

ANA CAROLINA TERNES QUADRADO TOMCZAK

**ESTUDOS SOBRE O CONTROLE DE QUALIDADE DE UNIDADES
TRANSFUSIONAIS ERITROCITÁRIAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento

Co-orientadora: Prof^a. Titular Maria Suely Soares
Leonart

CURITIBA

2008

AO ERITRÓCITO...

Elegante, rápido, diferente
por entre tantas outras células
da gente indiferente
vives e viajas e realizas
a mais bela das funções
a de manter a vida.

Rubens Leonart

À minha avó, que estará sempre presente em meu coração.

À minha mãe e melhor amiga, por tudo que aprendi e aprendo com ela e por seu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Aguinaldo José do Nascimento, pela amizade, bom humor e disponibilidade. Seus conhecimentos em bioquímica, estatística e informática foram inestimáveis para a elaboração desse trabalho.

À minha co-orientadora Prof^a. Tit. Maria Suely Soares Leonart, por seu carinho, por ter confiado em mim e acima de tudo por sua sincera amizade. Por seus conhecimentos, fundamentais para a realização do trabalho.

À minha família pelo incentivo, suporte e pelo apoio incondicional em todos os momentos.

À minha querida irmã Ana Elisa pelo auxílio e sacrifícios que foram fundamentais para a finalização deste trabalho.

À Diretoria do HEMEPAR por ter entendido a importância da pesquisa.

A toda equipe do HEMEPAR, em especial, à farmacêutica bioquímica Anália Maria Breckenfelder Machado, à bióloga Jaqueline Morcelli Castro e à Liliane Denise Fromholz, técnica de laboratório.

À farmacêutica bioquímica Katia Teixeira de Meiróz Grillo, por sua inestimável colaboração.

À amiga Luciane Tucholski pelo companheirismo, apoio e incansáveis incentivos.

À Irene Ermelindo Santos, amiga e funcionária do Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica do Curso de Farmácia da UFPR por sua cooperação e amizade.

À Regina Montrezol, secretária do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por sua atenção, sempre amável, durante a realização do curso.

Aos amigos de laboratório, em especial, Alisson Fernandes dos Santos e Fagner Salmazo.

Ao Prof. Dr. Orlando César de Oliveira Barretto, por disponibilizar seu laboratório no Hospital de Clínicas na Universidade de São Paulo – USP para realização das análises de G6-PD e ATP.

À Sheila Serra pela acolhida e auxílio na realização das análises na USP.

A todos aqueles que doaram seu sangue possibilitando a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3 BPG	2,3 bisfosfoglicerato
ACD	Solução aditiva contendo: adenina, citrato e dextrose
ADSOL	Solução aditiva contendo: adenina, dextrose, salina e manitol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina 5'trifosfato
ATPase	Adenina trifosfatase
CH	Concentrado de hemácias
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CP	Concentrado de plaquetas
CPD	Solução aditiva contendo: citrato, fosfato e dextrose
CPDA	Solução aditiva contendo: citrato, fosfato, dextrose e adenina
DEPH	2-etil-exil-ftalato
DTNB	Ácido 2-dinitrobenzóico
EDTA	Etileno diamino tetracético
FDA	"Food and drug administration"
G6-P	Glicose 6-fosfato
G6-PD	Glicose 6-fosfato desidrogenase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
Hb	Hemoglobina
Hbe	Hemoglobina extracelular
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
Ht	Hematócrito
HX	Hexoquinase
MS	Ministério da Saúde
NAD	Nicotinamina adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP	Nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NO	Óxido nitroso
PFC	Plasma fresco congelado
PFK	Fosfofrutoquinase
PIP	Fosfo inositol fosfato
PRP	Plasma rico em plaquetas
PVC	Polivinil cloreto
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SAGM	Solução aditiva contendo: salina, adenina, glicose e manitol
SCANT	Antígeno senescente da célula
SCD	Sistema coletor estéril
SPT	Sobrevida pós-transfusional
ST	Sangue total
SUS	Sistema Único de Saúde
TRALI	Injúria pulmonar aguda relacionada a transfusão
UI	Unidade internacional
UTE	Unidade transfusional eritrocitária
VCM	Volume corpuscular médio

RESUMO

O sistema de hemoterapia no Brasil está estruturado em Hemocentros Estaduais e Regionais ligados ou não ao SUS, que realizam diversos procedimentos preconizados pelo Ministério da Saúde (MS) para a garantia da qualidade, envolvendo as diversas etapas do processo, como seleção e cuidados com os doadores, produção e preservação de hemocomponentes, análises laboratoriais e testes para garantir a destinação adequada aos receptores. As Unidades Transfusionais Eritrocitárias (UTE) devem ser avaliadas, ao longo de sua preservação, quanto aos parâmetros relacionados à funcionalidade dos eritrócitos após transfusão. Esse trabalho visou estudar a metodologia empregada para o controle de qualidade de UTE e propor a inclusão de métodos que contribuam para a garantia da qualidade. Foram estudadas 19 UTE mantidas em bolsas contendo salina, adenina, glicose e manitol (SAGM), preparadas a partir da coleta de Unidades de Sangue Total após consentimento informado, incluídas na rotina do Setor de Controle de Qualidade do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), por monitoramento no tempo zero e após 2, 4 e 6 semanas de preservação entre 2 e 6 °C. Foram realizadas as determinações laboratoriais rotineiras no HEMEPAR: volume, hematócrito, concentração de hemoglobina, hemoglobina total, hemoglobina extracelular, percentual de hemólise, glicose e potássio; com a inclusão de outros métodos laboratoriais: hemoglobina extracelular por cianometahemoglobina e percentual de hemólise, morfologia eritrocitária, teores de metahemoglobina, ATP e GSH e atividades de G6-PD. A partir de Unidades com 450 ± 30 ml de sangue total obteve-se UTE com 310 a 350 ml e 54 a 74 g de hemoglobina; as quais, durante a preservação se apresentaram com hemoglobina estável de 20 ± 1 g/dl; hematócrito, VCM, HCM e CHCM estáveis; índices de hemólise de até 1,2%; consumo de glicose constante, de 15,3 µg de glicose/dl/dia; aumento gradativo da concentração de K^+ no meio extracelular, diminuição gradativa dos níveis de ATP, com perdas de até 60%; correlação positiva da % de discócitos com os níveis de ATP ($r=0,93$); concentrações de metahemoglobina menores que 1%; diminuição gradativa dos níveis de GSH, chegando a zero em 42 dias; atividades de G6-PD acima de 80% do normal. Os eritrócitos apresentaram índices adequados de morfologia e integridade celular e baixos teores de hemólise, porém com alterações significativas nas reservas energéticas e antioxidantes da célula, de forma concordante com outros estudos sobre as condições usuais de preservação de eritrócitos para transfusão. Os resultados apontam para a necessidade do monitoramento de algumas dessas lesões de estoque, para avaliar o comprometimento de funções ligadas à energia. A partir de uma análise do conhecimento científico atualizado, das normas preconizadas pela RDC nº 153/2004 da ANVISA, das atividades rotineiras praticadas no HEMEPAR e dos resultados obtidos, sugere-se a implementação de alguns métodos para o monitoramento das UTE, que poderiam contribuir com a qualidade da hemoterapia, entre eles, avaliação morfológica dos eritrócitos pela determinação das % de discócitos; determinação dos índices de hemólise a partir da determinação da concentração de cianometahemoglobina extracelular; determinação dos índices hematimétricos, VCM, HCM e CHCM; e determinação das concentrações de metahemoglobina e de GSH.

ABSTRACT

The hemotherapy system in Brazil is structured in States and Regional Hemocenters linked or not to SUS (Unique System of Health of Brazil), that accomplish several procedures extolled by Ministry of Health for the warranty of the quality, involving the several stages of the process, as selection and cares with the donors, production and hemocomponent preservations, laboratorial analyses and tests to guarantee the appropriate destination to the receivers. The transfusional erythrocyte units (UTE) should be appraised, along preservation time, about parameters related to the erythrocytes post-transfusion survival. The aim of this work was to study the methodology used for the quality control of UTE and to propose news assays in order to contribute to the warranty of the quality. It was studied 19 UTE maintained in bags containing saline, adenine, glucose and mannitol (SAGM), prepared from the collection of Units of Total Blood after informed consent, included in the routine of the Quality Control Department of the Center of Hematology and Hemotherapy of Paraná (HEMEPAR), for monitoration in the time zero and after 2, 4 and 6 weeks of preservation at 2 to 6 °C. The routine laboratorial determinations were accomplished in HEMEPAR: volume, hematocrit, hemoglobin concentration, total hemoglobin, extracelular hemoglobin, percentile of hemolysis, glucose and potassium concentrations; with the inclusion of other laboratorial assays: extracellular hemoglobin by cyanomethemoglobin method and percentile of hemolysis, morphology, hemoglobin, ATP and GSH content and activities of G6-PD. Starting from Units with 450 ± 30 ml of total blood it was obtained UTE with 310 to 350 ml and 54 to 74 g of hemoglobin; the ones which, during the preservation shown stable hemoglobin of 20 ± 1 g/dl; stables hematocrit (HCT), MCV, MCH and MHCC; hemolysis indexes less than 1.2 %; constant consumption of glucose at rates of $15.3 \mu\text{g glucose/dl/day}$; gradual increase of the concentration of K^+ in the extracelular medium, gradual decrease of the levels of ATP, with losses of up to 60%; positive correlation of the % of discocytes with the levels of ATP ($r=0.93$); concentrations of methemoglobin less than 1 %; gradual decrease to zero in 42 days of GSH levels; activities of G6-PD above 80 % of the normal. The appropriate indexes of morphology and cellular integrity and low hemolysis rates, however with significant alterations in the energy and antioxidant cell reserves, are in agreement with other studies about the usual conditions of preserved erythrocytes for transfusion. The results point out for the need of the monitoration of some of those stock lesions, to evaluate the energy linked functions compromise. Starting from an analysis of the updated scientific knowledge, of the regulations by RDC n° 153/2004 of ANVISA, of the routine activities practiced in HEMEPAR and of ours results, it is suggested the implementation of some monitoring methods for the UTE, that could contribute with the hemoterapy quality, among them, morphologic evaluation of the erythrocytes for the determination of the discocytes %; determination of the hemolysis indexes based on the concentration of extracelular cyanomethemoglobin; determination of the hematimetric indexes MCV, MCH and MHCC; and determination of the methemoglobin and GSH concentrations.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	ERITRÓCITO HUMANO	18
2.1.1	Metabolismo Energético e Oxidativo	20
2.1.2	Morfologia Eritrocitária	22
2.1.3	Hemoglobina	25
2.1.4	Senescência do Eritrócito.....	26
2.2	HEMOTERAPIA	27
2.2.1	Unidades Transfusionais Eritrocitárias	29
2.2.1.1	Lesões de estoque	29
2.2.1.2	Preservação e soluções aditivas	30
2.2.1.3	Emprego clínico.....	33
2.3	GARANTIA DA QUALIDADE E CONTROLE DE QUALIDADE EM HEMOTERAPIA.....	35
2.3.1	Controle de Qualidade de Unidades Transfusionais Eritrocitárias	37
3.	OBJETIVOS.....	40
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	40
3.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	MATERIAL	42
4.2	MÉTODOS	42
4.2.1	Triagem de Doadores e Coleta de Material.....	43
4.2.2	Fracionamento do Sangue em Hemocomponentes e Preparo das Unidades Transfusionais Eritrocitárias	43
4.2.3	Aliquotagem das Unidades Transfusionais Eritrocitárias	43
4.2.4	Determinações para o Controle de Qualidade de Unidades Transfusionais Eritrocitárias empregadas como rotina no HEMEPAR.....	44
4.2.4.1	Análise microbiológica.....	44
4.2.4.2	Determinação do volume de sangue total e de hemocomponentes	44
4.2.4.3	Determinação do hematócrito e dos valores de eritrograma	44
4.2.4.4	Determinação de potássio.....	45
4.2.4.5	Determinação da hemoglobina extracelular	45
4.2.4.6	Determinação da hemoglobina total.....	46
4.2.4.7	Determinação da quantidade de hemoglobina nas UTE	46
4.2.4.8	Determinação do percentual de hemólise	46
4.2.4.9	Dosagem da glicose extracelular	47
4.2.5	Determinações Laboratoriais Propostas Para Este Trabalho.....	47
4.2.5.1	Determinação da concentração de metahemoglobina	47
4.2.5.2	Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)	48
4.2.5.3	Determinação da atividade enzimática de G6-PD.....	48

