

**Efeito da Concentração Plaquetária na Coleta e Criopreservação dos
Concentrados de Plaquetas “Secas” Obtidos por Aférese**

Evaldo Pasquini Landi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas –
UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em
Clínica Médica

Campinas
2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**Efeito da Concentração Plaquetária na Coleta e Criopreservação dos
Concentrados de Plaquetas “Secas” Obtidos por Aférese**

Evaldo Pasquini Landi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP,
para obtenção do Título de Mestre em Clínica Médica,
área de concentração em Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Cármino Antonio de Souza

Campinas
2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
CHAMADA T/UNICAMP
L234e
EX
IMBO BC/ 64574
IOC 16-P.00086-05
IEÇO 11,00
ATA 08/08/05
CPD
Prinid 359038

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

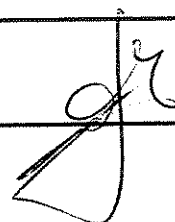
L234e Landi, Evaldo Pasquini
Efeito da concentração plaquetária na coleta e criopreservação
dos concentrados de plaquetas "secas" obtidos por aférese /
Evaldo Pasquini Landi. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador: Cármينو Antonio de Souza
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Selectina-P. 2. *Anexina V. 3. *Dimetilsulfoxido.
I. Cármينو Antonio de Souza . II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

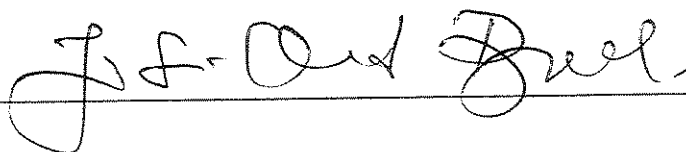
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Prof.Dr. Cármino Antonio de Souza*

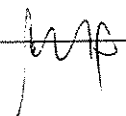


Membros:

Prof. Dr. Jose Orlando Bordim



Prof. Dr. José Francisco Comenalli Marques Junior



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 03/05/2004

DEDICATÓRIA

À minha esposa,
Ana Cristina Gales,
pelo suporte, inspiração e exemplo.

À minha filha,
Marília Gales Landi,
com muito amor.

Aos meus pais,
José Landi e
Ana Maria Pasquini Landi,
pela diligente condução e dedicação em
todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cármio Antonio de Souza, meu orientador, pela confiança, pela enriquecedora oportunidade e pelo exemplo de ética e sabedoria.

Ao Prof. Dr. José Francisco Comenalli Marques Júnior pelo acolhimento, confiança, dedicação, competência e profissionalismo.

À Eduardo Gasparotto Roveri, Andréia Fernanda Origa, Aparecida Ribeiro de Carvalho Reis, Fernanda Gonçalves Pereira Cunha e Tânia de Fátima Gomes Siegl Machado, meus mais sinceros agradecimentos pela cuidadosa realização dos procedimentos técnicos e laboratoriais, pela amizade e companheirismo.

À Prof. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzachi, à Prof. Dra. Margareth Castro Ozelo e à Prof. Dra. Irene Lorand-Metze pelas valiosas sugestões na realização deste trabalho.

À Mariuce Camargo de Andrade, Martha Cristina Discencia, Marcela Rozariz, João Luis de Souza Fadiga, Silmara Aparecida de Lima, Alan Franco de Oliveira, Nicete Romano, Iara Marília Cavalcante Torres pelo carinho e auxílio dispensados com muita gentileza e competência.

À Roberto Zulli pelas sugestões, dedicação e paciência na realização das análises estatísticas deste estudo.

Ao colega de pós-graduação Prof. João Rui pela amizade e pelo exemplo de dedicação e caráter.

Aos colegas e funcionários do Hemocentro de Campinas por terem viabilizado este trabalho. Foi realmente um enorme prazer poder trabalhar com todos vocês.

Ao Dr. Jerome Connor e à empresa LifeCell Corporation por terem gentilmente cedido o ThromboSol® para este estudo.

À Federico Voglino e à empresa Dideco pelo patrocínio aos circuitos de aférese e pelo suporte na organização dos dados de coleta.

À Fundação de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP) pelo suporte financeiro a este estudo.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	IV
Agradecimentos.....	V
Lista de Tabelas.....	IX
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	XII
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XVI
1. Introdução.....	1
1.1. Estocagem dos Concentrados de Plaquetas.....	2
1.2. Ativação Plaquetária e a Avaliação <i>In Vivo</i> e <i>In Vitro</i> dos Concentrados de Plaquetas Criopreservadas.....	6
1.3. Concentrados de Plaquetas "Secas" Obtidos por Aférese.....	15
2. Objetivos.....	17
3. Material e Métodos.....	18
3.1. Coleta dos Concentrados de Plaquetas por Aférese.....	18
3.2. Criopreservação dos Concentrados de Plaquetas "Secas".....	21
3.2.1. Criopreservação com ThromboSol®.....	21
3.2.2. Criopreservação com DMSO a 5%.....	22
3.3. Exame Microbiológico.....	23
3.4. Diluição das Amostras dos Concentrados de Plaquetas para os Estudos <i>in vitro</i>	23

3.5. Determinação da Contagem Plaquetária e do Volume	
Plaquetário Médio.....	24
3.6. Avaliação da Contagem de Leucócitos.....	24
3.7. Determinação do pH, da Dosagem de DHL e da Glicose.....	25
3.8. Avaliação dos Receptores de Membrana Plaquetária e da Formação da Superfície Pró-Coagulante por Citometria de Fluxo.....	25
3.9. Teste de Agregação Plaquetária.....	27
3.10. Descongelamento dos Concentrados de Plaquetas.....	28
3.11. Análise Estatística.....	29
4. Resultados.....	30
4.1. Coleta dos Concentrados de Plaquetas e Comparação entre os Concentrados de Plaquetas Convencionais e "Secas" por Aférese....	30
4.2. Criopreservação e Comparação entre os Concentrados de Plaquetas "Secas" Pré-Congelamento e Criopreservados.....	37
4.3. Comparação entre os Concentrados de Plaquetas "Secas" Criopreservados com ThromboSol® ou com DMSO 5%.....	42
5. Discussão.....	48
6. Conclusões.....	64
7. Referências Bibliográficas.....	66
8. Anexos.....	86
9. Apêndices.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos que avaliaram, <i>in vivo</i> , a utilização de concentrados de plaquetas criopreservados.....	10
Tabela 2. Técnicas empregadas na avaliação dos concentrados de plaquetas criopreservados.....	12
Tabela 3. Parâmetros de coleta dos concentrados e plaquetas convencionais e "secas" por aférese.....	31
Tabela 4. Parâmetros morfológicos e bioquímicos dos concentrados de plaquetas convencionais e "secas" por aférese.....	32
Tabela 5. Expressão dos receptores da membrana plaquetária e da formação da superfície pró-coagulante nos concentrados de plaquetas convencionais e "secas" por aférese.....	34
Tabela 6. Porcentagem de agregação dos concentrados e plaquetas convencionais e "secas" por aférese.....	37

Tabela 7. Mediana da contagem plaquetária, dos parâmetros morfológicos e bioquímicos, da expressão dos receptores de superfície da membrana plaquetária e da formação da superfície pró-coagulante dos concentrados de plaquetas "secas" pré-congelamento e criopreservados.....	39
Tabela 8. Porcentagem de agregação dos concentrados de plaquetas "secas" pré-congelamento e criopreservados e análise da associação de agonistas.....	41
Tabela 9. Comparação, pré-congelamento, entre os concentrados de plaquetas "secas" criopreservados com ThromboSol® e aqueles criopreservados com DMSO 5%.....	44
Tabela 10. Análise pré e pós-congelamento dos concentrados de plaquetas "secas" criopreservados com ThromboSol®.....	45
Tabela 11. Análise pré e pós-congelamento dos concentrados de plaquetas "secas" criopreservados com DMSO 5%.....	46
Tabela 12. Criopreservação com ThromboSol® versus criopreservação com DMSO 5%.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema demonstrativo da metodologia empregada neste estudo.....	20
Figura 2. Ilustração da identificação por citometria de fluxo da ligação da anexina V e da expressão dos antígenos CD41, CD62p e CD42b nas plaquetas "secas".....	35
Figura 3. Ilustração da identificação por citometria de fluxo da ligação da anexina V e da expressão dos antígenos CD41, CD62p e CD42b nas plaquetas convencionais por aférese.....	36
Figura 4. Ilustração da identificação por citometria de fluxo da ligação da anexina V e da expressão dos antígenos CD41, CD62p e CD42b nas plaquetas criopreservadas.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA -	Ácido Aracdônico
COX-1 -	Ciclooxigenase 1
DHL -	Desidrogenase Láctica
DMSO -	Dimetilsulfóxido
FC -	Fosfatidilcolina
FE -	Fosfatidiletanolamina
FI -	Fosfatidilinositol
FP-4 -	Fator Plaquetário 4
FS -	Fosfatidilserina
FVA -	Fator V Ativado
FVW -	Fator de Von Willebrand
GRL -	Glicoproteína Rica em Leucina
HLA -	Antígenos Leucocitários Humanos
IMF -	Intensidade Média de Fluorescência
IP ₃ -	Fosfatidilinositol Trifosfato
PBS -	Tampão Fosfato Salino
PG G ₂ -	Prostaglandina G ₂
PG H ₂ -	Prostaglandina H ₂
RES -	Resposta ao Estresse Hipotônico
RGD -	Arginina / Glicina / Aspartato
SCA -	Sistema Canalicular Aberto

STD -	Sistema Tubular Denso
TX A ₂ -	Tromboxano A ₂
TX B ₂ -	Tromboxano B ₂
VPM -	Volume Plaquetário Médio
⁵¹ Cr -	Cromo-51

RESUMO

Introdução. A criopreservação dos concentrados de plaquetas pode ser de grande importância para a manutenção dos estoques de concentrados de plaquetas. No entanto, a criopreservação exige a adição e remoção do crioprotetor, o que torna a técnica trabalhosa e de custo elevado. Os concentrados de plaquetas "secas" se caracterizam por apresentarem pequeno conteúdo plasmático. A criopreservação destes concentrados eliminaria a necessidade de centrifugação para remoção do plasma excedente antes da adição do crioprotetor. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da coleta por aférese e da criopreservação dos concentrados de plaquetas "secas" e a atividade do dimetilsulfóxido (DMSO) 5% e 2% com inibidores da segunda resposta celular (ThromboSol®) como substâncias crioprotetoras para os concentrados de plaquetas "secas". **Material e Métodos.** Foram coletadas 28 unidades de concentrados de plaquetas convencionais e "secas", utilizando o mesmo procedimento de aférese para cada coleta. Amostras dos respectivos concentrados foram obtidas para análise microbiológica, contagem de leucócitos, contagem plaquetária, determinação do volume plaquetário médio, do pH e dos níveis de glicose e DHL. Para avaliar a ocorrência de ativação plaquetária, foram estudados por citometria de fluxo, o complexo GPIb (CD42b), a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD41), a p-selectina (CD62p) e a ligação da anexina V. A avaliação funcional foi realizada por meio da agregação plaquetária com difosfato de adenosina (ADP), epinefrina, colágeno e ácido aracdônico. Após o descongelamento, foram colhidas amostras para realização dos mesmos testes acima descritos. Os concentrados de plaquetas "secas" foram comparados aos concentrados de plaquetas convencionais

por aférese e aos concentrados de plaquetas "secas" criopreservados, assim como o grupo de concentrados de plaquetas "secas" criopreservado com DMSO 5% foi comparado ao grupo criopreservado com ThromboSol®. Para análise estatística foi utilizado o teste de Wilcoxon pareado na comparação de bolsas do mesmo indivíduo, e não pareado, quando se tratava de indivíduos diferentes. Os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$. **Resultados.** Os concentrados de plaquetas "secas" apresentaram menor pH ($p < 0,001$) e conteúdo de glicose ($p < 0,001$), maiores níveis de DHL ($p < 0,001$), maior porcentagem de plaquetas p-selectina positivas ($p < 0,001$) e menor resposta agregatória com ADP ($p < 0,001$) e epinefrina ($p < 0,001$). A criopreservação ocasionou alterações morfológicas nas plaquetas e foi associada à maior ocorrência de lise, ativação e diminuição da resposta funcional. A criopreservação com ThromboSol® foi associada a maiores níveis de DHL ($p < 0,001$) e à maior ligação da anexina V ($p = 0,005$), além de menor porcentagem de plaquetas CD42 positivas ($p = 0,01$) e menor resposta agregatória ao colágeno ($p = 0,005$). **Conclusão.** Este estudo sugere que os concentrados de plaquetas "secas" devem ser prontamente criopreservados após a coleta para evitar a redução do pH e a ocorrência de ativação plaquetária. A utilização de DMSO 5% ofereceu um efeito crioprotetor melhor ao do ThromboSol®.

ABSTRACT

Introduction. Long term cryopreservation and banking of platelet concentrates (PCs) would provide a better storage management. However, cryopreservation requires the addition and posterior removal of a cryoprotective, making the procedure cumbersome and expensive. Dry PCs would provide a plasma reduced component and fresh dry PCs could be cryopreserved in a dry condition, avoiding the centrifugation required to remove excess plasma before adding the cryoprotective. The purpose of this study was to evaluate the effects of collecting and cryopreserving dry PCs and the activity of dymethyl sulfoxide (DMSO) 5% and of DMSO 2% plus second-messenger effector (ThromboSol™) as cryopreserving solution for dry PCs.

Material and Methods. Both standard and dry PCs were collected in the same apheresis procedure and samples were obtained for microbiologic control, leukocyte and platelet counts and mean platelet volume (MPV), pH, glucose and LDH levels determination. Activation was examined by flow cytometry using monoclonal antibodies directed against GPIb complex (CD42), $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin (CD41) and p-selectin (CD62p), along with annexin binding assay. Platelet function was assessed by aggregation using adenosine diphosphate (ADP), collagen and arachidonic acid as agonists. Dry PCs were compared to apheresis standard PCs and to cryopreserved dry PCs. The cryoprotective effect of DMSO 5% was also compared to ThromboSol™. Statistical analysis was performed by using a Wilcoxon signed rank test to test for significant differences between samples from the same donor and a Wilcoxon rank sum test between samples from distinct donors. A p value < 0.05 was considered significant. **Results.** Dry PCs presented a significantly reduced pH

($p < 0.001$) and glucose ($p < 0.001$), increased LDH levels ($p < 0.001$) and CD62p expression ($p < 0.001$), and diminished aggregation response to ADP ($p < 0.001$) and epinephrine ($p < 0.001$). Platelet cryopreservation was associated to platelet lyses, activation and loss of function. Dry PCs cryopreserved with ThromboSol™ were associated to higher LDH levels ($p < 0.001$) and annexin binding ($p = 0.005$), and to lower CD42 positive platelets ($p = 0.01$) and aggregation response to collagen as agonist ($p = 0.005$). **Conclusion.** This study suggest that dry PCs should be rapidly frozen after collection to avoid pH fall and platelet activation. In addition, it was observed that DMSO 5% demonstrated better performance than ThromboSol™ cryopreserving dry PCs.

1. INTRODUÇÃO

A transfusão de sangue total ou de plasma rico em plaquetas eram as únicas opções terapêuticas para o tratamento de hemorragias em pacientes trombocitopênicos até a descoberta e o patenteamento das bolsas plásticas em 1950 (GRENWALT, 1997). A utilização desse material otimizou o processo de separação do sangue em hemocomponentes e facilitou a obtenção dos concentrados de plaquetas, dando início a uma terapêutica transfusional mais eficiente (KLEIN et al., 1956).

A evidência de que a transfusão de plaquetas consistia em uma medida terapêutica realmente efetiva foi estabelecida por estudos retrospectivos e consensos clínicos. GYDOS et al. (1962) em um estudo retrospectivo de 92 pacientes com leucemia aguda evidenciaram que havia uma relação quantitativa entre a frequência de hemorragias e a contagem de plaquetas desses pacientes. DJERASSI et al. (1963) verificaram que a transfusão de concentrados de plaquetas consistia em estratégia importante no tratamento de pacientes com trombocitopenia e que a sua utilização não estava relacionada a efeitos indesejáveis importantes. HERSH et al. (1965), revendo a experiência de 414 pacientes tratados de leucemia entre os anos de 1954 e 1963, constataram que entre 1954 e 1959, 67% dos pacientes faleceram por complicações hemorrágicas e, entre 1960 e 1963, com o uso regular de transfusões de plaquetas, a mortalidade associada a hemorragias foi de 37%. Os mesmos achados foram posteriormente confirmados em uma análise

retrospectiva de 57 autópsias de pacientes tratados de leucemia aguda (HAN et al., 1966).

1.1. Estocagem dos Concentrados de Plaquetas

No início de sua utilização, os concentrados de plaquetas eram armazenados em geladeira a 4°C. Porém, a estocagem nesta temperatura estava sabidamente associada à redução da viabilidade e à ativação plaquetária, ocasionando baixos incrementos plaquetários após a transfusão. (BALDINI et al., 1960; WOLF, 1967).

MURPHY e GARDNER (1969) utilizaram amostras de voluntários para comparar a estocagem de concentrado de plaquetas a 4°C por até 18 horas com a estocagem a 22°C, sob agitação contínua, por até 96 horas. Após esse período, as plaquetas foram marcadas com ^{51}Cr e infundidas nos respectivos doadores. Foi observado que a recuperação plaquetária era significativamente maior quando os concentrados de plaquetas eram estocados a 22°C. Posteriormente, HANDIN et al. (1971) verificaram que as plaquetas estocadas a 22°C mantinham suas propriedades hemostáticas, sendo capazes de corrigir o tempo de sangramento e normalizar a agregação plaquetária em voluntários tratados com ácido acetilsalicílico. Além dos bons resultados, a praticidade e o baixo custo contribuíram para que a estocagem dos concentrados de plaquetas a 22°C, sob agitação contínua, fosse adotada como técnica padrão pelos serviços de hemoterapia.

Inicialmente, os concentrados de plaquetas eram estocados a 22°C por três dias porque, após esse período, observava-se uma redução abrupta do pH com conseqüente perda da viabilidade das plaquetas (MURPHY et al., 1982). O

desenvolvimento de novos plásticos mais permeáveis ao dióxido de carbono e ao oxigênio permitiram que o tempo de estocagem dos concentrados de plaquetas fosse ampliado de três para cinco dias (GRODE et al., 1985). Em seguida, HOGGE et al. (1986) e SIMON et al. (1987) demonstraram que os concentrados de plaquetas poderiam ser estocados por até sete dias. Porém, a estocagem prolongada aumentou significativamente o risco de bacteremias e septicemias associadas à transfusão (HEAL et al., 1987; PUNSALANG et al., 1989). Como consequência, a validade dos concentrados de plaquetas foi novamente revista e limitada a cinco dias.

Nas últimas três décadas, os serviços de hemoterapia tiveram que se adaptar ao curto período de validade dos concentrados de plaquetas e ao aumento significativo do consumo (NORFOLK et al., 1998). Essa adaptação tem implicado na necessidade de doações regulares e em produção excedente, ocasionando o descarte excessivo do produto e o aumento dos custos. Mesmo assim, freqüentemente, há escassez para atender a demanda.

A criopreservação é a única forma atualmente disponível para estocar concentrados de plaquetas por períodos prolongados. No entanto, ela apresenta inconveniências, como a necessidade de manipulação para a adição e remoção do crioprotetor, os custos do armazenamento e o aparecimento de lesões plaquetárias irreversíveis induzidas pelo processo de congelamento (LEE e BLAJCHMAN, 2001).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é o melhor crioprotetor disponível para o congelamento dos concentrados de plaquetas, apresentando resultados superiores em avaliações *in vivo* e *in vitro* aos obtidos com glicerol, com hidroxietila de amido e

com dextrano (COHEN et al., 1966; HERVE et al., 1981; REDMOND et al., 1983; TAYLOR, 1981; ANGELINI et al., 1992).

O DMSO se difunde rapidamente pela membrana das células, portanto a concentração plaquetária parece não influenciar o resultado da criopreservação (SCHIFFER et al., 1976). Além disso, quando adicionado aos concentrados de plaquetas, o DMSO não causa alterações morfológicas ou ativação plaquetária (BAYTHOON et al., 1982; GAO et al., 1999). Porém, inibe a atividade plaquetária, devendo ser removido antes da realização de um teste funcional (HANDIN e VALERI, 1972 CROWLEY et al., 1974).

Apesar de não ser tóxico para as plaquetas, a infusão de grande quantidade de DMSO pode causar efeitos adversos para o receptor, como náuseas, vômitos, flebites, exalação de odor característico, elevação das enzimas hepáticas e insuficiência renal (YELLOWLESS et al., 1980; DAVIS et al., 1990). Portanto, é recomendável a lavagem dos concentrados de plaquetas para remoção do DMSO antes da transfusão. Após a lavagem, estima-se que cerca de 400 mg de DMSO residual ainda permaneçam nos concentrados de plaquetas criopreservados (SPECTOR et al., 1977). DJERASSI et al. (1966) e LAZARUS et al. (1981) infundiram de 2,5 a 5,0g de DMSO em concentrados de plaquetas criopreservados não submetidos à lavagem e administrados a pacientes trombocitopênicos e não observaram efeitos adversos significativos.

De modo geral, as técnicas para criopreservação de plaquetas utilizam DMSO na proporção final de 6%, congelamento não programado e estocagem em freezer mecânico a -80°C, conforme proposto por VALERI et al. (1974), ou DMSO na

proporção final de 5%, congelamento gradual 1°C a 3°C/minuto e estocagem em nitrogênio líquido, conforme proposto por MURPHY et al. (1974). Ambas as técnicas apresentaram resultados semelhantes quanto à recuperação de plaquetas marcadas com ^{51}Cr e à eficiência hemostática após a transfusão (VALERI, 1974; KIM e BALDINI, 1974).

Recentemente, CURRIE et al. (1998) elaboraram uma solução criopreservante concentrada 50 vezes, designada de ThromboSol® (LifeCell, The Woodlands, Estados Unidos). Essa solução contém, após ser adicionada aos concentrados de plaquetas, inibidores das vias intracelulares da segunda transmissão nas concentrações de 0,25 mM de amilorida, 0,1 mM de adenosina, 50 μM de nitroprussiato de sódio, além de DMSO 2%. Tecnicamente, a redução na proporção final de DMSO simplifica o processo de criopreservação, pois permite que ele seja diretamente adicionado aos concentrado de plaquetas.

O ThromboSol® não evita o aparecimento das lesões plaquetárias induzidas pelo frio (LOZANO et al., 1999; LOZANO et al., 2000). No entanto, estudos *in vitro* e *in vivo* com esse criopreservante têm apresentado resultados discordantes, sendo, no momento, necessários estudos adicionais para comparação com técnicas convencionais de criopreservação para melhor definir a eficiência deste criopreservante (CURRIE et al., 1999; PEDRAZZOLI et al., 2000; BORZINI et al., 2000).

A criopreservação de concentrados de plaquetas é um procedimento trabalhoso e de custo elevado, se comparado ao método convencional de armazenamento. A técnica requer sucessivas etapas de centrifugação e lavagem

para a adição e remoção do crioprotetor que, por si mesma, promove ativação plaquetária (RINDER e AULT, 1998). A simplificação do processo de criopreservação seria de fundamental importância para a difusão desta forma de estocagem e para redução dos custos.

1.2. Ativação Plaquetária e a Avaliação *In Vivo* e *In Vitro* dos Concentrados de Plaquetas Criopreservados

As plaquetas apresentam naturalmente uma forma discóide mantida por um citoesqueleto que, observado à microscopia eletrônica, é representado por uma faixa marginal de microtúbulos e um arranjo cortical de microfilamentos de actina (PRIBLUDA e ROTMAN, 1982). Os principais componentes do citosol plaquetário são os grânulos alfa, os grânulos densos, os grânulos lisossomais, o sistema canalicular aberto (SCA), o sistema tubular denso (STD) e as mitocôndrias (WHITE, 1994; PARISE et al., 2001).

A membrana plaquetária apresenta fosfolípides dispostos de forma assimétrica na camada bilipídica. Noventa por cento da esfingomielina (EG) e 45% da fosfatidilcolina (FC) estão na camada externa, enquanto 80% da fosfatidiletanolamina (FE) e 90% da fosfatidilserina (FS) e fosfatidilinositol (FI) estão na camada interna. A FE e o FI são substratos críticos para a formação do ácido aracônico (AA) que é rapidamente convertido pela enzima prostaglandina H₂ sintetase (ciclo-oxigenase-1 ou COX-1), presente no sistema tubular denso, em prostaglandina G₂ (PG G₂) e em prostaglandina H₂ (PG H₂). A enzima tromboxano sintetase converte a PG H₂ em tromboxano A₂ (TX A₂), ambos capazes de induzir a

agregação plaquetária. O TX A₂ é rapidamente convertido no metabólito inativo tromboxano B₂ (TX B₂). A FS funciona como uma superfície pró-coagulante para o complexo pró-trombinase, capaz de potencializar a formação de trombina (PARISE et al., 2001). A manutenção do arranjo assimétrico da camada bilipídica depende da atividade da enzima aminofosfolípide translocase, que consome uma molécula de trifosfato de adenosina (ATP) para cada molécula de lipídeo transportada (ZWAAL e SCHROIT, 1997).

Quando agonistas fisiológicos específicos se ligam a receptores transmembrana que atuam sobre a proteína G das plaquetas, as enzimas fosfolipase C e proteína kinase C presentes no citosol são ativadas e promovem o aumento da concentração de fosfatidilinositol trifosfato (IP3). O IP3 promove a liberação de cálcio do STD, o que inicia o processo de exocitose e a polimerização da actina do citoesqueleto, promovendo a mudança da forma discóide para a esférica e a formação de pseudópodos (HEPTINSTALL et al., 1995; REED et al., 2000). Concomitantemente, irá ocorrer a migração dos grânulos alfa e densos para a posição central das plaquetas. Dependendo da intensidade do estímulo, as membranas do SCA irão se aproximar dos grânulos na posição central, podendo haver a fusão dos mesmos e a secreção para o exterior da célula. Após extrusão dos grânulos, observa-se a formação de cisternas ou vacúolos no interior das plaquetas, maior formação de pseudópodos e a liberação de micropartículas de membrana (ABRAMS e SHATTIL, 1991). A secreção granular altera a conformação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD41/CD61) que passa a atuar como receptor das moléculas de

fibrinogênio presentes no plasma ou liberados dos grânulos plaquetários, resultando na agregação plaquetária. (GRALNICK et al., 1992; RINDER e AULT, 1998).

Na circulação, as plaquetas estão em contato com substâncias produzidas pelo endotélio vascular que exercem efeito inibitório sobre a ativação plaquetária. As prostaciclina estimulam a produção de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) que por sua vez bloqueia a liberação de cálcio e a ativação da fosfolipase C (HASLAM et al., 1978). O óxido nítrico apresenta ação sinérgica às prostaciclina e atua elevando os níveis de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) intra-plaquetário (CAVALLINI et al., 1996). A enzima ATP difosfohidrolase (CD39) está presente na membrana das células endoteliais e converte o ATP e ADP extra-celular em AMP, diminuindo a estimulação sobre as plaquetas (KACZMAREK et al., 2001). A ausência de qualquer um desses mecanismos pode favorecer o processo de ativação.

Embora o processo de congelamento e descongelamento promova ativação e lise plaquetária, parte das plaquetas criopreservadas retém a atividade funcional, sugerindo efetividade terapêutica. A maioria dos estudos clínicos envolvendo a transfusão de plaquetas criopreservadas foi realizada em pacientes trombocitopênicos e em voluntários sadios. No entanto, a ausência de sangramento, o incremento plaquetário e a correção do tempo de sangramento em voluntários tratados com ácido acetilsalicílico não podem ser considerados parâmetros objetivos da eficiência transfusional (ALVING et al., 1997; VALERI et al., 2001).

Até o momento, somente o estudo de KHURI et al. (1999) comprovou, de forma objetiva, a efetividade das plaquetas criopreservadas no controle das

hemorragias. Nesse estudo randomizado, foi comparado o efeito hemostático da transfusão de concentrados de plaquetas estocados de forma convencional ou criopreservados no pós-operatório de cirurgias cardíacas. O grupo que recebeu os concentrados de plaquetas criopreservados apresentou menor incremento plaquetário pós-transfusional, não obstante ter sido observado menor volume de sangramento e consumo de hemocomponentes, sugerindo melhor eficiência hemostática.

A Tabela 1 sumariza os principais estudos, *in vivo*, com a utilização de plaquetas criopreservadas, relacionando a porcentagem de recuperação de plaquetas marcadas, o incremento plaquetário e a efetividade terapêutica baseada na prevenção e controle das hemorragias. Nesses estudos, podem ser evidenciadas diferenças nas técnicas de criopreservação e de obtenção dos concentrados de plaquetas, nos critérios de transfusão e nas populações estudadas, o que seguramente contribuiu para a grande variação nos resultados.

