

### 3.6.1.3 Aquisição de dados

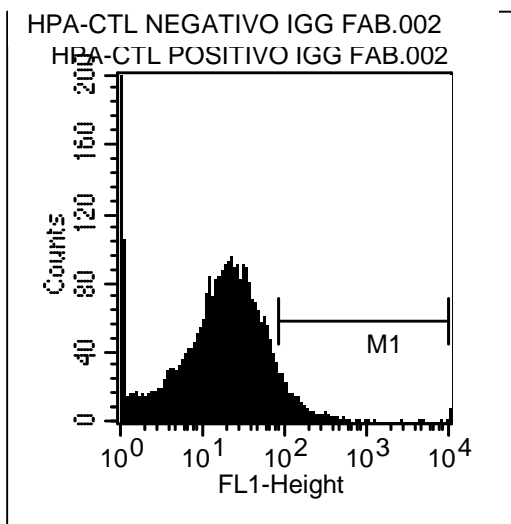
- As amostras foram lidas em citômetro de fluxo *BD modelo FACSCalibur* no programa CELL-QUEST para análise em plaquetas. Inicialmente foi realizada, a identificação das populações de células e selecionada a população de interesse. Essa identificação foi dada através de diagrama por pontos FSC vs. SSR (tamanho x granulosidade) e posteriormente obtido um histograma FL1 para cada amostra.



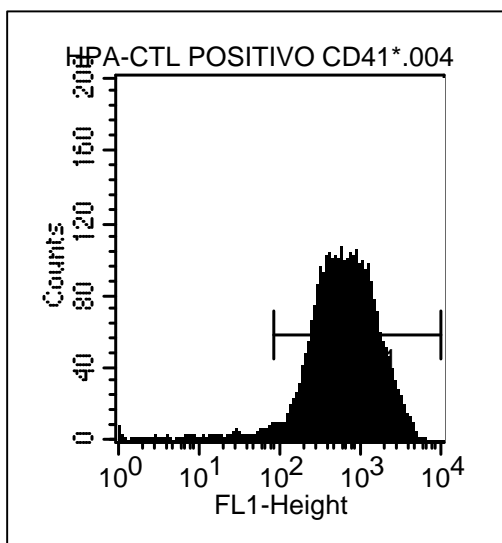
**Figura 13** - Diagrama de pontos (DOT PLOT) de Tamanho X Granulosidade (FSC X SSC). O gráfico foi realizado em escala logarítmica para destacar a população de plaquetas (células de interesse) excluindo as hemácias (canto superior direito) e o *debris* (lixo celular

#### 3.6.1.4 Análise de dados

- Após a seleção da população de interesse foi utilizado o controle positivo e o negativo para definir os pontos de corte no histograma FL1. O percentual de reações positivas foi medido pelos eventos deslocados à direita do ponto de corte.
- De acordo com o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu, por se tratar de um teste onde o soro do paciente não recebe nenhum tratamento pode haver reação com qualquer outro tipo de anticorpo da classe IgG presente no soro. Portanto, adota-se positivo os testes cujo % do *gate* for superior a 10%.

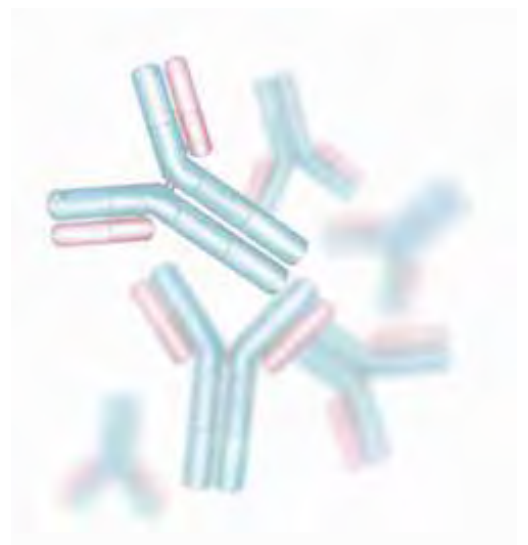


**Figura 14** - Histograma (FL1) controle negativo.  
Percentual do *Gate* - 4,50%  
(Tubo 2)



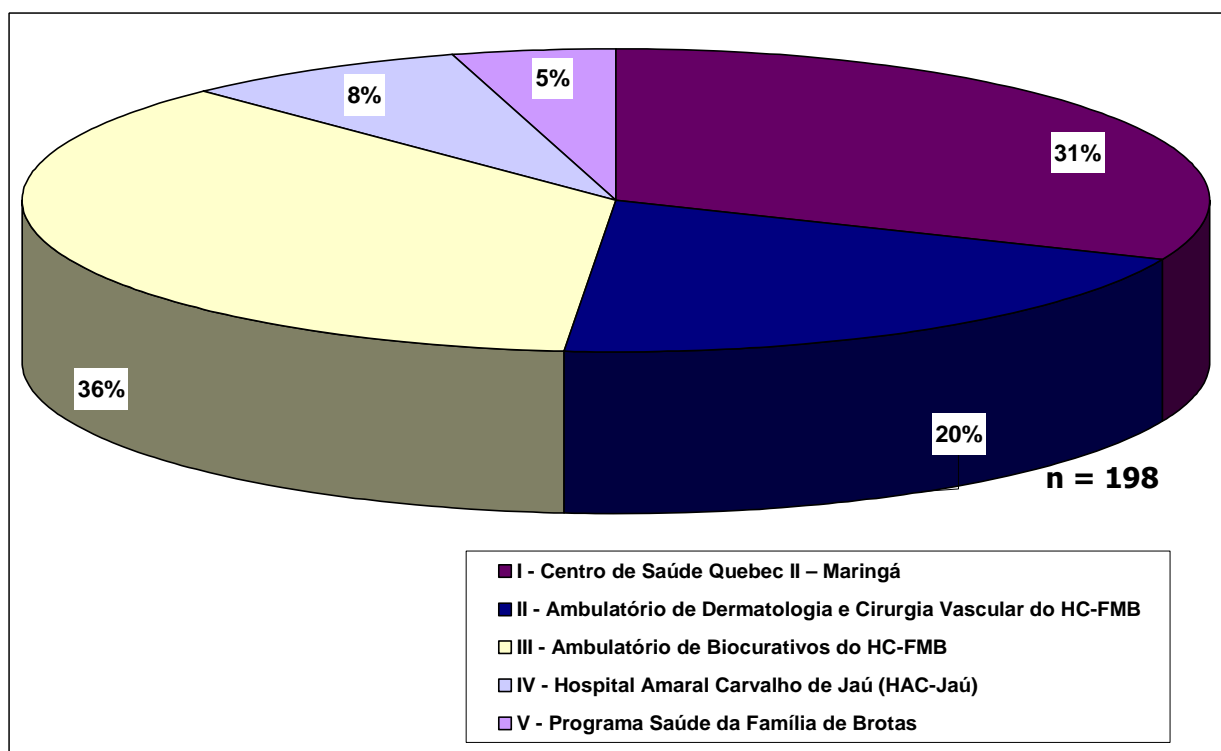
**Figura 15** - Histograma (FL1) controle positivo.  
Percentual do *Gate* - 97,52%  
(Tubo 5)

# 5 - Resultados e Discussões



## 1- Grupo de Estudo

O presente trabalho mostra a realização de um estudo multicêntrico realizado no Centro de Saúde Quebec II do Município de Maringá-PR, no Ambulatório de Dermatologia e Cirurgia Vascular do HC - FMB, no Ambulatório de Biocurativos do HC-FMB, no HAC-Jaú e no Programa Saúde da Família de Brotas. A figura 16 ilustra um gráfico com o percentual de pacientes acompanhados em cada local do estudo.