4.2.5.3.1	Preparo de hemolisado	49
4.2.5.3.2	Dosagem da hemoglobina do hemolisado	49
4.2.5.3.3	Determinação da atividade enzimática.....	50
4.2.5.4	Percentagem de hemólise.....	50
4.2.5.5	Morfologia eritrocitária.....	51
4.2.5.6	Determinação de ATP	52
4.2.5.6.1	Preparo do extrato.....	52
4.2.5.6.2	Determinação da concentração.....	52
4.2.6	Análises Estatísticas	53
5.	RESULTADOS.....	55
5.1	VOLUME DE SANGUE COLETADO.....	55
5.2	VOLUME DAS UNIDADES TRANSFUSIONAIS ERITROCITÁRIAS	56
5.3	CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA.....	57
5.4	QUANTIDADE DE HEMOGLOBINA EM UTE	58
5.5	HEMATÓCRITO	59
5.6	VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (VCM)	60
5.7	HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (HCM).....	61
5.8	CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (CHCM).....	62
5.9	HEMOGLOBINA EXTRACELULAR	63
5.10	HEMÓLISE	64
5.10.1	Hemólise pelo Método da Oxihemoglobina	64
5.10.2	Hemólise pelo Método da Cianometahemoglobina	65
5.11	GLICOSE.....	66
5.12	POTÁSSIO	68
5.13	PERCENTAGEM DE DISCÓCITOS.....	69
5.14	PERCENTAGEM DE ATP	70
5.15	PERCENTAGEM DE DISCÓCITOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP	71
5.16	METAHEMOGLOBINA.....	72
5.17	GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	73
5.18	GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6-PD)	74
6.	DISCUSSÃO	76
7.	CONCLUSÕES	87
8.	REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS		

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GLICÓLISE, DO CICLO DAS PENTOSE E DO CICLO DE LUEBERING-RAPOPORT EM ERITRÓCITOS HUMANOS	21
FIGURA 2.	NÚMERO DE UNIDADES EM FUNÇÃO DO VOLUME DE SANGUE COLETADO DOS DOADORES	54
FIGURA 3.	NÚMERO DE UNIDADES EM FUNÇÃO DO VOLUME DAS UNIDADES TRANSFUSIONAIS ERITROCITÁRIAS.....	55
FIGURA 4.	CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA NA UTE DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM.....	56
FIGURA 5.	NÚMERO DE UNIDADES EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE HEMOGLOBINA.....	57
FIGURA 6.	VALORES DE HEMATÓCRITO EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM.....	58
FIGURA 7.	VALORES DE VCM EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM.....	59
FIGURA 8.	VALORES DE HCM EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM.....	60
FIGURA 9.	VALORES DE CHCM EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM.....	61
FIGURA 10.	CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA PLASMÁTICA EM UNIDADE TRANSFUSIONAL ERITROCITÁRIA DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM.....	62
FIGURA 11A.	PERCENTAGEM DE HEMÓLISE DURANTE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO EM SAGM – MÉTODO DA OXIHEMOGLOBINA	63
FIGURA 11B.	PERCENTAGEM DE HEMÓLISE DURANTE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO EM SAGM - MÉTODO DE PELISSARI et al. (1993)	64
FIGURA 12A.	CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EXTRACELULAR DURANTE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM SAGM	65
FIGURA 12B.	GRÁFICO DA CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM PARA O CONSUMO DE GLICOSE DURANTE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM SAGM	66
FIGURA 13.	CONCENTRAÇÕES DE K ⁺ NO MEIO EXTRACELULAR DURANTE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM SAGM	67
FIGURA 14.	PERCENTAGEM DE DISCÓCITOS EM UNIDADES TRANSFUSIONAIS ERITROCITÁRIAS DURANTE 42 DIAS EM SAGM	68

FIGURA 15.	CONCENTRAÇÃO DE ATP EM ERITRÓCITOS DURANTE PRESERVAÇÃO POR 42 DIAS EM SAGM	69
FIGURA 16.	PERCENTAGEM DE DISCÓCITOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP EM ERITRÓCITOS PRESERVADOS DURANTE 42 DIAS EM SAGM.....	70
FIGURA 17.	CONCENTRAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM	71
FIGURA 18.	CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM	72
FIGURA 19.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6-PD EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ESPECIFICAÇÕES PARA A QUALIDADE DE UNIDADES DE ERITRÓCITOS DO MINISTÉRIO DA SAÚDE: RDC N° 153 DE 2004.....	37
TABELA 2. ESPECIFICAÇÕES PARA A QUALIDADE DE UNIDADES DE ERITRÓCITOS REALIZADAS PELO HEMEPAR ALÉM DAS EXIGIDAS PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE	38

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O sistema de hemoterapia no Brasil está estruturado em Hemocentros Estaduais e Regionais. Os Hemocentros realizam diversos procedimentos preconizados pelo Ministério da Saúde (MS) para a garantia da qualidade, envolvendo as diversas etapas do processo, como seleção e cuidados com os doadores, produção e preservação de hemocomponentes, análises laboratoriais de cada hemocomponente e testes para garantir a destinação adequada aos receptores.

Os hemocomponentes são submetidos a análises laboratoriais com o objetivo de avaliar sua qualidade para transfusão. As unidades de eritrócitos devem ser avaliadas ao longo de sua preservação por parâmetros relacionados à funcionalidade dos eritrócitos após transfusão.

Estudos *in vivo* são caros, invasivos e costumam ser utilizados para fins científicos. Baseiam-se no monitoramento de eritrócitos marcados com cromo radiativo e transfundidos, avaliando-se a sobrevivência pós-transfusional após 24 horas (SPT), a qual deve ser no mínimo de 75% (HESS & GREENWALT, 2002).

Estudos *in vitro* costumam ser mais seguros, podendo ser empregados tanto para pesquisas sobre novos métodos de preservação e qualidade, quanto para assegurar a qualidade de unidades transfusionais de eritrócitos. As análises mais empregadas nestes estudos são volume, hematócrito, hemoglobina extracelular, hemoglobina total, percentual de hemólise, morfologia, pH, potássio (K^+), sódio (Na^+), ATP, 2,3 bis-fosfoglicerato (2,3 BPG), controle microbiológico; e ainda enzimas e metabólitos do sistema antioxidante eritrocitário, como metahemoglobina, glutatona reduzida (GSH), glutatona redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD), entre outras.

Ao longo das últimas décadas, inúmeras pesquisas foram realizadas com a finalidade de encontrar formas de diminuir a lesão de estoque e as reações adversas pós-transfusionais, bem como estabelecer as situações clínicas nas quais o benefício da transfusão é superior aos riscos. Através dessas pesquisas, maior conhecimento sobre a fisiologia e metabolismo de eritrócitos foi estabelecido e novos parâmetros para a qualidade de UTE vêm sendo levantados.

Neste projeto foram realizados estudos *in vitro*, em cooperação entre o Setor de Controle de Qualidade do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná

(HEMEPAR) e o Programa de Pós Graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná. O estudo visou estudar a metodologia empregada no HEMEPAR para controle de qualidade das unidades transfusionais eritrocitárias, bem como outros métodos já conhecidos que, embora acessíveis, ainda não estejam sendo utilizados nos principais hemocentros do país, mas que possam vir a contribuir com a garantia da qualidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ERITRÓCITO HUMANO

Originários de células tronco pluripotentes da medula óssea através da eritropoese, os eritrócitos maduros, também conhecidos por hemácias, são discos bicôncavos de aproximadamente 7,2 μm em diâmetro, 1,5 a 2,5 μm de altura, e com volume de ± 90 fl, cerca de 95% de seu peso seco é constituído por hemoglobina (SCHWABBAUER, 1998).

A eritropoiese é predominantemente regulada por um fator de crescimento e diferenciação, a eritropoetina, cuja síntese é regulada por tensão renal de oxigênio em resposta a fatores como saturação de oxigênio na hemoglobina, concentração de hemoglobina, níveis de 2,3-BPG, total de eritrócitos, índice de fluxo sanguíneo e índice metabólico basal (ELGSAETER & MIKKELSEN, 1991). Quando amadurece, o eritrócito perde núcleo e inicia a produção de hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) entre os pulmões e tecidos. Fisiologicamente, após cerca de 120 dias na circulação, o eritrócito envelhece e é destruído no baço (DACIE & LEWIS, 1995).

A função primária do eritrócito é transportar O_2 dos pulmões aos tecidos, onde ocorre a troca pelo CO_2 . Esta é facilitada por efeitos sinérgicos da hemoglobina, da anidrase carbônica e da proteína banda 3, seguida pela entrega de CO_2 aos pulmões para sua liberação (KLEINBONGARD et al., 2007). O transporte bem sucedido de O_2 é dependente da eficácia de três elementos eritrocitários: a membrana, a hemoglobina, e o conteúdo energético celular (SHONAT & JOHNSON, 1997).

Diversos estudos têm demonstrado que, além da função de transporte das moléculas de O_2 e CO_2 , o eritrócito também tem um papel importante na regulação da vasodilatação (HÖGMAN et al., 1991). No caso de hipóxia nos tecidos, o eritrócito, envolvendo ATP e NO, estaria implicado com o aumento da vascularização (KLEINBONGARD et al., 2007).

Como outras membranas celulares, a membrana do eritrócito é uma estrutura fluída, composta de uma bicamada lipídica semipermeável com organização

assimétrica de proteínas (STIENE-MARTIN et al.,1998). A bicamada lipídica representa aproximadamente 40% da massa da membrana eritrocitária, com pequenas quantidades de ácidos graxos e glicolípídeos, e quantidades equimolares de colesterol não esterificado e fosfolípídeos. As proteínas da membrana podem ser divididas em integrais e periféricas, de acordo com sua localização em relação à bicamada lipídica e a suas funções (LEE et al., 1999).