Os testes, *in vitro*, para a avaliação da qualidade dos concentrados de plaquetas têm por objetivo principal prever a efetividade de uma transfusão. Podem ser estudadas a morfologia plaquetária, as características bioquímicas, a secreção granular, as glicoproteínas de superfície, a formação de superfície pró-coagulante e a resposta funcional das plaquetas. As principais técnicas empregadas para a avaliação, *in vitro*, da qualidade dos concentrados de plaquetas estão relacionadas na Tabela 2.

Tabela 1. Estudos que avaliaram, *in vivo*, a utilização de concentrados de plaquetas criopreservados.

Criopreservante	Obtenção	Recuperação in vivo (%)	Incremento plaquetário (x 10 ³ /μl)	Efetividade terapêutica ^b	Estudo
DMSO 5%	Autóloga	NA ^a	NA ^a	Regular	(BUCHHOLZ et al., 1974)
DMSO 5%	Homóloga	65	NA ^a	Regular	(SCHIFFER et al., 1976a)
DMSO 5%	Autóloga	NA ^a	6,4	Bom	(SCHIFFER et al., 1976b)
DMSO 5%	Autóloga	53	13,7	Bom	(SCHIFFER et al., 1978)
DMSO 5%	Autóloga	46	13,6	Bom	(VAN IMHOFF et al., 1983)
DMSO 6%	Homóloga	50	12,9	Regular	(MELARAGNO et al., 1985)
DMSO 5%	Autóloga	38	15,2	Bom	(MULDER et al., 1989)
DMSO 5%	Autóloga	NA ^a	11	Bom	(FUNKE et al., 1995)
DMSO 5%	Autóloga	NA ^a	>7,5	Bom	(TORRETTA et al., 1998)
ThromboSol®	Autóloga	40	NA ^a	NA ^a	(CURRIE et al., 1999)
ThromboSol®	Autóloga	NA ^a	2,7	Ruim	(PEDRAZZOLI et al., 2000)

a. NA, não avaliada;

b. Efetividade terapêutica avaliada através do controle ou prevenção das hemorragias.

Nos concentrados de plaquetas armazenados à temperatura ambiente, os testes que avaliam a morfologia são os que apresentam melhor correlação com a sobrevida plaquetária *in vivo* (WILLIAMSON, 1998). A diminuição da densidade óptica do plasma rico em plaquetas e o aumento no número de plaquetas esféricas no "score" morfológico apresentam boa correlação com a redução do pH e da resposta ao estresse hipotônico, podendo ser igualmente utilizado qualquer um desses testes (HOLME e MURPHY, 1978; ARNAUD e GOODRICH, 1996).

Nos concentrados de plaquetas criopreservados, a adição e a remoção do crioprotetor remove o plasma original, o que prejudica a avaliação das características bioquímicas e do pH (BÖCK et al., 1995). Além disso, ao contrário do que ocorre com os concentrados de plaquetas armazenados à temperatura ambiente, os testes que avaliam a morfologia apresentam pouca correlação com a efetividade transfusional (ROTHWELL et al., 2000). Portanto, a avaliação dos receptores de superfície, a formação de superfície pró-coagulante e os métodos funcionais são os que fornecem resultados mais fidedignos sobre a qualidade das plaquetas criopreservadas.

Os receptores de superfície são melhor avaliados por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos marcados com fluorocromos. O teste é um método prático, sensível, de fácil preparo e boa reprodutibilidade. Utiliza pequenos volumes de amostras e exige pouca manipulação, diminuindo a ativação associada ao manuseio.

Tabela 2. Técnicas, *in vitro*, empregadas na avaliação dos concentrados de plaquetas.

	Técnicas
Morfologia	Microscopia de contraste de fase: "score" morfológico, microscopia eletrônica, "swirling", densidade óptica do plasma rico em plaquetas, volume plaquetário médio (VPM).
Bioquímica	pH, glicose, lactato, conteúdo de ADP, desidrogenase láctica.
Secreção granular	β -tromboglobulina, fator plaquetário 4 (PF4).
Receptores de superfície	Complexo GPIb (CD42), integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CD41/61), p-selectina (CD62p), granulofisina (CD63).
Superfície pró-coagulante	Anexina V, fator V.
Métodos funcionais	Absorção de serotonina, agregação plaquetária, resposta ao estresse hipotônico, potencial de resposta após estimulação, modelos <i>ex-vivo</i> de hemostasia.

A técnica por citometria pode analisar a porcentagem de expressão e/ou a intensidade média de fluorescência (IMF) do antígeno estudado, a presença de alterações conformacionais de um receptor ativado, a secreção granular, a formação da superfície pró-coagulante e de micropartículas de plaquetas (MICHELSON, 1996; SCHMITZ et al., 1998; HICKERSON e BODE, 2002). Para a obtenção de resultados

fidedignos é recomendável o estudo conjunto de uma glicoproteína de superfície e de uma proteína granular (LANDI e MARQUES, 2003)72.

Após a ativação, os anticorpos monoclonais anti-CD41 ou anti-CD61 identificam a formação de micropartículas derivadas da membrana plaquetária e a externalização do pool granular da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (ESCOLAR e WHITE, 2000). O anticorpo anti-CD42 reconhece a glicoproteína Ib do complexo GPIb-IX-V e avalia o movimento de internalização do complexo associada à ativação plaquetária (ANDREWS et al., 1999). O anticorpo anti-CD62p liga-se à p-selectina que é expressa na superfície plaquetária após a degranulação. O número de plaquetas p-selectina positivas eleva-se gradualmente durante a estocagem, sendo o marcador *in vitro* mais sensível e precoce da ativação plaquetária (KOSTELIJK et al., 1996; METCALFE et al., 1997).

A identificação da superfície pró-coagulante nas plaquetas, por meio da ligação da anexina V, foi descrita por DACHARY-PRIGENT et al. (1993). Porém, foi empregada como marcador da ativação plaquetária por GAO et al. (1999). A capacidade de ligação da anexina V eleva-se mais rapidamente após o terceiro dia de estocagem, o que a torna este teste menos sensível do que expressão da p-selectina (LAI et al., 2002). Além disso, a sua correlação com a expressão dos outros marcadores de ativação e com a sobrevivência plaquetária *in vivo* não foi ainda bem definida (SHAPIRA et al., 2000).

A agregação plaquetária é um teste funcional, *in vitro*, capaz de avaliar quantitativamente alterações qualitativas das plaquetas. O processo de agregação inclui o estímulo das vias de ativação, as alterações morfológicas, as alterações na

conformação dos receptores, o metabolismo do AA e a secreção granular (GOTO et al., 1998). O teste avalia, portanto, a integridade da resposta fisiológica das plaquetas.

Diferentes agonistas podem ser utilizados com a finalidade de avaliar as distintas vias de ativação. O ADP está naturalmente presente nos grânulos densos das plaquetas. Em contato com a membrana plaquetária, age como agonista capaz de estimular os receptores transmembrana que atuam sobre a proteína G, induzindo a agregação plaquetária pela ação da fosfolipase C sobre a FC e a FE com a conseqüente produção AA e TX A₂ (DANIEL et al., 1998).

O mecanismo de agregação plaquetária da epinefrina é semelhante ao do ADP (KOBILKA et al., 1987), sendo pouco provável que a ação inibitória da epinefrina sobre a adenilciclase, diminuindo a formação de AMP cíclico, possa contribuir para iniciar o processo de agregação (HASLAM et al., 1978).

O colágeno está presente no subendotélio vascular e é capaz de se ligar à integrina $\alpha_2\beta_1$ (CD49b/CD29) das plaquetas, produzindo estimulação potente das enzimas tirosino-quinase e fosfolipase C. Quando em concentrações elevadas, essa resposta pode ser independente da produção de AA e TX A₂ via COX-1 (DANIEL et al., 1994).

Ao contrário do ADP que precisa agir em um receptor específico para iniciar a agregação, o AA, quando utilizado como agonista, avalia diretamente a atividade da COX-1.

A agregação plaquetária pode ser considerada um método muito sensível para a avaliação dos concentrados de plaquetas, uma vez que as plaquetas com

resposta agregatória deficiente podem ser metabolicamente normais (MAEKAWA et al., 2003). Os concentrados de plaquetas estocados de forma convencional geralmente apresentam diminuição da resposta agregatória e, quando criopreservados, esta resposta diminui ainda mais (WILLIAMSON, 1998). Contudo, a associação de dois agonistas melhora a resposta agregatória dos concentrados de plaquetas criopreservados (SPECTOR et al., 1977; BALDUINI et al., 1993; TORRETTA et al., 1998). A agregação plaquetária também apresenta baixa correlação com a efetividade transfusional e com sobrevida plaquetária *in vivo* dos concentrados de plaquetas criopreservados (KHURI et al., 1999)⁵⁵.

1.3. Concentrados de Plaquetas "Secas" Obtidos por Aférese

A coleta de plaquetas por aférese tem sido de fundamental importância para atender a elevada demanda de concentrados de plaquetas imposta pelo desenvolvimento de protocolos quimioterápicos mais agressivos, transplantes de medula óssea e cirurgias de grande porte (SURGENOR et al., 1990). Além disso, a utilização desses concentrados diminui o número de doadores, o que significa menor risco infeccioso e de sensibilização por antígenos leucocitários humanos (HLA) (ROCK, 2002). No entanto, o custo da produção dos concentrados de plaquetas por aférese é elevado (NESS e CAMPBELL-LEE, 2001). Com a finalidade de otimizar o processo de coleta e reduzir custos, os equipamentos de aférese atuais permitem a coleta de múltiplos hemocomponentes em um único procedimento (VALBONESI et al., 1996). Porém, a coleta de múltiplos hemocomponentes deve estar limitada ao volume máximo de 8 ml/kg permitido em uma doação.

A obtenção dos concentrados de plaquetas em volume reduzido de plasma, como 20 a 30 ml, para posterior suspensão em meio sintético facilitou a adoção dos procedimentos de multi-coleta por alguns centros (VALBONESI et al., 1999). Esses concentrados de plaquetas foram chamados de concentrado de plaquetas "secas" e possuem vantagens adicionais, como menor sensibilização por antígenos HLA solúveis, e menor risco de reações transfusionais associadas à infusão de plasma.

Considerando-se a possibilidade de criopreservação, a obtenção de concentrados de plaquetas com volume reduzido e alta concentração plaquetária eliminaria a necessidade da centrifugação pré-congelamento para remoção do plasma excedente, diminuindo a manipulação para o preparo e, conseqüentemente, a ocorrência de ativação plaquetária. Além disso, a criopreservação de pequenos volumes reduziria o custo de armazenamento e utilizaria proporcionalmente menos DMSO, o que diminuiria a possibilidade de efeitos adversos associados ao criopreservante. Até o momento, no entanto, não foram avaliados os efeitos da coleta na forma hiperconcentrada, do armazenamento em condições de hiperconcentração e da criopreservação dos concentrados de plaquetas "secas".

Sendo assim, este estudo foi idealizado para avaliar, *in vitro*, estes efeitos, intencionando caracterizar a viabilidade do método, assim como a factibilidade quanto à sua aplicação prática para se beneficiar das suas vantagens.

2. OBJETIVOS

1- Avaliar, *in vitro*, os efeitos da hiperconcentração plaquetária na coleta e na criopreservação dos concentrados de plaquetas “secas”;

2- Comparar o efeito crioprotetor do ThromboSol® com o do DMSO 5% nos concentrados de plaquetas “secas” criopreservados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos Concentrados de Plaquetas por Aférese

Foram selecionados aleatoriamente 28 doadores voluntários de plaquetas por aférese que compareceram à Seção de Procedimentos Especializados em Hemoterapia do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas, e triados conforme as normas técnicas da portaria 1376/93 (BRASIL, 1993) e, posteriormente, da Resolução da Diretoria Colegiada nº 343 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2002). Todos os doadores assinaram um protocolo de consentimento pós-informado antes da coleta.

Para a coleta dos concentrados de plaquetas, foram utilizados o equipamento de aférese Dideco Excel (Dideco, Mirândola, Itália), o circuito de multicoleta códigos 4205 ou 4203 e programação para coleta de plaquetas e plasma. Os parâmetros do equipamento foram ajustados conforme as instruções do fabricante, considerando os valores hematimétricos do doador. Os volumes processados foram estabelecidos pelo número total de plaquetas programadas para serem coletadas, conforme a volemia, a contagem de plaquetas e tempo de coleta para cada doador. Sempre que possível, os procedimentos foram programados para coletar um total de 6×10^{11} plaquetas. A primeira metade da coleta de plaquetas foi efetuada de forma convencional. Nessa fase, também foi coletado 100 ml de plasma do doador para, posteriormente, ser utilizado na diluição das amostras e no ajuste do espectrofotômetro para realização dos testes de agregação plaquetária. A segunda metade foi coletada por ciclos, sendo o número de ciclos estabelecido pelo total de

plaquetas a serem coletadas de forma "seca". O volume final do produto foi programado para não exceder 20 ml. No momento da reinfusão, para não alterar o volume da unidade de plaquetas "secas", o conteúdo da câmara de separação contendo cerca de 30 ml de plasma foi direcionado para a unidade de concentrado de plaquetas convencionais

Após cada coleta, as duas unidades foram mantidas em repouso por cerca de uma hora e, posteriormente, colocadas sob agitação por uma a duas horas, para a dissolução dos grumos plaquetários, caracterizada por inspeção visual.

As amostras para o estudo foram obtidas em sistema fechado. Para a unidade de concentrado de plaquetas com concentração convencional, foi utilizado conector estéril de bolsas e, após a adequada homogeneização, foi transferido cerca de 15 ml para uma bolsa de transferência de 100 ml (JP Indústria Farmacêutica, Ribeirão Preto, Brasil), e a conexão foi selada.

Para a coleta das amostras das unidades de concentrado de plaquetas "secas", foi utilizado o coletor de amostra acoplado à bolsa de coleta. O volume coletado de cada bolsa foi de 3 ml.

Para a obtenção do volume das unidades de concentrado de plaquetas de concentrações convencionais, as unidades foram pesadas em balança digital antes da obtenção das amostras. Foi descontado o peso da bolsa plástica equivalente a 28 gramas, e o valor final em gramas dividido por 1,025, que consiste na correção pela densidade específica do plasma. O volume do concentrado de plaquetas "secas" foi medido em seringa graduada durante o preparo para criopreservação e somado 3 ml correspondente ao volume da amostra previamente coletada.

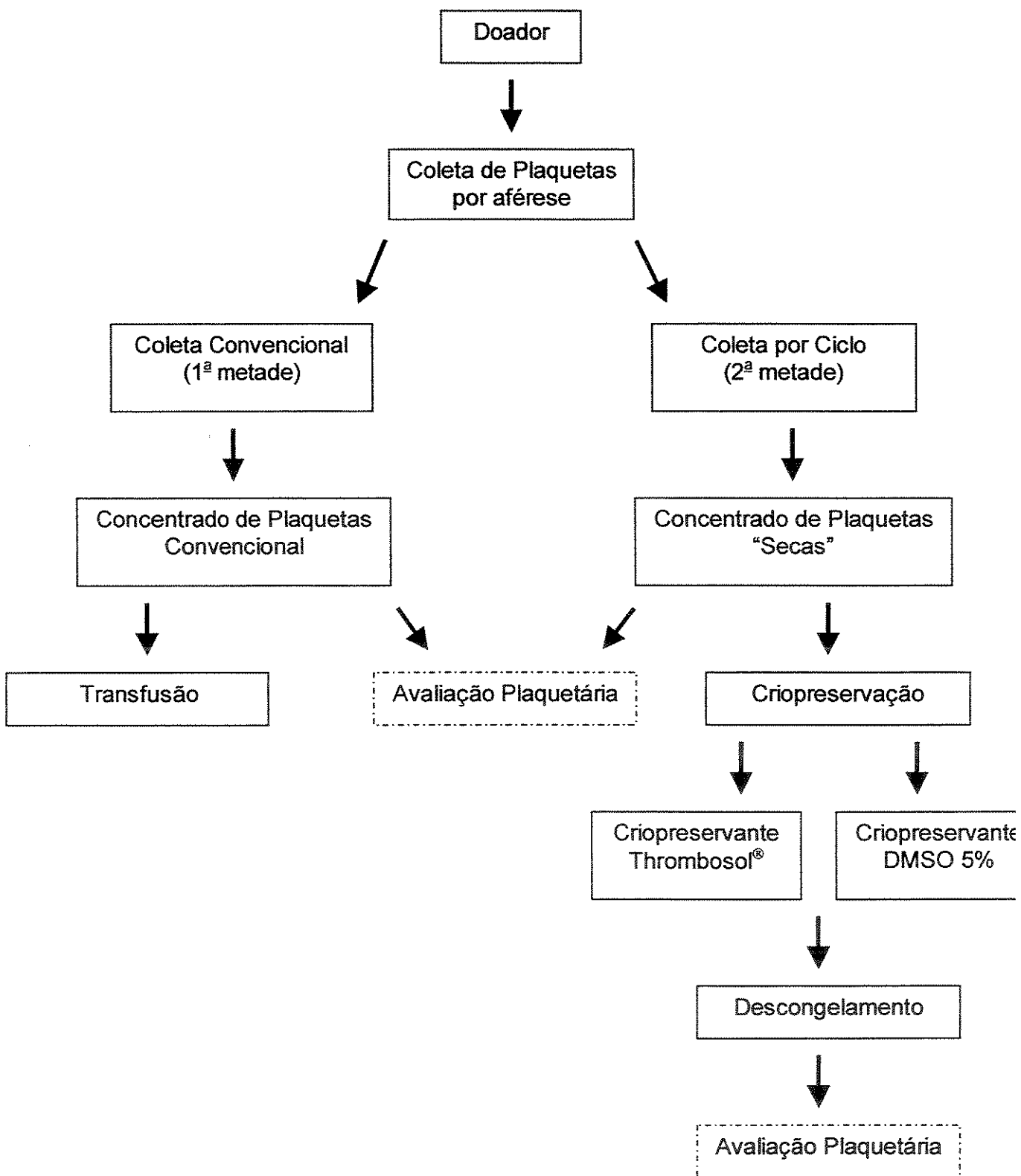


Figura 1. Esquema demonstrativo da metodologia empregada nesse estudo.

As amostras e os plasmas coletados durante os procedimentos foram encaminhadas ao laboratório para diluição e controles. Todos os testes foram realizados em até 6 horas após a coleta. O plasma excedente foi congelado a -30°C .

Os concentrados de plaquetas convencionais foram encaminhados para serem incorporados aos estoques do Hemocentro de Campinas para transfusão. As unidades de plaquetas "secas" foram encaminhadas para a criopreservação, e não foram transfundidas após o descongelamento.

3.2. Criopreservação dos Concentrados de Plaquetas

As 14 primeiras unidades de concentrado de plaquetas secas coletadas foram congeladas utilizando-se ThromboSol® (LifeCell, The Woodlands, Estados Unidos) como solução criopreservante. As outras 14 unidades foram congeladas utilizando DMSO (Edwards Lifesciences Research Medical Inc., Irvine, Estados Unidos) na concentração final de 5%.

3.2.1. Criopreservação com ThromboSol®

Em fluxo laminar, o conteúdo dos concentrados de plaquetas foi aspirado da bolsa de coleta com o auxílio de uma seringa estéril e colocado em uma bolsa própria para congelamento com capacidade para 250 ml (Baxter Helthcare Corporation, Deerfield, Estados Unidos). Para minimizar a perda de plaquetas, as bolsas de coleta foram lavadas com solução salina a 0,9%, o necessário para se obter o volume final de 39,2 ml quando adicionado ao concentrado de plaquetas. Foi adicionado 0,8 ml de ThromboSol® "em bolo" para concentração final de DMSO 2%,

amilorida 0,25 mmol/L, adenosina 0,1 mmol/L e nitroprussiato de sódio 50 uM. Estes concentrados de plaquetas, com o volume final de 40 ml, foram delicadamente homogeneizados, colocados em cassetes de alumínio e estes, em um congelador programável (Forma Scientific, Marietta, Estados Unidos). Após atingida a temperatura de -90°C, os concentrados foram transferidos para uma câmara de conservação e mantidos em fase de vapor de nitrogênio líquido (Forma Scientific, Marietta, Estados Unidos).

3.2.2. Criopreservação com DMSO a 5%

Em fluxo laminar, diluiu-se 2 ml de DMSO em 8 ml de solução salina para obtenção de uma solução de DMSO a 20%. A diluição foi mantida à temperatura ambiente, protegida da luz, até o equilíbrio térmico. O conteúdo dos concentrados de plaquetas foi aspirado da bolsa de coleta com o auxílio de uma seringa estéril graduada e colocado em bolsa própria para congelamento com capacidade para 250 ml (Baxter Helthcare Corporation, Deerfield, Estados Unidos). Para minimizar a perda de plaquetas, as bolsas de coleta foram lavadas com solução salina a 0,9%, o necessário para se obter o volume final de 30 ml quando adicionado ao concentrado de plaquetas. Essa solução foi mantida sob agitação contínua em agitador orbital 40 a 50 ciclos por minuto, enquanto a solução de DMSO a 20% era adicionada na velocidade de 1 ml por minuto.

Os concentrado de plaquetas com o volume final de 40 ml e concentração final de DMSO a 5% foram colocados em cassetes de alumínio e estes, em um congelador programável. Após atingida a temperatura de -90°C, os concentrados

foram transferidos para uma câmara de conservação e mantidos em fase de vapor de nitrogênio líquido.

3.3. Controle Microbiológico

Em fluxo laminar, foi feita a desinfecção com álcool a 70% da via de coleta de amostra das bolsas de transferência contendo amostras das unidades de concentrado de plaquetas com concentrações convencionais. Com o auxílio de seringa e agulha foram coletados 3 ml do concentrado de plaquetas e inoculados em meio de cultura para bactérias (Biomérieux, Durham, Estados Unidos). Os frascos foram mantidos em incubação a 37°C no equipamento BacTAlert (Organon Teknika Corporation Durham, Estados Unidos). Os exames foram considerados negativos quando não houve crescimento bacteriano após 7 dias de incubação. Caso contrário, a identificação do patógeno foi realizada de acordo com a metodologia convencional.

3.4. Diluição das Amostras dos Concentrados de Plaquetas para os Estudos *in vitro*

Após a homogeneização por 5 minutos, as amostras foram diluídas em plasma autólogo colhido durante o procedimento de aférese, utilizando-se tubos de polipropileno 12 x 75 mm e pipetas automáticas. As diluições iniciais foram de 1:2 para as plaquetas em concentrações convencionais e de 1:5 para as plaquetas "secas". As amostras de plaquetas em concentrações convencionais recebiam diluições sucessivas de 1:4 e 1:8, enquanto as amostras de plaquetas "secas"

recebiam diluições de 1:10 e 1:20, até se obter uma concentração inferior a $800 \times 10^3/\text{mm}^3$.

3.5. Determinação da Contagem Plaquetária e do Volume Plaquetário Médio

A contagem plaquetária e a determinação do volume plaquetário médio foram realizadas em equipamento automatizado Cell Dyn 1600 (Abbott Diagnostics Division, Mountain View, Estados Unidos).

3.6. Avaliação da Contagem de Leucócitos

Para a contagem de leucócitos em câmara de Nageotte, foi utilizado 1 ml das amostras de plaquetas em concentrações convencionais. As amostras de plaquetas "secas" foram diluídas em plasma autólogo até a obtenção de concentração equivalente à da amostra de plaqueta em concentração convencional correspondente, sendo utilizado 1 ml dessa diluição. As amostras foram mantidas sob agitação por 20 a 30 minutos para homogeneização. A técnica empregada foi descrita por MOROFF et al. (1994). Sumariamente, foi pipetado 100 μl da amostra para diluição em 400 μl de solução de Turk (150 μl de azul de metileno, 1 ml água destilada, ácido acético 1%). O material foi mantido à temperatura ambiente em repouso por 15 minutos, em seguida homogeneizado, colocado em câmara de Nageotte e incubado em câmara úmida por 15 minutos. Após a incubação foi realizada a contagem de 40 retângulos em microscópio convencional, equivalente a 50 μl dessa diluição. O número total foi calculado, considerando-se as diluições empregadas e o volume total do produto.

3.7. Determinação do pH, da Dosagem de DHL e da Glicose

As amostras de plaquetas convencionais e secas foram centrifugadas a 1500 g por 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno 12 x 75 mm para a determinação do pH (Quimis, Campinas, Brasil), dosagem da DHL e da glicose em equipamento automatizado Hitachi 917 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanha).

3.8. Avaliação dos Receptores de Membrana Plaquetária e da Formação da Superfície Pró-Coagulante por Citometria de Fluxo

Para a análise dos receptores de membrana por citometria de fluxo, as amostras de plaquetas em concentrações convencionais e plaquetas "secas" foram diluídas em plasma autólogo até se obter a concentração de 2 a $4 \times 10^5/\mu\text{l}$. A técnica empregada foi descrita por SCHMITZ et al. (1998). Sumariamente, foi pipetado $5 \mu\text{l}$ das amostras de concentrado de plaquetas em tubos de poliestireno 12 x 75 mm e adicionado $200 \mu\text{l}$ de paraformaldeído a 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha) diluído em tampão fosfato (PBS) 0,1M. Os tubos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 2 ml de PBS 0,1M, e os tubos centrifugados a 1500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e foi adicionado $45 \mu\text{l}$ de PBS 0,1M e $5 \mu\text{l}$ dos anticorpos monoclonais conjugados CD41 FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, Estados Unidos), CD42b FITC (PharMingen, San Diego, Estados Unidos), CD62p FITC (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Estados Unidos) e controle isotópico FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, Estados Unidos). Os tubos foram incubados por 15 a 20 minutos no

escuro à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 2 ml de PBS 0,1M, os tubos centrifugado a 1500 g por 10 minutos, e o sobrenadante removido. Foi adicionado 1 ml de PBS 0,1 M e a leitura feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Estados Unidos). As plaquetas foram identificadas conforme o tamanho e a complexidade, em escala logarítmica, avaliando 10000 eventos. A fluorescência das plaquetas marcadas foi analisada pelo programa Cell Quest para a obtenção da porcentagem de plaquetas positivas e da IMF.

A formação da superfície pró-coagulante foi avaliada por meio da ligação da anexina V. Em dois tubos de poliestireno 12 x 75 mm, foi adicionado 5 μ l das amostras de concentrado de plaquetas em concentrações convencionais e "secas" e adicionado 2 ml de PBS 0,1M. Os tubos foram centrifugados a 1500 g por 10 minutos, removido o sobrenadante, pipetado 1 ml de PBS 0,1M e homogeneizado. Para cada amostra, foi adicionado 100 μ l da solução de plaquetas em PBS 0,1M em dois tubos de poliestireno 12 x 75 mm. Em um dos tubos foi adicionado 5 μ l de anexina V (PharMingen, San Diego, Estados Unidos). Os tubos foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro e, após esse período, foi adicionado 400 μ l do tampão Hepes 0,1M, pH 7,4 (25 mM CaCl_2) em ambos os tubos e procedida imediatamente a leitura em citômetro de fluxo, conforme anteriormente descrita.

3.9. Teste de Agregação Plaquetária

Para a realização da agregação plaquetária, as amostras de plaquetas convencionais e plaquetas "secas" foram diluídas em plasma autólogo até a concentração de 2 a $4 \times 10^5/\mu\text{l}$. A técnica empregada foi descrita por WHITE e JENNING (1999). Sumariamente, o agregômetro Packs 4 (Helena Laboratories, Beaumont, Estados Unidos) foi ligado 20 minutos antes do início dos ensaios para atingir a temperatura de 37°C , e os canais calibrados, por meio da leitura da densidade óptica da água destilada em uma microcuveta contendo uma barra magnética agitadora. Utilizando-se uma outra microcuveta, foi feita a leitura da densidade óptica do plasma correspondente à amostra a ser testada.

Foi pipetado $450 \mu\text{l}$ de cada amostra de plaquetas convencionais ou de plaquetas "secas" em 4 microcuvetas contendo uma barra magnética agitadora. Os tubos foram mantidos à 37°C e colocados nos canais de leitura previamente calibrados. Nos respectivos tubos, foi pipetado $50 \mu\text{l}$ de ADP $100 \mu\text{mol/l}$ (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) para concentração final de $10 \mu\text{mol/l}$, $50 \mu\text{l}$ de colágeno $100\mu\text{g/ml}$ (Helena Laboratories, Beaumont, Estados Unidos) para concentração final de $10 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{l}$ de epinefrina $100 \mu\text{mol/l}$ (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) para concentração final de $10 \mu\text{mol/l}$ e $50 \mu\text{l}$ de ácido aracdônico $5000 \mu\text{g/ml}$ (Helena Laboratories, Beaumont, Estados Unidos) para concentração final de $500 \mu\text{g/ml}$.

