

# **PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DAS TÉCNICAS DE RE-CALCIFICAÇÃO E TROMBINIZAÇÃO DE PLASMA HUMANO PARA PRODUÇÃO DE PAINÉIS DE CONTROLE DE QUALIDADE EM TESTES LABORATORIAIS.**

Daniel Bassetto Jesuino, Elenice Deffune, Priscila Murador, Rosana Rossi Ferreira. – Inter-áreas – Ciências Biológicas – Departamento de Urologia – Faculdade de Medicina – Campus de Botucatu.

Políticas de controle de qualidade são essenciais em serviços de saúde (SS). Para minimizar erros e aumentar a excelência destes serviços, a determinação de um padrão, e de qualidade, são fatores fundamentais.

Através do estudo dos mecanismos de hemostasia *in vitro* e de fatores que influenciam este processo, é possível padronizar as técnicas de re-calcificação e trombinização, aplicadas pelos SS, para produção de soro de qualidade como padrão ouro.

Atualmente, a escassez de trabalhos publicados nesta área específica da dinâmica laboratorial, dificulta a execução de novos procedimentos bem como a padronização e validação das técnicas utilizadas. Isto implica em uma crescente necessidade de estudo de novos procedimentos, técnicas e contínua revisão dos protocolos utilizados.

Este estudo teve como objetivo a comparação de quatro técnicas de conversão de plasma em soro e avaliação do melhor desempenho.

Optou-se por utilizar plasma fresco congelado (PFC) do grupo O e Rh + do Laboratório de Componentes Lâbeis do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. Na realização dos testes foi constituído um “pool” das bolsas de PFC, aliquotado em oito diferentes tubos-teste, identificados de T1 à T8. Como controle, foi realizada análise visual, titulação e análise espectrofotométrica para determinação da concentração de proteínas totais plasmáticas (PT).

O teste consiste da ativação da cascata de coagulação utilizando-se componentes da mesma como  $\text{CaCl}_2$  e Trombina. O protocolo de re-calcificação utilizado rotineiramente no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu foi utilizado como base para a realização dos demais testes.

O teste T1 foi realizado apenas com  $\text{CaCl}_2$ ; T2 -  $\text{CaCl}_2$  + Caolin; T3 -  $\text{CaCl}_2$  + Ácido Aminocapróico (AAC); T4 -  $\text{CaCl}_2$  + Caolin + AAC; T5 -  $\text{CaCl}_2$  + Trombina; T6 -  $\text{CaCl}_2$  + Trombina + AAC; T7 -  $\text{CaCl}_2$  + Trombina + Caolin; T8 -  $\text{CaCl}_2$  + Trombina + AAC + Caolin.

Para realização dos testes, a bolsa de PFC foi descongelada em temperatura ambiente (TA), aproximadamente 25°C, e o conteúdo transferido para tubos de polipropileno, de fundo cônico. Adiciona-se  $\text{CaCl}_2$  em solução aquosa à 2M, solução aquosa AAC à 2M e solução aquosa de Trombina 10kU na proporção de 1mL para cada 100mL de plasma, cada qual para o respectivo teste. O reagente Caolin é adicionado em pó à proporção de 10g/100mL de plasma. O plasma é incubado por 12 horas em TA e logo em seguida por 12 horas à temperatura de 4°C. Após o período de incubação, o coágulo formado é descolado do tubo com auxílio de uma pipeta ou bastão de vidro e as amostras passam por centrifugação de 4000g por 10 minutos.

A análise visual foi realizada observando-se as amostras contra um fundo branco e em local de luminosidade adequada para observação de presença de turbidez, partículas em suspensão ou formação de rede de fibrina pós-procedimento de conversão.

A titulação dos anticorpos do sistema ABO foi realizada pela técnica de hemaglutinação em microplaca para as hemácias A<sub>1</sub> e B. O título foi determinado pela última diluição onde ocorreu aglutinação com intensidade de reação de 1+.

A análise espectrofotométrica foi realizada no aparelho NanoDrop® ND1000, da NanoDrop Technologies Inc., em comprimento de onda de 280nm. O branco de leitura (blank) foi determinado por leitura de solução fisiológica 0,9% disponível comercialmente. A concentração de PT é determinada através da fórmula: 1Abs = 1mg/mL.

O soro proveniente da técnica de melhor desempenho foi validado por congelamento e descongelamento de alíquotas em intervalos regulares de tempo.

Os procedimentos de re-calcificação retiraram em média 4,695 mg/mL de PT enquanto que procedimentos de trombinização retiraram em média 5,337mg/mL. Os testes T2, T4, T7 e T8 apresentaram melhor desempenho com taxa de retirada de PT de 5,99; 6,13; 6,24 e 6,48 mg/mL respectivamente. O Quadro1 demonstra a concentração de PT após análise espectrofotométrica dos testes e do plasma descongelado em TA pré-procedimento.