Proteínas integrais de membrana, tais como a glicoforina e a proteína banda 3, atravessam transversalmente a membrana e contém extensões internas e externas à membrana do eritrócito. Suas funções principais são apresentar antígenos do eritrócito e agirem como receptoras e transportadoras (MOHANDAS & CHASIS, 1993). Já as proteínas periféricas são encontradas somente na superfície citoplasmática da membrana e formam o citoesqueleto do eritrócito. Estas proteínas formam uma rede, também denominada malha de microfilamentos, que fortalece a membrana do eritrócito enquanto mantém sua forma e estabilidade (DERICK et al, 1992).

Embora todas as células vermelhas do sangue sejam essencialmente semelhantes, os antígenos em suas superfícies variam de um indivíduo para outro. Estes antígenos servem como base para a classificação em grupos sangüíneos (HÖGMAN et al., 1991), podendo ser proteínas, carboidratos, glicoproteínas ou glicolípídios, dependendo do sistema. A compatibilidade ou incompatibilidade de grupos importantes como o sistema ABO e Rh entre doador e receptor é uma consideração fundamental para uma transfusão de sangue bem sucedida (GAMBERO et al., 2004).

A captação e a liberação de oxigênio pela molécula de hemoglobina são controladas pelo 2,3-BPG. Este afeta a conformação da desoxihemoglobina, o que facilita a liberação de oxigênio em tecidos com baixa pressão de O₂ e diminui sua afinidade por este (STIENE-MARTIN et al.,1998). Portanto, um aumento nos níveis de 2,3-BPG desencadeado por hipóxia nos tecidos, muda a curva de dissociação de hemoglobina-oxigênio, ocasionando um desvio à direita, e conseqüente aumento da liberação de oxigênio nos tecidos (BEUTLER, 1984).

Os eritrócitos apresentam três propriedades raras: alta elasticidade, resposta rápida a tensões e capacidade de sofrer grandes expansões sem fragmentação da membrana (JANDL, 1991). Tais propriedades juntas dão significado à expressão

'deformabilidade celular' e conferem ao eritrócito flexibilidade para fluir e chegar até mesmo aos tubos capilares mais finos (LEE et al., 1999).

2.1.1 Metabolismo Energético e Oxidativo

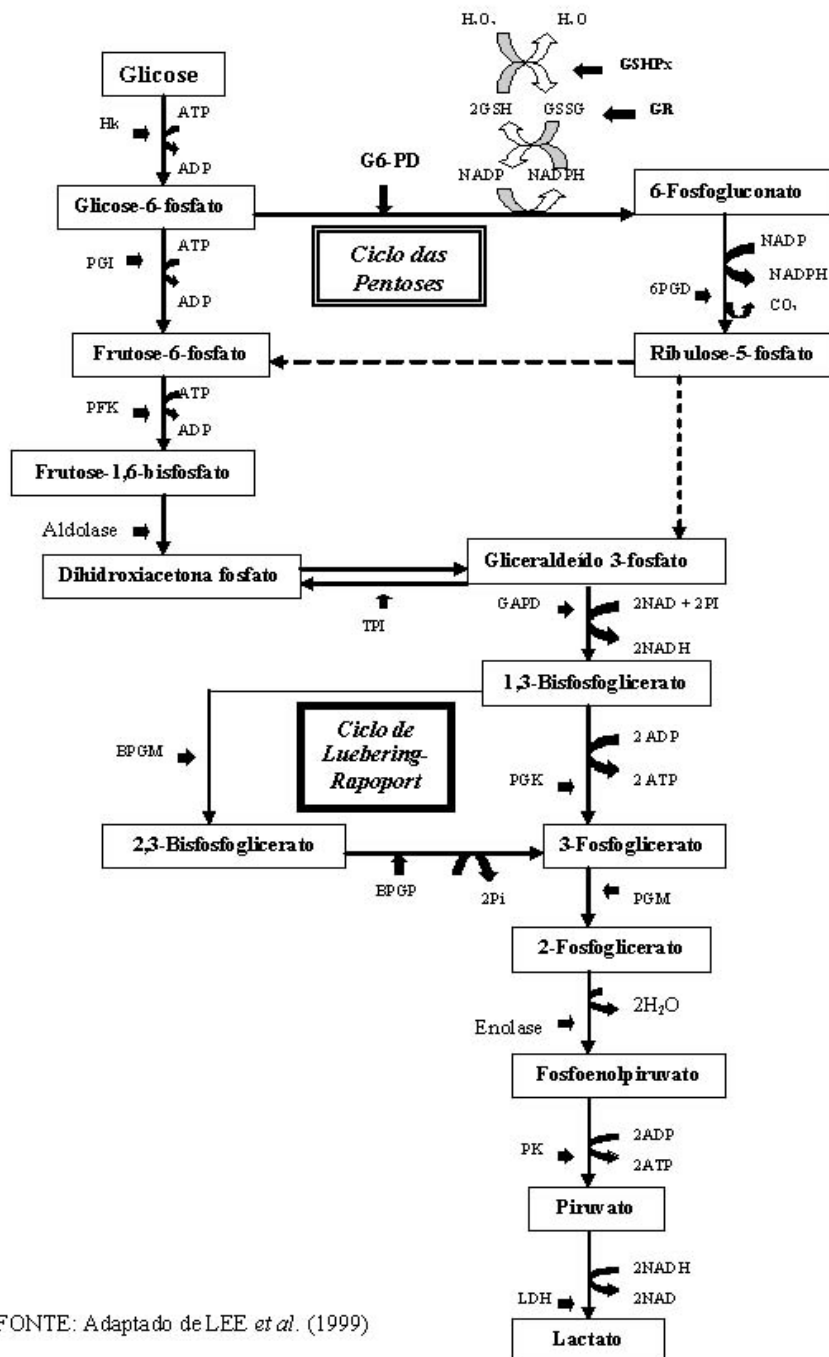
O eritrócito maduro necessita de energia para desempenhar sua função e manter sua integridade. Seu metabolismo depende basicamente de duas vias, a glicólise, neste caso conhecida como via de Embden-Meyerhof, e o ciclo das pentoses fosfato (SHONAT & JOHNSON, 1997). A principal fonte de energia para o eritrócito é a glicose, que atravessa a membrana plasmática com facilidade. Em condições normais, 90% da glicose que penetra na célula é metabolizada pela glicólise e o restante pela via das pentoses. Em situação de estresse oxidativo, a situação metabólica é invertida (LEE et al., 1999).

A glicólise gera três produtos importantes para o eritrócito: duas moléculas de adenosina-5'-trifosfato (ATP), duas moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) e 2,3 bisfosfoglicerato (2,3 BPG), através do desvio de Luebering-Rapoport (HAMASAKI & YAMAMOTO, 2000). O ATP é a principal fonte de energia que aciona a bomba de cátions, mantém a forma e a capacidade de deformação da membrana, possivelmente por fosforilação da espectrina, e modula a quantidade de 2,3 BPG gerada (STIENE-MARTIN et al., 1998). O NADH é co-fator enzimático em algumas etapas da glicólise e na reação de conversão da metahemoglobina a hemoglobina, isto é, na redução da metahemoglobina pela enzima metahemoglobina redutase (MeSH) (KLINKEN, 2002).

A regulação da glicólise parece ser realizada por três enzimas, hexoquinase (HX), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK). A HX é inibida por seu produto, a glicose-6-fosfato (G6-P) e estimulada por seu substrato, o ATP-Mg (KLINKEN, 2002). Esta etapa da via é irreversível e mantém a glicose aprisionada no interior da célula pois, ao se adicionar um grupo fosfato à glicose, ela torna-se uma molécula carregada negativamente e não atravessa passivamente a membrana celular (SHONAT & JOHNSON, 1997). A PFK é sensivelmente afetada pelo pH, sendo 8,0 seu pH ótimo. Sua atividade tende a aumentar com a elevação do pH e a diminuir com a queda deste. A regulação da PK é realizada por seu produto, o ATP (GRIMES, 1980).

A via das pentoses fosfato tem como maior objetivo disponibilizar potencial de redução ao eritrócito pelo fornecimento de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (SHONAT & JOHNSON, 1997). A G6-PD inicia esta via convertendo G6-P a 6-fosfoglicano- δ -lactona em uma etapa reguladora. A importância de NADPH no meio está na manutenção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no eritrócito, a qual é a principal fonte de proteção contra o ataque oxidativo (STIENE-MARTIN et al., 1998).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GLICÓLISE, DO CICLO DAS PENTOSSES E DO CICLO DE LUEBERING-RAPOPORT EM ERITRÓCITOS HUMANOS



FONTE: Adaptado de LEE *et al.* (1999)

2.1.2 Morfologia Eritrocitária

Ao longo de um ciclo de vida completo, o eritrócito saudável passa por modificações em sua morfologia, decorrentes de seu envelhecimento. Diversas são

as formas assumidas por ele neste período. As mais caracterizadas são discócito, equinócito, estomatócito e esferócito.

Dentre as possíveis formas assumidas por eritrócitos, a de discócito é a ideal, por apresentar a melhor proporção superfície/volume, o que possibilita um alto rendimento nas trocas gasosas, bem como para uma excelente deformabilidade, essencial para a passagem por pequenos capilares.

O mecanismo de controle da forma eritrocitária depende de energia, das proteínas da membrana, da bicamada lipídica e de suas interações (ELGSAETER & MIKKELSEN, 1991). As duas metades da bicamada podem responder de forma diferente a uma perturbação, sendo que alterações de forma dependem das áreas relativas de suas porções interna e externa (SHEETZ & SINGER, 1974).

A viscosidade citoplasmática, regulada pela concentração de hemoglobina e pelo conteúdo de água, é importante quando o CHCM ultrapassa 37 g/dl, pois aumenta exponencialmente, alterando a fisiologia do eritrócito (JANDL, 1991).

A formação de equinócito ou estomatócito se dá pela diminuição de ATP na chamada depleção metabólica, em excesso de Ca^{2+} , ou por agentes químicos (FÉO & MOHANDAS, 1977), pela expansão da porção externa ou da porção interna da bicamada, respectivamente, sendo que ambos são reversíveis à forma de discócito e interconvertíveis (CHAILLEY et al., 1973). Entretanto, se houver perda de fragmentos da membrana pela continuidade da lesão, com aumento da viscosidade e rigidez do eritrócito, forma-se o esferócito, irreversível e altamente suscetível à hemólise. Em todos os casos, ocorre diminuição da deformabilidade do eritrócito (CHABANEL et al., 1987).

Este fenômeno de formação do equinócito através da diminuição de ATP ocorre com redução da porção interna da bicamada, secundária às desfosforilações de PIP_2 e de fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP), sendo que o restabelecimento de concentrações adequadas de ATP ou a fosforilação dos fosfolípidos levam à reconversão a discócito (FERRELL & HUESTIS, 1982). Entre as conseqüências da falta de ATP, cita-se a polimerização ou formação que envolve o complexo espectrina na face interna da membrana (SHEETZ & SINGER, 1977); bem como a não manutenção da fosforilação pelas quinases, devida à contínua ação de fosfatases (GRATZER, 1984). Além disso, a presença de íons cálcio pode ativar a fosfodiesterase ligada à membrana, que degrada PIP e PIP_2 a 1,2- diacilglicerol (ALLAN & RAVAL, 1987). A bomba de Na^+/K^+ também depende da energia de

moléculas de ATP. Sem o funcionamento da bomba, a membrana celular deixa de realizar trocas de íons entre o eritrócito e o meio extracelular, comprometendo também a expulsão de moléculas de H₂O, que é realizada em conjunto com sua propriedade osmótica (KLEIN et al. 2007).