Após a pipetagem, o cronômetro foi acionado, e a densidade óptica do plasma rico em plaquetas registrada por 10 minutos. A diferença entre a densidade óptica do plasma rico em plaquetas e o ponto de menor densidade óptica durante a agregação foi registrada como a porcentagem máxima de agregação.

Para a agregação com a associação de agonistas, foi pipetado 400 μ l da amostra dos concentrado de plaquetas "secas" criopreservados em 2 microcuvetas contendo uma barra magnética agitadora e adicionado 50 μ l de ADP 100 μ mol/l e 50 μ l de epinefrina 100 μ mol/l em uma microcuveta e 50 μ l de colágeno 100 μ g/ml e 50 μ l de epinefrina 100 μ mol/l em outra microcuveta. O cronômetro foi acionado e a leitura realizada conforme anteriormente descrito.

Os resultados de agregação obtidos com amostras de plaquetas de voluntários sadios no mesmo dia da realização de cada teste foram utilizados como controle das reações. Os resultados de hipoagregação ou hiperagregação foram repetidos para confirmação.

3.10. Descongelamento dos Concentrados de Plaquetas

Os concentrados de plaquetas criopreservados foram descongelados juntamente com a amostra de plasma fresco correspondente, pela simples imersão em banho-maria a 37°C, e mantidos à temperatura ambiente.

Foram colhidas amostras dos concentrados de plaquetas para controle microbiológico, conforme a técnica anteriormente descrita.

Para a dosagem de DHL e glicose, foram colocados 3 ml do concentrado de plaquetas descongeladas em um tubo de polipropileno 12 x 75 mm, centrifugado a 1500 g por 20 minutos, e o sobrenadante enviado para análise, conforme anteriormente descrito. A contagem plaquetária foi realizada em diluições da amostra em plasma autólogo, conforme anteriormente descrito.

Para a realização dos ensaios funcionais de citometria e agregação plaquetária, as amostras foram lavadas em plasma autólogo para a remoção do DMSO. Em dois tubos de polipropileno 12 x 75 mm foi pipetado 2 ml do concentrado de plaquetas descongeladas e lentamente adicionado 2 ml do plasma autólogo. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 950 g por 20 minutos. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta, e as plaquetas foram ressuspensas em 2 ml do plasma autólogo. As amostras foram mantidas sob agitação por uma hora para a homogeneização adequada e em seguida diluídas em plasma autólogo para obtenção de concentrações entre 2 a $4 \times 10^5/\mu\text{l}$.

3.11. Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa S-Plus 2000 (MathSoft, Seattle, Estados Unidos) e o teste de Wilcoxon pareado para a comparação entre os concentrados de plaquetas em concentrações convencionais e "secas", os concentrados de plaquetas "secas" e criopreservados, os concentrado de plaquetas "secas" do grupo ThromboSol® e criopreservados do grupo ThromboSol® e os concentrado de plaquetas "secas" do grupo DMSO e criopreservados do grupo DMSO. O teste de Wilcoxon não pareado foi utilizado para comparação entre os concentrado de plaquetas "secas" do grupo ThromboSol® e do grupo DMSO e entre os concentrados de plaquetas criopreservados do grupo ThromboSol® e do grupo DMSO. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Coleta dos Concentrados de Plaquetas e Comparação entre os Concentrados de Plaquetas Convencionais e "Secas" por Aférese

Dos 28 doadores voluntários selecionados, 68% foram do sexo masculino e 32% do sexo feminino. Em valores expressos em mediana (variação), estes doadores apresentavam volemia de 4876 ml (3072 - 6607), hematócrito de 42,5% (33 - 51) e contagem de plaquetas de $277 \times 10^3 /\text{mm}^3$ (166 - 442).

A mediana do tempo de processamento para a coleta dos concentrados de plaquetas foi de 75 minutos (55 - 91), do volume total processado 4327 ml (3024 - 5760), da contagem de plaquetas pós-doação $180 \times 10^3 /\text{mm}^3$ (114 - 313) e do número total de plaquetas coletadas por procedimento $4,0 \times 10^{11}$ (2,0 - 7,0).

Para a coleta dos concentrados de plaquetas convencionais por aférese, foram processados 2420 ml (1737 - 3048), coletadas $2,42 \times 10^{11}$ (1,0 - 4,5) plaquetas/unidade, ou seja, 1×10^{11} (0,43 - 1,5) plaquetas/litro de volume processado. Para a coleta dos concentrados de plaquetas "secas", foram processados 2077 ml (1287 - 3000 ml), coletadas $1,9 \times 10^{11}$ (0,6 - 3,1) plaquetas/unidade, ou seja, $0,9 \times 10^{11}$ (0,3 - 1,8) plaquetas/litro de volume processado.

A mediana do volume dos concentrados de plaquetas convencionais por aférese foi de 247 ml (203 - 301), e a concentração plaquetária de $950 \times 10^3 /\text{mm}^3$ (410 - 1728), enquanto os concentrados de plaquetas "secas" apresentaram,

respectivamente, 17,5 ml (12 - 27) e $10580 \times 10^3 / \text{mm}^3$ (2505 - 17380). Os resultados das coletas convencional e por ciclo estão sumarizados na Tabela 3.

À inspeção visual, houve maior formação de grumos plaquetários nos concentrados de plaquetas "secas". Porém, não houve maior dificuldade na homogeneização e na dissolução desses grumos.

Tabela 3. Parâmetros de coleta dos concentrados e plaquetas convencionais e "secas" por aférese.

	Coleta convencional	Coleta por ciclo
	1ª parte	2ª parte
Volume processado (ml)	2420	2077
Nº de plaquetas/litro processado	1×10^{11}	$0,9 \times 10^{11}$
Concentração plaquetária ($\times 10^3 / \text{mm}^3$)	950	10580
Volume final dos concentrados (ml)	247	17,5

Não foram observadas diferenças significativas entre o número de leucócitos presentes nos concentrados de plaquetas convencionais e "secas" por aférese. Em ambos os grupos, a mediana foi inferior a $0,01 \times 10^6$ por unidade. Por motivos técnicos, não foi realizada a contagem de leucócitos no concentrado de plaquetas Nº 1 e, apenas o concentrado de plaquetas convencional Nº 10 contendo $1,02 \times 10^6$ leucócitos, apresentou mais do que 1×10^6 leucócitos por unidade.

Não houve crescimento bacteriano em nenhuma das culturas realizadas antes da criopreservação.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as medianas do VPM dos concentrados de plaquetas convencionais e "secas", o que não ocorreu com as medianas do pH, da DHL e da glicose. Os resultados obtidos estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros morfológicos e bioquímicos dos concentrados de plaquetas convencionais e "secas" por aférese.

	Plaquetas Convencionais	Plaquetas "Secas"	p
pH	7,34 (7,0 - 7,5)	7,02 (6,4 - 7,5)	<0,001
VPM (fl)	6,7 (5,9 - 9,5)	6,8 (5,8 - 8,8)	0,28
DHL (U/l)	277 (294 - 461)	703 (441 - 906)	<0,001
Glicose (mg/dl)	276 (235 - 433)	238 (235 - 433)	<0,001

A porcentagem de plaquetas positivas e a intensidade média de fluorescência dos anticorpos monoclonais anti-CD41 e anti-CD42b nos concentrados de plaquetas convencionais e "secas" por aférese não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Também não houve diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de ligação da anexina V. Em contrapartida, a porcentagem de

plaquetas positivas para o antígeno CD62p foi significativamente maior nos concentrados de plaquetas "secas". A mediana dos resultados de obtidos estão sumarizados Tabela 5. A ilustração da identificação por citometria de fluxo da ligação da anexina V e da expressão dos antígenos CD41, CD62p e CD42b nas plaquetas convencionais e "secas" por aférese pode ser visualizada nas Figuras 2 e 3.

Quando utilizados o ADP ou a epinefrina como agonistas, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de agregação entre os concentrados de plaquetas convencionais e "secas" por aférese. Porém, quando utilizado o colágeno ou o ácido aracdônico o mesmo não foi evidenciado. As medianas dos resultados obtidos com os testes de agregação plaquetária estão discriminados na Tabela 6.

As amostras dos concentrados de plaquetas convencionais e "secas" por aférese do doador Nº 2 apresentaram, respectivamente, 5,5% e 0% de agregação com ADP e 3,2% e 2,7% de agregação com epinefrina. Estes resultados foram confirmados em amostra de plasma rico em plaquetas colhida do mesmo doador em outra ocasião. Não foi evidenciada qualquer outra anomalia nesta amostra, e os resultados da agregação com ADP e epinefrina foram excluídos da análise estatística.

Tabela 5. Expressão dos receptores da membrana plaquetária e da formação da superfície pró-coagulante nos concentrados de plaquetas convencionais e "secas" por aférese.

Antígenos	Plaquetas		Plaquetas		p
	Convencionais		"Secas"		
	%	IMF ^a	%	IMF ^a	
CD41	97,9 (89,9 - 99,3)	266,5 (151,5 - 441,2)	98,0 (93,9 - 99)	270,5 (145,6 - 458,3)	0,55
CD42	97,7 (91,6 - 99,3)	119,2 (49,9 - 195,2)	97,3 (94,1 - 99,3)	117,8 (61,8 a 210,9)	0,11
CD62	15 (7 - 30,9)	29,5 (16 - 38)	19,8 (7 - 37,3)	31,5 (16,2 - 42,8)	<0,001
Anexina V	34,1 (13,4 a 70,1)		30,9 (7,1 a 73,1)		0,22

a. IMF, intensidade média de fluorescência.

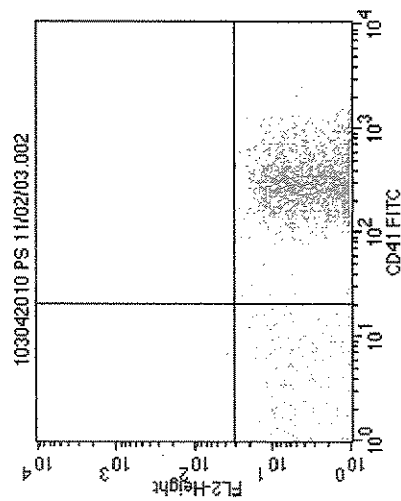
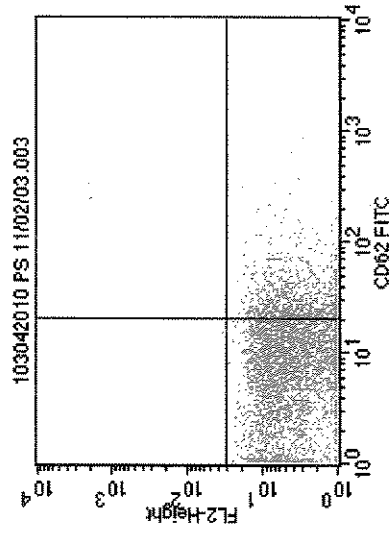
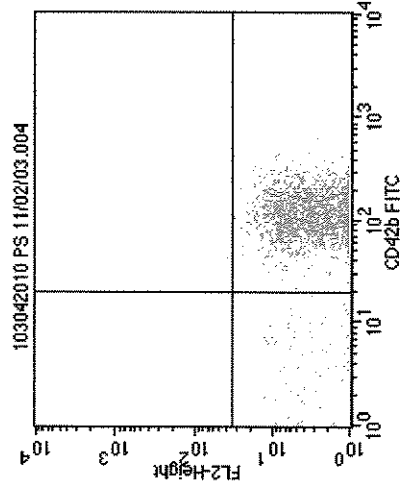
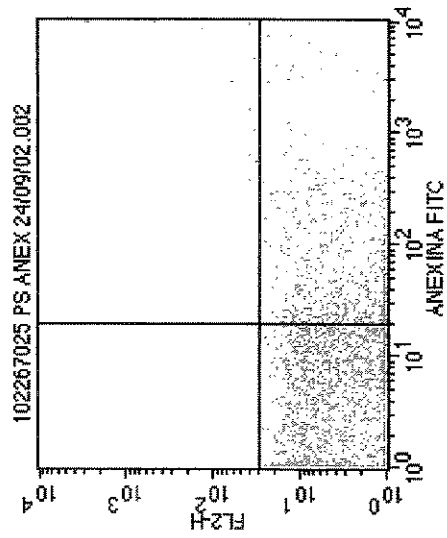


Figura 2. Ilustração da identificação por citometria de fluxo da ligação da anexina V e da expressão dos antígenos CD41, CD62p e CD42b nas plaquetas "secas".

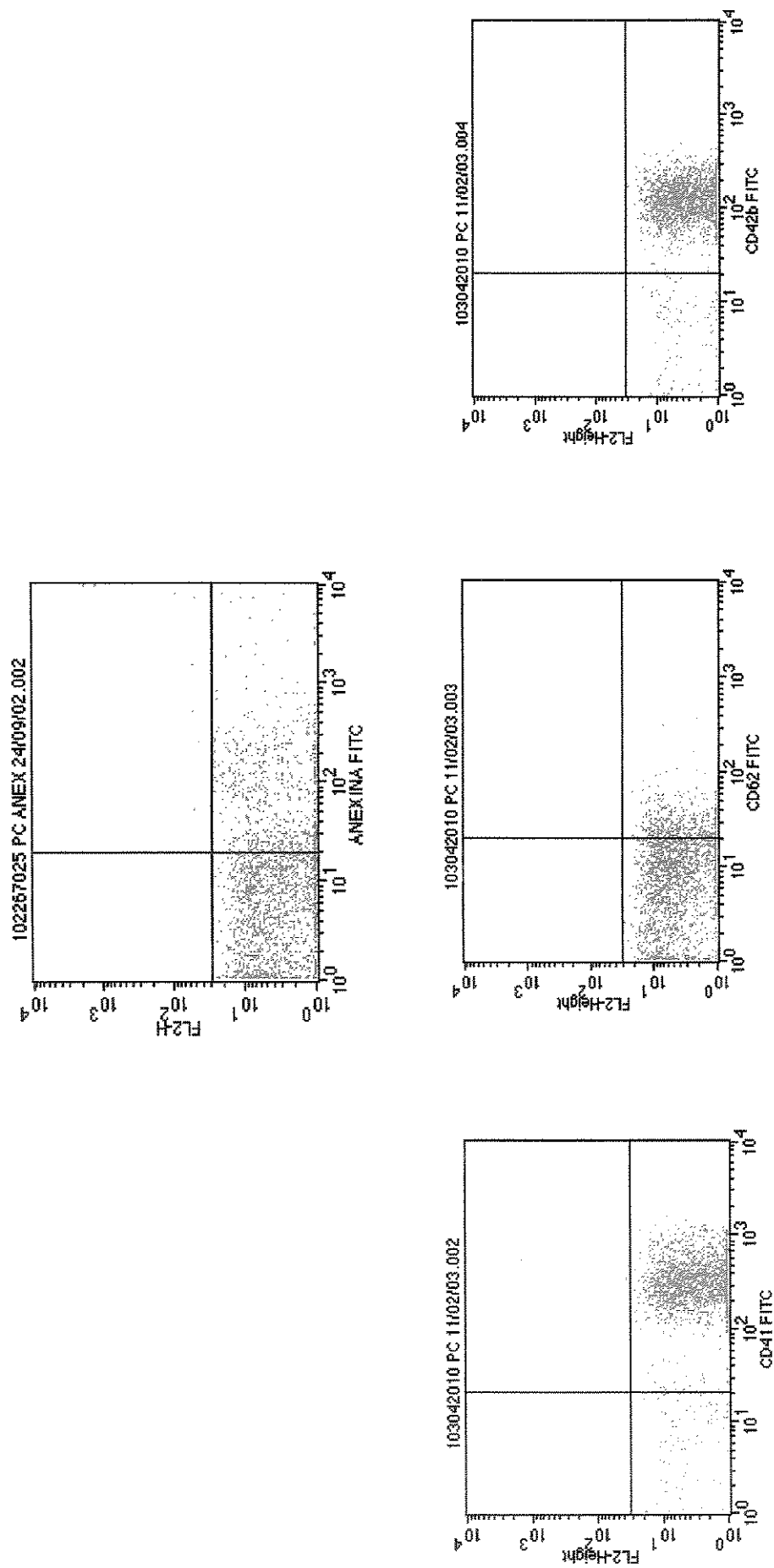


Figura 3. Ilustração da identificação por citometria de fluxo da ligação da anexina V e da expressão dos antígenos CD41, CD62p e CD42b nas plaquetas convencionais por aférese.

Tabela 6. Porcentagem de agregação dos concentrados de plaquetas convencionais e "secas" por aférese.

Agonistas	Agregação (%)		p
	Plaquetas	Plaquetas	
	Convencionais	"Secas"	
ADP 10 $\mu\text{mol/l}$	99,3 (44,5 - 118)	76 (21,4 - 110)	<0,001
Epinefrina 10 $\mu\text{mol/l}$	102 (2,3 - 143)	26,8 (2,7 - 138,2)	<0,001
Colágeno 10 $\mu\text{g/ml}$	109,1 (89,5 - 157,3)	110 (62,7 - 144,5)	0,7
Ácido aracdônico 500 $\mu\text{g/ml}$	107,3 (90 - 150,1)	105 (7,7 - 143,2)	0,09

4.2. Criopreservação e Comparação entre os Concentrados de Plaquetas

"Secas" Pré-Congelamento e Criopreservados.

A mediana do período de congelamento dos concentrados de plaquetas "secas" e das unidades de plasma fresco correspondentes foi de 154 dias (45 - 245 dias).

O controle microbiológico dos concentrados de plaquetas criopreservados evidenciou crescimento de uma amostra de *Staphylococcus aureus* na unidade Nº 19.

Os concentrados de plaquetas criopreservados apresentaram significativo aumento do VPM e da dosagem da DHL quando comparados aos resultados pré-congelamento. Comparando-se os concentrados de plaquetas "secas" pré-congelamento e criopreservados, foram observadas diferenças estatisticamente

significativas na porcentagem de plaquetas positivas para os antígenos CD41, CD42b, CD62p, para a ligação da anexina V e para a IMF dos antígenos CD41 e CD62p. A IMF do antígeno CD42 não apresentou diferença estatisticamente significativa. Estes resultados podem ser observados na Tabela 7. A ilustração da identificação por citometria de fluxo da ligação da anexina V e da expressão dos antígenos CD41, CD62p e CD42b nas plaquetas criopreservadas pode ser visualizada na Figura 4.

Tabela 7. Mediana da contagem plaquetária, dos parâmetros morfológicos e bioquímicos, da expressão dos receptores de superfície da membrana plaquetária e da formação da superfície pró-coagulante dos concentrados de plaquetas "secas" pré-congelamento e criopreservados.

	Plaquetas "secas" pré-congelamento	Plaquetas "secas" criopreservadas	p
Plaquetas ($\times 10^{11}/U$)	1,93 (0,6 - 3,1)	1,34 (0,54 - 2,46)	<0,001
VPM	6,8 (5,8 - 8,8)	9,1 (7,5 - 12,9)	<0,001
DHL (U/l)	703 (441 - 906)	3453 (964 - 14886)	<0,001
CD41 (%)	98,0 (93,9 - 99)	93,3 (87,2 - 98,1)	<0,001
CD41 (IMF)	270,5 (145,6 - 458,3)	560,5 (196,1 - 736,8)	<0,001
CD42 (%)	97,3 (94,1 - 99,3)	68 (40,2 - 83,6)	<0,001
CD42 (IMF)	117,8 (61,8 a 210,9)	121,5 (32,2 - 255,2)	0,72
CD62 (%)	19,8 (7 - 37,3)	60 (42 - 75,2)	<0,001
CD62 (IMF)	31,5 (16,2 - 42,8)	44,6 (25,9 - 65,6)	<0,001
Anexina V	30,9 (7,1 a 73,1)	70,7 (51,2 - 85,2)	<0,001

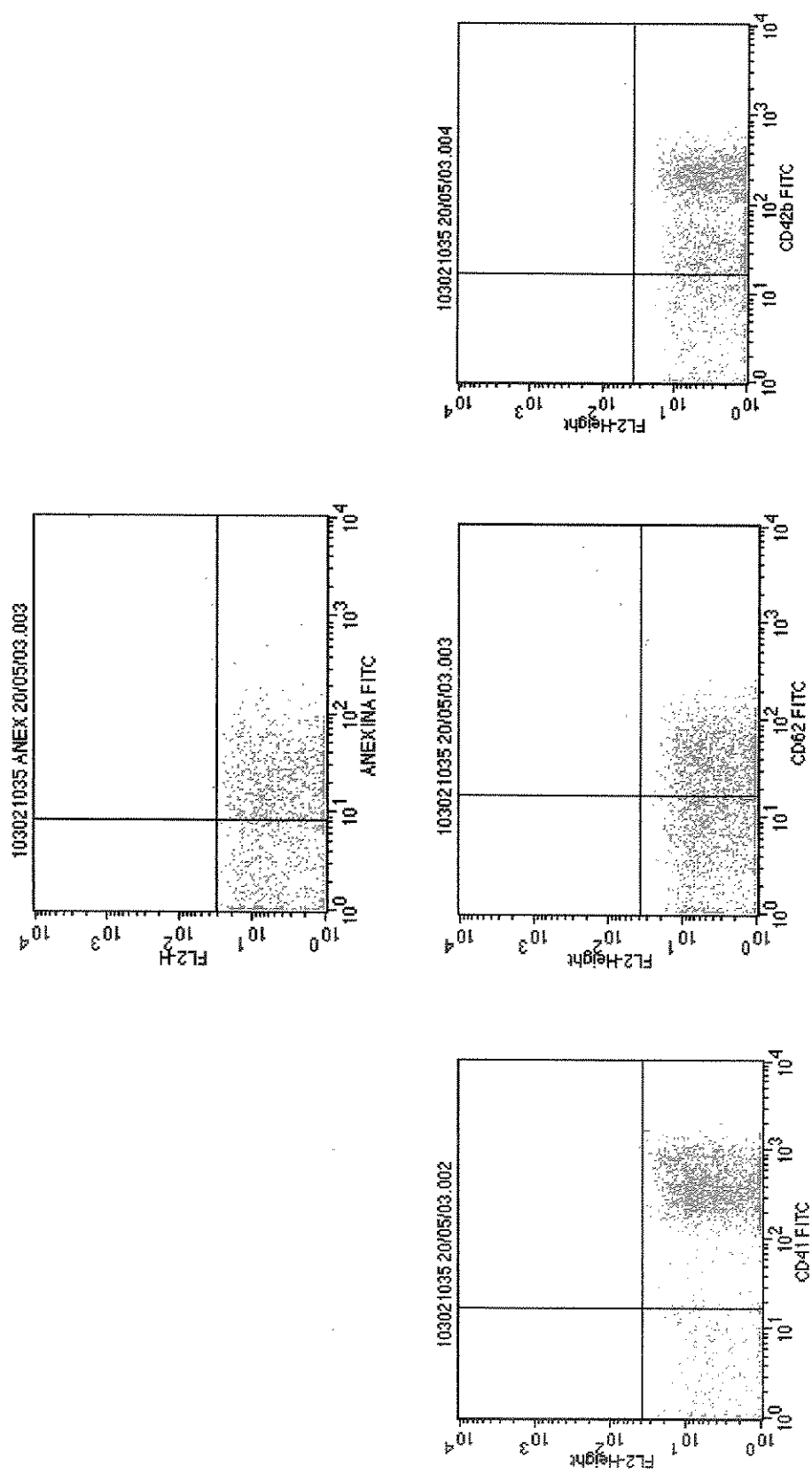


Figura 4. Ilustração da identificação por citometria de fluxo da ligação da anexina V e da expressão dos antígenos CD41, CD62p e CD42b nas plaquetas criopreservadas.

Comparando-se a porcentagem de agregação com ADP, com epinefrina, com colágeno e com ácido aracdônico dos concentrados de plaquetas "secas" pré-congelamento com os criopreservados, foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas para todos os agonistas. A associação dos agonistas ADP/epinefrina e ADP/colágeno aumentou a porcentagem de agregação em comparação com a avaliação isolada dos mesmos. As medianas destes resultados estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Porcentagem de agregação dos concentrados de plaquetas "secas" pré-congelamento e criopreservados e análise da associação de agonistas.

Agonistas	Agregação (%)		P
	Plaquetas "secas" pré-congelamento	Plaquetas "secas" Criopreservadas	
ADP	76 (21,4 - 110)	16,1 (2,3 - 34,1)	< 0,001
Epinefrina	26,8 (2,7 - 138,2)	21,6 (0 - 47,3)	0,04
Colágeno	110 (62,7 - 144,5)	60 (10 - 88,6)	< 0,001
Ác. Aracdônico	105 (7,7 - 143,2)	22,5 (4,5 - 69,1)	< 0,001
ADP e Epinefrina	NR ^a	48,6 (6,4 - 79,5)	NA ^b
ADP e Colágeno	NR ^a	77,3 (11,4 - 132,7)	NA ^b

a. NR, não realizado;

b. NA, não avaliado.

4.3. Comparação entre os Concentrados de Plaquetas "Secas"

Criopreservados com ThromboSol® e aqueles criopreservados com DMSO 5%.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre grupo criopreservado com ThromboSol® e aquele criopreservado com DMSO 5%, pré-congelamento, com relação à concentração plaquetária, ao pH, ao VPM, ao conteúdo de glicose e de DHL. A porcentagem de expressão dos antígenos CD41, CD42b, CD62p e da ligação anexina V também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. No entanto, a IMF para os antígenos CD41, CD42b, CD62p foi significativamente maior no grupo criopreservado com ThromboSol®. Ainda considerando os valores pré-congelamento, a porcentagem de agregação com ADP foi significativamente menor no grupo criopreservado com ThromboSol®, enquanto a porcentagem de agregação com colágeno foi significativamente maior. A agregação com ácido aracdônico foi maior no grupo criopreservado com ThromboSol®, porém não estatisticamente significativo. Os resultados pré-congelamento obtidos com cada grupo e a comparação entre eles podem ser visualizados na Tabela 9.

A perda plaquetária associada à criopreservação com ThromboSol® e com DMSO 5% foi de 19% para ambos os grupos.

No grupo criopreservado com DMSO 5%, todos os parâmetros avaliados pré-congelamento e pós-congelamento apresentaram diferenças estatisticamente significativas, exceto a porcentagem de agregação com epinefrina. No grupo criopreservado com ThromboSol®, todos os parâmetros estudados apresentaram

diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados podem ser observados nas Tabelas 10 e 11.

A comparação entre os concentrados de plaquetas criopreservados com ThromboSol® e os com DMSO 5% evidenciou diferenças estatisticamente significativas para os níveis de DHL, porcentagem de plaquetas positivas e IMF do antígeno CD42, e porcentagem de ligação da anexina V. A porcentagem de agregação com colágeno foi significativamente menor no grupo criopreservado com ThromboSol®. A porcentagem de agregação com ácido aracdônico e com a associação de ADP e epinefrina também foi menor no grupo criopreservado com ThromboSol®, porém não estatisticamente significativo. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 12.

Tabela 9. Comparação, pré-congelamento, entre os concentrados de plaquetas "secas" criopreservados com ThromboSol® e aqueles criopreservados com DMSO 5%.

	Plaquetas "secas"		p
	Grupo ThromboSol®	Grupo DMSO 5%	
Plaquetas x10 ¹¹ /U	2 (0,9 - 3,1)	1,25 (0,6 -2,2)	-
Plaquetas x10 ³ /μl	11470 (5280 - 17380)	8840 (2505 - 12820)	0,15
pH	7 (6,4 -7,6)	7 (6,7 -7,5)	1
VPM (fl)	6,9 (5,9 - 7,9)	6,55 (5,8 - 8,8)	0,4
DHL (U/l)	886,5 (426 - 1518)	679,5 (433 - 1918)	0,7
Glicose (g/dl)	246 (191 - 454)	231 (159 - 366)	0,08
CD41 (%)	97,6 (95,3 - 99)	98,2 (94 -99)	0,9
CD41 (IMF)	297,1(145,6 - 458,3)	233,68 (159,3 - 304)	0,01
CD42b (%)	97,3 (94,2 - 98,6)	96,8 (95,9 - 99,3)	0,9
CD42b (IMF)	140,5 (61,8 - 211)	89,4 (62,7 - 177,8)	0,03
CD62p (%)	18,9 (7 -37,3)	19,9 (10,4 - 36,2)	0,6
CD62p (IMF)	34 (21,1 - 42,8)	25,4 (16,3 - 34)	0,003
Anexina V (%)	29,1 (11 - 43)	34,1 (7 - 73)	0,1
ADP (%)	41,4 (21,4 - 110)	88,7 (39,1 - 106,4)	0,003
Epinefrina (%)	40,5 (6,8 -138,2)	15,5 (6,4 - 114,5)	0,2
Colágeno (%)	113,2 (103,2 - 144,5)	105,9 (62,7 - 118,2)	0,01
Ácido aracdônico (%)	113,2 (78,2 - 143,2)	100,9 (7,7 - 135,9)	0,05

Tabela 10. Análise pré e pós-congelamento dos concentrados de plaquetas "secas" criopreservados com ThromboSol®.