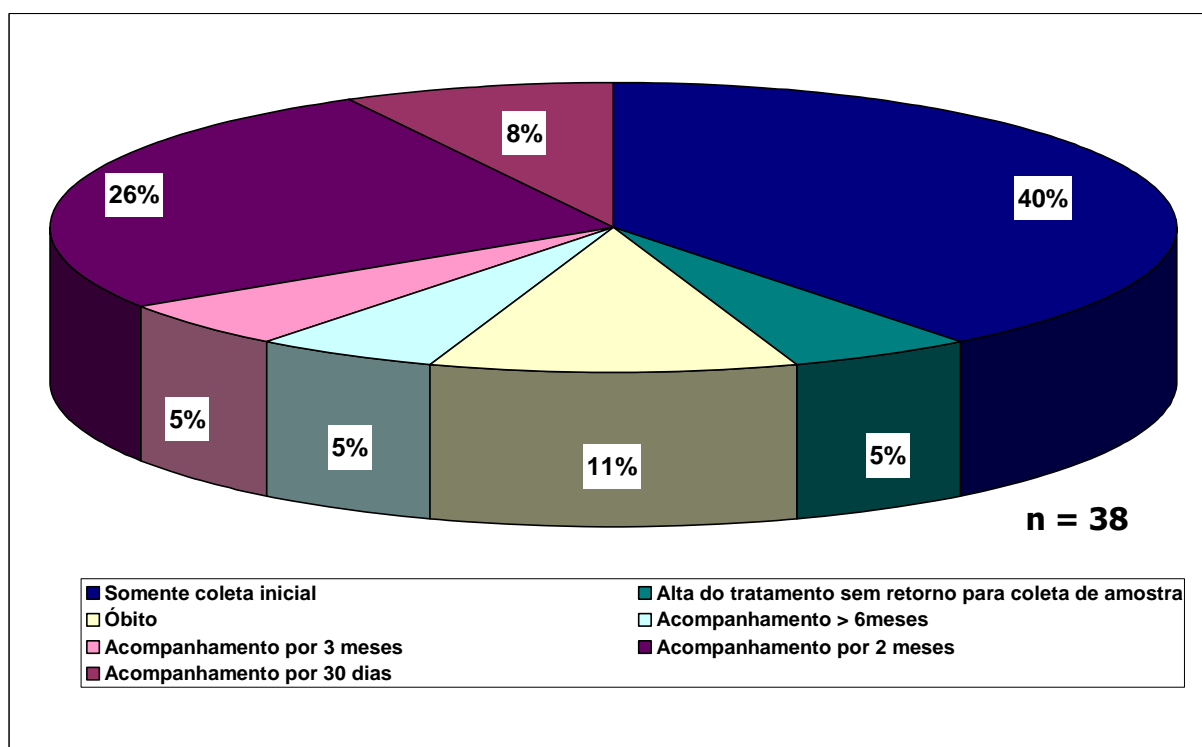


**Figura 16** – Percentual de pacientes por grupo de estudo.

Conforme descrito na Casuística e Métodos somente alguns pacientes do grupo III e também os pacientes dos grupos IV e V (total de 38 pacientes) foram submetidos à avaliação do potencial imunogênico dos curativos bioativos para formação de anticorpos anti-leucocitários e anti-plaquetários. A programação descrita para a coleta de amostras de sangue desses pacientes é que seriam submetidos a uma coleta antes de iniciar o tratamento ( $D_0$ ) com os curativos bioativos e também aos 30 ( $D_{30}$ ) e 60 ( $D_{60}$ ) dias posteriores. Porém, muitas dificuldades foram encontradas para cumprir a programação que foi estabelecida, pois a maioria dos pacientes estava recebendo

atendimento ambulatorial e levavam o produto para casa dando continuidade ao tratamento em caráter domiciliar. Além disso, foram encontrados problemas comuns e freqüentes que acontecem em pesquisa envolvendo seres humanos. Um exemplo disso foi os pacientes que foram a óbito no decorrer do tratamento em virtude de sua patologia de base, principalmente nos pacientes pertencentes ao HAC-Jaú, pois alguns se encontravam em estágio avançado da doença oncológica.

A figura 17 evidencia que 5% (n=2) tiveram alta e não retornaram para coleta das outras amostras e que 11% (n=4) foram a óbito. Em outros 5% (n=2) foi possível o acompanhamento por mais de 6 meses e em mais 5% (n=2) foi possível o acompanhamento por 3 meses, ou seja, um prazo maior do que havia sido estabelecido. Em 26% (n=10) o acompanhamento foi realizado por 2 meses e em 8% (n=3) dos pacientes por 30 dias. Os 39% (n=15) restantes só tinham a amostra antes de iniciar o tratamento até a finalização desse estudo.



**Figura 17** – Percentual de pacientes em relação ao tempo de acompanhamento e o levantamento de outros fatores que levaram a não conclusão do tempo estabelecido.

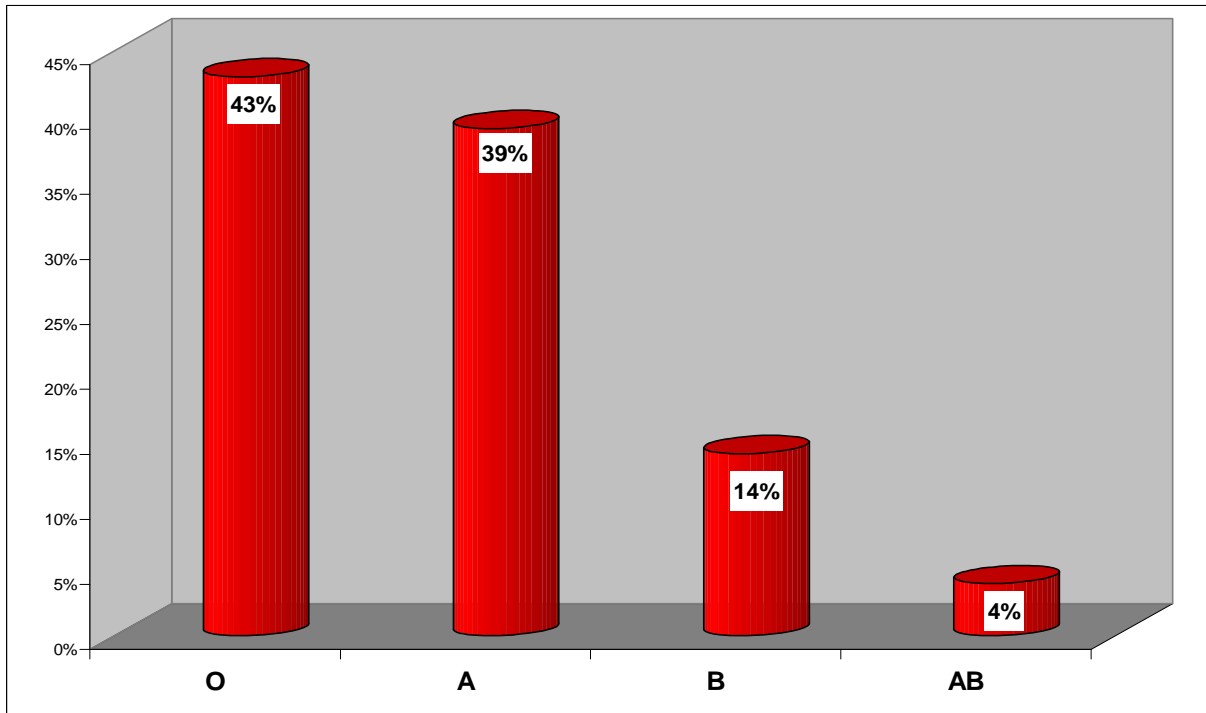
## 2- Fenotipagem eritrocitária

Acreditava-se que os antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos eram restritos à membrana eritrocitária. Atualmente sabe-se que esses antígenos também estão presentes nas demais células como nas epiteliais, endoteliais e nas plaquetas (DALBESTEEN, 2004). Nas plaquetas esses antígenos localizam-se nas glicoproteínas intrínsecas da membrana plaquetária (SANTOSO, 2001). Em decorrência disso desempenham um importante papel na integridade, adesão e transporte tanto intra como intercelular. Dentre essas se destaca a adesão celular, pois a sua manutenção é primordial para o desempenho esperado dos processos fisiológicos e patológicos, como: inflamação, cicatrização de feridas e neoplasias (REID, 2001).

Recentes estudos evidenciaram, ainda, que a expressão do precursor do sistema ABO, o antígeno H, nas células epiteliais estaria envolvido na angiogênese, processo essencial para cicatrização de feridas (DABELSTEEN, 2004). Já os antígenos do sistema Lewis que também estão expressos no epitélio da mucosa gástrica influenciariam na colonização e posterior infecção pelo *H. pylori* (REID, 2001).

Em relação à frequência do sistema sanguíneo ABO encontrado nos 100 pacientes estudados que estavam compreendidos nos grupos I, III, IV e V encontra-se detalhado na figura 18. Observamos que a maioria dos pacientes pertencia aos grupos O e A, respectivamente, 43% (n=43) e 39% (n=39). A menor incidência foi encontrada nos grupos B com 14% (n=14) e no grupo AB com 4% (n=4).

Esses dados demonstram que a amostra estudada compreende os dados de distribuição fenotípica normal para a população do estado de São Paulo e da cidade de Maringá não havendo parâmetros que aponte a determinação do sistema ABO como marcador de maior ou menor prevalência para o processo de lesão ou cicatrização.



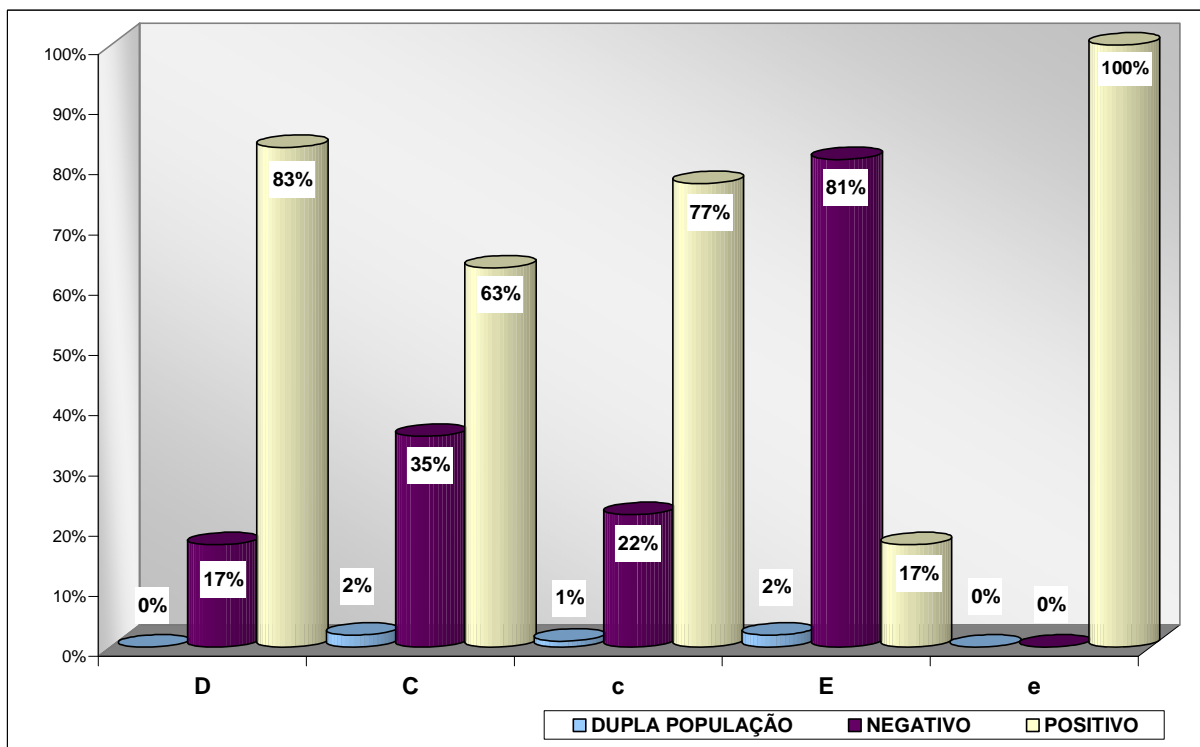
**Figura 18** – Gráfico evidenciando a distribuição de freqüência do sistema sanguíneo ABO que foi avaliada em 100 pacientes dos grupos de estudo I, III, IV e V.