Quando o equinócito é formado por depleção de ATP, com liberação de K⁺, acúmulo de Na⁺ e Ca²⁺ e diminuição da extratibilidade da espectrina, não há reversão por albumina, indicando a desforforilação da espectrina, com rearranjo ou desagregação das proteínas da membrana, situação que pode ser revertida pela clorpromazina (MOHANDAS et al., 1983).

Sabendo-se que o citoesqueleto é um gel iônico bidimensional ligado a uma bicamada lipídica fluida, é aceitável a idéia de que estas três camadas deslizam entre si (WOLFE, 1985).

Mudanças na organização do citoesqueleto podem também levar a alterações de forma. Por exemplo, o *crosslinking* das proteínas do citoesqueleto, por ação de transglutaminase, que é ativada por Ca²⁺, pode alterar a associação entre o citoesqueleto e a porção lipídica, levando a uma contração de sua camada interna, com formação de equinócito. Nesses casos, o excesso de Ca²⁺ provoca ainda a degeneração da membrana (REINHART & CHIEN, 1987). Equinócitos compostos por lisolecitina, que é agente equinocítico, são revertidos a discócitos por albumina bovina, que é estomatogênica (LICHTMAN et al., 1974).

2.1.3 Hemoglobina

A molécula de hemoglobina é composta por quatro cadeias polipeptídicas, as globinas, arranjadas de forma tetraédrica. A hemoglobina A, forma mais comum, presente em maior quantidade no adulto, é constituída por cadeias do tipo α e β . Cada uma dessas quatro cadeias contém um grupo prostético, o heme, o qual está localizado em fendas apolares próximas da face externa da molécula, uma em cada subunidade (STRYER, 1995; LEE et al., 1999).

A hemoglobina é a proteína transportadora de O_2 , íons hidrogênio (H^+) e outros gases como o CO_2 , presentes em abundância nos eritrócitos. Outras proteínas, no interior do eritrócito, são enzimas requeridas para a produção de energia e para a manutenção da hemoglobina na forma reduzida, seu estado funcional (LEE et al., 1999). A produção de hemoglobina depende de 3 processos: recebimento de ferro, síntese de protoporfirina, e síntese de globina.

A hemoglobina se liga ao oxigênio cooperativamente, de modo que mudanças pequenas na pressão de oxigênio resultem em quantias grandes do mesmo, podendo ser tomado do pulmão ou liberado aos tecidos (KLEIN et al., 2007). A curva de dissociação de oxigênio-hemoglobina mostra a relação entre a saturação de oxigênio na hemoglobina e a tensão de oxigênio. A ligação ao oxigênio e sua liberação são afetadas pelo pH no tecido e a concentração de dióxido de carbono, assim como pela concentração de 2,3 BPG. A porção abrupta da curva indica que essa tensão de oxigênio é bem conservada, ainda que a saturação de oxihemoglobina diminua drasticamente. Isto resulta da entrega continuada de oxigênio aos tecidos, apesar de níveis progressivamente mais baixos de saturação (BEASLEY et al., 2006). Mudanças no P50, a pressão parcial na qual 50% hemoglobina está saturada, compensa as mudanças na tensão de oxigênio nos alvéolos pulmonares ou nos tecidos.

A oxihemoglobina é formada durante a respiração, quando o oxigênio une-se ao componente heme da hemoglobina. Este processo ocorre nos capilares, junto aos alvéolos dos pulmões. Assim, o oxigênio levado pelos eritrócitos chega às células, onde é utilizado na produção de ATP pelo processo de fosforilação oxidativa, com diminuição do pH no sangue (HÖGMAN et al., 1991). No entanto, a respiração, pode inverter esta condição pela remoção do dióxido de carbono, o que eleva novamente o pH. A hemoglobina sem o oxigênio é conhecida por

desoxihemoglobina, a qual apresenta um pico de absorção em 940 nm, levemente mais alto que o da oxihemoglobina, que está em 660 nm. Esta diferença pode ser usada para medir a quantidade de oxigênio no sangue de pacientes através de oxímetro (GRIMES, 1980).

Formas variantes de hemoglobina fazem parte do desenvolvimento normal embrionário e fetal, mas também podem ser formas mutantes desta molécula, causadas por variações genéticas (HÖGMAN & MERYMAN, 2006b). Algumas formas variantes podem ser responsáveis por hemoglobinopatias, como a anemia falciforme, causada pela produção da hemoglobina S, que apresenta alteração mínima em sua estrutura, porém é capaz de determinar, sob certas circunstâncias, uma singular interação molecular, com drástica redução em sua solubilidade (LEE et al., 1999).

2.1.4 Senescência do Eritrócito

Durante um ciclo normal de vida, eritrócitos sofrem mudanças metabólicas e físicas associadas com o processo de senescência, tal como vesiculação da membrana, diminuição no tamanho da célula, aumento da densidade intracelular, alterações do citoesqueleto, perda de co-fatores enzimáticos, e exposição de fosfatidilserina (MOLLISON et al., 1997).

Eritrócitos saudáveis são mantidos na circulação sangüínea por até 110 a 120 dias. Com o passar do tempo, eles vão se tornando gradualmente mais densos, provavelmente por perda de material de membrana, sendo a centrifugação um método já reconhecido para separação entre células velhas e jovens, por densidade (MOHANDAS & CHASIS, 1993). Durante algum tempo acreditou-se que, com esta perda e diminuição da flexibilidade da célula, ocorria a fagocitose de eritrócitos nos estreitos canais do baço e fígado, resultando em sua retirada da circulação (DERICK et al., 1992). No entanto, embora uma membrana mais rígida possa contribuir para a eliminação do eritrócito e ser dominante sob certas condições patológicas, há evidências experimentais de que o principal mecanismo é outro (BRATOSIN et al., 2002). Foi mostrado, por exemplo, que uma alteração na proteína banda 3 da membrana celular leva à formação de um neo-antígeno, denominado antígeno senescente de célula (SCANT) (MOLLISON et al., 1997). A ligação subsequente de um auto-anticorpo (anti-SCANT) presente no plasma, provavelmente em maior

concentração pela atividade do sistema complemento, fornece um sinal forte para fagocitose, que ocorre predominantemente no baço (SCOTT et al., 2005).

2.2 HEMOTERAPIA

A hemoterapia é o emprego terapêutico do sangue, o qual pode ser transfundido como sangue total ou como um de seus componentes ou derivados. Os hemocomponentes são obtidos através de processos físicos de separação, entre eles: concentrado de hemácias, plasma fresco congelado, concentrado de plaquetas e crioprecipitado. Já os hemoderivados, proteínas extraídas do plasma, são fabricados através de processos físico-químicos industrializados, entre eles: albumina, imunoglobulinas e fatores da coagulação (VII, VIII, IX e complexos protrombínicos).

As primeiras transfusões eram feitas diretamente do doador para o receptor, para que o sangue não coagulasse. A primeira transfusão não-direta foi realizada em 1914 pelo médico belga Albert Hustin, que usou citrato de sódio como anticoagulante. Desde as primeiras tentativas de preservação de eritrócitos para transfusão, a glicose foi empregada como fonte de energia (ROUS & TURNER, 1916).

A primeira transfusão utilizando sangue armazenado e resfriado foi executada em 1916, por Oswald Hope Robertson. Pesquisador, médico e oficial do exército dos EUA, ele foi reconhecido por estabelecer o primeiro banco de sangue, enquanto servia na França durante a I Guerra Mundial (GIANGRANDE, 2000).

Em 1900, Karl Landsteiner, pesquisador austríaco, revelou que reações antígeno-anticorpo dos grupos sanguíneos ABO, eram responsáveis por incompatibilidades sangüíneas que geravam graves efeitos pós-transfusionais. Em 1940, Landsteiner e Wiener, estudando o sangue do macaco Rhesus, descobriram um novo sistema de grupos sanguíneos, a que deram o nome de Rh. Fisher e Race, aprofundando estes estudos, definiram melhor este sistema, considerando os antígenos descritos por Landsteiner e Wiener como pertencentes a um outro sistema, a que chamaram LW. Eles criaram ainda uma nomenclatura para os antígenos Rh, qual seja, a presença de antígeno D definia o chamado Rh positivo e a ausência do antígeno D, o Rh negativo (GAMBERO et al., 2004).

A partir da década de 40, sobretudo com a II Guerra Mundial, avanços científicos e tecnológicos permitiram maior e melhor aproveitamento do sangue e seus derivados, possibilitando menores riscos e melhores resultados para a saúde dos pacientes (JUNQUEIRA, 2005).

Esses avanços podem ser especialmente destacados com relação à incompatibilidade sanguínea, à utilização e ao acondicionamento dos componentes do sangue (GIANGRANDE, 2000).

Na década de 60, com o advento das bolsas plásticas, a segurança das transfusões aumentou, sobretudo por ser um sistema fechado de coleta, diminuindo a possibilidade das infecções advindas do ambiente (JUNQUEIRA, 2005). Outro aspecto relacionado com a preservação dos componentes do sangue, relativo às bolsas plásticas de coleta, é o fato de que, por serem de um material que permite a troca de gases, ao contrário dos frascos de vidro, conservam melhor as funções celulares, além de possibilitar o processamento do sangue e a separação dos seus componentes (SOARES, 2002).

Nas décadas de 60 e 70, durante a guerra do Vietnã, as técnicas de processamento do sangue evoluíram muito, possibilitando um melhor aproveitamento no uso dos hemocomponentes. A partir daí, o uso racional dos hemocomponentes se consolidou, com base na indicação clínica e na geração de economia de guerra. Conseqüentemente, observou-se uma melhor resposta terapêutica pela maior especificidade na utilização dos componentes (GUERRA, 2000).

A partir de uma unidade de sangue, são preparados basicamente três hemocomponentes: hemácias, plaquetas e plasma fresco congelado, os quais são armazenados, respectivamente, 1 a 6 °C, 20 a 24 °C e -30 °C. O uso de soluções aditivas possibilitou também um maior tempo de estocagem dos eritrócitos, sem grande perda das funções celulares (GIANGRANDE, 2000).

2.2.1 Unidades Transfusionais Eritrocitárias

A Unidade transfusional eritrocitária (UTE) é uma suspensão de eritrócitos obtida a partir de unidade de sangue total, da qual o plasma é retirado, formando um concentrado de eritrócitos, o qual contém quantidade residual de leucócitos e plaquetas, uma vez que seu plasma não é totalmente retirado. Ao concentrado é adicionada uma solução aditiva preservadora (GRIMES, 1980).

A preparação mais utilizada atualmente para a UTE é a líquida, com solução anticoagulante e solução aditiva, preparada a partir de uma unidade de sangue total e armazenada entre 2 e 6 °C. O sangue total é coletado em bolsa de cloreto de polivinil (PVC) contendo anticoagulante, ligada a duas bolsas satélites, das quais uma contém solução preservante. O sangue é centrifugado, retirando-se o sobrenadante, os eritrócitos são ressuspensos na solução aditiva, e a UTE é armazenada em geladeira por um tempo variável, de acordo com a solução empregada (SHI & NESS, 1999).