	Plaquetas "secas"	Criopreservação	p
	Grupo ThromboSol	Grupo ThromboSol®	
Plaquetas ($\times 10^{11}/U$)	2 (0,9 - 3,1)	1,55 (1 - 2,5)	0,002
VPM	6,9 (5,9 - 7,9)	8,9 (7,5 - 11,3)	0,001
DHL (U/l)	886,5 (426 - 1518)	7175 (1197 - 14886)	< 0,001
CD41 (%)	97,6 (95,3 - 99)	93,1 (87,2 - 97,3)	< 0,001
CD41 (IMF)	297,1 (145 - 458)	571 (196,1 - 736,8)	< 0,001
CD42b (%)	97,3 (94,2 - 98,6)	61,6 (40,2 - 77,1)	< 0,001
CD42b (IMF)	140 (61 - 210)	99,9 (32,2 a 130,7)	0,002
CD62p (%)	18,9 (7 - 37,3)	63,5 (42,5 - 75,2)	< 0,001
CD62p (IMF)	34,8 (21,1 - 42,8)	46,8 (32,3 - 65,9)	< 0,001
Anexina V (%)	29,1 (11 - 43)	73,5 (51,2 - 85,2)	< 0,001
ADP (%)	41,4 (21,4 - 110)	15,9 (3,2 - 34,1)	< 0,001
Epinefrina (%)	40,5 (6,8 - 138,2)	23,6 (0 - 34,1)	< 0,001
Colágeno (%)	113,2 (103,2 - 144,5)	40,9 (10 - 71,8)	< 0,001
Ácido aracdônico (%)	113,2 (78,2 - 143,2)	17,7 (6,4 - 33,2)	< 0,001

Tabela 11. Análise pré e pós-congelamento dos concentrados de plaquetas "secas" criopreservados com DMSO 5%.

	Plaquetas "secas"	Criopreservação	p
	Grupo DMSO 5%	DMSO 5%	
Plaquetas ($\times 10^{11}/U$)	1,4 (0,6 - 2,2)	1,1 (0,54 - 1,65)	0,002
VPM	6,55 (5,8 - 8,8)	9,6 (7,7 - 12,9)	0,002
DHL (U/l)	679,5 (433 - 1918)	2018 (964 - 5192)	<0,001
CD41 (%)	98,2 (94 - 99)	93,5 (92 - 98,1)	0,002
CD41 (IMF)	233,7 (159,4 - 304)	521,1 (201 - 726,8)	<0,001
CD42b (%)	96,8 (95,9 - 99,3)	77 (53,8 - 83,6)	<0,001
CD42b (IMF)	89,4 (62,7 - 177,8)	142 (58 - 255,2)	0,04
CD62p (%)	19,9 (10,4 - 36,2)	59,1 (42 - 70)	<0,001
CD62p (IMF)	25,38 (16,2 - 34)	43,2 (25,9 - 50,3)	<0,001
Anexina V (%)	34,1 (7 - 73)	62,9 (54,3 - 78,2)	<0,001
ADP (%)	88,7 (39,1 - 106,4)	17,3 (2,3 - 23,2)	0,002
Epinefrina (%)	15,5 (6,4 - 114,5)	20,5 (2,7 - 47,3)	0,64
Colágeno (%)	105,9 (62,7 - 118,2)	65,9 (38,6 - 88,6)	<0,001
Ácido aracdônico (%)	100,9 (7,7 - 135,9)	34,1 (4,5 - 69,1)	0,002

Tabela 12. Criopreservação com ThromboSol® versus criopreservação com DMSO 5%.

	Criopreservação ThromboSol®	Criopreservação DMSO 5%	p
Plaquetas (x10 ¹¹ /U)	1,55 (1 - 2,5)	1,1 (0,54 - 1,65)	-
VPM	8,9 (7,5 - 11,3)	9,6 (7,7 - 12,9)	0,09
DHL (U/I)	7175 (1197 - 14886)	2018 (964 - 5192)	<0,001
CD41 (%)	93,1 (87,2 - 97,3)	93,5 (92 - 98,1)	0,28
CD41 (IMF)	571 (196,1 - 736,8)	521,1 (201 - 726,8)	0,48
CD42b (%)	61,6 (40,2 - 77,1)	77 (53,8 - 83,6)	0,01
CD42b (IMF)	99,9 (32,2 a 130,7)	142 (58 - 255,2)	0,004
CD62p (%)	63,5 (42,5 - 75,2)	59,1 (42 - 70)	0,12
CD62p (IMF)	46,8 (32,3 - 65,9)	43,2 (25,9 - 50,3)	0,08
Anexina V (%)	73,5 (51,2 - 85,2)	62,9 (54,3 - 78,2)	0,005
ADP (%)	15,9 (3,2 - 34,1)	17,3 (2,3 - 23,2)	1
Epinefrina (%)	23,6 (0 - 34,1)	20,5 (2,7 - 47,3)	0,68
Colágeno (%)	40,9 (10 - 71,8)	65,9 (38,6 - 88,6)	0,005
Ácido aracdônico (%)	17,7 (6,4 - 33,2)	34,1 (4,5 - 69,1)	0,06
ADP/Epinefrina (%)	43,2 (6,4 - 68,6)	58,3 (10,5 - 79,5)	0,06
ADP/Colágeno (%)	70,9 (11,4 - 132,7)	77,8 (61,8 - 100,5)	0,4

5. DISCUSSÃO

Quando avaliado o número de plaquetas coletadas por litro de volemia processada, a coleta dos concentrados de plaquetas "secas", realizada por ciclo, apresentou rendimento semelhante ao observado na coleta convencional ($0,9 \times 10^{11}$ *versus* $1,0 \times 10^{11}$). Para não alterar o volume dos concentrados de plaquetas "secas", o conteúdo do cinto de separação foi direcionado para a bolsa do concentrado de plaquetas com concentração convencional durante a fase de reinfusão, o que pode ter contribuído para a pequena diferença observada.

Houve, propositalmente, maior processamento e coleta na forma convencional, porque estes concentrados seriam destinados à transfusão e deviam obedecer aos padrões de qualidade exigidos pela instituição.

A mediana do volume dos concentrados de plaquetas "secas" foi inferior a 20 ml, e a concentração foi, em média, 10 vezes superior à observada nos concentrados de plaquetas convencionais, obedecendo a proposta inicial desse estudo.

A coleta por ciclos não prejudicou a leucorredução. Com exceção do concentrado de plaquetas Nº 10, todos os demais continham menos do que 10^6 leucócitos por unidade. A leucorredução provavelmente não influenciou os resultados do presente estudo, uma vez que ela não altera a porcentagem de recuperação plaquetária após o congelamento e descongelamento (VALERI et al., 2003).

Como os controles microbiológicos foram negativos pré-congelamento, o isolamento de uma amostra de *Staphylococcus aureus* no concentrado de plaquetas Nº 19, após a criopreservação, pode exemplificar o risco de contaminação associado à abertura do sistema para a introdução do criopreservante. Em contrapartida, após a infusão do DMSO, os concentrados de plaquetas são rapidamente criopreservados, o que reduz a possibilidade de proliferação bacteriana (SNYDER e CHAMPNESS, 1997). A contaminação pôde também ter ocorrido no momento da coleta da amostra para a cultura, já que as bolsas de criopreservação não previam um local para adequada desinfecção e coleta da amostra, exigindo maior manipulação.

O processo de congelamento e descongelamento, e não o tempo de criopreservação, está implicado no aparecimento de lesões plaquetárias. DALY et al. (1979) estocou concentrados de plaquetas em fase de vapor de nitrogênio líquido e observou que o armazenamento por até três anos não aumentou a perda plaquetária. MELARAGNO et al. (1985) e VALERI et al. (2003) observaram menor recuperação plaquetária após dois anos de criopreservação a -80°C. No presente estudo, a mediana de 154 dias (45 - 245) de criopreservação em fase de vapor de nitrogênio líquido provavelmente não influenciou nos resultados obtidos.

O volume final de congelamento dos concentrados de plaquetas foi padronizado em 40 ml por motivos técnicos. Na opção pelo congelamento programado, foi considerado que o congelamento deste volume, de forma não controlada, poderia ocorrer muito rapidamente e propiciar a formação de cristais de gelo capazes de romper a membrana celular (CANALES et al., 1999). Na opção pelo

armazenamento em fase de vapor de nitrogênio, foi considerado que a ocorrência de eventuais oscilações térmicas poderiam interferir nos resultados (SPECTOR et al., 1977).

No presente estudo, a porcentagem de perda plaquetária associada à criopreservação com ThromboSol® foi similar à observada com a utilização de DMSO 5%. A perda plaquetária associada à utilização de DMSO 5% foi semelhante à observada por SHIFFER et al. (1976) e IMHOFF et al. (1983) que obtiveram, respectivamente, 19% e 21%. Porém, foi maior que aquela observada por FUNKE et al. (1995) que obteve 15%. Utilizando ThromboSol®, no entanto, a perda plaquetária foi inferior à observada por PEDRAZZOLI et al. (2000), LOZANO et al. (2000) e CURRIE et al. (1999) que obtiveram 49%, 30% e 28,8%, respectivamente. Estes autores utilizaram congelamento não controlado e estocaram à temperatura de -80°C. Portanto, assim como observado por PEDRAZZOLI et al. (2000), no presente estudo, o congelamento programado parece ter contribuído para a melhor porcentagem de recuperação plaquetária ao se utilizar o ThromboSol® com criopreservante.

O DMSO apresenta um papel importante na estabilização das membranas citoplasmática e do sistema tubular denso das plaquetas (ARNAUD, 1999). A concentração final de DMSO nos concentrado de plaquetas quando utilizado ThromboSol® é de apenas 2%, o que pode estar associada à maior instabilidade das membranas e à maior perda plaquetária associada ao processo de congelamento e descongelamento em comparação ao DMSO 5%. Em contrapartida, o aumento da concentração DMSO para 10% não diminui a perda associada à criopreservação

(LAZARUS et al., 1981). A hiperconcentração plaquetária está associada à maior porcentagem de perdas no processo de transferência de bolsas para o congelamento (MURPHY et al., 1974; SHEPHERD et al., 1984). Dessa forma, a elevada concentração plaquetária no presente estudo pode ter ainda superestimado a porcentagem de perda associada à criopreservação.

A ocorrência de ativação plaquetária e conseqüente diminuição da sobrevivência plaquetária *in vivo* torna-se evidente quando o pH dos concentrados de plaquetas for inferior a 6,4 (DUMONT et al., 2002). Neste estudo, os concentrados de plaquetas "secas" apresentaram valores de pH significativamente menores do que os concentrados de plaquetas convencionais (7,02 *versus* 7,34; $p < 0,001$). Como as medidas foram realizadas menos de 3 horas após a coleta, a diferença observada pode sugerir que a hiperconcentração dificultou a troca gasosa, ocasionando maior metabolismo anaeróbico e, conseqüentemente, a formação de ácido láctico. A significativa redução do conteúdo de glicose dos concentrados de plaquetas "secas" também sugere a ocorrência de metabolismo anaeróbico.

Apesar do pH observado nos concentrados de plaquetas "secas" não estar associado a alterações plaquetárias significativas, a sua rápida redução pode se constituir em um fator limitante para o processamento de plaquetas na forma hiperconcentrada. Dumont et al. (2002) utilizaram concentrações plaquetárias três vezes menores que a empregada neste estudo e, após 48 horas, obtiveram maior ativação e menor rendimento transfusional que a estocagem na concentração convencional.

Para evitar a rápida redução do pH em situações de hiperconcentração, seria de grande utilidade estabelecer uma relação entre a concentração plaquetária e tempo de estocagem. Além disso, a suplementação do meio de suspensão das plaquetas com acetato, conforme proposto por BERTOLINI et al. (1992), poderia melhorar a oferta metabólica, diminuir o consumo de glicose e evitar a acidificação do meio.

A ausência de diferenças significativas no VPM entre os concentrados de plaquetas convencionais e "secas" sugere que a hiperconcentração não provocou mudanças conformacionais associadas ao processo de ativação (MURPHY et al., 1970; KLINGER et al., 1996). Como o DMSO não altera a morfologia plaquetária, o aumento significativo do VPM após o descongelamento deve ser atribuída unicamente à criopreservação (CROWLEY et al., 1974; BÖCK et al., 1995).

O aumento da concentração de DHL nos concentrados de plaquetas não tem correlação com a ativação plaquetária, mas indica a ocorrência de lise (RINDER et al., 1993). Os níveis de DHL significativamente mais elevado nos concentrados de plaquetas "secas" sugere que a coleta na forma hiperconcentrada tenha provocado maior atrito entre plaquetas, tubos de coleta e bolsas plásticas. O aumento na concentração de DHL nos concentrados de plaquetas "secas" não tem sido reportado por outros autores.

A criopreservação aumentou a concentração de DHL de forma intensa em relação aos valores pré-congelamento, comprovando a ocorrência de lise associada ao processo. Antes da criopreservação, os níveis de DHL do grupo criopreservado com ThromboSol® era semelhante ao do grupo criopreservado com DMSO 5%. No

entanto, após a criopreservação, houve aumento significativamente maior no grupo criopreservado com ThromboSol® quando comparado àquele criopreservado com DMSO 5% ($p < 0,001$), sugerindo menor estabilidade da membrana plaquetária com a utilização do primeiro.

A integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ está naturalmente presente na membrana plaquetária. Com a ativação, ocorre a externalização do pool contido no SCA e nos grânulos alfa (NURDEN, 1997). O movimento de externalização é melhor avaliado pela intensidade média de fluorescência (IMF), uma vez que as plaquetas são naturalmente positivas para o antígeno (ESCOLAR e WHITE, 2000). Quando comparado aos concentrados de plaquetas convencionais, a ativação sofrida pelos concentrados de plaquetas "secas" não foi intensa o suficiente para promover a externalização da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Em contrapartida, a criopreservação elevou significativamente a IMF desta integrina.

Além do movimento de externalização, a ativação plaquetária desencadeia mudanças conformacionais na integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que passa a funcionar como receptor de superfície para o fibrinogênio, fator de von Willebrand (FVW), fibronectina e vitronectina, facilitando a adesão das plaquetas entre si e ao subendotélio vascular (CHARO et al., 1994). No presente estudo, a diminuição da porcentagem de expressão da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de 98% para 93,3% não foi concordante com o significativo aumento da IMF. Como o anticorpo utilizado neste estudo reconhecia apenas a forma não ativada da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, a redução da porcentagem de plaquetas positivas pode sugerir a ocorrência da mudança conformacional do

receptor e/ou a adesão de proteínas específicas do plasma (GINSBERG et al., 1990; ESCOLAR e WHITE, 2000).

Ao contrário da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, a ativação plaquetária promove a internalização do complexo GPIb-IX-V, havendo, portanto, a redução da porcentagem de expressão e da IMF (NURDEN, 1997; ELISABETH et al., 1991).

Quando comparados os concentrados de plaquetas convencionais e "secas", o segundo não apresentou redução da porcentagem de expressão e da intensidade média de fluorescência do complexo GPIb, confirmando o que foi observado para integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Os concentrados de plaquetas criopreservados, no entanto, apresentaram significativa redução da porcentagem de expressão do complexo GPIb ($p < 0,001$), sugerindo a ocorrência de ativação plaquetária.

O grupo de concentrados criopreservados com ThromboSol® apresentou significativa redução da expressão do complexo GPIb quando comparado ao grupo criopreservado com DMSO 5% ($p = 0,01$). O mesmo foi observado por PEDRAZZOLI et al. (2000), e este achado sugere que a criopreservação com ThromboSol® está associada à maior ativação plaquetária.

O complexo GPIb atua como receptor para o FVW do subendotélio vascular em condições de fluxo e, do ponto de vista fisiológico, a internalização implica na diminuição da capacidade adesiva das plaquetas na necessidade de estímulos mais potentes para a ativação e na menor resposta agregatória (KROLL et al., 1996; LOZANO et al., 1997; GOTO et al., 1998). A ativação induzida pela criopreservação permite identificar uma subpopulação com expressão normal e outra com expressão reduzida do complexo GPIb (BARNARD et al., 1999). No presente estudo, a

subpopulação com expressão normal representou 68% da população estudada. A capacidade de adesão plaquetária em condições de fluxo somente é significativamente afetada se a redução do complexo GPIb na superfície plaquetária for maior que 50% (ZANTEN et al., 1998). Dessa forma, considerando os resultados obtidos com as análises da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e do complexo GPIb, os concentrados de plaquetas "secas" criopreservados mantiveram potencial para agregação e adesão.

A p-selectina está presente nos grânulos alfa das plaquetas e atua como receptor de superfície capaz de mediar a interação das plaquetas com neutrófilos e monócitos (HAMBURGER e McEVER, 1990). Apesar de ser um marcador sensível e que se eleva gradativamente com a ocorrência de ativação, a sua correlação com a sobrevivência plaquetária *in vivo* ainda não está bem definida (RINDER et al., 1991; HOLME et al., 1997; STOHLAWETZ et al., 1999). No presente estudo, foram observados, respectivamente, 15% e 19,8% de plaquetas positivas para p-selectina nos concentrados de plaquetas convencionais e "secas". Estes valores, embora significativamente diferentes ($p < 0,001$), estão dentro da variação de 12% a 25% de plaquetas p-selectina positivas, esperada para os concentrados de plaquetas coletados por aférese (METCALFE et al., 1997; HOLME et al., 1997).

Após a criopreservação, foi observado que 60% de plaquetas eram positivas para p-selectina. Não houve diferenças entre o grupo criopreservado com ThromboSol® e o com DMSO 5% ($p = 0,12$). LOZANO et al. (1999) obtiveram, respectivamente, 42% e 38% de plaquetas p-selectina positivas, utilizando DMSO 6% ou ThromboSol®, enquanto CURRIE et al. (1999) obtiveram, respectivamente 50% e 40% utilizando os mesmos criopreservantes. ROTHWEEL et al. (2000)

obtiveram 41% de plaquetas p-selectina positivas, utilizando DMSO 5%. Nesses estudos, a porcentagem de plaquetas p-selectina positivas pré-congelamento estava ao redor de 20%. Dessa forma, quando comparados aos resultados do presente estudo, a porcentagem de plaquetas p-selectina positivas pré-congelamento não contribuiu para a maior porcentagem de plaquetas p-selectina positiva após a criopreservação.

Avaliando a porcentagem de expressão da p-selectina, pode-se sugerir que a criopreservação na forma hiperconcentrada produziu maior ativação. No entanto, deve-se ponderar que a lavagem excessiva remove a p-selectina da superfície plaquetária (MICHELSON et al., 1996). Da mesma forma, as plaquetas excessivamente ativadas ou degranuladas podem ser negativas para p-selectina, conforme observado nas populações plaquetárias com expressão reduzida do complexo GPIb (BARNARD et al., 1999).

Na presença de íons cálcio, a anexina V é uma proteína com capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípidos de carga negativa, como a fosfatidilserina (FS). Em decorrência da ativação, a FS se move da camada interna para a camada externa da membrana, originando uma superfície pró-coagulante capaz de potencializar a formação de trombina (JAMIESON, 1997). A ausência de formação da superfície pró-coagulante origina um distúrbio hemorrágico conhecido como síndrome de Scott (BROOKS et al., 2002).

Ao contrário da p-selectina, cujo aumento é gradual durante a estocagem, a ligação da anexina V aumenta lentamente nos primeiros cinco dias de estocagem e, rapidamente, após esse período (MATSUBAYASHI et al., 1999). A rápida elevação

da capacidade de ligação da anexina V no final da estocagem pode não refletir a ocorrência de ativação, mas o início do mecanismo de apoptose (GAFFET et al., 1994; LI et al., 2000). Não houve diferença estatística na porcentagem de ligação da anexina V quando comparados os concentrados de plaquetas convencionais e "secas". Em contrapartida, a porcentagem de expressão ao redor de 30% obtida no presente estudo foi elevada, se for considerado que MATSUBAYASHI et al. (1999) e SHAPIRA et al. (2000) obtiveram valores inferiores a 10% para concentrados de plaquetas recém coletados. Essa diferença pode ser atribuída, pelo menos em parte, à diferenças na técnica de preparação das amostras. No presente estudo não foi utilizada solução tampão contendo magnésio. O magnésio sabidamente inibe a polimerização da actina e a ativação plaquetária (HEPTINSTALL et al., 1995; SHEU et al., 2002). Como o ensaio para anexina V utiliza plaquetas não fixadas, pode ter ocorrido ativação durante as sucessivas lavagens, incubações e centrifugações para o preparo.

A criopreservação aumentou significativamente a porcentagem de ligação da anexina V. Quando comparado ao grupo criopreservado com ThromboSol®, a ligação da anexina V foi significativamente menor no grupo criopreservado com DMSO 5%, sugerindo melhor preservação com o último ($p=0,005$). A porcentagem de ligação da anexina V apresentou boa correlação com a expressão da p-selectina nos concentrados de plaquetas "secas" e nos criopreservados e parece ter apresentado maior sensibilidade que a p-selectina na detecção de ativação nos concentrados de plaquetas criopreservados.

Os concentrados de plaquetas obtidos por aférese podem apresentar resposta agregatória diminuída, portanto a utilização de doses convencionais de agonistas pode não avaliar integralmente o potencial de resposta dessas plaquetas (Vostal et al., 2000). Além disso, a criopreservação diminui ainda mais a resposta agregatória (TORRETTA et al., 1998; SHAPIRA et al., 2000). Para que os resultados de agregação pré-congelamento pudessem ser comparados com os pós-congelamento, foram utilizadas as mesmas concentrações de agonistas em ambos os momentos. As concentrações empregadas foram selecionadas a partir das respostas obtidas em estudos prévios de criopreservação de plaquetas (SPECTOR et al., 1977; IMHOFF et al., 1983; VAN PROOIJEN et al., 1985; LOZANO et al., 2000).

No presente estudo, não foram observadas diferenças estatísticas significativas na porcentagem de resposta agregatória entre concentrados de plaquetas convencionais e "secas", quando utilizado colágeno ou ácido aracdônico como agonistas. Em contrapartida, as agregações com ADP ou com epinefrina foram significativamente menores nos concentrados de plaquetas "secas" ($p < 0,001$). A redução do pH nos concentrados de plaquetas "secas" pode ter contribuído para a diferença observada, uma vez que o meio mais ácido está associado à menor resposta dos receptores transmembrana que atuam sobre a proteína G (HO e CHAN, 1995).

A resposta agregatória excepcionalmente fraca observada na amostra N°2 quando utilizado ADP ou epinefrina foi confirmada em amostra de plasma rico em plaquetas (dados não discriminados). A ausência de resposta ao ADP e à epinefrina

já havia sido documentada em doadores normais e pode ser atribuída a um defeito na mobilização dos íons cálcio no citosol plaquetário (SCRUTTON et al., 1981; JILMA-STOHLAWETZ et al., 2001).

A via de ativação do colágeno parece sofrer menor influência dos efeitos da criopreservação. Apesar de ser significativamente menor do que a porcentagem de agregação pré-congelamento ($p < 0,001$), a obtenção de 60% de agregação com colágeno após a criopreservação evidencia, mesmo que parcialmente, a manutenção da integridade funcional das plaquetas estudadas. Utilizando a mesma concentração do agonista, a porcentagem de agregação foi semelhante à observada por SHEPHERD et al. (1983) que obteve 63%, e superior àquelas observadas por BALDUINI et al. (1993) e LOZANO et al. (2000)³⁷ que obtiveram, respectivamente, 15% e 25%. Maiores concentrações de colágeno promovem melhor resposta agregatória, porém em concentrações acima de 40 $\mu\text{g/dl}$ pode ocorrer a lise plaquetária (VAN PROOIJEN et al. (1996).

No presente estudo, a porcentagem de agregação com ácido aracdônico foi significativamente menor nos concentrados de plaquetas criopreservados quando comparados aos resultados obtidos pré-congelamento ($p < 0,001$). Este resultado foi semelhante ao observado por LOZANO et al. (2000), que utilizaram a mesma concentração do agonista. A redução concomitante da porcentagem de agregação com ADP e com ácido aracdônico sugere que a via da ciclo oxigenase (COX-1) não foi exclusivamente comprometida.

Quando utilizado a epinefrina como agonista, não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores pré-congelamento e pós-congelamento. No

entanto, a porcentagem de agregação com epinefrina já era excessivamente baixa nos concentrados de plaquetas "secas" antes do congelamento, sugerindo que o agonista foi inadequado para avaliar estes concentrados de plaquetas.

A associação de agonistas permite uma melhor avaliação do potencial de resposta das plaquetas em situações de hipoagregação. No presente estudo, a associação dos agonistas ADP/epinefrina e colágeno/epinefrina produziram melhor resposta agregatória do que o uso isolado dos mesmos e sugere que o comprometimento das respectivas vias de ativação influenciaram na redução da resposta agregatória. (TORRETTA et al., 1998; XIAO et al., 2002).

Não há dados nesse estudo para explicar a agregação com ADP pré-congelamento significativamente menor no grupo criopreservado com ThromboSol® ($p < 0,001$). No entanto, essa diferença parece não ter influenciado os resultados de agregação com ADP pós-congelamento. Em contrapartida, a porcentagem de agregação com colágeno e com ácido aracdônico pré-congelamento foram maiores no grupo criopreservado com ThromboSol® quando comparada ao grupo criopreservado com DMSO 5% ($p = 0,01$ e $p = 0,05$, respectivamente), evidenciando bom potencial para agregação nos dois grupos.

Quando foram comparados os resultados de agregação do grupo criopreservado com ThromboSol® àquele criopreservado com DMSO 5%, houve diferença estatística, favorecendo o segundo grupo, com a utilização do colágeno como agonista. Apesar de não ser estatisticamente diferente, a porcentagem de agregação com ácido aracdônico e com a associação dos agonistas ADP/epinefrina foram maiores no grupo criopreservado com DMSO 5%. Esses resultados sugerem

maior reserva funcional dos concentrados de plaquetas criopreservados com DMSO 5%

De modo geral, após a criopreservação, um terço das plaquetas são lisadas, um terço sofrem ativação e um terço permanecem intactas. No momento, não são conhecidas as razões porque algumas plaquetas permanecem intactas, enquanto outras sofrem ativação ou lise. As plaquetas que sobrevivem à criopreservação, após a transfusão autóloga, apresentam sobrevida média e incremento plaquetário maior do se estocadas a temperatura ambiente por 5 dias (VALERI et al., 2002; MURPHY, 2002).

Em condições ideais, as plaquetas são células que permanecem na circulação por cerca de 10 dias (HANSON e SLICHTER, 1985). Como envelhecem rapidamente, ao coletá-las, obtém-se um grupo com idade muito heterogênea. As plaquetas mais velhas podem já conter alterações degenerativas e reagir de forma insatisfatória ao estresse da estocagem (ARNAUD, 1999). Estimulando-se a produção de plaquetas com trombopoietina é possível obter, além de uma grande quantidade de plaquetas para criopreservação, uma população mais jovem. Quando criopreservadas, as plaquetas estimuladas com trombopoietina apresentam melhores parâmetros morfológicos e funcionais, *in vitro*, do que aquelas obtidas sem a estimulação (VADHAN-RAJ et al.; 1999). No entanto, embora menos intensas, as lesões plaquetárias induzidas pela criopreservação também ocorrem nas plaquetas mais jovens, e os resultados transfusionais com estas plaquetas são semelhantes aos obtidos com plaquetas não estimuladas com trombopoietina (VADHAN-RAJ et al., 2002). Deve-se também considerar os efeitos adversos associados ao uso da

trombopoietina e os aspectos econômicos e logísticos desse tipo de procedimento (PERSEGHIN e DASSI., 2002).

A coleta de plaquetas "secas" por aférese é um recurso nunca empregado na obtenção de plaquetas para criopreservação. No presente estudo, ao se coletar concentrados de plaquetas "secas" para a criopreservação, procurou-se diminuir a manipulação e a conseqüente ativação plaquetária induzida por múltiplas etapas de centrifugação e lavagem. No entanto, as plaquetas são células que desprendem boa parte de sua energia para a manutenção da forma inativa, e a hiperconcentração pode ter ocasionado a rápida diminuição do substrato energético das plaquetas e maior ativação.