O sistema Rh, juntamente com o sistema ABO, tem enorme importância clínica por causa da alta capacidade imunogênica do antígeno D (BEIGUELMAN, 2003). Esse sistema é um mosaico constituído por vários antígenos: D, C, c, E, e (COVAS, 2001; LORENZI, 2003).

Os dados obtidos com a classificação da fenotipagem dos antígenos do sistema Rh encontram-se na figura 19 e revelam que 83% (n=83) são positivos para presença do antígeno D. Em 63% (n= 63), 77% (n=77), 17% (n=17) e 100% (n=100) estavam presentes, respectivamente, os antígenos: C, c, E, e.

Alguns pacientes apresentaram dupla população de hemácias (hemácias positivas e negativas para o antígeno) ao ter seu fenótipo determinado. Esse fato ocorre quando é determinado o fenótipo do paciente e esse recebeu transfusão de hemocomponentes, especificamente concentrado de hemácias, nos três últimos meses anteriores a fenotipagem, pois ainda há hemácias do doador circulantes em seu corpo não sendo possível determinar se o doador ou o receptor era positivo ou negativo para o antígeno em questão. Tal situação ocorreu em 4% (n=4) dos 100 pacientes fenotipados para o sistema Rh. Desses 4 pacientes, 100% pertenciam ao HAC-Jáu e tratavam-se de

pacientes em curso de tratamento oncológico, cuja necessidade de transfusão de hemocomponentes é constante para a continuidade e sucesso do tratamento.



**Figura 19** – Gráfico evidenciando a distribuição de frequência dos antígenos D, C, c, E, e que foi avaliada em 100 pacientes dos grupos de estudo I, III, IV e V.

A frequência para presença dos antígenos D,C,c,E,e demonstram também que a amostra estudada compreende os dados de distribuição fenotípica normal para a população do estado de São Paulo e da cidade de Maringá não havendo parâmetros que aponte os principais antígenos do sistema Rh como marcador de maior ou menor prevalência para o processo de lesão ou cicatrização.

O sistema de grupo sanguíneo Kell é uma interessante mescla de antígenos de baixa e alta frequência sendo, respectivamente, o antígeno K (Kell) e seu correspondente antitético k (cellano) os principais (CALHOUN, 2006). A glicoproteína que “carrega” os antígenos deste sistema eritrocitário é uma proteína de membrana do tipo II. Essas glicoproteínas Kell são enzimas *endothelin-3-converting* que especificamente “clivam” a endotelina-3 em endotelina-3 bioativa. As endotelinas são

potentes proteínas vasoativas (REID, 2001) que possuem várias funções biológicas dentre elas a vasoconstrição (LEE, 1999).

Em estudo anterior, realizado por Araújo (2007), o antígeno Kell esteve presente em hemácias dos pacientes portadores de feridas crônicas de membros inferiores. Este fato despertou interesse de investigação científica em função da biologia e bioquímica deste sistema. Houve uma clara relação entre a má-evolução do processo de cura da ferida e a presença do antígeno Kell, ou seja, pacientes que eram K+ foram os que apresentaram feridas mais difíceis de serem abordadas e exigiam maior tempo de tratamento. Diante do exposto, optou-se por ampliar este estudo voltado para o estabelecimento da presença do antígeno Kell como um possível marcador de má-evolução de úlceras crônicas de membros inferiores.

Os dados obtidos com ampliação no número de pacientes fenotipados para o sistema eritrocitário Kell estão descritos no quadro 8, e relacionam o número de pacientes portadores de feridas crônicas decorrentes de insuficiência venosa (I.V.), suas co-morbidades associadas e sua relação com a presença (K+k+) e ausência (K-k+) dos antígenos Kell (K) e cellano (k). As co-morbidades associadas a I.V. que foram mais freqüentes nos pacientes estudados foram a hipertensão arterial sistêmica (H.A.S.), o *diabetes mellitus* e a insuficiência cardíaca (I.C.).

**Quadro 8** - O quadro demonstra o número de pacientes portadores de feridas crônicas fenotipados para os antígenos K (Kell) e k (cellano), suas co-morbidades associadas e o percentual representativo de pacientes K+k+ e K-k+ em cada grupo. O primeiro grupo de pacientes corresponde aos portadores de feridas crônicas associados H.A.S. O segundo grupo corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas associados a H.A.S., *diabetes mellitus* e I.C. O ultimo grupo corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas decorrentes da I.V. isolada.

<b>Pacientes portadores de feridas crônica e doenças associadas</b>	<b>K+k+</b> n (%)	<b>K-k+</b> n (%)	TOTAL
H.A.S.	7 (8,86)	72 (91,14)	79
H.A.S. + Diabetes + I.C.	10 (10,64)	84 (89,36)	94
Somente I.V.	5 (20)	20 (80)	25
TOTAL	22 (11,11)	176 (88,89)	198

Os dados demonstrados no quadro 8 registram um total de 198 pacientes portadores de feridas crônicas de difícil controle. Todos estes pacientes foram submetidos à fenotipagem dos antígenos eritrocitários K (Kell) e k (cellano). Os dados de fenotipagem associados a co-morbidades revelam que 39,90% (n= 79) tinham H.A.S. e que 8,86% (n=7) deste grupo são Kell positivo. Quando se analisa a ferida crônica com mais de uma co-morbidade, aparece a concomitância de H.A.S., *diabetes mellitus* e comprometimento cardíaco. O termo comprometimento foi utilizado para representar tanto pacientes portadores de insuficiência cardíaca como aqueles que tiveram pelo menos um episódio de Infarto Agudo do Miocárdio, mas que não evoluíram para uma insuficiência cardíaca. Este grupo representa 47,47% (n=94) dos indivíduos sendo que 10,64% (n=10) eram positivos para o antígeno Kell. O terceiro grupo representa 12,12% (n=25) do total de pacientes analisados, ou seja, pacientes portadores somente de I.V., sem H.A.S., doença cardíaca ou diabetes, mas incluindo outras co-morbidades como Mal de Hansen, doenças reumatológicas e imunes, o percentual de indivíduos com fenótipo Kell positivo neste grupo foi de 20% (n=5).

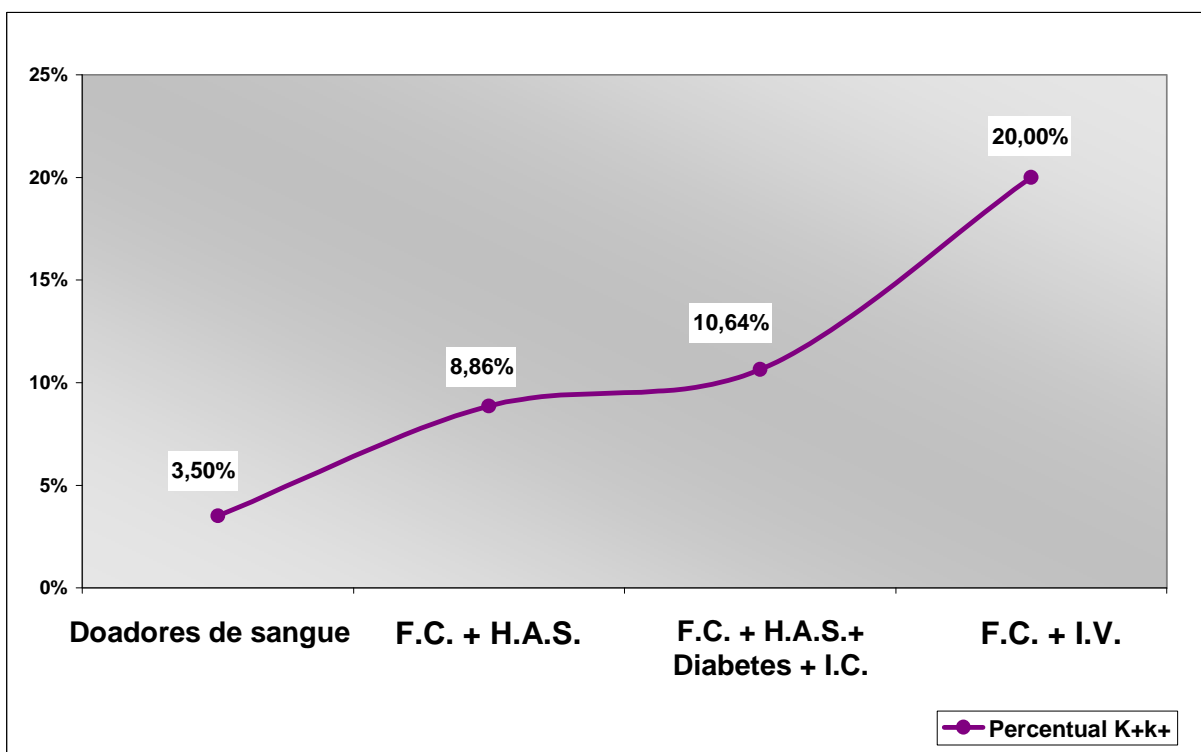
Os resultados obtidos com o a fenotipagem do sistema Kell nos pacientes estudados foram comparados a frequência fenotípica na população de doadores de

sangue do Hemocentro da HC-FMB e os resultados encontram-se detalhados no quadro 9.