2.2.1.1 Lesão de estoque

Chin-Yee, Arya e d'Almeida (1997) definiram lesão de estoque como uma constelação de alterações que ocorrem no eritrócito durante sua preservação, as quais podem eventualmente gerar danos irreversíveis e reduzir a sobrevida pós-transfusional (SPT).

Durante seu armazenamento a cerca de 4 °C, os eritrócitos se encontram em condições muito diferentes da circulação sangüínea. Seus processos metabólicos, nestas condições, estão relacionados à temperatura e a diluentes, como anti-coagulantes e soluções aditivas (HÖGMAN & MERYMAN, 2006b).

Nas condições mencionadas, o eritrócito sofre inicialmente um estímulo da glicólise para a produção de ATP. O consumo e conseqüente queda na quantidade de glicose, com diminuição da concentração de ATP, acarreta acúmulo de lactato e redução gradativa do pH e, assim, redução das atividades enzimáticas (HESS & GREENWALT, 2002). A falha das ATPases e a queda exponencial de ATP promovem falha da bomba de sódio e potássio, levando à inversão na concentração de potássio intracelular e sódio extracelular. Ocorre ainda redução de GSH com formação de metahemoglobina, e oxidação de lipídios e proteínas. A morfologia é

alterada da forma de discócito para equinócito ou estomatócito e, em seguida, para esferócito. A membrana celular é rompida e há hemólise, levando ao aumento da hemoglobina extracelular (LEONART, 1994).

2.2.1.2 Preservação e soluções aditivas

Estudos sobre a preservação de eritrócitos para uso em hemoterapia visam estabelecer a melhor maneira para manutenção de sua viabilidade, isto é, sua integridade física e funcional na circulação sangüínea do receptor. Além disso, condições ideais de estocagem reduzem o risco de crise respiratória aguda associada com transfusões de grande porte (HESS & GREENWALT, 2002).

A primeira e mais acessível forma de preservação de sangue, e também a mais largamente investigada foi o armazenamento em condições hipotérmicas, em temperatura mais baixa que a fisiológica e mais alta que o ponto de congelamento (GAMBERO et al. 2004). Em temperaturas mantidas abaixo da fisiológica, são inibidos processos metabólicos dependentes de temperatura, os quais esgotariam metabólitos celulares críticos e acumulariam danos às células (HÖGMAN et al., 1991).

Depois da descoberta dos grupos sangüíneos ABO por Karl Landsteiner, havia dois principais obstáculos para transfusões bem-sucedidas: coagulação do sangue e perda da viabilidade e função de eritrócitos *in vitro* (GIANGRANDE, 2000). A apresentação de citrato como um anticoagulante em 1914 por Hustin (1914) e glicose como um conservante em 1916 por Rous e Turner (1916a; 1916b) foram marcos para a criação de bancos de sangue (MOLLISON, 2000). No seguinte ano, durante a Primeira Guerra Mundial, Robertson desbravou a forma de conservação do sangue humano por usar garrafas de vidro, solução conservante de citrato-glicose de Rous-Turner, e jarros de gelo empacotados com serragem (MOLLISON, 2000). A técnica de transfusão de sangue de Robertson rapidamente tornou-se uma reanimação aceita. A descoberta de preservação com glicose-citrato foi o primeiro passo em direção ao banco de sangue moderno (SCOTT et al., 2005).

Por volta de 1940, a adição de soluções anticoagulantes e ao mesmo tempo preservantes ao sangue total, começou a ser testada, sendo a primeira uma mistura padrão de ácido cítrico, citrato de sódio e glicose, também conhecida por ACD

(GAMBERO et al., 2004). Cerca de vinte anos mais tarde, esta solução perdeu sua hegemonia para outra, chamada CPD, a qual por conter NaH_2PO_4 e não conter ácido cítrico, possuía a vantagem de aumentar a capacidade tamponante e manter os eritrócitos em um pH mais alto em relação a ACD (GRIMES, 1980).

Com a evolução no campo da hemoterapia, passou-se a utilizar sistemas de bolsas plásticas estéreis, fechadas, que garantem tanto a preservação do sangue e de seus componentes para uma transfusão mais eficiente, como a diminuição de riscos de contaminação por microorganismos (SCOTT et al., 2005). De um modo geral, colhe-se o sangue total em bolsa-mãe, a qual contém uma solução anticoagulante, mas que também seja adequada à sua preservação durante algum tempo (HESS & GREENWALT, 2002). A partir do emprego de glicose como nutriente e de citrato como anticoagulante, os eritrócitos se mantêm viáveis por até 21 dias (MOORE, 1987).

Com a adição do ácido cítrico (ACD) ou fosfato (CPD), o tempo de preservação não melhorou, ou seja, só se assegurava uma SPT aceitável para os eritrócitos até 21 dias de preservação (MOORE et al., 1987). Com adição de adenina (CPDA-1 e CPDA-2), os eritrócitos puderam ser preservados para transfusão em sangue total ou na forma de concentrado de hemácias por até 35 dias (GIANGRANDE, 2000). Eritrócitos mantidos em ACD podem ser protegidos pela adição de vitaminas C e E, com diminuição da fragilidade osmótica e melhor manutenção dos níveis de 2,3 BPG (KOPEC-SZLEZAK et al, 1988).

A temperatura de preservação das bolsas, universalmente aceita e utilizada, pode variar de 1 a 6°C, por manter o metabolismo em condições basais, aumentando assim o tempo de preservação (MOLLISON et al., 2000). Em experimentos recentes, observou-se que um dia de estoque de concentrado de eritrócitos isolados de sangue colhido em CPDA-1 a 25°C equivale a 10 dias entre 1 a 6°C, ou seja, os eritrócitos envelhecem mais rapidamente no primeiro caso (RUDELL et al., 1998).

No entanto, soluções como ACD e CPD eram empregadas em uma proporção relativamente pequena em relação ao sangue total (1,4:10), para preservar a viscosidade e outras propriedades do sangue total adequadas para transfusão (GRIMES, 1980). Uma década mais tarde, com a separação do sangue total em hemocomponentes, passou-se a armazenar os eritrócitos como concentrados ou papa de hemácias, com hematócrito de 50 a 80% (HÖGMAN & MERYMAN, 2006).

Esta conduta, além de não trazer benefícios para o tempo de preservação, pode levar a complicações transfusionais devido à elevada viscosidade. Assim, o seu uso mostrou a necessidade de se desenvolver um meio líquido adequado para suspensão e preservação das células vermelhas isoladas (HESS & GREENWALT, 2002).

A partir daí, várias soluções aditivas têm sido testadas com sucesso, tendo-se conseguido aumentar o tempo seguro de estocagem para seis semanas, por fornecer substâncias que mantêm o metabolismo do eritrócito funcionando por um tempo um pouco maior. A primeira solução aditiva aprovada e liberada para uso na Europa foi salina-adenina-glicose-manitol (SAGM) (HESS & GREENWALT, 2002).

Soluções aditivas atuais contêm adenina, que aumenta a *pool* de adenilatos e muda as condições de equilíbrio em direção à produção de ATP, sendo que a energia para a primeira metade da via glicolítica e a integridade da membrana são mantidas. A glicose é suplementada como um nutriente essencial para a manutenção de metabolismo celular, enquanto manitol e citrato são estabilizadores da membrana (HÖGMAN, 1987). O fosfato inorgânico é adicionado ao meio de armazenamento para corrigir o pH, continuamente decrescente, e como substrato para a síntese de 2,3-BPG. O tampão de bicarbonato é eficiente para manutenção de pH ácido e de níveis de ATP, por permitir a difusão de dióxido de carbono das bolsas de PVC (HÖGMAN, 1987).

Soluções aditivas hipotônicas vêm sendo propostas como um método para reduzir a microvesiculação associada à hemólise, por inchar o eritrócito e aumentar sua tensão de superfície (HESS et al., 2006). Em vários estudos, reduziu-se o conteúdo salino de soluções aditivas, o que resultou em menor percentagem de hemólise (HESS & GREENWALT, 2002).

Bolsas plásticas para armazenamento de sangue foram desenvolvidas primeiramente na década de cinquenta (ARTZ et al., 1954). Foram vistas como vantajosas para a logística militar, devido ao seu menor peso e resistência à quebra. A capacidade de fabricação capacitou o projeto de um sistema esterilizado de coleta fechada, o que diminuiu o índice de contaminação bacteriana (HESS et al., 2006). Assim, as bolsas tornaram-se produtos comerciais aprovados nos anos sessenta. A construção de uma tubulatura unitária, ou seja, uma para cada bolsa, a capacidade de excluir bolhas de ar reduzindo a possibilidade de embolismo durante a infusão, o volume reduzido para o armazenamento em geladeira e a clareza ótica, eram

vantagens reconhecidas como distintas. Com o desenvolvimento da produção de hemocomponentes, as bolsas plásticas se tornaram indispensáveis (HESS et al., 2006).

Existem bolsas de materiais diversos para a preservação dos diferentes componentes do sangue. A natureza química e a porosidade das paredes das bolsas variam de acordo com as necessidades de trocas gasosas de cada tipo de célula. Foi demonstrado que eritrócitos são melhor preservados em bolsas se submetidos a freqüentes homogeneizações (HÖGMAN et al., 1991). O material mais empregado para as bolsas é o cloreto de polivinil (PVC), plasticizado com 2-etil-exil-ftalato (DEHP), o qual migra das paredes da bolsa para o meio, penetra na bicamada lipídica e reduz a hemólise espontânea, aumentando a viabilidade dos eritrócitos (AUBUCHON et al., 1988). Novos componentes têm sido utilizados para a composição das bolsas de coleta, como o butiril-n-triexil citrato (BTHC), com melhor manutenção dos níveis de ATP e 2,3 BPG nos eritrócitos (HÖGMAN et al., 1991).

As soluções aditivas para UTE, atualmente, funcionam bem para os bancos de sangue, permitindo armazenamento por 5 a 7 semanas, o que significa que mais de 90% de unidades coletadas são aproveitadas por um receptor (HÖGMAN & MERYMAN, 2006). O contínuo crescimento do número de estudos científicos e pesquisas clínicas, com objetivos de aprofundar o entendimento da lesão de estoque e suas possíveis conseqüências para o receptor, devem propiciar o desenvolvimento de soluções aditivas ainda melhores, com maior manutenção do metabolismo eritrocitário, redução das perdas de membrana e até mesmo conter substâncias que diminuam os riscos de efeitos adversos no receptor (SCOTT et al., 2005).

2.2.1.3 Emprego Clínico

O desenvolvimento de hemocomponentes tem limitado o uso de sangue total a poucas condições clínicas. O uso de sangue total fresco não é mais aceito na hemoterapia atual e traduz apenas a falta de disponibilidade de produtos mais adequados. O sangue total estocado deverá ser usado nos casos em que tenha ocorrido perda superior a 30% da volemia. Todavia, essas hemorragias também poderão ser repostas com a transfusão de glóbulos vermelhos e soluções eletrolíticas e/ou coloidais (MURPHY, et al., 2001; RAZOUK, et al., 2004).

A transfusão de unidades eritrocitárias costuma ser indicada no tratamento de casos de hipovolemia e anemia. Como muitos casos de anemia podem ser controlados com tratamentos medicamentosos, somente em casos com valores de hemoglobina muito baixos a transfusão de unidades de eritrócitos deverá ser indicada (LEE et al., 1999).