Os inibidores das vias intracelulares da segunda transmissão contidos no ThromboSol®, quando utilizados isoladamente, não inibem a ocorrência de ativação plaquetária. A amilorida inibe a bomba de sódio e potássio, evitando a diminuição do pH intraplaquetário e a conseqüente liberação de cálcio do STD. O nitroprussiato de sódio e a adenosina aumentam os níveis de óxido nítrico, o que aumenta a produção de AMP e GMP cíclicos, inibindo a ação de agonistas da ativação plaquetária que podem estar presentes no meio em suspensão (CONNOR et al., 1996)¹²⁸.

A reduzida concentração de DMSO na composição do ThromboSol® pode ser implicada na ocorrência de maior lise e de maior ativação plaquetária associada ao uso deste criopreservante.

O mecanismo de ativação plaquetária associada à criopreservação ainda não está totalmente compreendido. Acredita-se que a ativação não ocorra exclusivamente pela estimulação de receptores da superfície, mas seja secundária à

lesão mecânica das membranas citoplasmática e do STD, promovendo a abertura de canais (REID et al., 1999). Esta comunicação faz com que o cálcio contido no interior do STD extravase e produza mais ativação (WINOKUR e HARTWIG, 1995).

Durante o resfriamento, as membranas passam do estado líquido para o estado gelatinoso, resultando em menor capacidade de reorganização de sua estrutura e em perda da integridade (REID et al., 1999). Outra possibilidade considera que a porção polar dos fosfolípides de membrana é hidratada e, durante o congelamento, ocorra desidratação celular o que provoca um aumento na densidade dessa estrutura. Durante o processo de rehidratação, essas membranas se tomam transitoriamente permeáveis, permitindo a liberação das substâncias contidas no seu interior e/ou a lise osmótica das plaquetas (CROWE et al., 1998).

Para criopreservar plaquetas mantendo-as intactas serão necessários desenvolver mecanismos capazes de estabilizar as membranas. A utilização de glicoproteínas anticongelantes ou dissacarídeos para estabilização da membrana plaquetária tem demonstrado resultados promissores (CROWE et al., 1999; TABLIN et al., 2001). Porém, serão necessários estudos adicionais para confirmação dos resultados obtidos por estes autores e para a determinação da toxicidade e da viabilidade de aplicação destas técnicas em larga escala.

6. CONCLUSÕES

- Nos concentrados de plaquetas "secas", a hiperconcentração plaquetária foi associada à maior ocorrência de lise e ativação plaquetária. A primeira foi evidenciada pelo aumento da concentração de DHL, enquanto a segunda, pela redução do pH, maior expressão da p-selectina e menor resposta agregatória com os agonistas ADP e epinefrina.
- A criopreservação dos concentrados de plaquetas "secas" promoveu aumento significativo na ocorrência de lise e ativação plaquetária quando comparados aos parâmetros pré-congelamento. Porém, as plaquetas "secas" criopreservadas mantiveram o potencial de adesão e, conforme a estimulação, o de agregação.
- A criopreservação dos concentrados de plaquetas "secas" com o crioprotetor ThromboSol®, quando comparado ao DMSO 5%, esteve associada à maior ocorrência de lise e ativação plaquetária. A primeira evidenciada pelo aumento da concentração de DHL, enquanto a segunda, pela maior ligação da anexina V e menor resposta agregatória com a utilização de colágeno como agonista.

- Esse estudo sugere que, após a coleta, os concentrados de plaquetas "secas" devem ser prontamente criopreservados para evitar a rápida redução do pH e a ocorrência de ativação plaquetária. Para a criopreservação desses concentrados, o DMSO 5% apresentou o melhor efeito crioprotetor.

7. REFERÊNCIAS

ABRAMS, C.; SHATTIL, S.J. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. **Thromb Haemost**, 65(5):467-73, 1991.

ALVING, B.M.; REID, T.J.; FRATANTONI, J.C.; FINLAYSON, J.S. Frozen platelets and platelet substitutes in transfusion medicine. **Transfusion**, 37(8):866-76, 1997.

ANDREWS, R.K.; SHEN, Y.; GARDINER, E.E.; DONG, J.F.; LOPEZ, J.A.; BERNDT, M.C. The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. **Thromb Haemost**, 82(2):357-64, 1999.

ANGELINI, A.; DRAGANI, A.; BERARDI, A.; IACONE, A.; FIORITONI, G.; TORLONTANO, G. Evaluation of four different methods for platelet freezing. In vitro and in vivo studies. **Vox Sang**, 62(3):146-51, 1992.

ARNAUD, F.; GOODRICH, R.P. Measurement of transmitted light as an indicator of cryopreserved platelet viability. **Haemostasis**, 26(2):107-16, 1996.

ARNAUD, F. Frozen/thawed platelets: importance of osmotic tolerance and platelet subpopulations. **Cryobiology**, 38(3):192-9, 1999.

BALDINI, M.; COSTEA, N.; DAMESHEK, W. The viability of stored human platelets. **Blood**, 16:1669-92, 1960.

BALDUINI, C.L.; MAZZUCCO, M.; SINIGAGLIA, F.; GRIGNANI, G.; BERTOLINO, G.; NORIS, P. et al. Cryopreservation of human platelets using dimethyl sulfoxide and glycerol-glucose: effects on "in vitro" platelet function. **Haematologica**, 78(2):101-4, 1993.

BARNARD, M.R.; MACGREGOR, H.; RAGNO, G.; PIVACEK, L.E.; KHURI, S.F.; MICHELSON, A.D. et al. Fresh, liquid-preserved, and cryopreserved platelets: adhesive surface receptors and membrane procoagulant activity. **Transfusion**, 39(8):880-8, 1999.

BAYTHOON, H.; TUDDENHAM, E.G.; HUTTON, R.A. Morphological and functional disturbances of platelets induced by cryopreservation. **J Clin Pathol**, 35(8):870-4, 1982.

BERTOLINI, F.; MURPHY, S.; REBULLA, P.; SIRCHIA, G. Role of acetate during platelet storage in a synthetic medium. **Transfusion**, 32(2):152-6, 1992.

BOCK, M.; SCHLEUNING, M.; HEIM, M.U.; MEMPEL, W. Cryopreservation of human platelets with dimethyl sulfoxide: changes in biochemistry and cell function. **Transfusion**, 35(11):921-4, 1995.

BORZINI, P.; LAZZARO, A.; MAZZUCCO, L.; SCHIAVO, R.; CONNOR, J.; SIENA, S. Platelet cryopreservation using second-messenger effector and low-dose (2%) dimethyl sulfoxide. In vitro evaluation of post-thawing platelet activity with the platelet function analyzer. **Haematologica**, 85(8):885-7, 2000.

BRASIL. Normas Técnicas em Hemoterapia. Portaria Nº 1.376, de 19 de novembro de 1993. **Diário Oficial da União**, 02 de dezembro de 1993.

BRASIL. Regulamento Técnico dos Serviços de Hemoterapia. Resolução - RDC nº 343, de 13 de dezembro de 2002. **Diário Oficial da União**, 17 de janeiro de 2003.

BROOKS, M.B.; CATALFAMO, J.L.; BROWN, H.A.; IVANOVA, P.;
LOVAGLIO, J. A hereditary bleeding disorder of dogs caused by a lack of platelet
procoagulant activity. **Blood**, 99(7):2434-41, 2002.

BUCHHOLZ, D.H.; SCHIFFER, C.A.; WIERNIK, P.H.; BETTS, S.W. The use
of frozen autologous platelets in the supportive care of patients with acute leukemia.
Transfusion, 14:512, 1974.

CANALES, M.A.; ARRIETA, R.; HERNANDEZ NAVARRO, F.
Cryopreservation of hematopoietic progenitor cells. **Sangre**, 44(6):473-81, 1999.

CAVALLINI, L.; COASSIN, M.; BOREAN, A.; ALEXANDRE, A. Prostacyclin
and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate
receptor and promote its phosphorylation. **J Biol Chem**, 271(10):5545-51, 1996.

CHARO, I.F.; KIEFEER, N.; PHILLIPS, D.R. Platelet membrane glycoproteins.
In: COLMAN, R.W.; HIRSH, J.; MARDER, V.J.; SALZMAN, E.W. **Hemostasis and
Thrombosis: basic principles and clinical practice**. Third Edition. Philadelphia:
Lippincott Company, 1994. p. 489-523.

COHEN, P.; GARDNER, F.H. Platelet preservation. IV. Preservation of human
platelet concentrates by controlled slow freezing in a glycerol medium. **N Engl J
Med**, 274(25):1400-7, 1966.

CONNOR, J.; CURRIE, L.M.; ALLAN, H.; LIVESEY, S.A. Recovery of in vitro
functional activity of platelet concentrates stored at 4 degrees C and treated with
second-messenger effectors. **Transfusion**, 36(8):691-8, 1996.

CRAMER, E.M.; LU, H.; CAEN, J.P.; SORIA, C.; BERNDT, M.C.; TENZA, D. Differential redistribution of platelet glycoproteins Ib and IIb-IIIa after plasmin stimulation. **Blood**, 77(4):694-9, 1991.

CROWE, J.H.; CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annu Rev Physiol**, 60:73-103, 1998.

CROWLEY, J.P.; RENE, A.; VALERI, C.R. Changes in platelet shape and structure after freeze preservation. **Blood**, 44(4):599-603, 1974.

CURRIE, L.M.; LIVESEY, S.A.; HARPER, J.R.; CONNOR, J. Cryopreservation of single-donor platelets with a reduced dimethyl sulfoxide concentration by the addition of second-messenger effectors: enhanced retention of in vitro functional activity. **Transfusion**, 38(2):160-7, 1998.

CURRIE, L.M.; LICHTIGER, B.; LIVESEY, S.A.; TANSEY, W.; YANG, D.J.; CONNOR, J. Enhanced circulatory parameters of human platelets cryopreserved with second-messenger effectors: an in vivo study of 16 volunteer platelet donors. **Br J Haematol**, 105(3):826-31, 1999.

DACHARY-PRIGENT, J.; FREYSSINET, J.M.; PASQUET, J.M.; CARRON, J.C.; NURDEN, A.T. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups. **Blood**, 81(10):2554-65, 1993.

DALY, P.A.; SCHIFFER, C.A.; AISNER, J.; WIERNIK, P.H. Successful transfusion of platelets cryopreserved for more than 3 years. **Blood**, 54(5):1023-7, 1979.

DANIEL, J.L.; DANGELMAIER, C.; SMITH, J.B. Evidence for a role for tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma 2 in collagen-induced platelet cytosolic calcium mobilization. **Biochem J**, 302 (Pt 2):617-22, 1994.

DANIEL, J.L.; DANGELMAIER, C.; JIN, J.; ASHBY, B.; SMITH, J.B.; KUNAPULI, S.P. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. **J Biol Chem**, 273(4):2024-9, 1998.

DAVIS, J.M.; ROWLEY, S.D.; BRAINE, H.G.; PIANTADOSI, S.; SANTOS, G.W. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. **Blood**, 75(3):781-6, 1990.

DJERASSI, I.; FARBER, S.; EVANS, A.E. Transfusions of fresh platelet concentrates to patients with secondary thrombocytopenia. **N Engl J Med**, 268:221-6, 1963.

DJERASSI, I.; FARBER, S.; ROY, A.; CAVINS, J. Preparation and in vivo circulation of human platelets preserved with combined dimethylsulfoxide and dextrose. **Transfusion**, 6(6):572-6, 1966.

DUMONT, L.J.; AUBUCHON, J.P.; WHITLEY, P.; HERSCHEL, L.H.; JOHNSON, A.; MCNEIL, D. et al. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. **Transfusion**, 42(7):847-54, 2002.

ESCOLAR, G.; WHITE, J.G. Changes in glycoprotein expression after platelet activation: differences between in vitro and in vivo studies. **Thromb Haemost**, 83(3):371-86, 2000.

FUNKE, I.; WIESNETH, M.; KOERNER, K.; CARDOSO, M.; SEIFRIED, E.; KUBANEK, B. et al. Autologous platelet transfusion in alloimmunized patients with acute leukemia. **Ann Hematol**, 71(4):169-73, 1995.

GAFFET, P.; BASSE, F.; BIENVENUE, A. Loss of phospholipid asymmetry in human platelet plasma membrane after 1-12 days of storage. An ESR Study. **Eur J Biochem**, 222:1033-40, 1994.

GAO, D.Y.; NEFF, K.; XIAO, H.Y.; MATSUBAYASHI, H.; CUI, X.D.; BONDERMAN, P. et al. Development of optimal techniques for cryopreservation of human platelets. I. Platelet activation during cold storage (at 22° and 8°C) and cryopreservation. **Cryobiology**, 38(3):225-35, 1999.

GAYDOS, L.A.; FREIREICH, E.J.; MANTEL, N. The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia. **N Engl J Med**, 266:905-9, 1962.

GINSBERG, M.H.; FRELINGER, A.L.; LAM, S.C.; FORSYTH, J.; MCMILLAN, R.; PLOW, E.F. et al. Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies. **Blood**, 76(10):2017-23, 1990.

GOTO, S.; IKEDA, Y.; SALDIVAR, E.; RUGGERI, Z.M. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. **J Clin Invest**, 101(2):479-86, 1998.

GRALNICK, H.R.; WILLIAMS, S.B.; MCKEOWN, L.; SHAFER, B.;
CONNAGHAN, G.D.; HANSMANN, K. et al. Endogenous platelet fibrinogen: its
modulation after surface expression is related to size-selective access to and
conformational changes in the bound fibrinogen. **Br J Haematol**, 80(3):347-57, 1992.

GREENWALT, T.J. A short history of transfusion medicine. **Transfusion**,
37(5):550-63, 1997.

GRODE, G.; MIRIPOL, J.; GARBER, J.; BARBER, T.; BUCHHOLZ, D.H.
Extended storage of platelets in a new plastic container. I. Biochemical and
morphologic changes. **Transfusion**, 25(3):204-8, 1985.

HAMBURGER, S.A.; MCEVER, R.P. GMP-140 mediates adhesion of
stimulated platelets to neutrophils. **Blood**, 75(3):550-4, 1990.

HAN, T.; STUTZMAN, L.; COHEN, E.; KIM, U. Effect of platelet transfusion on
hemorrhage in patients with acute leukemia. An autopsy study. **Cancer**, 19(12):1937-
42, 1966.

HANDIN, R.I.; VALERI, C.R. Hemostatic effectiveness of platelets stored at
22°C. **N Engl J Med**, 285(10):538-43, 1971.

HANDIN, R.I.; VALERI, C.R. Improved viability of previously frozen platelets.
Blood, 40(4):509-13, 1972.

HANSON, S.R.; SLICHTER, S.J. Platelet kinetics in patients with bone marrow
hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement. **Blood**, 66(5):1105-9, 1985.

HASLAM, R.J.; DAVIDSON, M.M.; FOX, J.E.; LYNHAM, J.A. Cyclic
nucleotides in platelet function. **Thromb Haemost**, 40(2):232-40, 1978.

HEAL, J.M.; JONES, M.E.; FOREY, J.; CHAUDHRY, A.; STRICOF, R.L. Fatal *Salmonella* septicemia after platelet transfusion. **Transfusion**, 27(1):2-5, 1987.

HEPTINSTALL, S.; GLENN, J.R.; LOSCHE, W.; SPANGENBERG, P. ADP-induced platelet aggregation and actin polymerization. Involvement of GpIIb/IIIa and the effect of Mg²⁺. **Semin Thromb Hemost**, 21(2):137-45, 1995.

HERSH, E.M.; BODEY, G.P.; NIES, B.A.; FREIREICH, E.J. Causes of death in acute leukemia: a ten-year study of 414 patients from 1954-1963. **JAMA**, 193:105-9, 1965.

HERVE, P.; POTRON, G.; DROULE, C.; BEDUCHAUD, M.P.; MASSE, M.; COFFE, C. et al. Human platelets frozen with glycerol in liquid nitrogen: biological and clinical aspects. **Transfusion**, 21(4):384-90, 1981.

HICKERSON, D.H.M.; BODE, A.P. Flow cytometry of platelets for clinical analysis. **Hematol Oncol Clin N Am**, 16:421-454, 2002.

HO, C.H.; CHAN, I.H. The influence of time of storage, temperature of storage, platelet number in platelet-rich plasma, packed cell, mean platelet volume, hemoglobin concentration, age, and sex on platelet aggregation test. **Ann Hematol**, 71(3):129-33, 1995.

HOGGE, D.E.; THOMPSON, B.W.; SCHIFFER, C.A. Platelet storage for 7 days in second-generation blood bags. **Transfusion**, 26(2):131-5, 1986.

HOLME, S.; MURPHY, S. Quantitative measurements of platelet shape by light transmission studies; application to storage of platelets for transfusion. **J Lab Clin Med**, 92(1):53-64, 1978.

HOLME, S.; SWEENEY, J.D.; SAWYER, S.; ELFATH, M.D. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates: relationship to loss of in vivo viability. **Transfusion**, 37(1):12-7, 1997.

JAMIESON, G.A. Pathophysiology of platelet thrombin receptors. **Thromb Haemost**, 78(1):242-6, 1997.

JILMA-STOHLAWETZ, P.; HERGOVICH, N.; HOMONCIK, M.; DZIRLO, L.; HORVATH, M.; JANISIW, M. et al. Impaired platelet function among platelet donors. **Thromb Haemost**, 86(3):880-6, 2001.

KACZMAREK, E.; KOZIAK, K.; SEVIGNY, J.; SIEGEL, J.B.; ANRATHER, J.; BEAUDOIN, A.R. et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **J Biol Chem**, 271(51):33116-22, 1996.

KHURI, S.F.; HEALEY, N.; MACGREGOR, H.; BARNARD, M.R.; SZYMANSKI, I.O.; BIRJINIUK, V. et al. Comparison of the effects of transfusions of cryopreserved and liquid-preserved platelets on hemostasis and blood loss after cardiopulmonary bypass. **J Thorac Cardiovasc Surg**, 117(1):172-83, 1999.

KIM, B.K.; BALDINI, M.G. Biochemistry, function, and hemostatic effectiveness of frozen human platelets. **Proc Soc Exp Biol Med**, 145(3):830-5, 1974.

KLEIN, E.; ARNOLD, P.; EARL, R.T.; WAKE, E. A practical method for the aseptic preparation of human platelet concentrates without loss of other blood elements. **N Engl J Med**, 254(24):1132-3, 1956.

KLINGER, M.H.; JOSCH, M.; KLUTER, H. Platelets stored in a glucose-free additive solution or in autologous plasma—an ultrastructural and morphometric evaluation. **Vox Sang**, 71(1):13-20, 1996.

KOBILKA, B.K.; MATSUI, H.; KOBILKA, T.S.; YANG-FENG, T.L.; FRANCKE, U.; CARON, M.G. et al. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. **Science**, 238(4827):650-6, 1987.

KOSTELIJK, E.H.; FIJNHEER, R.; NIEUWENHUIS, H.K.; GOUWEROK, C.W.; DE KORTE, D. Soluble P-selectin as parameter for platelet activation during storage. **Thromb Haemost**, 76(6):1086-9, 1996.

KROLL, M.H.; HELLUMS, J.D.; MCINTIRE, L.V.; SCHAFER, A.I.; MOAKE, J.L. Platelets and shear stress. **Blood**, 88(5):1525-41, 1996.

LAI, M.; RUMI, C.; D'ONOFRIO, G.; PUGGIONI, P.L.; MENICHELLA, G.; CANDIDO, A. et al. Phosphatidylserine exposure in platelet concentrates during the storage period: differences between the platelets collected with different cell separators. **Transfus Apheresis Sci**, 27(3):239-45, 2002.

LANDI, E.P.; MARQUES JÚNIOR, J.F.C. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 25(1): 39-46, 2003.

LAZARUS, H.M.; KANIECKI-GREEN, E.A.; WARM, S.E.; AIKAWA, M.; HERZIG, R.H. Therapeutic effectiveness of frozen platelet concentrates for transfusion. **Blood**, 57(2):243-9, 1981.

LEE, D.H.; BLAJCHMAN, M.A. Novel treatment modalities: new platelet preparations and substitutes. **Br J Haematol**, 114(3):496-505, 2001.

LI, J.; XIA, Y.; BERTINO, A.M.; COBURN, J.P.; KUTER, D.J. The mechanism of apoptosis in human platelets during storage. **Transfusion**, 40(11):1320-9, 2000.

LOZANO, M.L.; RIVERA, J.; GONZALEZ-CONEJERO, R.; MORALEDA, J.M.; VICENTE, V. Loss of high-affinity thrombin receptors during platelet concentrate storage impairs the reactivity of platelets to thrombin. **Transfusion**, 37(4):368-75, 1997.

LOZANO, M.L.; RIVERA, J.; CORRAL, J.; GONZALEZ-CONEJERO, R.; VICENTE, V. Platelet cryopreservation using a reduced dimethyl sulfoxide concentration and second-messenger effectors as cryopreserving solution. **Cryobiology**, 39(1):1-12, 1999.

LOZANO, M.; ESCOLAR, G.; MAZZARA, R.; CONNOR, J.; WHITE, J.G.; DELECEA, C. et al. Effects of the addition of second-messenger effectors to platelet concentrates separated from whole-blood donations and stored at 4 °C or -80°C. **Transfusion**, 40(5):527-34, 2000.

MAEKAWA, Y.; YAGI, K.; NONOMURA, A.; KURAOKU, R.; NISHIMURA, E.; UCHIBOR, E. et al. A tetrazolium-based colorimetric assay for metabolic activity of stored blood platelets. **Thromb Res**, 109:307-14, 2003.

MATSUBAYASHI, H.; WEIDNER, J.; MIRAGLIA, C.C.; MCINTYRE, J.A. Platelet membrane early activation markers during prolonged storage. **Thromb Res**, 93(4):151-60, 1999.

MELARAGNO, A.J.; CARCIERO, R.; FEINGOLD, H.; TALARICO, L.; WEINTRAUB, L.; VALERI, C.R. Cryopreservation of human platelets using 6% dimethyl sulfoxide and storage at -80°C. Effects of 2 years of frozen storage at -80°C and transportation in dry ice. **Vox Sang**, 49(4):245-58, 1985.

METCALFE, P.; WILLIAMSON, L.M.; REUTELINGSPERGER, C.P.; SWANN, I.; OUWEHAND, W.H.; GOODALL, A.H. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric study of different production methods. **Br J Haematol**, 98(1):86-95, 1997.

MICHELSON, A.D. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. **Blood**, 87(12):4925-36, 1996.

MICHELSON, A.D.; BARNARD, M.R.; HECHTMAN, H.B.; MACGREGOR, H.; CONNOLLY, R.J.; LOSCALZO, J. et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface p-selectin but continue to circulate and function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93(21):11877-82, 1996.

MOROFF, G.; EICH, J.; DABAY, M. Validation of use of the Nageotte hemocytometer to count low levels of white cells in white cell-reduced platelet components. **Transfusion**, 34:35-38, 1994.

MULDER, P.O.; MAAS, A.; DE VRIES, E.G.; ORIE, J.L.; SLEIJFER, D.T.; SMIT SIBINGA, C.T. et al. Bleeding prophylaxis in autologous bone marrow transplantation for solid tumors. Comparison of cryopreserved autologous and fresh allogeneic single-donor platelets. **Haemostasis**, 19(2):120-4, 1989.

MURPHY, S. What's so bad about old platelets? **Transfusion**, 42(7):809-11, 2002.

MURPHY, S.; GARDNER, F.H. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability- deleterious effect of refrigerated storage. **N Engl J Med**, 280(20):1094-8, 1969.

MURPHY, S.; SAYAR, S.N.; GARDNER, F.H. Storage of platelet concentrates at 22°C. **Blood**, 35(4):549-57, 1970.

MURPHY, S.; SAYAR, S.N.; ABDOU, N.L.; GARDNER, F.H. Platelet preservation by freezing. Use of dimethylsulfoxide as cryoprotective agent. **Transfusion**, 4(2):139-44, 1974.

MURPHY, S.; KAHN, R.A.; HOLME, S.; PHILLIPS, G.L.; SHERWOOD, W.; DAVISSON, W. et al. Improved storage of platelets for transfusion in a new container. **Blood**, 60(1):194-200, 1982.

NESS, P.M.; CAMPBELL-LEE, S.A. Single donor versus pooled random donor platelet concentrates. **Curr Opin Hematol**, 8(6):392-6, 2001.

NORFOLK, D.R.; ANCLIFFE, P.J.; CONTRERAS, M.; HUNT, B.J.; MACHIN, S.J.; MURPHY, W.G. et al. Consensus Conference on Platelet Transfusion, Royal College of Physicians of Edinburgh, 27-28 November 1997. Synopsis of background papers. **Br J Haematol**, 101(4):609-17, 1998.

NURDEN, P. Bidirectional trafficking of membrane glycoproteins following platelet activation in suspension. **Thromb Haemost**, 78(5):1305-15, 1997.

PARISE, L.V.; SMYTH, S.S.; COLLIER, B.S. Platelet morphology, biochemistry, and function. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U. **Williams Hematology**. Sixth Edition. United States of America: McGraw Hill, 2001. p. 1357-1408.

PEDRAZZOLI, P.; NORIS, P.; PEROTTI, C.; SCHIAVO, R.; PONCHIO, L.; BELLETTI, S. et al. Transfusion of platelet concentrates cryopreserved with ThromboSol plus low-dose dimethylsulphoxide in patients with severe thrombocytopenia: a pilot study. **Br J Haematol**, 108(3):653-9, 2000.

PERSEGHIN, P.; DASSI, M. Safety and usefulness of autologous cryopreserved platelets. **Lancet**, 360(9349):1985-6, 2002.

PRIBLUDA, V.; ROTMAN, A. Dynamics of membrane-cytoskeleton interactions in activated blood platelets. **Biochemistry**, 21(12):2825-32, 1982.

PUNSALANG, A.; HEAL, J.M.; MURPHY, P.J. Growth of gram-positive and gram-negative bacteria in platelet concentrates. **Transfusion**, 29(7):596-9, 1989.

REDMOND III, J.; BOLIN, R.B.; CHENEY, B.A. Glycerol-glucose cryopreservation of platelets. In vivo and in vitro observations. **Transfusion**, 23(3):213-4, 1983.

REED, G.L.; FITZGERALD, M.L.; POLGAR, J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. **Blood**, 96(10):3334-42, 2000.

REID, T.J.; ESTEBAN, G.; CLEAR, M.; GOROGIAS, M. Platelet membrane integrity during storage and activation. **Transfusion**, 39(6):616-24, 1999.

REID, T.J.; LARUSSA, V.F.; ESTEBAN, G.; CLEAR, M.; DAVIES, L.; SHEA, S. et al. Cooling and freezing damage platelet membrane integrity. **Cryobiology**, 38(3):209-24, 1999.

REMALEY, A.T.; KENNEDY, J.M.; LAPOSATA, M. Evaluation of the clinical utility of platelet aggregation studies. **Am J Hematol**, 31(3):188-93, 1989.

RINDER, H.M.; MURPHY, M.; MITCHELL, J.G.; STOCKS, J.; AULT, K.A.; HILLMAN, R.S. Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. **Transfusion**, 31(5):409-14, 1991.

RINDER, H.M.; SNYDER, E.L.; BONAN, J.L.; NAPYCHANK, P.A.; MALKUS, H.; SMITH, B.R. Activation in stored platelet concentrates: correlation between membrane expression of P-selectin, glycoprotein IIb/IIIa, and beta-thromboglobulin release. **Transfusion**, 33(1):25-9, 1993.

RINDER, H.M.; AULT, K.A. Platelet activation and its detection during the preparation of platelets for transfusion. **Transf Med Rev**, 12(4):271-87, 1998.

ROCK, G. Apheresis: four decades of practice. **Vox Sang**, 83(Suppl 1):45-7, 2002.

ROTHWELL, S.W.; MAGLASANG, P.; REID, T.J.; GOROGIAS, M.; KRISHNAMURTI, C. Correlation of in vivo and in vitro functions of fresh and stored human platelets. **Transfusion**, 40(8):988-93, 2000.

SCHIFFER, C.A.; AISNER, J.; WIERNIK, P.H. Clinical experience with transfusion of cryopreserved platelets. **Br J Haematol**, 34(3):377-85, 1976.

SCHIFFER, C.A.; BUCHHOLZ, D.H.; AISNER, J.; WOLFF, J.H.; WIERNIK, P.H. Frozen autologous platelets in the supportive care of patients with leukemia. **Transfusion**, 16(4):321-9, 1976.

SCHIFFER, C.A.; AISNER, J.; WIERNIK, P.H. Frozen autologous platelet transfusion for patients with leukemia. **N Engl J Med**, 299(1):7-12, 1978.

SCHMITZ, G.; ROTHE, G.; RUF, A.; BARLAGE, S.; TSCHOPE, D.; CLEMETSON, K.J. et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. **Thromb Haemost**, 79(5):885-96, 1998.