**Quadro 9** - Quadro comparativo da freqüência do fenótipo K+k+ e K-k+ nos doadores de sangue do Hemocentro da HC-FMB em relação aos pacientes portadores de feridas crônicas e suas co-morbidades associadas. O grupo F.C.+H.A.S. corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas associados com H.A.S. O grupo F.C.+H.A.S.+Diabetes+I.C. corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas associados a H.A.S., *diabetes mellitus* e I.C. O último grupo (F.C.+I.V.) corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas decorrentes da I.V. isolada.

<b>População de Estudo</b>	<b>K+k+</b> n (%)	<b>K-k+</b> n (%)	TOTAL
Doadores de Sangue - Hemocentro HC-FMB	471 (3,5)	12979 (96,50)	13450
F.C. + H.A.S.	7 (8,86)	72 (91,14)	79
F.C. + H.A.S. + Diabetes + I.C.	10 (10,64)	84 (89,36)	94
F.C. + I.V.	5 (20)	20 (80)	25

Os resultados do percentual de pacientes portadores de feridas crônicas que são K+k+ quando comparados com o percentual de doadores de sangue K+k+, destacam-se e encontram-se detalhados na figura 20. Pois, no Hemocentro do HC-FMB a freqüência de doadores positivos para fenótipo Kell em 2008 foi de 3,5%, enquanto que essa freqüência nos portadores de feridas crônicas foi de: 8,86% no grupo de pacientes com H.A.S associada; 10,64% no grupo de pacientes com H.A.S.+Diabetes+I.C. associada; e 20% no grupo corresponde aos pacientes somente com I.V. Os dados encontrados sugerem que a fenotipagem do sistema eritrocitário Kell em pacientes portadores de feridas crônicas é um marcador biológico de fácil detecção que pode ser sugestivo de cronicidade.



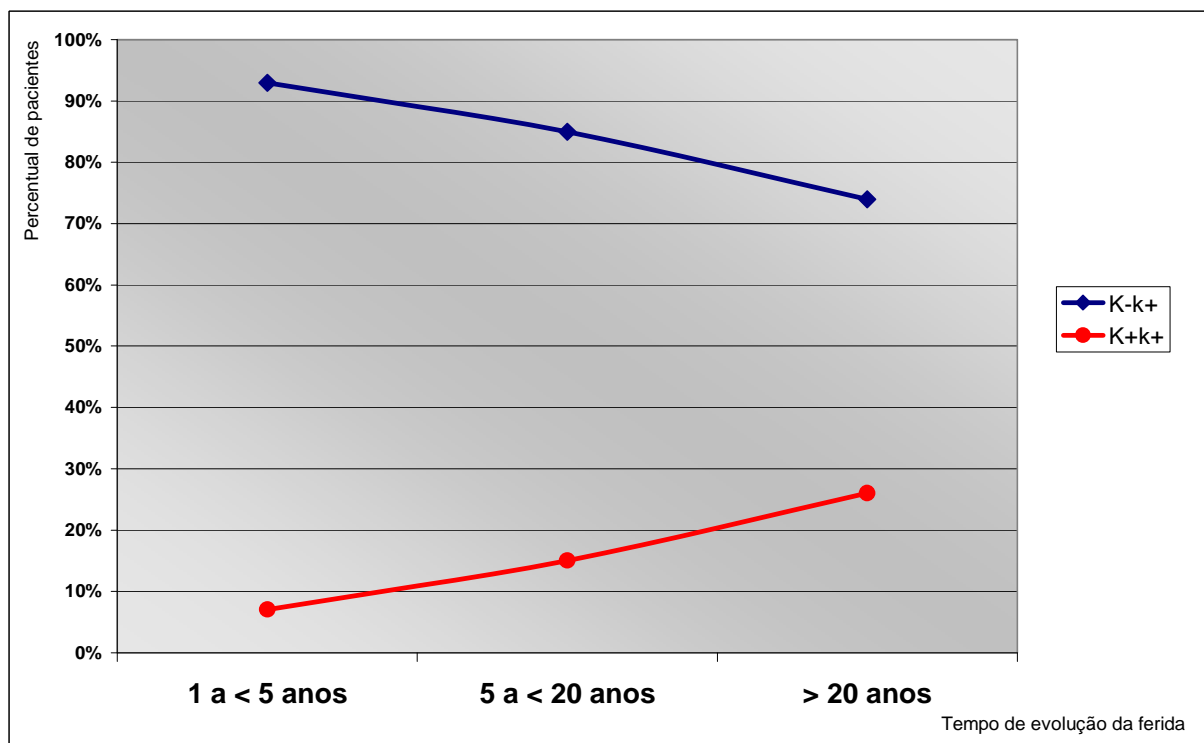
**Figura 20** - Gráfico de linha comparando o percentual de pacientes K+k+ nos doadores de sangue do Hemocentro da HC-FMB e nos pacientes portadores de feridas crônicas e suas comorbidades associadas. O grupo F.C.+H.A.S. corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas associados com a hipertensão arterial sistêmica. O grupo F.C.+H.A.S.+Diabetes+I.C. corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas associados a H.A.S., *diabetes mellitus* e insuficiência cardíaca. O ultimo grupo (F.C.+I.V.) corresponde aos pacientes portadores de feridas crônicas decorrentes da insuficiência venosa isolada.

A freqüência dos antígenos eritrocitários K (Kell) e k (celano) do sistema eritrocitário Kell foi também relacionado ao tempo de evolução da ferida, ou seja, o tempo em que esses pacientes possuíam essa ferida aberta. Os dados encontram-se detalhados no quadro 10 e através deles pode-se observar que a positividade do antígeno Kell é maior (26,09%) nos indivíduos cujas feridas estão abertas há mais de 20 anos. Estes dados reforçam que a fenotipagem deste sistema pode auxiliar o clínico na indicação do tratamento diante do diagnóstico de uma lesão tegumentar. Nos pacientes em que o fenótipo Kell se expressar, o clínico deverá se utilizar das opções terapêuticas mais eficazes para que a lesão se cicatrize em menor tempo possível.

**Quadro 10** - Frequências absolutas e relativas do fenótipo K+k+ e K-k+ nos 198 pacientes portadores de feridas crônicas em relação ao tempo de evolução da ferida.

Tempo de evolução da ferida	Fenótipo Kell		TOTAL
	K+k+ n (%)	K-k+ n (%)	
1 a <5 anos	08 (6,61)	113 (93,39)	121
5 a <20 anos	08 (14,81)	46 (85,19)	54
20 anos ou mais	06 (26,09)	17 (73,91)	23
TOTAL	22 (11,11)	176 (88,89)	198

Esses dados ficam fáceis de serem identificados ao ser traçado um paralelo entre a frequência do fenótipo K+k+ e K-k+ em relação ao tempo de ferida aberta. A figura 21 ilustra através de um gráfico de linha que quanto maior é o tempo de evolução da ferida maior é o percentual de pacientes positivos para o antígeno Kell (K+k+). Demonstram também, que quanto menor é o tempo de evolução da ferida maior é o percentual de pacientes negativos para o antígeno Kell (K-k+).



**Figura 21** - Gráfico de linha comparando a frequência de pacientes portadores de feridas crônicas K+k+ e K-k+ em relação ao tempo de evolução da ferida.

Portanto, nossos dados ampliaram os estudos de Araújo (2007), pois o antígeno Kell esteve presente em mais 14 pacientes além dos 8 que já haviam sido encontrados no grupo de estudo oriundo da Unidade básica de saúde do município de Maringá – PR. Assim, finalizamos o estudo com 22 (11,11%) pacientes K+k+ em 198 pacientes portadores de feridas crônicas.

Relacionando o tempo de evolução da ferida e o fenótipo para os antígenos Kell e cellano, podemos propor que houve uma relação positiva entre má-evolução do processo de cura da ferida e a presença do antígeno Kell, ou seja, os indivíduos Kell positivo foram os que apresentaram feridas em que o tempo de permanência era maior ou com maior dificuldade de cicatrização. Podemos sugerir, assim, a presença do antígeno Kell como um possível marcador de má-evolução de úlceras crônicas.

### **3- Aloimunização contra antígenos anti-eritrocitários, leucocitários e plaquetários nos receptores dos curativos bioativos.**

A pele humana é uma barreira natural que protege o corpo contra possíveis substâncias nocivas que se encontram no ambiente. Quando um produto farmacêutico é aplicado na pele à absorção pode ocorrer por três vias de permeação percutânea: a primeira por difusão através das células ou penetração transcelular, a segunda por difusão entre as células ou penetração intercelular, e a última por difusão através dos folículos pilosos, glândulas (sudoríparas e sebáceas) e anexos pilosebáceos ou penetração transanexal (ANTONIO, 2007).

No preparo de produtos dermatológicos para aplicação em pele íntegra, embora seja importante que o fármaco penetre além da superfície, normalmente não se deseja que o medicamento penetre na circulação sistêmica (ANTONIO, 2007). Como os curativos bioativos são aplicados diretamente no local da ferida onde ocorre a exposição do tecido e existe uma grande neovascularização, a proposta do estudo foi analisar se aplicação dos curativos bioativos que possuem antígenos altamente imunogênicos levaria a formação de anticorpos.

A aloimunização contra antígenos eritrocitários foi realizada num total de 100 pacientes que são oriundos dos grupos I, III, IV e V. Em apenas em 2% (n=2) dos

pacientes foi identificada a presença de anticorpos anti-eritrocitários irregulares, porém não se tratou de aloimunização visto que identificação ocorreu antes de iniciar o tratamento com os curativos bioativos.

Um desses achados foi em uma paciente do sexo feminino, pertencente à Unidade Básica de Saúde do Município de Maringá-PR com histórico transfusional de duas transfusões há mais de quatro anos. Tratava-se de paciente múltipara, RhD negativa e os aloanticorpos identificados tinham especificidade anti-D e anti-C, que correspondem aos anticorpos de maior prevalência em indivíduos RhD negativo.