<b>Quadro 1 - Concentração de proteínas totais (mg/mL)</b>										
<i>Amostras</i>	<b>Pré Recal.</b>	<b>Pré Tromb.</b>	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>3</sub></b>	<b>T<sub>4</sub></b>	<b>T<sub>5</sub></b>	<b>T<sub>6</sub></b>	<b>T<sub>7</sub></b>	<b>T<sub>8</sub></b>
<b>Pool "X"<sup>1</sup></b>	49,87	50,61	46,53	43,88	46,05	43,73	46,33	46,26	44,37	44,13
<b>Pré – Tx<sup>2</sup></b>			3,34	5,99	3,32	6,13	4,28	4,35	6,24	6,48

**Análise espectrofotométrica dos testes. 1.** Análise do pool anterior aos procedimentos de conversão e após cada um dos testes. A diferença da análise pré-recalcificação e pré-trombinização é devida à adição de nova bolsa ao pool para restituição do volume. **2.** Diferença entre as taxas de PT pré-procedimento e pós-procedimento.

Os procedimentos de conversão de plasma em soro, geralmente, baixam título de anticorpos devido ao fato de serem procedimentos bioquímicos com processos físico-químicos agressivos. Nestes procedimentos é comum que parte dos anticorpos presentes no plasma seja retirada conjuntamente com outras proteínas plasmáticas.

O quadro 2 demonstra o título dos anticorpos contra antígenos ABO, encontrados no plasma pré-procedimento e em cada um dos respectivos testes.

<b>Quadro 2 - Título da amostras à partir de pool de PFC.</b>										
<i>Amostras</i>	<b>Pré Recal.</b>	<b>Pré Tromb.</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>T6</b>	<b>T7</b>	<b>T8</b>
Hemácias A <sub>1</sub>	1/512	1/256	1/256	1/256	1/256	1/512	1/128	1/128	1/64	1/64
Hemácias B	1/512	1/512	1/256	1/256	1/256	1/1024	1/256	1/256	1/128	1/256

Os testes T2, T4 e T6 obtiveram maiores títulos relativos (A<sub>1</sub>-B) sendo 1/256 - 1/256; 1/512 - 1/1024 e 1/128 - 1/256, respectivamente.

A análise visual demonstrou que os testes realizados com o reagente Caolin produzem soros mais turvos, devido à presença de partículas em suspensão. Os soros produzidos na ausência de Caolin apresentam coloração amarelo-palha, mais clara que a do plasma, sem apresentarem turbidez e de aspecto visual muito bom.

O teste T4 obteve melhor desempenho enquanto que o teste T2 obteve segundo melhor desempenho devido ao título mais baixo. Os estudos indicam que o uso de Trombina pode ser substituído apenas por solução de CaCl<sub>2</sub> visto que os dois testes de melhor desempenho, T2 e T4, não utilizaram Trombina.

Os aspectos de maior relevância na análise do desempenho dos testes foram a manutenção do título do anticorpo e a queda na concentração de PT. A validação do soro produzido pelos testes T2 e T4 demonstrou que o aspecto visual da amostra é uma avaliação superficial de sua real qualidade.

O soro produzido por T2(sT2) apresentou turbidez de 1+ nas alíquotas descongeladas em 7, 30 e 60 dias e 2+ na alíquota descongelada em após 15 dias de estoque à -20°C. O soro produzido por T4(sT4) apresentou turbidez de 1+ nas alíquotas de 7 e 30 dias de estoque e turbidez de 2+ nas alíquotas de 15 e 60 dias de estoque.

Não houve formação de rede de fibrina nas alíquotas de ambos os testes o que indica que, apesar da aparente turbidez, a cascata de coagulação foi inativada pelo procedimento de conversão. As amostras conservadas por 15 dias à 4°C, de ambos os testes, mantiveram-se límpidas e sem formação de rede de

fibrina. Entretanto, uma análise mais detalhada está em andamento para determinar a viabilidade do soro após estocagem à 4 °C.

<b>Quadro 3 - Título das alíquotas estocadas</b>				
<i>Tempo de Estoque</i>	7dias	15dias	30dias	60dias
<b>T2</b>	1/128 - 1/164	1/64 - 1/64	1/16 - 1/16	1/16 - 1/16
<b>T4</b>	1/128 - 1/64	1/64 - 1/64	1/64 - 1/64	1/16 - 1/16

**Título das alíquotas estocadas e descongeladas.** O título está expresso para hemácias A<sub>1</sub> – B.

O sT4 manteve títulos 1/64, por 30 dias de estocagem à –20°C enquanto que o sT2 manteve títulos de 1/64 por 15 dias de estocagem à – 20°C. Tanto no sT2 quanto no sT4 ocorreu aglutinação de intensidade 4+ na reação sem diluição nas alíquotas de 7, 15 e 30 dias.