Por mais de 40 anos, a transfusão de eritrócitos foi indicada com a finalidade de manter a concentração de hemoglobina acima de 10g/dl e hematócrito acima de 30%. Considerando o risco de infecções e o baixo número de doadores, um conceito mais racional sobre a empregabilidade de transfusões de unidades eritrocitárias sugere que múltiplos fatores relacionados ao estado clínico do paciente sejam considerados. Assim, a decisão de transfundir eritrócitos deve ser baseada em uma avaliação dos riscos da anemia contra os riscos da transfusão (POLK et al., 1995).

As hemácias são estocadas também em soluções aditivas, em geral com hematócrito entre 50 - 70% e validade de 42 dias. As unidades eritrocitárias para transfusão deveriam, preferencialmente, estar livres de plaquetas ou leucócitos funcionais.

As principais situações descritas na literatura em que a transfusão de eritrócitos não é justificada são: hematócrito superior a 30%, exceto nos casos com queda superior a 6% em 24 horas ou superior a 12% em 48 horas; hematócrito entre 24 e 30%, desde que não ocorram as seguintes alterações: queda do hematócrito superior a 6% nas últimas 24 horas; angina e dor torácica nas 24 horas que antecedem o ato transfusional; infarto agudo do miocárdio até seis semanas antes da transfusão; perda de sangue superior a 1.000 ml antes da transfusão; eletrocardiograma indicando isquemia coronariana ou infarto agudo do miocárdio (MURPHY et al., 2001).

As reações clínicas adversas mais comuns são: reações febris, urticária e outras reações cutâneas, aloimunização, reações hemolíticas, injúria pulmonar aguda relacionada a transfusão (TRALI), contaminações por agentes biológicos, entre outras (KLEIN et al., 2007).

2.3 GARANTIA DA QUALIDADE E CONTROLE DE QUALIDADE EM HEMOTERAPIA

A garantia de qualidade em hemoterapia inclui toda e qualquer atividade desenvolvida no sentido de melhorar a qualidade ou de controlá-la. Envolve a organização do sistema de hemoterapia no país, os procedimentos preconizados pelo Ministério da Saúde, a seleção e cuidados com os doadores, a produção e preservação de hemocomponentes e o controle de qualidade dos hemocomponentes para garantir que estes estejam adequados aos receptores (HÖGMAN, 1999).

O controle de qualidade faz parte das medidas para a garantia da qualidade e inclui análises a serem realizadas durante todo o processo, no sentido de avaliar possíveis erros ou alterações. Trata-se de avaliar o processo em suas várias etapas, com o intuito de detectar erros ao acaso ou erros sistemáticos, para que se possa tomar atitudes no sentido de minimizá-los.

Os serviços de hemoterapia no Brasil são coordenados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA) e, nos Estados e Distrito Federal, pelos gestores do Sistema Único de Saúde (SUS). A legislação em vigor, que visa assegurar, entre outras questões, a garantia da qualidade, é regulamentada pela Lei Federal nº 10205 de 2001, a qual normatiza a coleta, o processamento, a estocagem, a distribuição e a aplicação do sangue e seus hemoderivados e dá outras providências; pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 153 de 2004, da ANVISA, a qual determina o regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos, bem como o uso humano de sangue e de seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. A legislação conta ainda com a Portaria nº 121 de 1995, do Ministério da Saúde, que institui o roteiro para inspeção em núcleos de hemoterapia e determina o cumprimento das Normas Gerais de Garantia de Qualidade (SOARES, 2002).

De acordo com os princípios gerais do sistema da qualidade definidos pela RDC nº 153/2004:

“O serviço de hemoterapia deve possuir um manual de procedimentos operacionais que cubra as atividades do ciclo do sangue desde a captação, registro, triagem clínica, coleta, triagem laboratorial de doenças transmissíveis pelo sangue, exames imunohematológicos,

processamento, armazenamento, distribuição, transporte, transfusão, controle de qualidade interno dos hemocomponentes e dos laboratórios. Os procedimentos operacionais devem estar disponíveis a qualquer momento, para todo o pessoal envolvido na atividade, e ser revisado e atualizado, no mínimo, uma vez por ano.”

A RDC nº 153/2004 determina que:

“Todo serviço de hemoterapia que processa o sangue total para a obtenção de hemocomponentes deve realizar um controle de qualidade sistemático de todos os hemocomponentes produzidos.”

Em relação à amostragem, diz:

“O controle de qualidade dos concentrados de hemácias e dos concentrados de plaquetas deve ser realizado em, pelo menos, 1% da produção, ou 10 unidades por mês (o que for maior)”; “Os serviços de hemoterapia devem ter protocolos escritos, definindo o tipo de controle a ser feito em cada hemocomponente e os parâmetros mínimos esperados para cada item controlado.”; “Cada item verificado pelo controle de qualidade deve apresentar um percentual de conformidade superior a 75%, à exceção da esterilidade, que deve apresentar conformidade superior a 99,5%.”

Em relação à análise dos resultados, a RDC nº 153/2004 determina que:

“Os resultados do controle de qualidade devem ser periodicamente revisados e analisados, e ações corretivas devem ser propostas para as não-conformidades observadas.”

A RDC define também que o serviço de hemoterapia deve contar com um programa de treinamento e capacitação de pessoal; os equipamentos devem ser validados e sua calibração deve ser efetuada a intervalos pré-determinados, de acordo com as características de cada equipamento, aplicando-se medidas corretivas em casos de irregularidades, com registro de todas as operações realizadas e dos defeitos apresentados pelo equipamento, com a respectiva data de conserto. Deve haver refrigeradores (4 ± 2 °C) e congeladores (no mínimo -20 °C) específicos para a conservação de componentes sanguíneos, especiais para componentes liberados e para componentes não liberados para uso; equipados com sistema de alarme sonoro e visual; sendo que as temperaturas devem ser registradas ao menos a cada 4 horas, os registros revisados periodicamente por pessoa qualificada, e os alarmes testados a cada 3 meses; com descrição disponível escrita para casos de não conformidade ou defeitos. As centrífugas e centrífugas refrigeradas devem ser calibradas no mínimo a cada 4 meses e apresentar controle de velocidade; os banhos termostatizados ou incubadoras (banhos-maria) devem

possuir termômetro de uso exclusivo, a temperatura registrada a cada 24 horas e conferida imediatamente antes do uso. No Controle dos Insumos, todo serviço de hemoterapia deve manter um sistema de controle e validação dos conjuntos diagnósticos de sorologia e de imunohematologia, os filtros de leucócitos, os conjuntos para aférese e das bolsas, o que inclui a inspeção dos produtos quando da sua utilização e a monitoração dos resultados obtidos com o insumo. Os serviços de hemoterapia devem manter procedimentos escritos a respeito das normas de biossegurança a serem seguidas, disponibilizar os equipamentos de proteção individual e coletiva e oferecer treinamento periódico para toda a equipe. O descarte de sangue total, hemocomponentes e resíduos de laboratório deve estar de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS), e respeitar o disposto na RDC/Anvisa nº 33 de 25 de fevereiro de 2003, ou a que vier substituí-la.

2.3.1 Controle de Qualidade de Unidades Transfusionais Eritrocitárias

A qualidade das unidades de eritrócitos disponíveis para transfusões em todo o país, deve seguir, no mínimo, as especificações contidas na RDC nº 153 de 2004. Os fatores a serem avaliados e seus respectivos parâmetros aceitáveis, de acordo com a RDC, estão representados na Tabela 1 e incluem volume, hematócrito, teor de hemoglobina, grau de hemólise e teste microbiológico.

TABELA 1 – ESPECIFICAÇÕES PARA A GARANTIA DA QUALIDADE DE UNIDADES DE ERITRÓCITOS DO MINISTÉRIO DA SAÚDE: RDC nº 153 de 2004

	Análises	Valores Padrão
Unidades de Eritrócitos	Volume	270 +/- 50 ml
	Teor de Hb	> 45g/unidade
	Hematócrito	50 a 80%
	Grau de hemólise	< 0,2 (dia 1)
		< 0,8 (dia 35)
	Microbiológica	negativa

A escolha dos métodos de análise não é mencionada na resolução. Entretanto, a escolha dos métodos analíticos empregados é considerada de grande importância para que o controle de qualidade tenha confiabilidade e viabilidade. Alguns dos fatores a serem avaliados para a escolha do método são: sensibilidade, especificidade, custo, tempo e susceptibilidade a interferentes (STIENE-MARTIN *et al.*,1998).

Além das especificações da RDC nº 153 de 2004, o Controle de Qualidade do HEMEPAR realiza a análise de outros fatores como as concentrações de glicose, potássio e hemoglobina plasmática (Tabela 2).

TABELA 2 - ESPECIFICAÇÕES PARA A QUALIDADE DE UNIDADES DE ERITRÓCITOS REALIZADAS PELO HEMEPAR ALÉM DAS EXIGIDAS PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE

	Análises	Valores Padrão
Unidades de Eritrócitos	Glicose	> 50 mg/dl
	Potássio	< 100 mEq/l
	Hemoglobina plasmática	< 0,8 g/dl

O controle de qualidade das unidades de eritrócitos tem como principal objetivo garantir que eritrócitos transfundidos sobrevivam e circulem após transfusão e se mantenham funcionais, quanto às suas características morfológicas e reológicas, e de liberação de oxigênio e dióxido de carbono (HÖGMAN, 1999). Outras questões importantes para a qualidade das unidades transfusionais de eritrócitos são possíveis efeitos negativos causados por substâncias incluídas no meio de armazenamento, efeitos colaterais causados pela presença de certa quantidade de outras células sanguíneas e presença de agentes infecciosos (HÖGMAN & MERYMAN, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Estudar a metodologia empregada para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias, visando contribuir com a garantia da qualidade do sistema de hemoterapia brasileiro.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

3.2.1 Estudar sistematicamente as determinações laboratoriais realizadas no HEMEPAR para o controle de qualidade de unidades eritrocitárias: volume, hematócrito, hemoglobina total, hemoglobina extracelular, percentual de hemólise, glicose e potássio.

3.2.2 Estudar métodos laboratoriais não utilizados rotineiramente para o controle de qualidade das unidades eritrocitárias, como: percentual de hemólise, morfologia eritrocitária, metahemoglobina, GSH, atividade de G6-PD, ATP, VCM, HCM e CHCM.

3.2.3 Propor ao HEMEPAR e a outros hemobancos o emprego de métodos alternativos e adequados ao controle de qualidade de unidades eritrocitárias, visando contribuir para a garantia da qualidade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram selecionadas aleatoriamente 19 unidades transfusionais eritrocitárias (UTE), obtidas a partir da coleta de sangue venoso de doadores voluntários, que se apresentaram no Serviço de Coleta do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná - HEMEPAR, no período de fevereiro a junho de 2008.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, levando em conta o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido regularmente assinado pelos doadores do HEMEPAR, no qual os mesmos declaram expressamente consentir em doar o seu sangue para qualquer paciente que dele necessite e para a realização de todos os exames laboratoriais exigidos pelas leis e normas técnicas vigentes.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Triagem de Doadores e Coleta de Material

A coleta de sangue foi realizada após triagem dos doadores, de acordo com as Normas Técnicas preconizadas pela RDC nº 153/2004 da ANVISA. A equipe técnica procedeu à avaliação dos doadores por anamnese e exames clínicos e laboratoriais, tais como: medida da pressão arterial, peso e temperatura corporais, pulso e hemoglobina. A triagem foi feita obedecendo a rígidos critérios pré-estabelecidos, no sentido de proteção ao próprio doador e ao receptor.