Para dar continuidade ao estudo e excluir a possibilidade de aumento do título desses anticorpos pelo uso dos curativos bioativos, foi realizado a titulação desses anticorpos ao longo do tratamento. O título do anti-D se manteve em 1/4 durante toda a análise e o título do anti-C se manteve em 1/16. Portanto, não houve mudanças durante o uso dos curativos bioativos.

O outro paciente que apresentou pesquisa de anticorpo irregular positiva era do sexo masculino pertencente ao HAC-Jaú. Esse paciente estava em tratamento oncológico e havia histórico transfusional recente. Em virtude disso, não foi possível determinar sua fenotipagem para o antígeno E pela presença de dupla população de hemácias. A especificidade do anticorpo encontrado foi anti-Kell, porém não foi possível realizar a titulação pelo pouco volume de amostra que foi coletado do paciente no primeiro momento. Além disso, não houve coleta posterior já que esse paciente enquadrava-se nos 5% (n=2) dos casos em que tiveram alta do tratamento e não retornaram para a coleta das amostras posteriores.

Os dados mostraram que nenhum paciente se aloimunizou contra antígenos eritrocitários no decorrer do tratamento dos curativos bioativos. Mesmo sabendo de diversos fatores que poderiam levar a essa aloimunização como: a presença de antígenos eritrocitários do sistema ABO nas plaquetas; a contaminação dos concentrados de plaquetas com hemácias do doador devido ao procedimento que estes componentes sanguíneos são fracionados; o fato de que alguns antígenos eritrocitários se encontrarem solúveis no plasma; e também a utilização de *pools* de concentrado de plaquetas e plasma fresco congelado não isogrupo para a confecção dos curativos

bioativos. Em conjunto, esses fatores não apresentaram interferência alguma nos benefícios oferecidos pelo uso tópico dos curativos bioativos na aceleração do processo de cicatrização em pacientes portadores de feridas. Então, estes resultados apontam a não necessidade da compatibilidade dos hemocomponentes utilizados para confecção dos curativos bioativos para os antígenos eritrocitários.

As transfusões endovenosas de concentrado de plaquetas podem levar a formação de anticorpos anti-leucocitários ou -plaquetários contra antígenos recebidos das plaquetas do doador. Esses anticorpos podem reagir com as transfusões subsequentes diminuindo a função *in vivo* ou sobrevivência das plaquetas transfundidas, conhecido com refratariedade a transfusão de plaquetas (REBULLA, 2005). Os anticorpos contra antígenos HLA classe I são a primeira causa dessa refratariedade, porém anticorpos específicos contra as glicoproteínas plaquetárias também levam a essa desordem (SACHER, 2003).

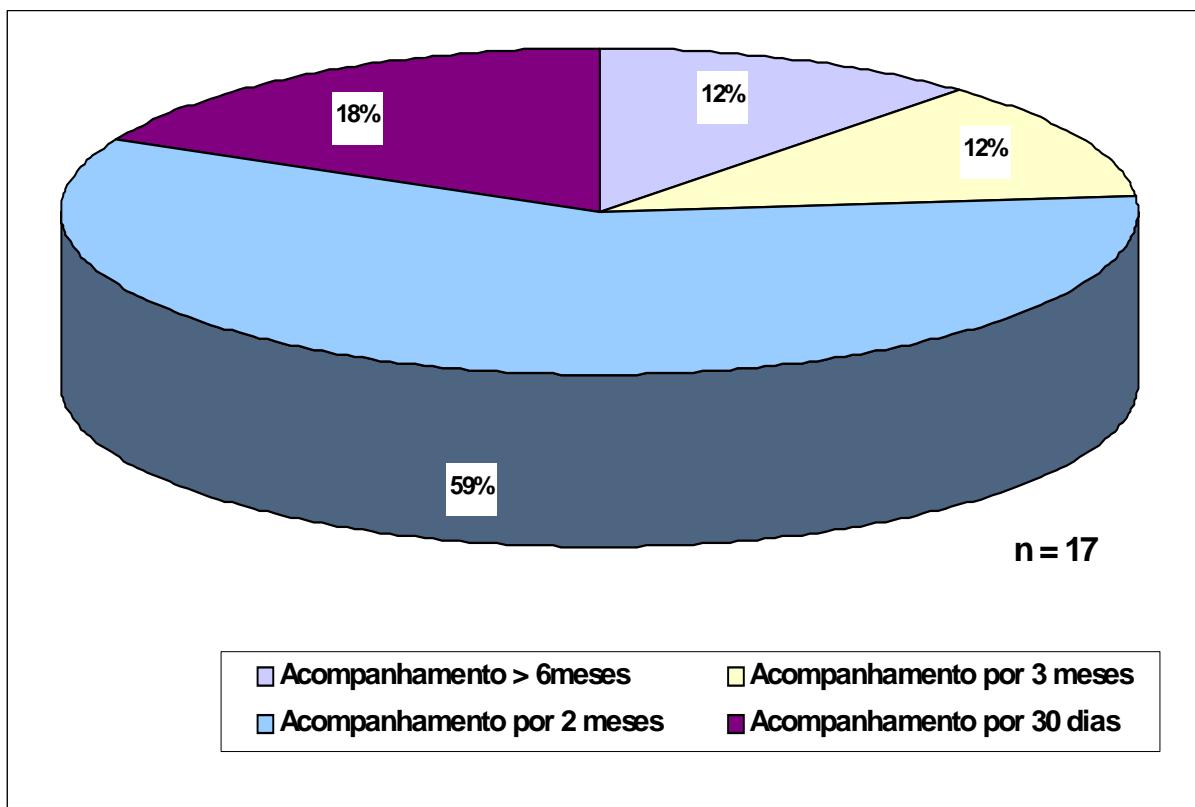
A incidência, a especificidade e a persistência desses anticorpos tem sido o objetivo de uma série de investigações. Um artigo de revisão em relação à refratariedade à transfusão de plaquetas realizado por Rebullá (2005), descreve um estudo realizado com 252 pacientes onco-hematológicos receptores de plaquetas onde em 113 (44,8%) foram detectados anticorpos anti-HLA e anti-HPA, sendo a maior frequência contra antígenos HLA. Este estudo reforça a prevalência de anticorpos contra sistema HLA como sendo a principal causa de refratariedade plaquetária. Outro estudo multicêntrico, citado pelo mesmo autor, realizado em 150 pacientes politransfundidos com anemia aplástica mostraram que 62% dos pacientes foram aloimunizados e que o título do anticorpo persistiu durante muitos anos após a última transfusão (REBULLA, 2005).

Um estudo multicêntrico citado por Sacher (2003), mostrou uma frequência de aloimunização de 10% em pacientes politransfundidos. Outro estudo citado pelo mesmo autor, revelou que 8% dos pacientes politransfundidos com doenças onco-hematológicas possuíam anticorpos anti-HPA, sendo a especificidade mais frequente contra as glicoproteínas plaquetária anti-HPA-5b e -1b (SACHER, 2003).

A refratariedade à transfusão de plaquetas também foi a base do estudo de Toor (2006), e a descreve como um mecanismo imunomediado que pode ocorrer entre 20 a 70% dos pacientes submetidos a múltiplas transfusões. Pacientes em tratamento para leucemia mielóide aguda possuem 10 a 15% risco de desenvolver anticorpos anti-HLA. Além disso, cita os mecanismos não-imunes que estão associados à refratariedade, como em pacientes: que recebem a transfusão de plaquetas quando estão em estado febril, que apresente quadro infeccioso ou hemorrágico, com diagnóstico de CIVD (coagulação intravascular disseminada), que apresentem esplenomegalia ou que esteja em uso de medicamentos como antibióticos e antifúngicos (TOOR, 2006).

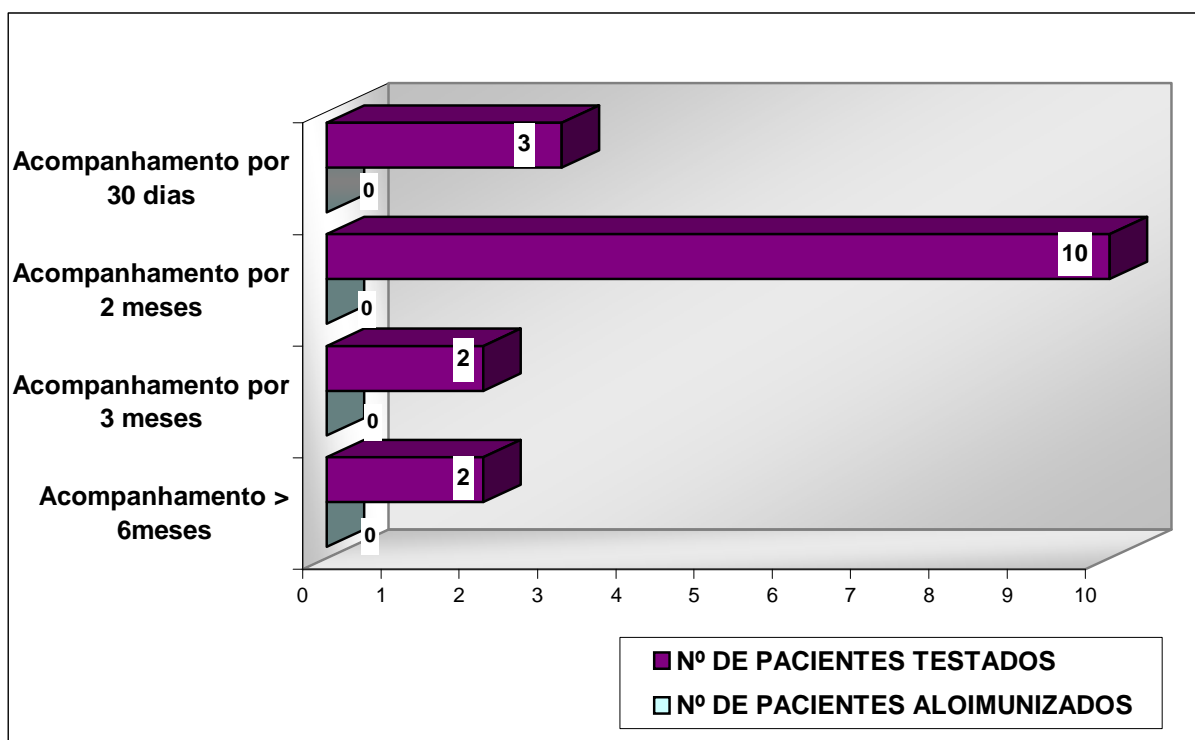
De acordo com a literatura consultada podemos observar uma amplitude nos percentuais de aloimunização encontrado pelos autores, pois se trata de uma diversidade de patologias e associações que levaram a necessidade da transfusão de plaquetas.