Os estudos indicam que, devido à dificuldade de manipulação e custo elevado, aliado ao desempenho inferior aos demais procedimentos, a utilização de técnicas de produção de soro à partir de plasma com Trombina pode ser seguramente substituída por solução aquosa de CaCl<sub>2</sub>. A avaliação da vida de prateleira determinou que o soro pode ser estocado de 15 a 30 dias dependendo do título.

O aspecto visual do soro não é determinante direto de sua qualidade sendo necessárias análises mais detalhadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BOARO, C.S.F. Instituto de Biociências, Unesp – Campus de Botucatu. **Comunicação Pessoal**, 2006.

BROMMER, E.J.; MEIJER, P. Thrombin generation induced by the intrinsic or extrinsic coagulation pathway is accelerated by streptokinase, independently of plasminogen. **Tromb. Haemost.**, v. 70, n. 6, p.995 – 997, 1993.

CAEN, J.; LARRIEU, M.J.; SAMAMA, M. **La Hemostasía: métodos de exploración y diagnóstico práctico**. Barcelona: Toray-Masson, 1977. 328p.

CHAMONE, D.A.F.; NOVARETTI, M.C.Z.; DORLHIAC-LLACER, P.E. **Manual de transfusão sanguínea**. São Paulo: Roca, 2001. 288p.

DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry**, v. 30, n.43, p.10363 – 10370, 1991.

DELVIN T.M. et. Al. (Eds.) **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 4. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2002. 1007p.

DOOLITTLE, R.F. The transformation of fibrinogen into fibrin. In: OGSTON, D.; BENNETT, B. (Eds.). **Haemostasis: biochemistry, physiology and pathology**. London: John Wiley & Sons, 1977. 529p.

FERINO, C.A. **Produção de anticorpos monoclonais anti-produto de degradação do fibrinogênio/fibrina humano**, 2002. 70f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FERREIRA, R.R. **Obtenção de anticorpo monoclonal murino anti-fator VIII da coagulação sanguínea**. Botucatu, 2001. 161f. Tese (Doutoramento) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- GARTNER, L.P.; HIATT J.L. **Tratado de histologia**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 456p.
- GOLDENBERG, N.A. et al. A new global assay of coagulation and fibrinolysis. **Tromb. Res.**, v.116, p.345 – 356, 2005.
- GUYTON, A.C.; HALL J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973p.
- HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN A.G. (Eds.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of the therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. 2148p.
- HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1999. 862p.
- HEYMAN, S.N. et al. The fibrinolytic system attenuates vascular tone: effects of tissue plasminogen activator (tPA) and aminocaproic acid on renal microcirculation. **Br. J. Pharm.**, v. 141, n. 1, p.971 – 978, 2004.
- HILLYER, C.D. et al. (Eds.). **Blood banking and transfusion medicine**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003. 624p.
- HIRSH, J.; SPILLERT, C.R.; DELLE DONNE, E.P.; LAZARO, E.J. In vitro effect of hirudin on recalcification time. **J. Med. Natl. Assoc.**, v. 86, n. 8, p.627 – 628, 1994.
- KUMAR, R.; BEGIN, S.; HEMKER, H.C. The influence of fibrinogen and fibrin on thrombin generation - evidence for feedback activation of the clotting system by clot bound thrombin. **Tromb. Haemost.**, v. 72, n. 5, p.713 - 721, 1994.
- MATSUDA, M. et al. Structure and function of fibrinogen: insights from dysfibrinogens. **Tromb. Haemost.**, v.82, p283 – 290, 1999.
- MEDDAHI, S. et al. Standard Measurement of clot-bound thrombin by using a chromogenic substrate for thrombin. **Thromb. Res.**, v.114, p.51 – 56, 2004.
- MIALE, J.P.; **Laboratory medicine**. 6. ed. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1982. 1084p.
- MOLLISON, P.L.; ENGELFRIET, C.P.; CONTRERAS, M. **Blood transfusion in clinical medicine**. 10. ed. Oxford: Blackwell Science, 1997. 754p.
- NICHOLL, S.M. et al. Plasmin induces smooth muscle cell proliferation. **J. Surg. Res.**, v. 127, n. 1, p.39 – 45, 2005.
- PISCIOTTO P.T. (Ed.). **Terapêutica transfusional**. 3. ed. Bethesda: AABB, 1989. 105p.
- RHODES, N.P.; WILLIAMS, D.F. Plasma recalcification as a measure of contact phase activation and heparinization efficacy after contact with biomaterials. **Biomaterials**, v. 15, n. 1, p.35 – 37, 1994.
- WEISEL, J.W. Fibrinogen and fibrin. **Adv. Protein. Chem.**, v. 70, p.247 – 299, 2005.