Coletou-se cerca de 450 ml de sangue venoso de 19 doadores, em bolsas para coleta de sangue, configuração tripla, com solução aditiva de SAGM (Manitol), marca Fresenius Kabi®. A bolsa de coleta contém 63 ml de solução anticoagulante e preservante citrato trissódico 102 mmoles/l, fosfato dihidrógeno de sódio 1,08 mmoles/l e dextrose 11 mmoles/l (CPD). A coleta de amostras para a realização dos testes imunohematológicos (tipagem ABO/ RhD e pesquisa de anticorpos irregulares) e para os testes sorológicos para AIDS (Anti HIV-1/2), vírus T-linfotrópico

humano (Anti HTLV-1/2), hepatite B (HbsAg e Anti-HBc), hepatite C (Anti-HCV), doença de Chagas e sífilis, foi realizada a partir do dispositivo para coleta de amostras a vácuo, previamente à coleta do sangue para a bolsa de coleta.

Por medida de segurança no trabalho, aguardou-se a negatividade dos resultados dos exames sorológicos antes de prosseguir com as análises.

4.2.2 Fracionamento do Sangue em Hemocomponentes e Preparo das Unidades Transfusionais Eritrocitárias

Fracionou-se o sangue total (ST) para a obtenção de três hemocomponentes: concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas e plasma fresco congelado (PFC). O método de fracionamento utilizado foi o do plasma rico em plaquetas (PRP), onde a primeira centrifugação do ST é feita em baixa rotação e a segunda centrifugação é realizada em alta rotação. O protocolo de centrifugação utilizado foi de 2700 rpm, 5:30 min, 22°C e 3000 rpm, 10:00 min, 22°C, respectivamente, para a 1ª e 2ª centrifugações (centrífuga Sorvall® RC3 BP, Rotor H6000 A). A separação do ST em CH e PRP e do PRP em CP e PFC foi realizada com extrator manual de plasma (Fresenius Hemo Care). A solução aditiva composta por salina-adenina-glicose-manitol (SAGM), foi adicionada ao CH, constituindo uma UTE. A composição da SAGM é de 150 mmoles/l de cloreto de sódio, 2 mmoles/l de adenina, 45,5 mmoles/l de glicose e 28,8 mmoles/l de manitol, pH 5,7, com 297 mosm/kg H₂O. Não foi realizada nenhuma técnica para a retirada dos leucócitos.

4.2.3 Aliquotagem das Unidades Transfusionais Eritrocitárias

As UTE foram divididas em 4 alíquotas de cerca de 50 ml, em sistema fechado, utilizando-se o *Sterile Connection Device* (SCD), em bolsas para transferência (JP®). As amostras foram mantidas entre 2 e 6 °C, em refrigerador especial para armazenamento de sangue, com temperatura monitorada a cada 4 horas. As alíquotas foram rotuladas, de acordo com os tempos zero, 14, 28 e

42 dias e submetidas às determinações laboratoriais especificadas nos respectivos tempos pré-determinados.

4.2.4 Determinações para o Controle de Qualidade de Unidades Transfusionais Eritrocitárias Empregadas Como Rotina no HEMEPAR.

As técnicas descritas abaixo (4.2.4.1 a 4.2.4.6) são realizadas de acordo com o Manual de Procedimentos Operacionais Padrão do Laboratório de Controle de Qualidade de Hemocomponentes do HEMEPAR.

4.2.4.1 Análise microbiológica

O sistema de detecção microbiana foi baseado no sistema Bact Alert®, pela detecção de CO₂ produzido por eventual crescimento bacteriano, utilizando-se o sensor permeável a gases existente no fundo do frasco altera a cor, de azul-esverdeada para amarela.

4.2.4.2 Determinação do volume de Sangue Total e de hemocomponentes

A determinação do volume do ST e dos hemocomponentes (ml) foi realizada pelo sistema informatizado (Hemovida), a partir da programação prévia dos valores das taras das bolsas vazias e das densidades relativas dos hemocomponentes, de acordo com as especificações requeridas pela RDC 153/2004. O volume do ST deve ser de 450 ± 45 ml; do CH de 270 ± 50 ml; das UTE com SAGM, de 370 ± 50 ml; do CP, de 60 ± 10 ml; do PFC, acima de 170 ml; e do crioprecipitado, de 20 ± 10 ml.

4.2.4.3 Determinação do Hematócrito e dos valores do eritrograma

A determinação do hematócrito foi realizada em centrífuga de microhematócrito (Hemata Stat II) a 6000 rpm, durante 1 minuto. A leitura do volume globular foi realizada conforme as instruções do equipamento.

Os valores de concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram obtidos em aparelho eletrônico (ABX MICROS 60), com o uso de sal de amônio quaternário (<20 %) como solução lisante.

4.2.4.4 Determinação de potássio

A determinação da concentração de potássio no meio extracelular foi realizada nas UTE através de potenciometria, em analisador de íon seletivo.

4.2.4.5 Determinação da hemoglobina extracelular

O sobrenadante foi obtido das bolsas com auxílio do extrator de plasma. Após centrifugação, o sobrenadante límpido foi utilizado puro ou diluído em solução fisiológica 1:2 ou mais, dependendo do grau de hemólise. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 370, 415, 510, 577 e 600 nm, empregando-se água destilada como branco. Nos casos em que a leitura da absorbância a 415 nm foi < 1,5, utilizou-se a Fórmula 1, abaixo. Nos casos em que a absorbância (A) foi igual ou maior que 1,5, empregou-se a fórmula 2.

Fórmula 1:

$$X = A_{510} + (A_{370} - A_{510}) \times 0,68$$

$$Y = A_{510} - X$$

$$Hb = \frac{Y}{113,22} \times \frac{16125}{D}$$

D – caminho ótico (em geral 1 cm)

Fórmula 2:

$$X = A_{600} + (A_{510} - A_{600}) \times 0,26$$

$$Y = A_{577} - X$$

$$Hb = \frac{Y}{13,64} \times \frac{16125}{D}$$

D – caminho ótico (em geral 1 cm)

A concentração foi expressa em mg Hb/l

Especificação requerida: 141 a 808 mg Hb/dl no 35º dia de armazenamento (MOROFF et al., 1984)

4.2.4.6 Determinação da hemoglobina total

A determinação da hemoglobina no ST e nas UTE foi realizada pelo método automatizado (hemoglobinômetro), com o uso de sódio lauril sulfato (SDS) como surfactante. As absorbâncias foram monitoradas em 555 nm.

4.2.4.7 Determinação da quantidade de hemoglobina nas UTE

A determinação da quantidade de hemoglobina em g por UTE foi realizada por cálculo:

$$\text{Hb(g/UTE)} = \text{Hb (g/dl)} \times \text{Vol (dl)}$$

4.2.4.8 Determinação do percentual de hemólise

A determinação do percentual de hemólise, em unidades de CH e sangue total foi realizada pela aplicação de fórmula matemática que emprega o hematócrito, hemoglobina extracelular e hemoglobina total do hemocomponente.

$$\% \text{ hemólise} = \frac{100 - \text{Ht} \times \text{Hbe}}{\text{Hb}}$$

Onde,

Ht = hematócrito (%)

Hbe = hemoglobina extracelular (g/dl)

Hb = hemoglobina total (g/dl)

Especificação requerida: inferior a 0,2% (1º dia) e inferior a 0,8% (35º dia)

4.2.4.9 Dosagem da glicose extracelular

A análise da concentração de glicose, por método enzimático, foi realizada no meio extracelular (sobrenadante límpido) de UTE ou de ST. Esta foi realizada com o kit de reagentes para a determinação da glicose ANALISA®

4.2.5 Determinações Laboratoriais Propostas Para Este Trabalho

4.2.5.1 Determinação da concentração de metahemoglobina

A determinação da concentração de metahemoglobina foi realizada segundo o método de Evelyn & Malloy (1938), modificado por Beutler et al. (1995).

Em um tubo de ensaio adicionou-se 100 μ l de suspensão de eritrócitos a 10 ml de solução tampão fosfato 16 mmoles/l, pH 6,6. Realizou-se a homogeneização por inversão e, após 5 min, procedeu-se a leitura espectrofotométrica (A) em comprimento de onda de 630 nm, utilizando-se como branco, água destilada. Nessa primeira leitura, a absorvância corresponde a metahemoglobina e outras substâncias cromógenas para o comprimento de onda de 630 nm.

Em seguida, foram adicionados 50 μ l de uma solução de cianeto neutralizado (10 g/dl de NaCN e 12 g/dl de ácido acético na proporção 1:1). Após 5 min, homogenizou-se e realizou-se nova leitura (B) a 630 nm, com água destilada como branco. Nessa etapa, a metahemoglobina desaparece.

Do tubo da leitura B, retirou-se uma alíquota de 2 ml, que foi misturada a 8 ml de 66 mmoles/l de solução tampão fosfato a pH 6,6. Após a homogeneização, a leitura (D) foi realizada em 540 nm, usando-se como branco 10 ml de 66 mmoles/l de solução tampão fosfato pH 6,6, adicionando-se 50 μ l de 10 g/dl de solução NaCN e 50 μ l de 20 g/dl de solução $K_3[Fe(CN)_6]$. Nessa etapa, estima-se a concentração de hemoglobina total.

A concentração de metahemoglobina é expressa como porcentagem em relação à concentração total de hemoglobina, de acordo com a fórmula abaixo:

$$C = \frac{(A - B) \times F}{D}$$

Onde:

F = Fator de correção que varia para cada espectrofotômetro utilizado, é a média dos fatores obtidos para as 5 amostras de sangue utilizadas;

A= leitura correspondente à metahemoglobina;

B= leitura correspondente à hemoglobina total.

O valor de referência para cada UTE é de no máximo 1%.

4.2.5.2 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

Em um tubo de ensaio hemolisou-se 200 µl de suspensão de eritrócitos em 2 ml de água destilada. Adicionou-se uma alíquota de 200 µl de hemolisado a 10 ml de reativo de Drabkin para se estimar a concentração de hemoglobina por método espectrofotométrico.

Em seguida, adiciona-se 2 ml do hemolisado a 3 ml de solução precipitante (1,67 g de ácido metafosfórico, 0,2 g de EDTA dissódico, 30 g de NaCl e água destilada q.s.p 100 ml). Após 5 min, realiza-se a filtração em papel filtro com grau de porosidade 50.

Adiciona-se uma alíquota de 1 ml do filtrado obtido a uma solução de Na₂HPO₄ 300 mmoles/l. Após a homogeneização, procede-se a leitura espectrofotométrica a 412 nm (A1). Logo depois, adiciona-se 1 ml de solução de DTNB (ácido 2-dinitrobenzólico) 0,05 % ao sistema, realizando-se nova leitura a 412 nm (A2).