Os dados obtidos em nossos pacientes quanto à aloimunização contra antígenos HLA estão descritos nas figuras abaixo (figuras 22 e 23). A figura 22 detalha o perfil em relação ao tempo de acompanhamento dos 17 pacientes pertencentes aos grupos de estudo III, IV e V testados para formação de anticorpos anti-HLA de classe I: 59% (n=10) foram acompanhados por 2 meses, 18% (n=3) foram acompanhados por 30 dias, 12% (n=2) foram acompanhados por 3 meses e os 12% (n=2) restante foram acompanhados por mais de 6 meses.



**Figura 22** – Percentual de pacientes em relação ao tempo de acompanhamento para a aloimunização contra anticorpos anti-HLA de classe I.

A metodologia escolhida para verificar a existência de anticorpos anti-HLA de classe I foi o teste de rastreio FlowPRA<sup>®</sup>. De acordo com os dados do fabricante, foi demonstrado que a metodologia de leitura (citometria de fluxo) usada pode detectar anticorpos com um nível maior de sensibilidade. Os resultados encontrados estão detalhados na figura 23, e revelam que dos 17 pacientes que foram acompanhados em nenhum deles foi detectado a formação de anticorpos anti-HLA de classe I posteriores ao uso dos curativos bioativos.

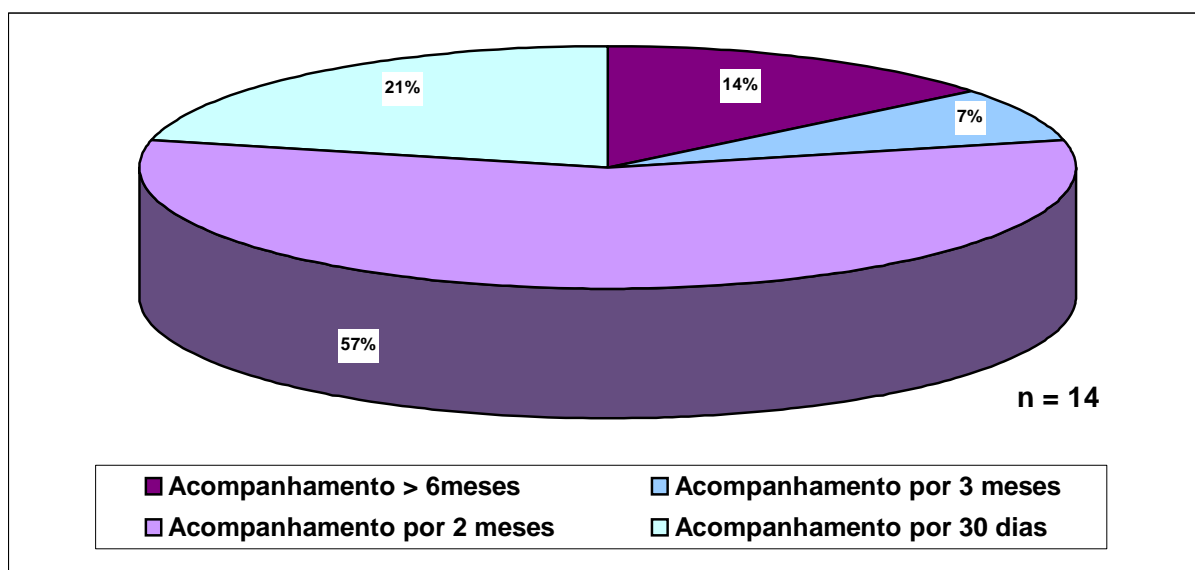


**Figura 23** – Relação entre o número de pacientes que receberam a aplicação tópica dos curativos bioativos e foram monitorados por um tempo determinado (30 dias, 2 meses, 3 meses e mais de 6 meses) e o número de pacientes que se aloimunizaram contra anticorpos anti-HLA de classe I através do teste de rastreio FlowPRA<sup>®</sup>.

Outro dado importante encontrado com a pesquisa de anticorpos anti-HLA foi que dois pacientes apresentavam anticorpos já formados antes de iniciar o tratamento com os curativos bioativos. Diante desse fato, foi realizado um levantamento de dados que pudesse explicar essa sensibilização prévia. Um deles trata-se de um paciente do sexo masculino, 54 anos de idade, paraplégico há 19 anos por acidente automobilístico, politransfundido e com histórico de enxerto de pele alogênico com rejeição. Esse paciente foi acompanhado por dois meses e nesse período não houve o aumento no percentual de anticorpos encontrado no soro deste paciente.

O segundo trata-se também de paciente do sexo masculino, de idade avançada, politransfundido e com histórico de enxerto alogênico com rejeição. Neste caso não foi possível acompanhar se houve ou não o aumento no percentual de anticorpos anti-HLA, pois este paciente enquadra-se nos 11% (n=4) que foram a óbito no decorrer da coleta de amostra.

Os dados obtidos em nossos pacientes quanto à formação de anticorpos anti-HPA encontram-se descritos nas figuras 24 e 25. O perfil em relação ao tempo de acompanhamento dos 14 pacientes testados para formação desses anticorpos foram o seguinte: 57% (n=8) foram acompanhados por 2 meses, 21% (n=3) foram acompanhados por 30 dias, 14% (n=2) foram acompanhados por mais de 6 meses e os 7% (n=1) restante foram acompanhados por 3 meses como detalha a figura 24.



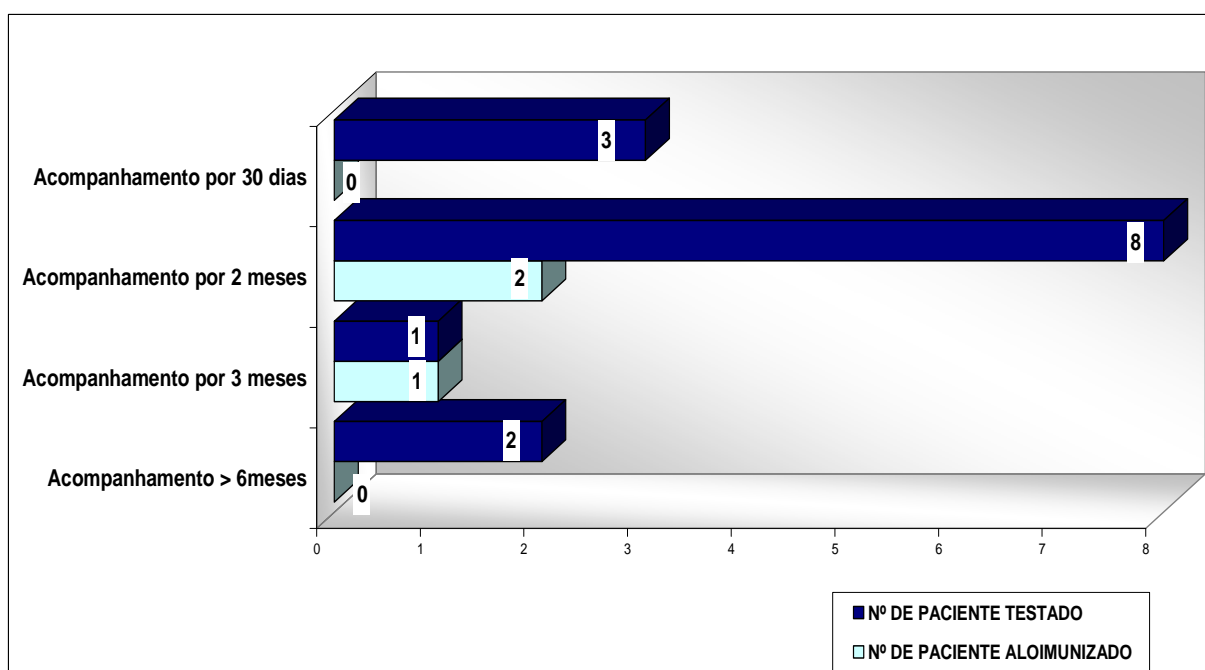
**Figura 24** – Percentual de pacientes em relação ao tempo de acompanhamento para a aloimunização contra anticorpos anti-HPA.

O método utilizado para pesquisa de anticorpos anti-HPA foi o Coombs Indireto Plaquetário (CIP), uma técnica realizada "*in house*" que possui ampla especificidade inclusive contra anticorpos anti-HLA, pois é realizada com um *pool* de plaquetas humanas com o objetivo de aumentar a diversidade de expressão dos antígenos plaquetários e submetida à incubação com o soro do paciente. Posteriormente, se existente o complexo antígeno-anticorpo este será marcado com anticorpo anti-humano IgG (Fab) FITC e detectados pela leitura em Citômetro de Fluxo.