SCRUTTON, M.C.; CLARE, K.A.; HUTTON, R.A.; BRUCKDORFER, K.R. Depressed responsiveness to adrenaline in platelets from apparently normal human donors: a familial trait. **Br J Haematol**, 49(2):303-14, 1981.

SHAPIRA, S.; FRIEDMAN, Z.; SHAPIRO, H.; PRESSEIZEN, K.; RADNAY, J.; ELLIS, M.H. The effect of storage on the expression of platelet membrane phosphatidylserine and the subsequent impact on the coagulant function of stored platelets. **Transfusion**, 40(10):1257-63, 2000.

SHEPHERD, K.M.; SAGE, R.E.; BARBER, S.; O'BRIEN, E. Platelet cryopreservation. 1. In vitro aggregation studies. **Cryobiology**, 21(1):39-43, 1984.

SHEU, J.R.; HSIAO, G.; SHEN, M.Y.; FONG, T.H.; CHEN, Y.W.; LIN, C.H. et al. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of magnesium in human platelets. **Br J Haematol**, 119(4):1033-41, 2002.

SIMON, T.L.; NELSON, E.J.; MURPHY, S. Extension of platelet concentrate storage to 7 days in second-generation bags. **Transfusion**, 27(1):6-9, 1987.

SNYDER, L; CHAMPNESS, W. **Molecular genetics of bacteria**. Washington, DC: ASM Press, 1997. p. 1-10.

SPECTOR, J.I.; SKRABUT, E.M.; VALERI, C.R. Oxygen consumption, platelet aggregation and release reactions in platelets freeze-preserved with dimethylsulfoxide. **Transfusion**, 17(2):99-109, 1977.

SPECTOR, J.I.; YARMALA, J.A.; MARCHIONNI, L.D.; EMERSON, C.P.; VALERI, C.R. Viability and function of platelets frozen at 2 to 3°C per minute with 4 or 5 % DMSO and stored at -80°C for 8 months. **Transfusion**, 17(1):8-15, 1977.

STOHLAWETZ, P.; HORVATH, M.; PERNERSTORFER, T.; NGUYEN, H.; VONDROVEC, B.; ROBISCH, A. et al. Effects of nitric oxide on platelet activation during plateletpheresis and in vivo tracking of biotinylated platelets in humans. **Transfusion**, 39(5):506-14, 1999.

SURGENOR, D.M.; WALLACE, E.L.; HAO, S.H.; CHAPMAN, R.H. Collection and transfusion of blood in the United States, 1982-1988. **N Engl J Med**, 322(23):1646-51, 1990.

TABLIN, F.; WOLKERS, W.F.; WALKER, N.J.; OLIVER, A.E; TSVETKOVA, N.M.; GOUSSET, K. et al. Membrane reorganization during chilling: implications for long-term stabilization of platelets. **Cryobiology**, 43(2):114-23, 2001.

TAYLOR, M.A. Cryopreservation of platelets: an in-vitro comparison of four methods. **J Clin Pathol**, 34(1):71-5, 1981.

TORRETTA, L.; PEROTTI, C.; PEDRAZZOLI, P.; DORNINI, G.; VIARENGO, G.; LIVRAGHI, A. et al. Autologous platelet collection and storage to support thrombocytopenia in patients undergoing high-dose chemotherapy and circulating progenitor cell transplantation for high-risk breast cancer. **Vox Sang**, 75(3):224-9, 1998.

VADHAN-RAJ, S.; CURRIE, L.M.; BUESO-RAMOS, C.; LIVESEY, S.A.; CONNOR, J. Enhanced retention of in vitro functional activity of platelets from recombinant human thrombopoietin-treated patients following long-term cryopreservation with a platelet-preserving solution (ThromboSol) and 2% DMSO. **Br J Haematol**, 104(2):403-11, 1999.

VADHAN-RAJ, S.; KAVANAGH, J.J.; FREEDMAN, R.S.; FOLLODER, J.; CURRIE, L.M.; BUESO-RAMOS, C. et al. Safety and efficacy of transfusions of autologous cryopreserved platelets derived from recombinant human thrombopoietin to support chemotherapy-associated severe thrombocytopenia: a randomised cross-over study. **Lancet**, 359(9324):2145-52, 2002.

VALBONESI, A.M.; FLORIO, G.; VENTURINO, V.; BRUNI, R. Plateletpheresis: what's new? **Transfus Sci**, 17(4):537-44, 1996.

VALBONESI, M.; BRUNI, R.; FLORIO, G.; DE LUIGI, M.C.; FABI, L. Dry platelets with the Dideco Excel apparatus. **Transfus Sci**, 20(2):101-6, 1999.

VALERI, C.R. Hemostatic effectiveness of liquid-preserved and previously frozen human platelets. **N Engl J Med**, 290(7):353-8, 1974.

VALERI, C.R.; FEINGOLD, H.; MARCHIONNI, L.D. A simple method for freezing human platelets using 6 per cent dimethylsulfoxide and storage at -80 degrees C. **Blood**, 43(1):131-6, 1974.

VALERI, C.R.; CASSIDY, G.; PIVACEK, L.E.; RAGNO, G.; LIEBERTHAL, W.; CROWLEY, J.P. et al. Anemia-induced increase in the bleeding time: implications for treatment of nonsurgical blood loss. **Transfusion**, 41(8):977-83, 2001.

VALERI, C.R.; GIORGIO, A.; MaCGREGOR, H.; RAGNO, G. Circulation and distribution of autotransfused fresh, liquid-preserved and cryopreserved baboon platelets. **Vox Sang**, 83:347-51, 2002.

VALERI, C.R.; MaCGREGOR, H.; GIORGIO, A.; RAGNO, G. Circulation and distribution of autotransfused fresh, liquid-preserved and cryopreserved baboon platelets transfused to correct an aspirin-induced thrombocytopathy. **Transfusion**, 42(9):1206-16, 2002.

VALERI, C.R.; SREY, R.; LANE, J.P.; RAGNO, G. Effect of WBC reduction and storage temperature on PLTs frozen with 6 percent DMSO for as long as 3 years. **Transfusion**, 43(8):1162-7, 2003.

VAN IMHOFF, G.W.; ARNAUD, F.; POSTMUS, P.E.; MULDER, N.H.; DAS, P.C.; SMIT SIBINGA, C.T. Autologous cryopreserved platelets and prophylaxis of bleeding in autologous bone marrow transplantation. **Blut**, 47(4):203-9, 1983.

VAN PROOIJEN, H.C.; VAN HEUGTEN, J.G.; MOMMERSTEEG, M.E.; AKKERMAN, J.W.N. Acquired secretion defect in platelets after cryopreservation in dimethyl sulfoxide. **Transfusion**, 26(4):358-36, 1986.

VAN ZANTEN, G.H.; HEIJNEN, H.F.; WU, Y.; SCHUT-HESE, K.M.; SLOOTWEG, P.J.; DE GROOT, P.G. et al. A fifty percent reduction of platelet surface glycoprotein Ib does not affect platelet adhesion under flow conditions. **Blood**, 91(7):2353-9, 1998.

VOSTAL, J.G.; REID, T.J.; MONDORO, T.H. Summary of a workshop on in vivo efficacy of transfused platelet components and platelet substitutes. **Transfusion**, 40(6):742-50, 2000.

WHITE, J.G. Anatomy and structural organization of the platelet. In: COLMAN, R.W.; HIRSH, J.; MARDER, V.J.; SALZMAN, E.W. **Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice**. Third Edition. Philadelphia: Lippincott Company, 1994. p.397-413.

WHITE, M.M.; JENNINGS, L.K. **Platelet Protocols Research and Clinical Laboratory Procedures**, San Diego, Academic Press, 1999, pp.39-55.

WILLIAMSON, L.M. How should the safety and efficacy of platelet transfusions be assured? **Blood Rev**, 12(4):203-14; 1998.

WINOKUR, R.; HARTWIG, J.H. Mechanism of shape change in chilled human platelets. **Blood**, 85(7):1796-804, 1995.

WOLF, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **Br J Haematol**, 13(3):269-88, 1967.

XIAO, H.; JEPKORIR, C.J.; HARVEY, K.; REMICK, D.G. Thrombin-induced platelet microparticles improved the aggregability of cryopreserved platelets. **Cryobiology**, 44(2):179-88, 2002.

YELLOWLEES, P.; GREENFIELD, C.; MCINTYRE, N. Dimethylsulphoxide-induced toxicity. **Lancet**, 2(8202):1004-6, 1980.

ZWAAL, R.F.; SCHROIT, A.J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. **Blood**, 89(4):1121-32, 1997.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas "secas"

	Data	Identificação	Vol. ^o (ml)	Plaq. ^b 10 ³ /μl	Plaq. ^b 10 ¹¹ /U ^f	Leuc. ^c 10 ⁶ /U ^f	VPM (fl)	pH	DHL (U/l)	Glic. ^d (g/dl)
1	13/8/2002	0102225-027	22	14260	3,14	NR ^a	7,6	6,57	537	254
2	20/8/2002	0102232-029	17	17380	2,95	0,05	6,1	6,74	1518	265
3	27/8/2002	0102239-012	18	10740	1,93	0,003	7,9	6,93	618	264
4	10/9/2002	0102253-016	13	16140	2,1	0,002	6,6	6,41	1373	191
5	10/9/2002	0102253-047	21	11480	2,41	0,004	6	6,89	426	259
6	17/9/2002	0102260-009	19	7220	1,37	0,012	6,8	7,23	713	216
7	24/9/2002	0102267-025	19	5280	1	0,003	7,1	7,01	1147	245
8	1/10/2002	0102274-021	20	11460	2,29	0,01	7,6	7,2	565	250
9	8/10/2002	0102281-006	22	11700	2,57	0,06	7,8	6,82	1361	224
10	23/10/2002	0102295-046	27	5290	1,43	0,05	7,7	7,68	464	454
11	29/10/2002	0102302-009	20	11740	2,35	0,01	6,6	7,34	641	243
12	5/11/2002	0102309-013	27	7170	1,94	0,01	5,9	7,32	1174	228
13	12/11/2002	0102316-007	17	12460	2,11	0,01	6,9	6,9	1020	231
14	18/11/2002	0102323-008	16	6060	0,96	0,01	6,9	7,23	1338	248
15	26/11/2002	0102330-044	17	5760	0,97	0,01	6,5	7,39	570	236
16	3/12/2002	0102337-022	15	10280	1,54	0,005	6,3	6,82	857	159
17	10/12/2002	0102344-016	17	7400	1,26	0,01	6,2	7,11	433	366
18	17/12/2002	0102351-010	27	2505	0,68	0,01	6,8	7,49	665	263
19	17/12/2002	0102351-034	17	11820	2,01	0,01	6,2	7,02	1493	186
20	21/1/2003	0103021-035	18	11300	2,03	0,04	7,1	6,71	950	238

21	28/1/2003	0103028-022	14	7080	0,99	0,01	7,3	7,17	1918	181
22	4/2/2003	0103035-040	17	12820	2,18	0,05	7,9	6,78	482	224
23	4/2/2003	0103035-019	17	5140	0,87	0,032	5,8	7,38	1122	252
24	11/2/2003	0103042-010	17	12020	2,04	0,017	7,4	6,71	694	171
25	18/2/2003	0103049-016	19	11080	2,1	0,038	8,8	6,82	1770	179
26	25/2/2003	0103056-019	18	6620	1,19	0,001	6,6	7,33	575	239
27	18/3/2003	0103077-046	17	10420	1,77	0,017	6,3	6,98	507	227
28	18/3/2003	0103077-034	17	3515	0,6	0,004	5,9	7,38	440	245
		média	18,8	9505	1,74	0,017	6,8	7,04	906,1	240,6
		mediana	17,5	10580	1,85	0,04	6,8	7,01	703,5	238,5

a. NR, não realizado; b. Plaq., plaquetas; c. leuc., leucócitos; d. Glic., glicose; e. Vol. volume; f. U, Unidade

ANEXO 1. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas "secas"

Data	Identificação	GPIIb (CD41)		GPIb (CD42b)		(CD62p)		Anex.V ^b		ADP		Adren. ^c		Colág. ^d		Ác.Araq. ^e	
		%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f
1	13/8/2002	0102225-027	97,51	236,34	97,58	118,6	27	37,16	21,07	110	18,2	113,2	113,2	113,2	113,2	113,2	113,2
2	20/8/2002	0102232-029	95,31	145,58	97,32	91,92	25,37	21,15	35,92	0	2,7	124,1	78,2	78,2	78,2	78,2	78,2
3	27/8/2002	0102239-012	96,02	458,33	97,24	135,12	19,96	31,52	19,52	31,8	11,8	104,5	NR	NR	NR	NR	NR
4	10/9/2002	0102253-016	97,76	294,09	97,32	121,59	24,87	37,82	35,33	37,7	29,1	114,5	114,5	114,5	114,5	114,5	114,5
5	10/9/2002	0102253-047	96,56	274,29	97,21	146,7	16,9	34,03	42,94	21,4	91,4	105	89,1	89,1	89,1	89,1	89,1
6	17/9/2002	0102260-009	98,79	314,19	98,31	178,71	17,77	35,11	28,76	37,3	40,5	130	124,1	124,1	124,1	124,1	124,1
7	24/9/2002	0102267-025	97,24	439,95	96,46	111,59	37,36	42,79	29,45	26,8	35	103,2	NR	NR	NR	NR	NR
8	1/10/2002	0102274-021	98,95	229,89	94,51	61,78	14,96	25,4	25,24	76,4	110,5	NR ^a	NR ^a	NR ^a	NR ^a	NR ^a	NR ^a
9	8/10/2002	0102281-006	97,54	271,84	94,16	98,93	32,23	26,5	14,84	80,5	138,2	144,5	143,2	143,2	143,2	143,2	143,2
10	23/10/2002	0102295-046	98,57	359,08	95,86	210,94	7	33,02	30,36	41,4	6,8	113,2	102,3	102,3	102,3	102,3	102,3
11	29/10/2002	0102302-009	98,93	300,23	98,56	148,15	16,22	38	31,49	39,1	41,8	133,2	136,4	136,4	136,4	136,4	136,4
12	5/11/2002	0102309-013	99,04	405,09	96,42	204,99	26,12	36,67	22,51	60	29,5	112,7	105	105	105	105	105
13	12/11/2002	0102316-007	98,65	369,68	98,37	153,07	11,24	34,12	38,64	75,5	104,5	120	116,5	116,5	116,5	116,5	116,5
14	18/11/2002	0102323-008	97,57	269,04	97,75	145,97	12,54	31,5	11,02	51,4	40,9	110	107,7	107,7	107,7	107,7	107,7
15	26/11/2002	0102330-044	98,3	210,43	97,99	91,18	12,25	20,09	24,67	94,1	103,2	105	104,1	104,1	104,1	104,1	104,1
16	3/12/2002	0102337-022	93,93	218,24	97,38	146,41	24,22	33,41	37,54	39,1	24,5	110,9	106,4	106,4	106,4	106,4	106,4
17	10/12/2002	0102344-016	98,11	249,11	97,7	125,7	10,36	25,02	35,86	77,3	24,5	108,2	107,3	107,3	107,3	107,3	107,3
18	17/12/2002	0102351-010	97,7	297,62	96	177,86	24,57	31,54	28,1	46,4	9,1	96,4	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
19	17/12/2002	0102351-034	97,99	262,64	96,26	117,01	36,2	34,05	73,15	105	106,8	114,1	103,2	103,2	103,2	103,2	103,2
20	21/1/2003	0103021-035	96,47	200,33	95,91	87,55	16,32	21,78	27,84	96,8	9,1	99,1	98,6	98,6	98,6	98,6	98,6

21	28/1/2003	0103028-022	98,98	168,36	98,36	62,71	23,54	21,1	7,1	93,6	13,2	62,7	98,2
22	4/2/2003	0103035-040	98,29	173,36	95,87	83,21	31,66	22,72	33,12	39,1	10,5	86,8	36,8
23	4/2/2003	0103035-019	97,69	159,34	98,18	76,66	12,27	16,24	34,71	85,5	6,4	106,8	106,8
24	11/2/2003	0103042-010	94,51	297,55	96,17	114,87	19,59	33,67	44,04	106,4	114,5	118,2	135,9
25	18/2/2003	0103049-016	98,72	204,43	96,13	81,86	22,99	23,89	29,76	86,4	17,7	116,8	117,3
26	25/2/2003	0103056-019	98,47	290,58	99,3	156,41	12,43	28,3	35,38	90,9	6,8	93,6	93,6
27	18/3/2003	0103077-046	99,02	254,98	95,99	82,84	20,23	30,32	33,52	80	6,4	98,2	77,7
28	18/3/2003	0103077-034	98,72	304,03	97,31	82,59	12,45	25,73	38,57	98,2	78,6	108,6	75
		média	97,69	273,52	96,98	121,96	20,30	29,74	31,08	65,3	44	109,4	99,9
		mediana	98,05	270,5	97,28	117,8	19,7	31,5	30,9	76	26,8	110	105,7

a. NR, não realizado; b. Anex. V, Anexina V; c. Adren., Adrenalina; d. Colág., Colágeno; e. Ác. Araq., Ácido Araquidônico;

f. IMF, Intensidade Média de Fluorescência

ANEXO 2. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas "secas" grupo ThromboSol

Data	Identificação	Vol. ^e (ml)	Pla ^a . 10 ³ /μl	Pla ^a . 10 ¹¹ /U ^f	Leuc. ^c 10 ⁶ /U ^f	VPM (fl)	pH	DHL (U/l)	Glic. ^d (g/dl)
1 13/8/2002	0102225-027	22	14260	3,14	NR	7,6	6,57	537	254
2 20/8/2002	0102232-029	17	17380	2,95	0,05	6,1	6,74	1518	265
3 27/8/2002	0102239-012	18	10740	1,93	0,003	7,9	6,93	618	264
4 10/9/2002	0102253-016	13	16140	2,1	0,002	6,6	6,41	1373	191
5 10/9/2002	0102253-047	21	11480	2,41	0,004	6	6,89	426	259
6 17/9/2002	0102260-009	19	7220	1,37	0,012	6,8	7,23	713	216
7 24/9/2002	0102267-025	19	5280	1	0,003	7,1	7,01	1147	245
8 1/10/2002	0102274-021	20	11460	2,29	0,01	7,6	7,2	565	250
9 8/10/2002	0102281-006	22	11700	2,57	0,06	7,8	6,82	1361	224
10 23/10/2002	0102295-046	27	5290	1,43	0,05	7,7	7,68	464	454
11 29/10/2002	0102302-009	20	11740	2,35	0,01	6,6	7,34	641	243
12 5/11/2002	0102309-013	27	7170	1,94	0,01	5,9	7,32	1174	228
13 12/11/2002	0102316-007	17	12460	2,11	0,01	6,9	6,9	1020	231
14 18/11/2002	0102323-008	16	6060	0,96	0,01	6,9	7,23	1338	248
média		19,79	10598,5	2,04	0,01	6,96	7,02	921,07	255,14
mediana		19,5	11470	2,02	0,01	6,9	6,97	866,5	246,5

a. NR, não realizado; b. Pla^a., Plaquetas; c. Leuc., Leucócitos; d. Glic., Glucose; e. Vol. Volume; f. U, Unidade

ANEXO 2. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas "secas" grupo ThromboSol

Data	Identificação	GPIIb (CD41)		GPIb (CD42b)		(CD62p)		Anex.V ^b		ADP		Adren. ^c		Colág. ^d		Ac.Araq. ^e	
		%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f
1	13/8/2002	0102225-027	97,51	236,34	97,58	118,6	27	37,16	21,07	110	18,2	113,2	113,2	113,2	113,2	113,2	113,2
2	20/8/2002	0102232-029	95,31	145,58	97,32	91,92	25,37	21,15	35,92	0	2,7	124,1	78,2	78,2	78,2	78,2	78,2
3	27/8/2002	0102239-012	96,02	458,33	97,24	135,12	19,96	31,52	19,52	31,8	11,8	104,5	NR	NR	NR	NR	NR
4	10/9/2002	0102253-016	97,76	294,09	97,32	121,59	24,87	37,82	35,33	37,7	29,1	114,5	114,5	114,5	114,5	114,5	114,5
5	10/9/2002	0102253-047	96,56	274,29	97,21	146,7	16,9	34,03	42,94	21,4	91,4	105	89,1	89,1	89,1	89,1	89,1
6	17/9/2002	0102260-009	98,79	314,19	98,31	178,71	17,77	35,11	28,76	37,3	40,5	130	124,1	124,1	124,1	124,1	124,1
7	24/9/2002	0102267-025	97,24	439,95	96,46	111,59	37,36	42,79	29,45	26,8	35	103,2	NR ^a	NR ^a	NR ^a	NR ^a	NR ^a
8	1/10/2002	0102274-021	98,95	229,89	94,51	61,78	14,96	25,4	25,24	76,4	110,5	NR ^a	NR ^a	NR ^a	NR ^a	NR ^a	NR ^a
9	8/10/2002	0102281-006	97,54	271,84	94,16	98,93	32,23	26,5	14,84	80,5	138,2	144,5	143,2	143,2	143,2	143,2	143,2
10	23/10/2002	0102295-046	98,57	359,08	95,86	210,94	7	33,02	30,36	41,4	6,8	113,2	102,3	102,3	102,3	102,3	102,3
11	29/10/2002	0102302-009	98,93	300,23	98,56	148,15	16,22	38	31,49	39,1	41,8	133,2	136,4	136,4	136,4	136,4	136,4
12	5/11/2002	0102309-013	99,04	405,09	96,42	204,99	26,12	36,67	22,51	60	29,5	112,7	105	105	105	105	105
13	12/11/2002	0102316-007	98,65	369,68	98,37	153,07	11,24	34,12	38,64	75,5	104,5	120	116,5	116,5	116,5	116,5	116,5
14	18/11/2002	0102323-008	97,57	269,04	97,75	145,97	12,54	31,5	11,02	51,4	40,9	110	107,7	107,7	107,7	107,7	107,7
média			97,75	311,97	96,93	137,72	20,68	33,21	27,65	53,02	53,71	117,55	111,84	111,84	111,84	111,84	111,84
mediana			97,66	297,16	97,28	140,5	18,86	34,75	29,1	41,4	40,5	113,2	113,2	113,2	113,2	113,2	113,2

a. NR, não realizado; b. Anex. V, Anexina V; c. Adren., Adrenalina; d. Colág., Colágeno; e. Ác. Araq., Ácido Araquidônico; f. IMF, Intensidade Média de Fluorescência

ANEXO 3. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas "secas" grupo DMSO 5%

Data	Identificação	Vol. ^a (ml)	Plaq. ^b 10 ³ /μl	Plaq. ^b 10 ¹¹ /U ^f	Leuc. ^c 10 ⁶ /U ^f	VPM (fl)	pH	DHL (U/l)	Glic. ^d (g/dl)
15 26/11/2002	0102330-044	17	5760	0,97	0,01	6,5	7,39	570	236
16 3/12/2002	0102337-022	15	10280	1,54	0,005	6,3	6,82	857	159
17 10/12/2002	0102344-016	17	7400	1,26	0,01	6,2	7,11	433	366
18 17/12/2002	0102351-010	27	2505	0,68	0,01	6,8	7,49	665	263
19 17/12/2002	0102351-034	17	11820	2,01	0,01	6,2	7,02	1493	186
20 21/1/2003	0103021-035	18	11300	2,03	0,04	7,1	6,71	950	238
21 28/1/2003	0103028-022	14	7080	0,99	0,01	7,3	7,17	1918	181
22 4/2/2003	0103035-040	17	12820	2,18	0,05	7,9	6,78	482	224
23 4/2/2003	0103035-019	17	5140	0,87	0,032	5,8	7,38	1122	252
24 11/2/2003	0103042-010	17	12020	2,04	0,017	7,4	6,71	694	171
25 18/2/2003	0103049-016	19	11080	2,1	0,038	8,8	6,82	1770	179
26 25/2/2003	0103056-019	18	6620	1,19	0,001	6,6	7,33	575	239
27 18/3/2003	0103077-046	17	10420	1,77	0,017	6,3	6,98	507	227
28 18/3/2003	0103077-034	17	3515	0,6	0,004	5,9	7,38	440	245
	média	17,1	8411,4	1,45	0,018	6,79	7,08	891,1	226,1
	mediana	17	8840	1,25	0,01	6,55	7,06	679,5	231,5

a. NR, não realizado; b. Plaq., plaquetas; c. Leuc., leucócitos; d. Glic., glicose; e. Vol. volume; f. U, Unidade

ANEXO 3. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas "secas" grupo DMSO 5%

Data	Identificação	GPIIb (CD41)		GPIb (CD42b)		(CD62p)		Anex.V ^b		ADP		Adren. ^c Colág. ^d Ác.Araq. ^e	
		%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f
15	26/11/2002	0102330-044	98,3	210,43	97,99	91,18	12,25	20,09	24,67	94,1	103,2	105	104,1
16	3/12/2002	0102337-022	93,93	218,24	97,38	146,41	24,22	33,41	37,54	39,1	24,5	110,9	106,4
17	10/12/2002	0102344-016	98,11	249,11	97,7	125,7	10,36	25,02	35,86	77,3	24,5	108,2	107,3
18	17/12/2002	0102351-010	97,7	297,62	96	177,86	24,57	31,54	28,1	46,4	9,1	96,4	7,7
19	17/12/2002	0102351-034	97,99	262,64	96,26	117,01	36,2	34,05	73,15	105	106,8	114,1	103,2
20	21/1/2003	0103021-035	96,47	200,33	95,91	87,55	16,32	21,78	27,84	96,8	9,1	99,1	98,6
21	28/1/2003	0103028-022	98,98	168,36	98,36	62,71	23,54	21,1	7,1	93,6	13,2	62,7	98,2
22	4/2/2003	0103035-040	98,29	173,36	95,87	83,21	31,66	22,72	33,12	39,1	10,5	86,8	36,8
23	4/2/2003	0103035-019	97,69	159,34	98,18	76,66	12,27	16,24	34,71	85,5	6,4	106,8	106,8
24	11/2/2003	0103042-010	94,51	297,55	96,17	114,87	19,59	33,67	44,04	106,4	114,5	118,2	135,9
25	18/2/2003	0103049-016	98,72	204,43	96,13	81,86	22,99	23,89	29,76	86,4	17,7	116,8	117,3
26	25/2/2003	0103056-019	98,47	290,58	99,3	156,41	12,43	28,3	35,38	90,9	6,8	93,6	93,6
27	18/3/2003	0103077-046	99,02	254,98	95,99	82,84	20,23	30,32	33,52	80	6,4	98,2	77,7
28	18/3/2003	0103077-034	98,72	304,03	97,31	82,59	12,45	25,73	38,57	98,2	78,6	108,6	75
	média		97,64	235,07	97,04	106,20	19,93	26,28	34,53	81,34	37,95	101,81	90,61
	mediana		98,2	233,67	96,78	89,36	19,91	25,37	34,11	88,65	15,45	105,9	100,9

a. NR, não realizado; b. Anex. V, Anexina V; c. Adren., Adrenalina; d. Colág., Colágeno; e. Ác. Araq., Ácido Araquidônico;

f. IMF, Intensidade Média de fluorescência

ANEXO 4. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas convencionais

Data	Identificação	Vol. ^e (ml)	Plaq. ^b 10 ³ /μl	Plaq. ^b 10 ¹¹ /U ^f Leuc. ^c 10 ⁹ /U ^f	VPM (fl)	pH	DHL (U/l)	Glic. ^d (g/dl)
1 13/8/2002	0102225-027	260	920	2,39	NR ^a	6,8	7,26	262
2 20/8/2002	0102232-029	261	1728	4,51	0,42	6	7,29	324
3 27/8/2002	0102239-012	252	927	2,34	0,05	7,4	7,31	232
4 10/9/2002	0102253-016	258	1086	2,8	0,05	6,4	7,23	254
5 10/9/2002	0102253-047	300	968	2,9	0,03	6,1	7,04	239
6 17/9/2002	0102260-009	226	1234	2,79	0,01	7,1	7,38	346
7 24/9/2002	0102267-025	236	689	1,63	0,01	6,5	7,13	252
8 1/10/2002	0102274-021	235	1410	3,31	0,01	7,4	7,11	274
9 8/10/2002	0102281-006	208	1662	3,46	0,02	7,9	7,15	413
10 23/10/2002	0102295-046	203	921	1,87	1,06	8	7,42	391
11 29/10/2002	0102302-009	226	1220	2,76	0,01	6,6	7,45	212
12 5/11/2002	0102309-013	268	712	1,91	0,01	6,4	7,39	284
13 12/11/2002	0102316-007	285	1184	3,37	0,01	7,5	7,35	419
14 18/11/2002	0102323-008	223	410	0,91	0,01	5,9	7,38	331
15 26/11/2002	0102330-044	257	531	1,36	0,01	6,8	7,37	244
16 3/12/2002	0102337-022	235	644	1,51	0,01	6,6	7,39	320
17 10/12/2002	0102344-016	239	649	1,55	0,01	6,7	7,36	235
18 17/12/2002	0102351-010	301	801	2,41	0,03	7,7	7,38	256
19 17/12/2002	0102351-034	234	1218	2,85	0,01	6,2	7,41	339
20 21/1/2003	0103021-035	255	960	2,44	0,1	7,1	7,43	461
								235

21	28/1/2003	0103028-022	210	940	1,97	0,01	7,8	7,27	243	264
22	4/2/2003	0103035-040	246	1170	2,88	0,02	7,6	7,23	225	261
23	4/2/2003	0103035-019	270	492	1,33	0,01	6	7,36	227	315
24	11/2/2003	0103042-010	248	1140	2,83	0,02	7,3	7,33	297	260
25	18/2/2003	0103049-016	244	1130	2,76	0,02	9,5	7,32	385	267
26	25/2/2003	0103056-019	263	801	2,11	0,03	6,7	7,51	220	269
27	18/3/2003	0103077-046	212	1276	2,71	0,01	6,3	7,2	287	280
28	18/3/2003	0103077-034	272	461	1,25	0,01	6,2	7,33	281	287
		média	247,4	974,4	2,39	0,074	6,95	7,31	294,7	284,5
		mediana	247	950	2,42	0,01	6,75	7,34	277	276

a. NR, não realizado; b. Plaq., plaquetas; c. Leuc., leucócitos; d. Glic., glicose; e. Vol., volume; f. U, Unidade

ANEXO 4. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas convencionais

Data	Identificação	GPIIb (CD41)		GPIb (CD42b)		(CD62p)		Anex.V ^b		ADP		Adren. ^c		Colág. ^d		Ac.Ataq. ^e	
		%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	%
1	13/8/2002	0102225-027	96,13	210,32	96,35	128,86	20,11	35,39	21,07	111,8	48,2	105	115,5				
2	20/8/2002	0102232-029	98	151,54	98,5	91,76	15,64	20,79	33,95	5,5	3,2	114,1	110,9				
3	27/8/2002	0102239-012	96,5	441,21	96,32	131,9	13,39	29,06	18,43	76,8	18,6	105,9	NR ^a				
4	10/9/2002	0102253-016	97,13	268,27	97,71	126,01	13,32	33,9	38,65	113,2	115	120,5	115,5				
5	10/9/2002	0102253-047	97,86	250,4	98,45	130,81	13,99	33,5	34,81	96,4	104,1	102,7	97,3				
6	17/9/2002	0102260-009	98,61	336,34	98,19	187,95	12,49	34,41	43,89	64,5	100,9	121,4	118,2				
7	24/9/2002	0102267-025	97,69	408,58	98,23	117,96	15,15	33,2	29,42	103,6	103,6	109,1	NR ^a				
8	1/10/2002	0102274-021	98,69	226,63	96,24	136,76	9,62	21,78	37,32	114,5	111,8	NR ^a	NR ^a				
9	8/10/2002	0102281-006	97,8	287,37	96,03	98,69	23,36	26,79	23,16	65	143,2	154,5	150,9				
10	23/10/2002	0102295-046	98,52	357	98,67	182,36	7,05	37,99	27,51	60,9	10	111,4	108,6				
11	29/10/2002	0102302-009	98,5	299,04	96,91	120,47	11,33	37,09	32,79	65	82,3	130,5	126,8				
12	5/11/2002	0102309-013	99,04	424,62	98,96	188,02	19,31	29,9	19,41	104,5	105,5	97,3	100,9				
13	12/11/2002	0102316-007	98,17	374,15	98,23	151,55	10,64	32,21	27,15	118,6	121,4	123,6	119,5				
14	18/11/2002	0102323-008	97,13	263,93	97,84	113,52	10,04	30,19	13,4	100,5	110,9	116,8	115,9				
15	26/11/2002	0102330-044	98,38	213,99	98,22	91,38	17,23	19,72	27,44	99,5	95,9	107,3	104,5				
16	3/12/2002	0102337-022	95,42	213,66	96,37	143,83	27,57	36,82	36,52	44,5	24,5	110,9	102,3				
17	10/12/2002	0102344-016	97,74	251,16	98,39	117,05	11,47	25,58	40,67	100,9	42,3	108,2	107,3				
18	17/12/2002	0102351-010	97,93	307,21	97,49	195,19	15,46	29,99	34,2	87,3	12,3	95,5	99,5				
19	17/12/2002	0102351-034	89,89	264,67	96,33	117,44	30,95	35,5	70,15	96,8	103,2	111,4	107,7				
20	21/1/2003	0103021-035	96,59	198,94	97,15	93,44	14,84	22,22	14,28	90,5	12,7	89,5	90				

21	28/1/2003	0103028-022	99,27	181,79	97,86	49,9	22,48	22,02	27,95	103,6	103,6	99,1	101,4
22	4/2/2003	0103035-040	96,22	192,41	97,32	96,03	15,35	21,21	36,75	95	2,3	104,5	94,1
23	4/2/2003	0103035-019	96,77	155,24	98,05	69,21	9,77	16,07	37,7	99,1	16,4	105	103,2
24	11/2/2003	0103042-010	95,88	306,24	95,87	122,05	18,82	31,05	42,12	116,8	124,5	125,5	118,6
25	18/2/2003	0103049-016	98,32	205,66	97,64	87,37	18,81	23,36	31,01	108,6	111,8	110,5	116,4
26	25/2/2003	0103056-019	98,83	315,17	99,33	157,38	11,6	27,99	34,3	85,9	11,4	101,4	100
27	18/3/2003	0103077-046	98,23	281,03	91,65	101,56	15,24	28,97	39,22	104,5	107,3	157,3	101,8
28	18/3/2003	0103077-034	98,66	318,24	97,27	90,43	10,57	25,77	40,37	105,9	107,7	107,3	105,5
		média	97,43	275,17	97,34	122,81	15,55	28,66	32,63	90,7	73,38	112,82	109,3
		mediana	97,9	266,47	97,6	119,2	15	29,5	34,1	99,3	102	109,1	107,3

a. NR, não realizado; b. Anex. V, Anexina V; c. Adren., Adrenalina; d. Colág., Colágeno; e. Ác. Araq., Ácido Araquidônico;
f. IMF, Intensidade Média de Fluorescência

ANEXO 5. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas criopreservados grupo ThromboSol

	Data	Identificação	Vol. ^e (ml)	Plaq. ^b 10 ³ /μl	Plaq. ^b 10 ¹¹ /U ^f	VPM (fl)	DHL (U/l)	Glic. ^d (g/dl)
1	13/8/2002	0102225-027	40	5410	1,16	10,2	14886	110
2	20/8/2002	0102232-029	40	6140	2,46	9,1	13627	79
3	27/8/2002	0102239-012	40	3770	1,51	11,3	10032	98
4	10/9/2002	0102253-016	40	3395	1,36	7,6	3894	1
5	10/9/2002	0102253-047	40	4310	1,72	8	6821	2
6	17/9/2002	0102260-009	40	2905	1,16	8,9	5999	94
7	24/9/2002	0102267-025	40	2590	1,04	7,6	5124	107
8	1/10/2002	0102274-021	40	4352	1,74	10,4	2172	121
9	8/10/2002	0102281-006	40	5040	2,02	8,7	1197	48
10	23/10/2002	0102295-046	40	3130	1,25	10,5	6765	290
11	29/10/2002	0102302-009	40	4635	1,85	9,1	13040	111
12	5/11/2002	0102309-013	40	3965	1,59	7,8	7530	142
13	12/11/2002	0102316-007	40	4505	1,8	8,9	13133	180
14	18/11/2002	0102323-008	40	2810	1,12	7,5	9250	82
		média	40	4068,3	1,56	8,97	8105	104,6
		mediana	40	4137,5	1,55	8,9	7175	102,5

a. NR, não realizado; b. Plaq., plaquetas; c. Leuc., leucócitos; d. Glic., glicose; e. Vol., volume; f. U, Unidade

ANEXO 5. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas criopreservados grupo ThromboSol

Data	Identificação	GPIIb (CD41)		GPIb (CD42b)		(CD62p)		Anex. V ^b		ADP		Adren. ^c		Colág. ^d		Ac.Araq. ^e		ADP + Colág.		Adren. ^g		+ Adren. ^h	
		%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f
1	13/8/2002	0102225-027	93,07	196,15	54,96	59,76	46,12	32,3	73,27	16,4	18,2	71,8	22,7	57,7	70								
2	20/8/2002	0102232-029	87,24	693,07	66,45	128,68	63,59	52,7	74,7	10,5	0	27,3	6,4	35	87,3								
3	27/8/2002	0102239-012	92	600,93	55,14	92,22	66,54	50,15	75,72	12,7	16,4	45,9	17,7	43,2	79,1								
4	10/9/2002	0102253-016	93,82	375,3	50,85	32,21	64,51	40,12	73,73	6,8	9,5	10	8,6	6,4	11,4								
5	10/9/2002	0102253-047	91,07	367,11	69,06	48,69	71,01	46,76	72,53	10	10,5	15	13,2	6,8	23,2								
6	17/9/2002	0102260-009	91,81	616,94	57,03	121,84	59,72	46,83	70,85	19,5	25	57,7	28,2	46,4	51,8								
7	24/9/2002	0102267-025	91,93	564,47	54,71	121,16	63,32	43,75	78,54	17,7	25,9	32,7	11,4	19,5	30								
8	1/10/2002	0102274-021	96,12	259,26	40,18	54,28	42,47	34,2	72,67	3,2	9,5	23,6	19,1	13,2	49,1								
9	8/10/2002	0102281-006	93,17	577,69	60,07	64,51	75,23	59,7	85,21	15,9	23,6	40,9	28,6	52,3	87,7								
10	23/10/2002	0102295-046	90,15	564,26	76,13	104,69	58,94	60,89	56,7	20	34,1	67,7	33,2	60,5	118,6								
11	29/10/2002	0102302-009	97,35	736,79	69,58	102,87	72,03	65,9	76,2	14,1	27,7	34,1	16,4	37,7	70,9								
12	5/11/2002	0102309-013	95,98	681,12	77,11	99,78	72,14	60,59	74,12	34,1	31,8	65,5	17,3	68,6	132,7								
13	12/11/2002	0102316-007	93,46	422,23	63,11	100,01	52,53	44,53	51,24	24,5	24,5	58,6	28,2	67,3	89,5								
14	18/11/2002	0102323-008	96,17	638,75	69,62	130,68	60,65	44,49	70,49	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a								
	média		93,10	521,01	61,71	90,10	62,06	48,78	71,86	15,8	19,75	42,37	19,31	39,58	69,33								
	mediana		93,12	571,08	61,59	99,9	63,45	46,8	73,5	15,9	23,6	40,9	17,7	43,2	70,9								

a. NA, não avaliado; b. Anex. V, Anexina V; c. Adren., Adrenalina; d. Colág., Colágeno; e. Ac. Araq., Ácido Araquidônico;

f. IMF, Intensidade Média de Fluorescência; g. ADP + Adren., ADP associado à Adrenalina; h. Colág. + Adren., Colágeno associado à Adrenalina

ANEXO 6. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas criopreservados grupo DMSO 5%

Data	Identificação	Vol. ^e (ml)	Plaq. ^b 10 ³ /μl	Plaq. ^b 10 ¹¹ /U ^f	VPM (fl)	DHL (U/l)	Glic. ^d (g/dl)
15 26/11/2002	0102330-044	40	1925	0,77	8,7	1246	80
16 3/12/2002	0102337-022	40	3000	1,2	9,7	3013	46
17 10/12/2002	0102344-016	40	2505	1	10,7	1382	10
18 17/12/2002	0102351-010	40	1650	0,66	9,6	964	142
19 17/12/2002	0102351-034	40	3590	1,44	9	1127	31
20 21/1/2003	0103021-035	40	4130	1,65	9,6	5192	92
21 28/1/2003	0103028-022	40	2325	0,93	11,1	5042	49
22 4/2/2003	0103035-040	40	3990	1,6	12,4	2463	72
23 4/2/2003	0103035-019	40	2120	0,85	7,7	2310	82
24 11/2/2003	0103042-010	40	3575	1,43	10,3	2460	6
25 18/2/2003	0103049-016	40	3300	1,32	12,9	1955	69
26 25/2/2003	0103056-019	40	2285	0,91	NR ^a	1463	82
27 18/3/2003	0103077-046	40	3380	1,35	9,2	2081	58
28 18/3/2003	0103077-034	40	1350	0,54	8	1453	11
	média	40	2794,64	1,12	9,92	2296,5	59,29
	mediana	40	2752,5	1,1	9,6	2018	63,5

a. NR, não realizado; b. Plaq., Plaquetas; c. Leuc., Leucócitos; d. Glic., Glicose; e. Vol., Volume; f. U, Unidade

ANEXO 6. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas criopreservados grupo DMSO 5%

Data	Identificação	GPIIb (CD41)		GPIb (CD42b)		(CD62p)		Anex. V ^p		ADP		Adren. ^c		Colág. ^d		Ac.Araq. ^e		ADP + Colág.		Adren. ^g		+ Adren. ^h	
		%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	%	IMF ^f
15	26/11/2002	0102330-044	95,99	556,8	83,66	233,34	48,65	40,57	63,26	18,6	31,8	86,8	23,2	79,5	97,3								
16	3/12/2002	0102337-022	94,02	339,82	60,89	122,42	60,64	45,93	54,55	22,3	35	74,5	13,2	64,1	100,5								
17	10/12/2002	0102344-016	92,2	580,21	68,75	183,3	59,89	47,24	55,94	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a								
18	17/12/2002	0102351-010	93,55	527,86	80,96	242,28	70,01	47,59	62,52	2,3	7,7	51,8	4,5	43,6	88,6								
19	17/12/2002	0102351-034	92,72	514,33	67,14	128,17	69,54	44,6	56,58	17,3	47,3	88,6	34,1	NR	NR								
20	21/12/2003	0103021-035	93,05	381,47	82,42	125,6	53,35	42,84	59,81	13,2	18,6	85,9	69,1	78,6	77,3								
21	28/12/2003	0103028-022	92,52	663,02	74,07	174,25	66,03	50,35	78,19	23,2	20,5	65,5	11,4	53,6	74,1								
22	4/2/2003	0103035-040	94,33	581,42	81,37	255,2	59,13	41,95	65,6	10,9	10,5	65,9	21,8	44,1	82,3								
23	4/2/2003	0103035-019	98,16	201,06	55,81	67,81	42,03	25,85	69,85	17,3	22,7	61,4	37,7	48,6	70,5								
24	11/2/2003	0103042-010	95,81	218,62	64,63	65,23	47,36	32,73	72,51	17,7	30	44,1	36,8	71,8	70								
25	18/2/2003	0103049-016	96,62	225,39	53,83	58,05	46,8	34,72	72,29	20	19,1	69,5	46,8	47,3	61,8								
26	25/2/2003	0103056-019	92,01	720,36	80,06	155,88	60,07	43,58	54,32	5,5	2,7	38,6	22,3	10,5	75,5								
27	18/3/2003	0103077-046	92,46	510,84	80,56	127,65	58,42	37,82	57,68	13,6	18,6	64,1	37,3	54,1	78,2								
28	18/3/2003	0103077-034	93,53	726,77	82,25	252,28	59,08	46,54	63,7	10,5	25,5	73,2	40	77,7	89,1								
		média	94,07	482,00	72,6	156,53	57,21	41,59	63,34	14,8	22,31	66,92	30,63	56,125	80,433								
		mediana	93,54	521,09	77,06	142,02	59,1	43,21	62,89	17,3	20,5	65,9	34,1	53,8	77,8								

a. NA, não avaliado; b. Anex. V, Anexina V; c. Adren., Adrenalina; d. Colág., Colágeno; e. Ac. Araq., Ácido Araquidônico;

f. IMF, Intensidade Média de Fluorescência; g. ADP + Adren., ADP associado à Adrenalina; h. Colág. + Adren., colágeno associado à Adrenalina

ANEXO 7. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas criopreservados

	Data	Identificação	Vol. ^e (ml)	Plaq. ^b 10 ³ /μl	Plaq. ^b 10 ¹¹ /U ^f	VPM (fl)	DHL (U/l)	Glic. ^d (g/dl)
1	13/8/2002	0102225-027	40	5410	1,16	10,2	14886	110
2	20/8/2002	0102232-029	40	6140	2,46	9,1	13627	79
3	27/8/2002	0102239-012	40	3770	1,51	11,3	10032	98
4	10/9/2002	0102253-016	40	3395	1,36	7,6	3894	1
5	10/9/2002	0102253-047	40	4310	1,72	8	6821	2
6	17/9/2002	0102260-009	40	2905	1,16	8,9	5999	94
7	24/9/2002	0102267-025	40	2590	1,04	7,6	5124	107
8	1/10/2002	0102274-021	40	4352	1,74	10,4	2172	121
9	8/10/2002	0102281-006	40	5040	2,02	8,7	1197	48
10	23/10/2002	0102295-046	40	3130	1,25	10,5	6765	290
11	29/10/2002	0102302-009	40	4635	1,85	9,1	13040	111
12	5/11/2002	0102309-013	40	3965	1,59	7,8	7530	142
13	12/11/2002	0102316-007	40	4505	1,8	8,9	13133	180
14	18/11/2002	0102323-008	40	2810	1,12	7,5	9250	82
15	26/11/2002	0102330-044	40	1925	0,77	8,7	1246	80
16	3/12/2002	0102337-022	40	3000	1,2	9,7	3013	46
17	10/12/2002	0102344-016	40	2505	1	10,7	1382	10
18	17/12/2002	0102351-010	40	1650	0,66	9,6	964	142
19	17/12/2002	0102351-034	40	3590	1,44	9	1127	31
20	21/1/2003	0103021-035	40	4130	1,65	9,6	5192	92

21	28/1/2003	0103028-022	40	2325	0,93	11,1	5042	49
22	4/2/2003	0103035-040	40	3990	1,6	12,4	2463	72
23	4/2/2003	0103035-019	40	2120	0,85	7,7	2310	82
24	11/2/2003	0103042-010	40	3575	1,43	10,3	2460	6
25	18/2/2003	0103049-016	40	3300	1,32	12,9	1955	69
26	25/2/2003	0103056-019	40	2285	0,91	NR ^a	1463	82
27	18/3/2003	0103077-046	40	3380	1,35	9,2	2081	58
28	18/3/2003	0103077-034	40	1350	0,54	8	1453	11
média				3431,5	1,34	9,43	5200,8	81,9
mediana				3340	1,28	9,1	3453	79,5

a. NR, não realizado; b. Plaq., Plaquetas; c. Leuc., Leucócitos; d. Glic., glicose; e. Vol., volume; f. U, Unidade

ANEXO 7. Análise laboratorial dos concentrados de plaquetas criopreservados

Data	Identificação	GPIIb (CD41)		GPIb (CD42b)		(CD62p)		Anex V ^b		ADP		Adren. ^c		Colág. ^d		Ac.Araq. ^e		Adren. ^o		ADP + Colág.	
		%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f	%	IMF ^f
1	13/8/2002	0102225-027	93,07	196,15	54,96	59,76	46,12	32,3	73,27	16,4	18,2	71,8	22,7	57,7	70						
2	20/8/2002	0102232-029	87,24	693,07	66,45	128,68	63,59	52,7	74,7	10,5	0	27,3	6,4	35	87,3						
3	27/8/2002	0102239-012	92	600,93	55,14	92,22	66,54	50,15	75,72	12,7	16,4	45,9	17,7	43,2	79,1						
4	10/9/2002	0102253-016	93,82	375,3	50,85	32,21	64,51	40,12	73,73	6,8	9,5	10	8,6	6,4	11,4						
5	10/9/2002	0102253-047	91,07	367,11	69,06	48,69	71,01	46,76	72,53	10	10,5	15	13,2	6,8	23,2						
6	17/9/2002	0102260-009	91,81	616,94	57,03	121,84	59,72	46,83	70,85	19,5	25	57,7	28,2	46,4	51,8						
7	24/9/2002	0102267-025	91,93	564,47	54,71	121,16	63,32	43,75	78,54	17,7	25,9	32,7	11,4	19,5	30						
8	1/10/2002	0102274-021	96,12	259,26	40,18	54,28	42,47	34,2	72,67	3,2	9,5	23,6	19,1	13,2	49,1						
9	8/10/2002	0102281-006	93,17	577,69	60,07	64,51	75,23	59,7	85,21	15,9	23,6	40,9	28,6	52,3	87,7						
10	23/10/2002	0102295-046	90,15	564,26	76,13	104,69	58,94	60,89	56,7	20	34,1	67,7	33,2	60,5	118,6						
11	29/10/2002	0102302-009	97,35	736,79	69,58	102,87	72,03	65,9	76,2	14,1	27,7	34,1	16,4	37,7	70,9						
12	5/11/2002	0102309-013	95,98	681,12	77,11	99,78	72,14	60,59	74,12	34,1	31,8	65,5	17,3	68,6	132,7						
13	12/11/2002	0102316-007	93,46	422,23	63,11	100,01	52,53	44,53	51,24	24,5	24,5	58,6	28,2	67,3	89,5						
14	18/11/2002	0102323-008	96,17	638,75	69,62	130,68	60,65	44,49	70,49	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a						
15	26/11/2002	0102330-044	95,99	556,8	83,66	233,34	48,65	40,57	63,26	18,6	31,8	86,8	23,2	79,5	97,3						
16	3/12/2002	0102337-022	94,02	339,82	60,89	122,42	60,64	45,93	54,55	22,3	35	74,5	13,2	64,1	100,5						
17	10/12/2002	0102344-016	92,2	580,21	68,75	183,3	59,89	47,24	55,94	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a	NA ^a						
18	17/12/2002	0102351-010	93,55	527,86	80,96	242,28	70,01	47,59	62,52	2,3	7,7	51,8	4,5	43,6	88,6						
19	17/12/2002	0102351-034	92,72	514,33	67,14	128,17	69,54	44,6	56,58	17,3	47,3	88,6	34,1	NR	NR						
20	21/1/2003	0103021-035	93,05	381,47	82,42	125,6	53,35	42,84	59,81	13,2	18,6	85,9	69,1	78,6	77,3						

21	28/1/2003	0103028-022	92,52	663,02	74,07	174,25	66,03	50,35	78,19	23,2	20,5	65,5	11,4	53,6	74,1
22	4/2/2003	0103035-040	94,33	581,42	81,37	255,2	59,13	41,95	65,6	10,9	10,5	65,9	21,8	44,1	82,3
23	4/2/2003	0103035-019	98,16	201,06	55,81	67,81	42,03	25,85	69,85	17,3	22,7	61,4	37,7	48,6	70,5
24	11/2/2003	0103042-010	95,81	218,62	64,63	65,23	47,36	32,73	72,51	17,7	30	44,1	36,8	71,8	70
25	18/2/2003	0103049-016	96,62	225,39	53,83	58,05	46,8	34,72	72,29	20	19,1	69,5	46,8	47,3	61,8
26	25/2/2003	0103056-019	92,01	720,36	80,06	155,88	60,07	43,58	54,32	5,5	2,7	38,6	22,3	10,5	75,5
27	18/3/2003	0103077-046	92,46	510,84	80,56	127,65	58,42	37,82	57,68	13,6	18,6	64,1	37,3	54,1	78,2
28	18/3/2003	0103077-034	93,53	726,77	82,25	252,28	59,08	46,54	63,7	10,5	25,5	73,2	40	77,7	89,1
		média	93,58	501,50	67,16	123,32	59,64	45,19	67,60	15,3	21,03	54,64	24,97	47,52	74,66
		mediana	93,12	542,3	66,8	112,9	59,8	44,5	70,1	15	19,8	58,3	22,05	47,3	75,5

a. NA, não avaliado; b. Anex. V, Anexina V; c. Adren., Adrenalina; d. Colág., Colágeno; e. Ac. Araq., Ácido Araquidônico; f. IMF, Intensidade Média de Fluorescência; g. ADP + Adren., ADP associado à Adrenalina; h. Colág. + Adren., Colágeno associado à Adrenalina

9. APÊNDICES

Artigos publicados durante a realização do mestrado.

LANDI, E.P.; MARQUES JÚNIOR, J.F.C. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 25(1): 39-46, 2003.

LANDI, E.P.; ROVERI, E.G.; OZELO, M.C.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; ORIGA, A.F.; REIS, A.R.C.; SOUZA, C.A.; MARQUES JUNIOR, J.F.C. Effects of high platelet concentration in collecting and freezing dry platelets concentrates. **Transfusion and Apheresis Science**, no prelo. Os resultados apresentados fazem parte dessa tese.



Available online at www.sciencedirect.com



TRANSFUSION
AND APHERESIS
SCIENCE

Transfusion and Apheresis Science xxx (2004) xxx-xxx

intl.elsevierhealth.com/journals/tras

Effects of high platelet concentration in collecting and freezing dry platelets concentrates

Evaldo Pasquini Landi ^{a,b,*}, Eduardo Gasparotto Roveri ^a,
Margareth Castro Ozelo ^a, Joyce Maria Annichino-Bizzacchi ^a,
Andreia Fernanda Origa ^a, Aparecida Ribeiro de Cavalho Reis ^a,
Cármino Antonio de Souza ^a, José Francisco Comenalli Marques jr ^a

^a Hematology and Blood Transfusion Centre, Hemocentro/Unicamp, State University of Campinas, Brazil

^b Universidade São Francisco, HUSF, Hemonúcleo, Av. São Francisco de Assis, 218, Taboão, Bragança Paulista, São Paulo, CEP 12916-900, Brazil

Abstract

Objective. To evaluate, in vitro, the effects of collecting and cryopreserving fresh dry platelet concentrates (PCs).

Material and methods. Standard and dry PCs were collected in the same apheresis procedure. PCs were evaluated by mean platelet volume (MPV), pH, glucose and LDH levels. Activation was examined by flow cytometry using anti-CD41, anti-CD42 and anti-CD62p monoclonal antibodies and annexin binding assay. Platelet function was assessed by aggregation using ADP, collagen and arachidonic acid as agonists. Dry PCs were compared to standard PCs and to cryopreserved dry PCs. We also compared the use of ThromboSol (TS) to 5% DMSO as cryoprotectives.

Results. Dry PCs presented a significantly reduced pH and glucose ($p < 0.001$), increased LDH levels and CD62p expression ($p < 0.001$) and diminished aggregation response to ADP ($p < 0.001$). Platelet cryopreservation was associated with platelet lysis, activation and loss of function. Dry PCs cryopreserved with TS were associated with statistically higher LDH levels ($p < 0.001$) and a higher percentage of annexin binding ($p = 0.005$), in addition to a lower number of CD42 positive platelets ($p = 0.01$).

Conclusion. Dry PCs should be rapidly frozen after collection to avoid a fall in pH and platelet activation. 5% DMSO performed better than TS to cryopreserve dry PCs.

© 2004 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Dry platelets; Cryopreservation; P-selectin; Annexin V

1. Introduction

Since Murphy and Gardner [1] reported that platelet concentrates (PCs) were best preserved at 22 °C rather than 4 °C, there has been little improvement in how PCs are stored. Currently, platelet concentrates are stored at 22 °C for only five days because prolonged storage has been

* Corresponding author. Tel.: + 55-11-4034-8065; fax: + 55-11-40333540.

E-mail address: evaldolandi@saofrancisco.edu.br (E.P. Landi).

34 associated with bacterial proliferation and trans-
35 fusion associated septicemia [2,3]. Even if bacterial
36 growth could be avoided or prevented, PCs would
37 have to be transfused by the seventh day of storage
38 at 22 °C due to activation and loss of platelet
39 function [4].

40 Platelet cryopreservation using 5% or 6% di-
41 methyl sulfoxide (DMSO) is the best way to store
42 PCs for longer periods [5]. At this concentration,
43 DMSO is not toxic to platelets [6]. Although the
44 freezing and thawing process promotes activation
45 and cell lysis due to loss of membrane integrity,
46 cryopreserved platelets can be safely transfused
47 since they have displayed superior hemostatic
48 function and similar recovery as five day stored
49 PCs at 22 °C [7,8].

50 ThromboSol™ (Life Cell Corporation, The
51 Woodlands, US) (TS) is a newly developed highly
52 concentrated platelet storage solution, which con-
53 tains adenosine, sodium nitroprusside, amiloride
54 and DMSO [9]. These substances act as second
55 messenger effectors and allow the final concentra-
56 tion of DMSO to be reduced to 2% in PCs. At this
57 concentration DMSO can be added to PCs in a
58 rapid bolus injection, simplifying the cryopreser-
59 vation process. Few studies have evaluated TS as a
60 cryoprotective and their results are conflicting
61 since different percentages of loss and degree of
62 platelet activation have been reported [10–12].