Como nessa técnica existe a possibilidade de detecção tanto de anticorpos anti-HLA como anti-HPA, o próprio teste de rastreio FlowPRA<sup>®</sup> foi utilizado para excluir essa variável. E em todas as amostras em que o CIP foi positivo o teste de anticorpos anti-

HLA foi negativo. Assim, podemos constatar que uma das limitações que a técnica apresenta não interferiu em nossos resultados.

Os resultados encontram-se detalhados na figura 25, e revelam que em 21% (n=3) do pacientes que foram acompanhados houve detecção de anticorpos anti-HPA posteriores ao uso dos curativos bioativos, ou seja, do total de 14 pacientes acompanhados 3 desenvolveram anticorpos anti-plaquetários. Sendo que 2 formaram anticorpos 2 meses após o uso dos curativos bioativos e 1 deles após 3 meses.



**Figura 25** – Relação entre o número de pacientes que receberam a aplicação tópica dos curativos bioativos e foram monitorados por um tempo determinado (30 dias, 2 meses, 3 meses e mais de 6 meses) e o número de pacientes que se aloimunizaram contra anticorpos anti-HPA através do teste de Coombs indireto Plaquetário.

Do mesmo modo como aconteceu com a pesquisa de anticorpos anti-HLA, foram encontrados pacientes com sensibilização anterior ao tratamento com os curativos bioativos para anticorpos anti-plaquetários. Foi realizado um histórico desses 3 pacientes para levantar dados que pudessem explicar essa sensibilização prévia. Uma delas trata-se de uma paciente do sexo feminino, politransfundida com histórico de mais de vinte enxertos de pele.

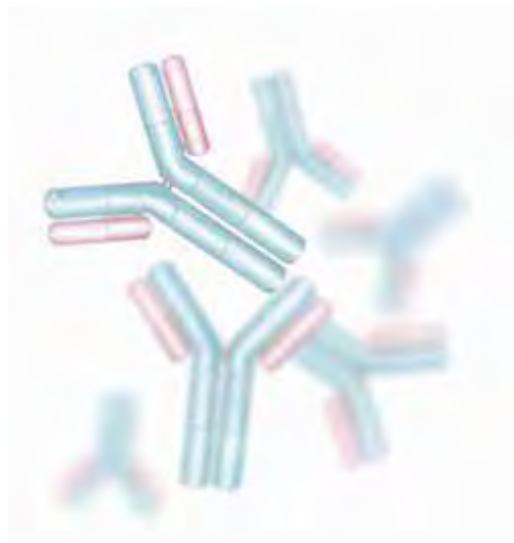
O segundo é um paciente do sexo masculino em curso de tratamento oncológico por melanoma maligno com histórico transfusional de concentrado de plaquetas. O terceiro trata-se também de paciente do sexo masculino e também politransfundido.

Nossos dados revelaram um percentual de 21% (n=3) de aloimunização contra antígenos plaquetários dos 14 pacientes avaliados. Não houve aloimunização contra

antígenos leucocitários nos 17 pacientes avaliados e também não houve sensibilização contra antígenos eritrocitários nos 100 pacientes avaliados, demonstrando assim, o baixo potencial imunogênico dos curativos bioativos em relação aos aspectos imunohematológicos e leucoplaquetários quando comparados ao percentual de pacientes aloimunizados por transfusão de plaquetas descritas na literatura consultada (REBULLA, 2005; SACHER, 2003; TOOR, 2006).

Isto vem reforçar que os efeitos benéficos dos curativos bioativos, já evidenciado em estudos anteriores do Laboratório de Engenharia Celular junto ao Ambulatório de Biocurativos, não são comprometidos com a questão da aloimunização por antígenos expressos na membrana plaquetária, visto que a plaqueta é um dos principais princípios ativos utilizados na formulação dos curativos bioativos.

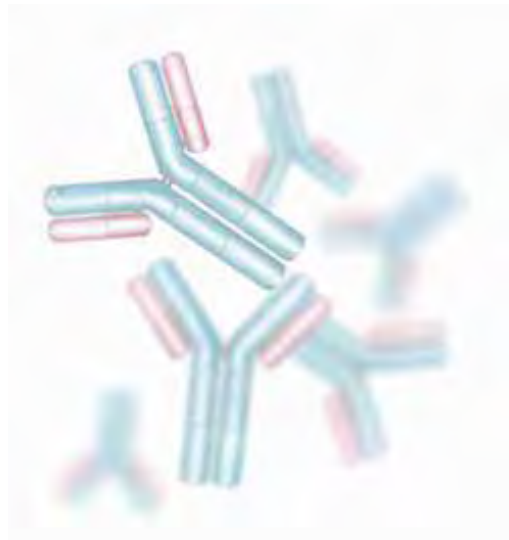
# 6 - Conclusão



Baseado nos dados obtidos nesse trabalho, bem como nas informações oriundas da literatura, podemos concluir que:

- Não foram evidenciadas correlações entre os antígenos eritrocitários do sistema ABO nem para os antígenos D,C,c,E,e do sistema Rh no processo de lesão ou cicatrização;
- Os estudos realizados para ampliar as evidências que apontavam o antígeno eritrocitário Kell com um marcador preditivo da evolução de feridas crônicas reforçaram uma relação no aumento no tempo de evolução da ferida e a presença do antígeno Kell, sugerindo a presença deste como um possível marcador de má-evolução de úlceras crônicas de diversas etiologias;
- O estudo do potencial imunogênico dos curativos bioativos demonstrou que a exposição a antígenos altamente imunogênicos a que esses pacientes foram submetidos levaram somente a aloimunização contra antígenos plaquetários, porém em um percentual abaixo daqueles encontrados pela transfusão de concentrado de plaquetas. Portanto, caracterizam os curativos bioativos como tendo um baixo potencial imunogênico em relação aos aspectos imunohematológicos e leucoplaquetários.
- Assim, reforçam os efeitos benéficos dos curativos bioativos para o uso em feridas crônicas de diversas etiologias quando analisado seu potencial imunogênico.

# 7 - Referências



ALVES, C.A.; MEYER, I.; TORALLES, M.B.P.; SANTIAGO, M.B. Complexo principal de histocompatibilidade: sua participação na patogênese das doenças reumáticas auto-imunes. **Rev. Bras. Promoc. Saúde**, v.19, n.3, p.155-163, 2006.

ALVES, C.A.; SOUZA, T.; VEIGA, S.; ALVES, C.; TORALLES, M.B.; LEMAIRE, D. The importance of the human histocompatibility antigens (HLA) in Pediatrics. **Pediatria (São Paulo)**, v.27, n.4, p.274-286, 2005.

ALVES, C.A.; VEIGA, S.; TORALLES, M.B.P.; LOPES, A.C.V. Major histocompatibility complex: its role in the physiology of pregnancy and in the pathogenic mechanisms of obstetric complications. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v.7, n.4, p.357-363, 2007.

ANTONIO, M.E.C.O. **Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas.** 2007. 147f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução da Diretoria Colegiada -RDC no. 153, de 14 de junho de 2004. Anexo 1- Regulamento Técnico dos Serviços de Hemoterapia, Brasília, Distrito Federal: Ministério da Saúde, 2004.

ARAÚJO, I.C.F. **Tratamento de feridas crônicas de membros inferiores com biocurativos.** 2007. 199f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Médica) – Programa de pós-graduação em pesquisa e desenvolvimento, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.41, n.1, p.1-26, 2005.

BARBIERI, C.M.O.; COSTA, P.I. Fatores de crescimento derivado das plaquetas humanas (PDGF) – obtenção e perspectiva e aplicação clínica. In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. **Plasma rico em plaqueta – PRP e fatores de crescimento**. São Paulo: Livraria Santos, 2004. p.121-144.

BEIGUELMAN, B. **Os sistemas sanguíneos eritrocitários**. 3.ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003.

BLUMBERG, N.; HEAL, J. M.; GETTINGS, K. F. WBC reduction of RBC transfusions is associated with a decreased incidence of RBC alloimmunization. **Transfusion**, v.43, p.945-952, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

CALHON, L. Outros sistemas importantes de grupos sanguíneos. In: HARMENING, D.M. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. p.198-208.

CANDIDO, L.C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: SENAC, 2001.

CARDONE, J.D.B.; CHIVA, A.K.; BOTURÃO-NETO, E.; VIEIRA-FILHO, J.P.B.; BORDIN, J.O. Gene frequencies of the HPA-15 (Gov) platelet alloantigen system in Brazilians. **Transfusion Med.**, v.14, p.433-437, 2004.

CASTRO, H. C.; FERREIRA, B.L.A.; HAGASHIM, T.; SCHUELER, A.; RUEFF, C.; CAMISASCA, D.; MOREIRA, G.; SCOVINO, G.; BORGES, L.; LEAL, M.; FILGUEIRA, M.;

PASCHOAL, P.; BERNARDO, V.; BOURGUINHON, S.; RODRIGUES, C.R.; SANTOS, D.O. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **J. Brás. Patol. Med. Lab.**, v.42, n.5, p.321-332, 2006.

CASTRO, V.; ARRUDA, V.R.; COSTA, F.F. Study of human platelet antigen (HPA) system polymorphisms in hemorrhagic and thrombotic disorders. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.26, n.4, p.292-293, 2004.

CHAGAS, S.A.; OLIVEIRA, S.; JÚNIOR, N.B. Regeneração tecidual- plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em fibrinogênio (PRP). In: PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. **Plasma rico em plaqueta – PRP e fatores de crescimento**. São Paulo: Livraria Santos, 2004.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

COVAS, D.T.; ZAGO, M.A. Antígenos eritrocitários, leucocitários e plaquetários. In: ZAGO, M.A.; PASSETTO, R.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001.

DALBELSTEEN, E.; GAO, S. ABO blood-group antigens in oral cancer. **J. Dent. Res.**, v.84, n.1, p.21-28, 2004.

D'AMICO, E.A.; VILHAÇA, P.R.; BARNA, G.A.O.; HAMONE, D.A.F. Fisiologia plaquetária. In: MAFFEI, F.H.A.; LASTÓRIA, S.; YOSHIDA, W.B.; ROLLO, H.A. **Doenças vasculares periféricas**. 3.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2002.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

DIAS, E.P.; SOARES, M.M.S.; RESENDE, L.M.H. Diabetes Mellitus: diagnóstico e classificação. In: BRAGA, Walter dos Reis Caxeta. **Enciclopédia da saúde: diabetes mellitus**. São Paulo: Medsi, 2001.

FLAUMENHAFT, R. Molecular basis of platelet granule secretion. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.23, n.7, p.1152-1160, 2003.

GARCIA, M.A. **Uso de biocurativo na abordagem de úlceras de pressão**. 2004. 80f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Médica) - Programa de pós-graduação em pesquisa e desenvolvimento, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

GOMES, M.E.W.; FABRIS, C.; FILHO, J.L.B.; DREHER, R.; ROSITO, G.A. Antagonistas do receptor plaquetário GPIIb/IIIa. **Rev. Assoc. Méd. Brás.**, v.46, n.3, p.255-64, 2000.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HARMENING, D.M. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão**. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

HESS, C.T. **Tratamento de feridas e úlceras**. 4.ed. Rio de Janeiro: Reichmann e Afonso, 2000.

IRION, G. **Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

JONES, D.C.; BUNCE, M.†; FUGGLE, S.V.†; YOUNG, N.T.; MARSHALL, S.E. Human platelet alloantigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. **Eur. J. Immunogenet.**, v.30, p.415-419, 2003.

JORGE, A.S., DANTAS, S.R.P.E. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2003.

KIEFEL, V.; KÖNIG, C.; KROLL, H.; SANTOSO, S. Platelet alloantibodies in transfused patients. **Transfusion**, v.41, p.766-770, 2001.

LANDI, E.P.; OLIVEIRA, J.S.R. Doença do enxerto contra hospedeiro pós-transfusional: guia para irradiação gama de hemocomponentes. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.45, n.3, p.261-272, 1999.

LEE, S.; LIN, M.; MELE, A.; CAO, Y; FARMAR, J.; RUSSO, D.; REDMAN, C. Proteolytic Processing of Big Endothelin-3 by the Kell Blood Group Protein. **Blood**, v.94, n.4, p.1440-1450, 1999.

LENHARO, A.; COSSO, F.; MAGALHÃES, D.; MENEZES, H.H.M. Plasma rico em plaquetas. In: PONTUAL, M.A.B., MAGINI, R.S. **Plasma rico em plaqueta – PRP e fatores de crescimento**. São Paulo: Livraria Santos, 2004.

LESSA, I. **O adulto brasileiro e as doenças da modernidade. Epidemiologia das doenças crônicas não-transmissíveis**. São Paulo: Abrasco, 1998.

LIMA, D. P. Complicações crônicas do diabetes mellitus. In: BRAGA, W.R.C. **Enciclopédia da saúde: diabetes mellitus**. São Paulo: Medsi, 2001.

LOIOLA, L.V.; SCHMID, H. Os pés dos pacientes com diabetes. In: BRAGA, W.R.C. **Enciclopédia da saúde: diabetes mellitus**. São Paulo: Medsi, 2001.

LOPES, C.F. Pé diabético. In: PITTA, G.B.B., CASTRO, A.A., BURILAN, E. **Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado**. Maceió: UNCISAL/ECMAL e LAVA, 2003. Disponível em: <<http://www.lava.med.br/livro>>. Acesso em: 01 maio 2008.

LORENZI, T.F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MAFFEI, F.H.A.; LASTÓRIA, S.; YOSHIDA, W.B.; ROLLO, H.A. **Doenças vasculares periféricas**. 3.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2002.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources -Part I\*. **An. Bras. Dermatol.**, v.78, n.4, p.393-410, 2003.

METCALFE, P.; CAVANAGH, G.; HURD, C.; OUWEHAND, W.H. HPA Genotyping by PCR-SSP: Report of 4 exercises. **Vox Sang.**, v.77, p.40-43, 1999.

METCALFE, P.; WATKINS, N. A.; OUWEHAND, W. H.; KAPLAN, C., NEWMAN, P.; KEKOMAKI, R.; HASS, M.; ASTER, R.; SHIBATA, Y.; SMITH, J.; KIEFEL, V.; SANTOSO, S. Nomenclature of human platelet antigens. **Vox Sang.**, v.85, p.240-245, 2003.

OLIVEIRA, E.A.; SELL, A.M. Os antígenos HLA e a hemoterapia. **Acta Sci.**, v.24, n.3, p.731-736, 2002.

ROBISON, J.; WALLER, M. J.; STOEHR, P.; MARSH, S.G.E. IPD-the Immuno Polymorphism Database. **Nucleic Acids Res.**, v.33, p.523-526, 2005.

PAVKOVIC, M.; PETLICHKOVSKI, A.; STREZOVA, A.; ARSOV, T.; TRAJKOV, D.; SPIROSKI, M. Gene frequencies of human platelet antigens in the Macedonian population. **Tissue Antigens**, v.67, p.241-246, 2006.

REBULLA, P. A mini-review on platelet refractoriness. **Hematol. J.**, v.90, n.2, p.247-253, 2005.

REID, M. E.; YAHALOM, V. Blood groups and their function. **Baillières Clin. Haematol.**, v.13, n.4, p.485-509, 2001.

SACHER, R.A.; KICKLER, T.S.; SCHIFFER, C.A.; SHERMAN, L.A.; BRACEY, A.W.; SHULMAN, I.A. Management of Patients Refractory to Platelet Transfusion. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.127, p.409-414, 2003.

SANTOSO, S.; KIEFEL, V. Human platelet alloantigens. **Wien. Klin. Wochenschr.**, v.113, n.20-21, p.806-813, 2001.

SCHCOEN, F.; COLTRAN, R. Vasos sangüíneos. In: COTRAN, R., KUMAR, V., COLLINS T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SHIH, M.C.; LIU, T.C.; I-LING, L.; LIN, S.F.; CHEN, C.M.; CHANG, J.G. Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-13, Oe and Gov platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, Filipino and Thai populations. **Int. J. Mol. Med.**, v.12, p.609-614, 2003.

TOLEDO, E.H.R.; DIOGO, M.J.D. Idosos com afecção onco-hematológica: ações e as dificuldades para o autocuidado no início da doença. **Rev. Latinoam. Enferm.**, v.1, n.6, p.707-712, 2003.

TOOR, A.A.; CHOO, S.Y.; LITTLE, J.A. Bleeding risk and platelet transfusion refractoriness in patients with acute myelogenous leukemia who undergo autologous stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, n.26, p.315-320, 2006.

TORALLES-PEREIRA, C.; PARDINI, M. I. DE M. C.; DEFFUNE, E.; MACHADO, P. E. A.  
The first report of the human platelet alloantigen 4b allele in a Brazilian. **Int. J. Immunogenet.**, v.32, p. 165-166, 2005.

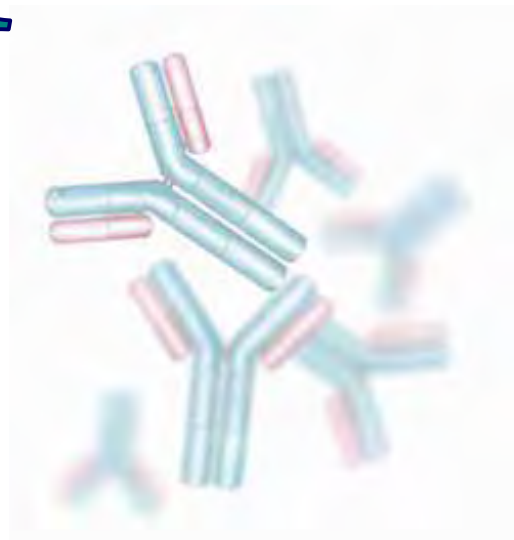
TORTI, M.; BERTONI, A.; CANOBBIO, M.; SIGAGLIA, F.; LEPETINA, E.G.; BALDUINI, C.  
Rap1B and Rap2B translocation to the cytoskeleton by von Willebrand factor involves Fc gamma II receptor-mediated protein tyrosine phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.19, p.13690-13697, 1999.

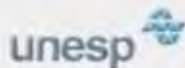
ZOTZ, R. B.; GIERS, G.; MARUHN-DEBOWSKI, B.; SCHARF, R. E. Genetic typing of human platelet antigen 1 (HPA-1) by oligonucleotide ligation assay in a specific and reliable semi-automated system. **Br. J. Haematol.**, v.96, p.198-203, 1997.

WIWANITKIT, V. Gene Frequencies of the Human Platelet Antigen-3 in Different Populations. **Clin. Appl. Thromb. Hemost.**, v.11, n.1, p.89-93, 2005.

YIP, J. Primary platelet adhesion receptors. **IUBMB Life**, v.57, n.2, p.103-108, 2005.

# 8 - Apêndices





Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distribuição Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de  
abril de 1997

Botucatu, 07 de julho de 2008

Of. 283/08-CEP

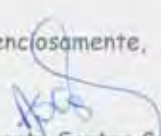
Ilustríssima Senhora  
Profª Drª Rosana Rossi Ferreira  
Divisão de Hemocentro da  
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezada Profª Rosana,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Potencial imunogênico do gel de plaquetas: aspectos imunohematológico e leucoplaquetário", a ser conduzido por Maira Camila Felix, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração da Profª Drª Elenice Deffune recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 07/07/2008.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao término deste projeto apresentar ao CEP Relatório Final de Atividades.

Atenciosamente,

  
Alberto Santos Capellupi  
Secretário do CEP.