63 Cryopreserving PCs is a labor intensive and
64 costly process that requires several steps to add
65 and to remove the cryoprotective. Moreover, the
66 manipulation required is associated with platelet
67 activation and loss of function [13]. These reasons
68 seem to contribute to the limitations in its wide-
69 spread use.

70 Platelet concentrates containing a high platelet
71 concentration in a small amount of plasma are
72 known as dry platelet concentrates. They facilitate
73 multiple component collection by apheresis and
74 have a potential to reduce the occurrence of
75 transfusion reactions associated with plasma
76 infusion [14].

77 Fresh dry highly concentrated PCs could be
78 cryopreserved since the metabolic requirement
79 during freezing is insignificant. It would also avoid
80 a centrifugation usually required to remove excess
81 plasma before freezing. Moreover, reduced volume

PCs would be logistically easier to handle and to
store and would be less toxic due to diminished
DMSO content.

The purpose of this study was to evaluate the
effects of high platelet concentration in dry PCs
collected by apheresis and cryopreserved using 5%
DMSO or TS as a cryoprotective.

2. Material and methods

2.1. Platelet collection and sampling

Twenty eight plateletapheresis procedures were
performed in healthy volunteer donors according
to Brazilian federal regulations. A blood cell sep-
arator (Excel, Dideco, Mirandola, Italy) was used
with multi component collection kits, numbers
4205 and 4203. Each procedure collected standard
PCs until 3×10^{11} platelets were reached as indi-
cated by the processor. During this time, 100 ml of
plasma was collected in a separate bag to be used
in the tests. After collecting standard platelets, the
separator was adjusted to collect platelets cycli-
cally. Cycle numbers and volume were adjusted to
collect $1.5\text{--}3 \times 10^{11}$ platelets in 15–30 ml, according
to the donor's weight and height. Platelets har-
vested in the last cycle were sent to the dry PC bag
before the reinfusion phase. The contents of the
separation chamber were driven to the standard
PC bag to avoid plasma contamination in the dry
PC.

After the collection, both standard PCs and dry
PCs were kept undisturbed for one hour. Then,
they were placed on a flatbed shaker in standard
blood bank conditions for up to one hour.

For sampling, the standard PCs were connected
to a 100 ml transfer bag (JP Pharmaceutical
Industry, Ribeirão Preto, Brazil), using a sterile
connection system, and approximately 15 ml was
withdrawn for analysis. A 3 ml dry PCs sample
was collected for testing using the PC sample bag.

Standard PCs were sent to transfusion, while
dry PCs were cryopreserved in the vapor phase of
liquid nitrogen and autologous plasma in a
mechanical freezer at -30 °C.

124 2.2. Freezing and thawing dry PCs

125 A total of 28 dry PCs were cryopreserved using
126 TS (14 PCs) or 5% DMSO (14 PCs).

127 For TS treated PCs cryopreservation, the PCs
128 were transferred to a 250 ml freezing bag (Baxter
129 Healthcare Corporation, Deerfield, USA). To
130 minimize loss associated with the transfer process,
131 the collecting bag was washed with a saline solu-
132 tion of 0.9% to obtain a final volume of 39.2 ml for
133 each PC. Then, 0.8 ml of TS was injected through
134 a sterile port. The resulting TS treated PCs con-
135 tained 0.25 mM of amiloride, 0.1 mM of adeno-
136 sine, 50 μ M of sodium nitroprusside and 2% of
137 DMSO. The treated PCs were mixed by gentle
138 shaking and frozen in a controlled rate freezer
139 (Forma Scientific, Marietta, US), and then kept in
140 the vapor phase of nitrogen.

141 For DMSO treated PCs cryopreservation, the
142 PCs were transferred to a 250 ml freezing bag and
143 the collecting bag was washed with a saline solu-
144 tion of 0.9% to obtain a final volume of 30 ml for
145 each PC. Then, 10 ml of 20% DMSO was added to
146 the PCs at a controlled rate (1 ml/min) with con-
147 stant agitation, and the PCs were frozen as de-
148 scribed above.

149 The PCs were thawed in a water bath at 37 °C
150 along with the fresh frozen plasma, gently mixed,
151 washed once using autologous plasma and assayed
152 as described below.

153 2.3. Platelets assays

154 Tests and assays were performed in fresh stan-
155 dard PCs and in dry PCs before and after freezing.
156 Platelet counts and mean platelet volume (MPV)
157 were recorded using a counter (Cell Dyn 1600,
158 Abbot Diagnostics Division, Mountain View, US).
159 The pH was measured by a pH meter (Quimis,
160 Campinas Brazil), while extracellular LDH and
161 glucose concentration were quantified by an
162 automatic analyzer (Hitachi 917, Boehringer
163 Mannheim, Mannheim, Germany). A hemocytometer
164 (Nageotte Chamber) was used to visually count
165 white cells as described by Moroff et al. [15].

166 Using an aseptic technique, 3 ml of each stan-
167 dard PC was inoculated in a culture medium and
168 incubated in the BacTAlert System (Organon

169 Teknique Corporation, Durham, USA) for 7 days
170 for microbiologic control. In the case of bacterial
171 growth, the identification was done by conven-
172 tional methodology.

173 Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, GPIb complex and p-selectin
174 expressions were determined as described by Sch-
175 mitz et al. [16]. Briefly, 5 μ l of platelet sample was
176 mixed with 1% paraformaldehyde and incubated
177 for 10 min. Platelets were washed in phosphate
178 buffered saline (PBS) with a pH of 7.4, the super-
179 natant was removed and 5 μ l of the following
180 monoclonal antibodies were added to each tube:
181 CD41 FITC (Caltag Laboratories, Burlingham,
182 US), CD42b FITC (PharMingen, San Diego, US),
183 CD62p FITC (Southern Biotechnology Associ-
184 ates, Birmingham, US) and isotopic control FITC
185 (Caltag Laboratories, Burlingham, US). The tubes
186 were incubated for 20 min, washed and analyzed in
187 an FACS analyzer (FCAScalibur, Becton Dickin-
188 son, USA). Platelets were identified by a forward
189 versus side scatter plot set to a logarithmic scale,
190 and 10,000 events were evaluated. The fluores-
191 cence of stained platelets was analyzed with the
192 Cell Quest software to obtain both the percentage
193 of positively stained cells and the mean particle
194 fluorescence intensity (MFI).

195 Annexin V binding was utilized to detect the
196 platelet pro-coagulant surface. Two milliliters of
197 PBS with a pH of 7.4 was added to 5 μ l of the
198 platelet sample adjusted to a concentration of 2-
199 $4 \times 10^5/\mu$ l with autologous platelet-poor plasma
200 and centrifuged 1500 $\times g$ for 10 min. The super-
201 natant was removed, and platelets were diluted in
202 1 ml PBS pH 7.4. One hundred microliters of this
203 solution was placed in two tubes and 5 μ l of
204 annexin V (PharMingen, San Diego, US) was ad-
205 ded to one of the tubes. Both tubes were incubated
206 for 20 min. Four hundred microliters of Hepes 0.1
207 M with a pH of 7.4 (25 mM CaCl_2) was added to
208 each tube and immediately evaluated in a FACS
209 analyzer as described above.

210 Platelet aggregation was studied in a PACKs 4
211 aggregometer (Helena Laboratories, Beaumont,
212 US) as described by White and Jennings [17]. Four
213 hundred fifty microliters of a platelet sample ad-
214 justed to 2-4 $\times 10^5/\mu$ l with autologous platelet poor
215 plasma was placed in the aggregometer with stir-
216 ring then light transmission was measured. For

platelet aggregation induced by a single agonist, the following agonists and concentrations were used in each tube: adenosine diphosphate (ADP) (Sigma, St. Louis, US) 50 μ l (100 mol/l), epinephrine (Sigma, St. Louis, US) 50 μ l (100 mol/l), collagen (Helena Laboratories, Beaumont, US) 50 μ l (100 μ g/ml) and arachidonic acid (AA) (Helena Laboratories, Beaumont, US) 50 μ l (500 μ g/ml). The maximum platelet aggregation using platelet-rich plasma as the baseline and platelet-poor plasma as 100% was recorded in 10 min. For platelet aggregation induced by paired agonists, ADP 50 μ l (100 mol/l) and epinephrine 50 μ l (100 mol/l) or epinephrine 50 μ l (100 mol/l) and collagen 50 μ l (100 μ g/ml) were added to a 400 μ l sample in a tube with stirring and recorded as described above.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using S-Plus 2000 software (Math Soft, Seattle, US). A Wilcoxon signed rank test was applied to test for significant differences between the following groups: standard PCs versus dry PCs, dry PCs versus cryopreserved dry PCs, the dry PC TS group versus the cryopreserved dry PC TS group, and the dry PC DMSO group versus the cryopreserved dry PC DMSO group. A Wilcoxon rank sum test was applied to test for significant differences between the dry PC TS group versus the dry PC DMSO

group and the cryopreserved dry PC TS group versus the cryopreserved dry PC DMSO group. A p -value of <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Standard PCs versus dry PCs

The median of standard PCs volume and platelet concentration were 247 ml (203–301) and $950 \times 10^3/\text{mm}^3$ (410–1728), while the median of dry PCs volume and platelet concentration were 17.5 ml (12–27) and $10.580 \times 10^3/\text{mm}^3$ (2505–17380), respectively. Both standard and dry PC had less than 0.01×10^6 white cells per unit. No bacterial growth was detected in standard PC cultures.

Standard and dry PC MPV, pH, LDH and glucose results are shown in Table 1. There was no difference in the PMV, but pH and glucose were lower and LDH was higher in the dry PC than in the standard PC ($p < 0.001$).

The percentage of platelets staining positive for CD42, CD62, annexin V binding, and MFI for CD41 in standard and dry PCs is shown in Table 1. There were no differences between the two groups in CD41, CD42 and annexin V binding. In contrast, CD62 expression was higher in the dry PC than in the standard PC ($p < 0.001$).

Functional activity measured by agonist-induced aggregation is shown in Table 1. The

Table 1

Morphology, biochemistry, surface receptors, pro-coagulant surface and aggregation results of standard platelet concentrates (PCs), dry PCs and cryopreserved dry PCs

	Standard PC	Dry PC	Cryopreserved Dry PC
pH	7.34 (7.0–7.5)	7.02 (6.4–7.5) ^a	–
PMV (fl)	6.7 (5.9–9.5)	6.8 (5.8–8.8)	9.1 (7.5–12.9) ^b
LDH (U/l)	277 (294–461)	703 (441–906) ^a	3453 (964–14886) ^b
Glucose (g/dl)	276 (235–433)	238 (235–433) ^a	–
CD41 (MFI)	266.5 (151.5–441)	270.5 (145.6–458.3)	560.5 (196–736.8) ^b
CD42 (%)	97.7 (91.6–99.3)	97.3 (94.1–99.3)	68 (40.2–83.6) ^b
CD62 (%)	15 (7–30.9)	19.8 (7–37.3) ^a	60 (42–75.2) ^b
Annexin V (%)	34.1 (13.4–70.1)	30.9 (7.1–73.1)	70.7 (51.2–85.2) ^b
ADP (%)	99.3 (44.5–118)	76 (21.4–110) ^a	16.1 (2.3–34.1) ^b
Collagen (%)	109.1 (89.5–157.3)	110 (62.7–144.5)	60 (10–88.6) ^b
Arachidonic acid (%)	107.3 (90–150.1)	105 (7.7–143.2)	22.5 (4.5–69.1) ^b

^a Statistically significant between standard PCs and dry PCs.

^b Statistically significant between dry PCs and cryopreserved dry PCs.

Table 2

Comparison between the ThromboSol™ (TS Group) and the 5% DMSO (5% DMSO Group) dry platelet concentrates

	Dry platelets concentrates		<i>p</i>
	TS Group	5% DMSO Group	
Platelets $\times 10^3/\mu\text{l}$	11470 (5280–17380)	8840 (2505–12820)	0.15
pH	7 (6.4–7.6)	7 (6.7–7.5)	1
PMV (fl)	6.9 (5.9–7.9)	6.55 (5.8–8.8)	0.4
LDH (U/l)	886.5 (426–1518)	679.5 (433–1918)	0.7
Glucose (g/dl)	246 (191–454)	231 (159–366)	0.08
CD41 (IMF)	297.1 (145.6–458.3)	233.68 (159.3–304)	0.01
CD42 (%)	97.3 (94.2–98.6)	96.8 (95.9–99.3)	0.9
CD62 (%)	18.9 (7–37.3)	19.9 (10.4–36.2)	0.6
Annexin V (%)	29.1 (11–43)	34.1 (7–73)	0.1
ADP (%)	41.4 (21.4–110)	88.7 (39.1–106.4)	0.003
Collagen (%)	113.2 (103.2–144.5)	105.9 (62.7–118.2)	0.01
Arachidonic acid (%)	113.2 (78.2–143.2)	100.9 (7.7–135.9)	0.05

aggregation response of the studied samples after stimulation with ADP was statistically lower in dry PCs than in the standard PC ($p < 0.001$), but no difference was observed when collagen or AA were used as agonists.

3.2. Dry PCs versus cryopreserved dry PCs

Dry PCs were cryopreserved for a median of 154 days (45–245). Following platelet freezing and thawing, the loss was 19%, and, in post-freezing microbiology control, one cryopreserved dry PC had a positive culture for *Staphylococcus aureus*. Cryopreserved dry PC presented statistically higher MPV and LDH compared to dry PC. There were also statistically significant differences in the percentage of platelets staining positive for CD42 and CD62 antigen, annexin V binding expression and CD41 MIF between the two groups. Aggregation responses to ADP, collagen and AA were also lower in cryopreserved PCs ($p < 0.001$). The dry PC and cryopreserved dry PC results are shown in Table 1.

3.3. TS treated cryopreserved dry PCs versus 5% DMSO treated cryopreserved dry PCs

Before cryopreservation, the TS treated dry PC group presented higher CD41 MIF expression (297 versus 233; $p = 0.01$) and lower aggregation response to ADP as the agonist (41.4 versus 88.7;

$p = 0.003$). In contrast, aggregation responses to collagen and AA as agonists were statistically higher in this group. All other results showed no statistical differences and can be seen in Table 2.

Comparing the dry PC TS group and the dry PC 5% DMSO group before and after freezing, both presented statistical differences in all tests performed. However, comparing TS treated cryopreserved dry PC to 5% DMSO treated cryopreserved dry PC, LDH levels and annexin V binding were higher ($p < 0.001$ and $p = 0.005$, respectively) and the number of CD42 positive cells was lower ($p = 0.01$) in the first group. Aggregation with collagen was statistically lower in the TS treated group as well ($p = 0.005$). Although not statistically different, aggregation with AA and paired agonists ADP/epinephrine were also higher in the 5% DMSO treated group. These results are demonstrated in Table 3.

4. Discussion

One of the limiting factors for multiple component collection during thrombocytapheresis is the plasma needed to suspend PCs. Dry PCs can be suspended in a synthetic medium containing acetate and stored in standard blood bank conditions without loss of platelet viability [18]. However, cryopreserving dry PCs is an alternative for storage that might provide additional benefits.

Table 3

Comparison between TS treated dry PCs and 5% DMSO treated dry PCs

	TS treated dry PC	5% DMSO treated dry PC	<i>p</i>
PMV	8.9 (7.5–11.3)	9.6 (7.7–12.9)	0.09
LDH (U/l)	7175 (1197–14886)	2018 (964–5192)	<0.001
CD41 (IMF)	571 (196.1–736.8)	521.1 (201–726.8)	0.48
CD42 (%)	61.6 (40.2–77.1)	77 (53.8–83.6)	0.01
CD62 (%)	63.5 (42.5–75.2)	59.1 (42–70)	0.12
Annexin V (%)	73.5 (51.2–85.2)	62.9 (54.3–78.2)	0.005
ADP (%)	15.9 (3.2–34.1)	17.3 (2.3–23.2)	1
Collagen (%)	40.9 (10–71.8)	65.9 (38.6–88.6)	0.005
Arachidonic acid (%)	17.7 (6.4–33.2)	34.1 (4.5–69.1)	0.06
ADP/adrenalin (%)	43.2 (6.4–68.6)	58.3 (10.5–79.5)	0.06
ADP/collagen (%)	70.9 (11.4–132.7)	77.8 (61.8–100.5)	0.4

Long-term storage of PCs by freezing allows the shelf life of PCs to be extended from the current five days to two or three years [19]. This could help solve inventory management problems. Additionally, it would allow access to compatible human leukocyte antigen (HLA) platelets, and stockpile autologous platelets for use during the recovery phase of chemotherapy. Cryopreserved PC has been proved to shorten aspirin-prolonged bleeding time, prevent hemorrhage in thrombocytopenic patients and control nonsurgical bleeding in post operative cardiac operations [7,8,20]. On the other hand, platelet cryopreservation involves multiple preparation steps that make the method cumbersome and expensive. Simplifying platelet cryopreservation would make cryopreserved PC more practical for clinical use.

DMSO is a cryoprotective that penetrates the platelet membrane rapidly and independently of platelet concentration [21]. Along with 2% DMSO, TS as a cryoprotective contains second-messenger effectors that inhibit specific activation pathways [9].

A dry PC is a low volume, highly concentrated product that would not require an initial centrifugation to remove the excess plasma and could be easily stored. In addition, the final amount of DMSO would be very low. Considering the volume used in this study, TS treated dry PC had 0.8 g of DMSO, three times less than a pool of six units of washed cryopreserved standard PC [22]. The 5% DMSO treated dry PCs contained 2.0 g of DMSO,

almost 10 times less than the dose associated with minor toxicity if infused in an adult [10,23].

The pH and glucose measurements were not done in freezing dry PCs due to technical difficulties. Dry PCs were associated with increased LDH suggesting platelet lysis that might have occurred during collection due to friction among platelets and tubes. In addition, storing PCs in a such high concentration, even for a few hours, impaired oxygen exchange, which might have caused a decrease in the pH and glucose level due to lactic acid production [24]. Dry PCs were also associated with an increased p-selectin expression and lower aggregation response to ADP as an agonist. However, the 19% p-selectin expression observed in this study is considered a reasonable value for PCs collected by apheresis [25,26]. The reduced aggregation response to ADP probably did not mean loss of functional platelet activity, but instead G-protein-coupled ADP receptor impaired response due to pH fall [27]. Moreover, a good aggregation response was observed when collagen and AA were used as agonists.

A controlled freezing rate was chosen because small volumes can freeze very fast and form ice crystals that disrupt platelet membranes [28]. Platelet loss was 19% both for TS treated and 5% DMSO treated PCs. Similar platelet loss was observed by other authors using 5% DMSO [21,29]. However, percentages of platelet loss in PCs at standard concentrations treated with TS varies between 10% and 50% [10,12]. As suggested by others, controlled freezing is important to preserve

platelet integrity [12]. It should also be noted that platelet loss not only involves platelet lysis but also adhesion to the bag wall. Variation in the material and technique applied in these studies might be responsible for these differences.

No bacterial growth was observed before cryopreserving PCs. However, a *S. aureus* strain grew from a dry PC cryopreserved with 5% DMSO. The PC contamination could have happened during the addition of the cryoprotective. However, the PC were cryopreserved soon after the addition of the cryoprotective, reducing the chance of bacterial proliferation [30].

As observed among cryopreserved PCs at standard concentration, cryopreserved dry PC exhibited reduced CD42 expression and increased LDH levels and CD41, CD62 and annexin V binding expression. In this study, annexin V binding correlated well with p-selectin expression. We obtained 60% CD62 positive platelets while most of the studies had 38–50% using both cryoprotective solutions [10,31]. But CD62 expression might be contradictorily low in highly activated or intensively washed platelets since they can lose surface p-selectin and continue to circulate and function [32,33]. On the other hand, CD42 positive platelets were higher than 50% in both TS treated and 5% DMSO treated PCs, suggesting a retained potential for adhesion [34].

Both TS and DMSO treated PC groups had similar in vitro analyses before freezing, except for a higher CD41 expression and lower aggregation response to ADP as the agonist in the TS group. In contrast, the TS group presented a higher aggregation response to collagen and AA as agonists. We believe that these differences did not influence the results after freezing and thawing the PC.

TS as a cryoprotective was associated with higher LDH levels and annexin V binding positive platelets, and lower CD42 positive platelets and an aggregation response to collagen as an agonist. This might suggest that TS treated PC suffered more platelet lysis and activation than those cryopreserved with 5% DMSO. Thus, in this study, 5% DMSO showed a better cryoprotective effect than TS. The reduced DMSO content in the TS might have played a role in the loss of protection.

In conclusion, since dry PCs collection was associated with a higher degree of platelet lysis, we suggest that the dry PCs should be rapidly frozen after collection to avoid a fall in pH, platelet activation and loss of function, and 5% DMSO should be used as the cryoprotective of choice. In addition, more studies are necessary to determine maximum platelet concentration and the best storage condition before freezing the dry PCs.

Acknowledgements

450

We would like to thank Dr. Jerome Connor from the Life Cell Corporation for kindly providing ThromboSol™; Roberto Zulli for the statistical analysis; Fernanda Gonçalves Pereira Cunha and Tânia de Fátima Gomes Siegl Machado for their excellent technical assistance in flow cytometric and platelet aggregation studies; Federico Voglino from Dideco for technical support; Dideco for sponsoring the apheresis kits; and Jenna Wright Francisco for the English revision.

This work was partially supported by a grant from Fundação de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (No. 996/01), Universidade Estadual de Campinas—UNICAMP.

References

465

- [1] Murphy S, Gardner FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability—deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med* 1969;280:1094–8.
- [2] Heal JM, Jones ME, Forey J, et al. Fatal *Salmonella septicemia* after platelet transfusion. *Transfusion* 1987;27:2–5.
- [3] Punsalang A, Heal JM, Murphy PJ. Growth of gram-positive and gram-negative bacteria in platelet concentrates. *Transfusion* 1989;29:596–9.
- [4] Dumont LJ, AuBuchon JP, Whitley P, et al. Seven day storage of apheresis platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. *Transfusion* 2002;42:849–56.
- [5] Angelini A, Dragani A, Berardi A, et al. Evaluation of four different methods for platelet freezing. In vitro and in vivo studies. *Vox Sang* 1992;62:146–51.
- [6] Gao DY, Neff K, Xiao HY, et al. Development of optimal techniques for cryopreservation of human platelets. I. Platelet activation during cold storage (at 22 °C and 8 °C) and cryopreservation. *Cryobiology* 1999;38:225–35.

- 485 [7] Khuri SF, Healey N, Macgregor H, et al. Comparison of
486 the effects of transfusions of cryopreserved and liquid-
487 preserved platelets on hemostasis and blood loss after
488 cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*
489 1999;117:172-83.
- 490 [8] Valeri CR, Macgregor H, Giorgio A, et al. Circulation and
491 distribution of auto transfused fresh, liquid-preserved and
492 cryopreserved baboon platelets transfused to correct an
493 aspirin-induced thrombocytopenia. *Transfusion*
494 2002;42:1206-16.
- 495 [9] Currie LM, Livesey SA, Harper JR, et al. Cryopreservation
496 of single-donor platelets with a reduced dimethyl sulfoxide
497 concentration by the addition of second-messenger effec-
498 tors: enhanced retention of in vitro functional activity.
499 *Transfusion* 1998;38:160-7.
- 500 [10] Lozano ML, Rivera J, Corral J, et al. Platelet cryopreser-
501 vation using a reduced dimethyl sulfoxide concentration
502 and second-messenger effectors as cryopreserving solution.
503 *Cryobiology* 1999;39:1-12.
- 504 [11] Lozano M, Escolar G, Mazzara R, et al. Effects of the
505 addition of second-messenger effectors to platelet concen-
506 trates separated from whole-blood donations and stored at
507 4 °C or -80 °C. *Transfusion* 2000;40:527-34.
- 508 [12] Pedrazzoli P, Noris P, Perotti C, et al. Transfusion of
509 platelet concentrates cryopreserved with ThromboSol plus
510 low-dose dimethylsulphoxide in patients with severe
511 thrombocytopenia: a pilot study. *Br J Haematol*
512 2000;108:653-9.
- 513 [13] Rinder HM, Ault KA. Platelet activation and its detection
514 during the preparation of platelets for transfusion. *Transf*
515 *Med Rev* 1998;12:271-87.
- 516 [14] Valbonesi M, Bruni R, Florio G, et al. Dry platelets with
517 the Dideco Excel apparatus. *Transfus Sci* 1999;20:101-6.
- 518 [15] Moroff G, Eich J, Dabay M. Validation of use of the
519 Nageotte hemocytometer to count low levels of white cells in
520 white cell-reduced platelet components. *Transfusion*
521 1994;34:35-8.
- 522 [16] Schmitz G, Rothe G, Ruf A, et al. European Working
523 Group on clinical cell analysis: consensus protocol for the
524 flow cytometric characterisation of platelet function.
525 *Thromb Haemost* 1998;79:885-96.
- 526 [17] White MM, Jennings LK. Platelet Protocols Research and
527 Clinical Laboratory Procedures. San Diego: Academic
528 Press; 1999. p. 39-55.
- 529 [18] Holme S, Heaton WA, Smith KT, et al. Evaluation of
530 apheresis platelet concentrates collected with a reduced (30
531 ml) collection chamber with resuspension and storage in a
532 synthetic medium. *Vox Sang* 1994;67:149-53.
- 533 [19] Valeri CR, Srey R, Lane JP, et al. Effect of WBC reduction
534 and storage temperature on PLTs frozen with 6 percent
535 DMSO for as long as 3 years. *Transfusion* 2003;43:1162-7.
- 536 [20] Torretta L, Perotti C, Pedrazzoli P, et al. Autologous
537 platelet collection and storage to support thrombocytope-
538 nia in patients undergoing high-dose chemotherapy and
circulating progenitor cell transplantation for high-risk
breast cancer. *Vox Sang* 1998;75:224-9.
- [21] Schiffer CA, Buchholz DH, Aisner J, et al. Frozen
autologous platelets in the supportive care of patients with
leukemia. *Transfusion* 1976;16:321-9.
- [22] Spector II, Skrabut EM, Valeri CR. Oxygen consumption,
platelet aggregation and release reactions in platelets
freeze-preserved with dimethylsulfoxide. *Transfusion*
1977;17:99-109.
- [23] Davis JM, Rowley SD, Braine HG, et al. Clinical toxicity
of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood*
1990;75:781-6.
- [24] Murphy S. What's so bad about old platelets? *Transfusion*
2002;42:809-11.
- [25] Metcalfe P, Williamson LM, Reutelingsperger CP, et al.
Activation during preparation of therapeutic platelets
affects deterioration during storage: a comparative flow
cytometric study of different production methods. *Br J*
Haematol 1997;98:86-95.
- [26] Holme S, Sweeney JD, Sawyer S, et al. The expression of p-
selectin during collection, processing, and storage of
platelet concentrates: relationship to loss of in vivo
viability. *Transfusion* 1997;37:12-7.
- [27] Ho CH, Chan IH. The influence of time of storage,
temperature of storage, platelet number in platelet-rich
plasma, packed cell, mean platelet volume, hemoglobin
concentration, age, and sex on platelet aggregation test.
Ann Hematol 1995;71:129-33.
- [28] Canales MA, Arrieta R, Hernandez Navarro F. Cryopres-
ervation of hematopoietic progenitor cells. *Sangre*
1999;44:473-81.
- [29] Van Imhoff GW, Arnaud F, Postmus PE, et al. Autologous
cryopreserved platelets and prophylaxis of bleeding in
autologous bone marrow transplantation. *Blut*
1983;47:203-9.
- [30] Snyder L, Champness W. Molecular genetics of bacteria.
Washington, DC: ASM Press; 1997. p. 1-10.
- [31] Currie LM, Lichtiger B, Livesey SA, et al. Enhanced
circulatory parameters of human platelets cryopreserved
with second-messenger effectors: an in vivo study of 16
volunteer platelet donors. *Br J Haematol* 1999;105:826-31.
- [32] Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, et al. In vivo
tracking of platelets: circulating degranulated platelets
rapidly lose surface p-selectin but continue to circulate
and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11877-82.
- [33] Barnard MR, Macgregor H, Ragno G, et al. Fresh, liquid-
preserved, and cryopreserved platelets: adhesive surface
receptors and membrane procoagulant activity. *Transfu-
sion* 1999;39:880-8.
- [34] Van Zanten GH, Heijnen HF, Wu Y, et al. A fifty percent
reduction of platelet surface glycoprotein Ib does not affect
platelet adhesion under flow conditions. *Blood*
1998;91:2353-9.