A concentração de GSH pode ser expressa em micromoles de GSH por grama de hemoglobina, de acordo com a fórmula:

$$C = \frac{(A_2 - A_1) \times E_1 \times 101}{[Hb]}$$

Onde:

[Hb] = concentração de hemoglobina da amostra

E1= fator de correção para coeficiente de extinção molar do complexo cromógeno GSH-DTNB.

Os valores de referência em adultos normais são de $7,57 \pm 1,04$ $\mu\text{moles/g}$ de Hb (BEUTLER, 1984).

4.2.5.3 Determinação da atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD)

4.2.5.3.1 Preparo de hemolisado

Em centrífuga refrigerada (HERMLE modelo Z323K) a 4 °C, centrifugou-se o sangue coletado a 1200 x g por 10 min, retirando-se a camada de leucócitos (*buffy-coat*). Em seguida, lavou-se a suspensão de eritrócitos obtida com solução gelada de 154 mmoles/l de NaCl por três vezes.

Foi adicionado 0,1 ml da suspensão de eritrócitos a 1,9 ml de solução hemolisante EDTA- β -mercaptoetanol (BEUTLER, 1984), homogeneizando-se por agitação. Em seguida, procedeu-se o ciclo congelamento-degelo a -20 °C durante 5 min, seguido de fusão a temperatura ambiente por mais 5 min, repetindo-se o processo por duas vezes consecutivas. O hemolisado obtido foi conservado a 4 °C para posterior utilização.

4.2.5.3.2 Dosagem da hemoglobina do hemolisado

Adicionou-se 200 μl do hemolisado a 10 ml de reativo de Drabkin para a estimativa da hemoglobina da amostra, utilizando-se como padrão sangue com a

concentração de hemoglobina conhecida, na diluição usual de 1:251. Procede-se a leitura a 540 nm, em espectrofotômetro SIEL 500S.

4.2.5.3.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima G6-PD foi monitorada segundo BEUTLER (1984). Foram adicionados 20 µl do hemolisado (1:20) a 0,98 ml do meio de reação contendo, 0,05 mol/l de tampão Tris-HCl-EDTA, pH 8,0, 0,01 mol/l, de MgCl₂ e 0,2 mol/l. de NADP. O sistema foi incubado por 10 min a 37 °C e a reação iniciada pela adição de 100µl de glicose-6-fosfato 0,6 mmol/l. A reação foi monitorada a 340 nm (Shimadzu UV 1601). A atividade enzimática foi expressa em UI/g Hb. O coeficiente de absorção molar do NADPH utilizado foi 6,22 l / (moles x cm). Uma unidade da enzima corresponde a 1µmol de NADPH formado por min.

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta A \times 10^5}{6,22 \times 20 \times [\text{Hb}]}$$

Onde: ΔA = variação de absorbância média por minuto

10^5 = diluição

6,22 = coeficiente de absorvidade molar do NADPH

20 = volume de reação

[Hb] = concentração de hemoglobina do hemolisado em g/dl.

Valor de Referência: $12,1 \pm 2,09$ UI/g Hb (BEUTLER, 1984).

4.2.5.4 Porcentagem de hemólise

A porcentagem de hemólise foi analisada pelo método da cianometahemoglobina, adaptado por PELISSARI et al., 1993, para baixas concentrações de hemoglobina.

O reagente de Drabkin (DACIE e LEWIS, 1995) foi adicionado a uma suspensão contendo hemoglobina com a diluição variando entre 1:3 e 1:110, de

acordo com o grau de hemólise observado visualmente, em relação à faixa de sensibilidade do método.

A fórmula para o cálculo da hemoglobina extracelular é,

$$\text{Hbe} = \frac{A_{540} \times \text{diluição}}{5,68}$$

Onde: Hbe = concentração de hemoglobina extracelular em g/dl;

A_{540} = absorvância em 540 nm

5,68 = constante de proporcionalidade.

Os cálculos das porcentagens de hemólise foram realizados segundo HÖGMAN et al. (1981), pela fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{100 - \text{Ht} \times \text{He}}{[\text{Hb}]}$$

Onde: HT = hematócrito em %

Hbe = concentração de hemoglobina extracelular em g/dl

[Hb] = concentração de hemoglobina na suspensão de eritrócitos

4.2.5.5 Morfologia eritrocitária

O estudo de morfologia eritrocitária foi realizado segundo o critério morfológico de Bessis (1972) modificado por Leonart (1994). Uma alíquota de 1ml da suspensão de eritrócitos da UTE, previamente homogeneizada, foi preparada em diluição de 1:200 com líquido de Gower (0,106 moles/l de citrato de sódio com 1 ml/l de formalina) em tubo de hemólise. Após homogeneização a amostra foi colocada em câmara de Neubauer Improved, previamente limpa.

Em microscópio óptico no aumento de 400x, fez-se a contagem de discócitos diferenciando-os de equinócitos, estomatócitos, esferócitos. De acordo com a

modificação proposta por Leonart et al. (1997), considerou-se entre os discócitos as formas discoequinócito, discoestomatócito, equinócito I e estomatócito II.

A porcentagem de discócitos foi determinada através da contagem de mil células em diferentes regiões do retículo.

4.2.5.6 Determinação de ATP

4.2.5.6.1 Preparo do extrato

Em alíquota de 2 ml, obtida de uma unidade eritrocitária, foi adicionado 1ml de solução de ácido perclórico 20% (Merck). Homogeneizou-se e centrifugou-se a 2000 x g. Transferiu-se 1ml do sobrenadante para um tubo graduado e realizou-se a neutralização com 3 moles/l de K₂CO₃ e indicador 0,05% metil-orange. Centrifugou-se, em seguida, para retirada do precipitado e acertou-se o volume para 1,5 ml com água deionizada.

4.2.5.6.2 Determinação da concentração

A determinação da concentração de ATP foi realizada pelo método de Beutler (1984).

O meio de reação de 1 ml continha, 0,05 mol/l de tampão tris- EDTA, pH 8,0, 2 mmol/l de MgCl₂, 0,4 mmoles/l de NADP e 1 mmol/l de glicose. Foram adicionados 200 µl do extrato e 5 µl de 60 U/ml de G6-PD. O meio de reação foi utilizado como branco. A reação foi iniciada com a adição de 10µl de 400U/ml de hexoquinase nas cubetas de amostra e branco e monitoradas espectrofotometricamente a 340 nm e a 37 °C.

A concentração de ATP foi calculada pela fórmula:

$$C = \frac{\Delta A \times 0,013}{A_{540} \times F_{Hb}}$$

Onde: ΔA = variação de Absorbância

A_{540} = Absorbância em 540nm

0,013 = coeficiente extinção molar de NADPH

F_{HB} = fator de calibração para hemoglobina

O valor de ATP em eritrócitos de adultos brancos normais é de $4,23 \pm 0,29$ μ moles por grama de hemoglobina (Hb), já este valor para adultos negros normais é de $3,53 \pm 0,30$ μ moles/g de Hb (BEUTLER, 1984).

4.2.6 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados pela análise de variância e teste de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

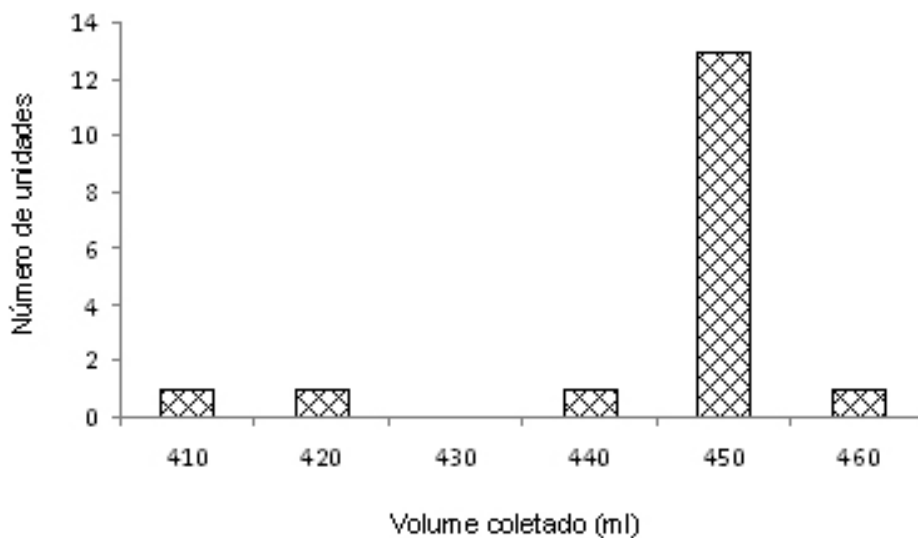
5 RESULTADOS

5.1 VOLUME DE SANGUE COLETADO

Na análise microbiológica, o teste Bact Alert realizado não acusou crescimento bacteriano durante a preservação dos eritrócitos.

A variação do volume de sangue coletado está representada na Figura 2.

FIGURA 2. NÚMERO DE UNIDADES DE ST EM FUNÇÃO DO VOLUME DE SANGUE COLETADO DOS DOADORES

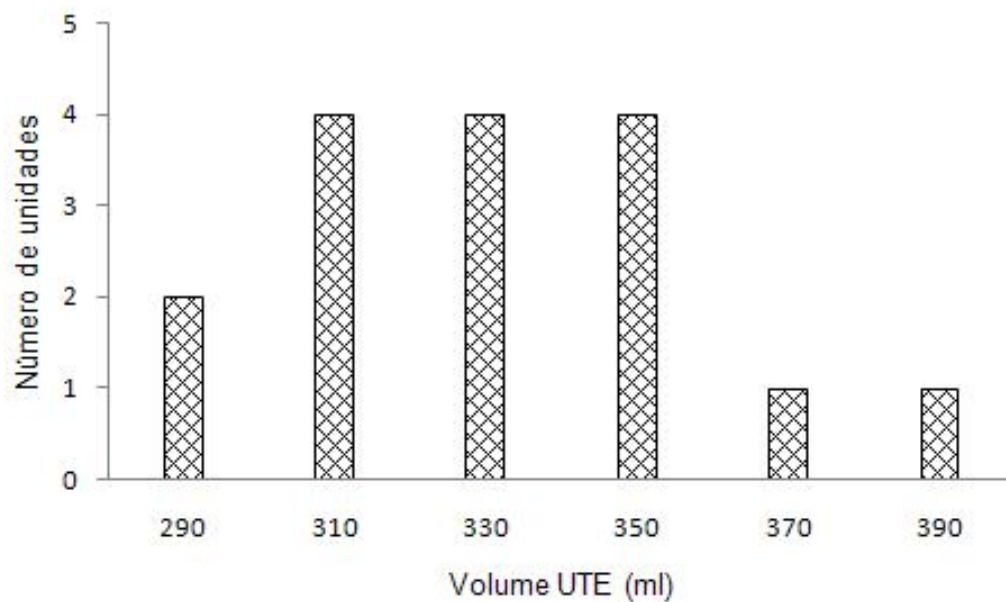


Histograma de freqüência dos volumes de sangue coletados dos doadores. Foram avaliados os volumes de 17 unidades de ST.

5.2 VOLUME DAS UNIDADES TRANSFUSIONAIS ERITROCITÁRIAS

A variação do volume das UTE está representada na Figura 3.

FIGURA 3. NÚMERO DE UTE EM FUNÇÃO DO VOLUME DAS UNIDADES TRANSFUSIONAIS ERITROCITÁRIAS

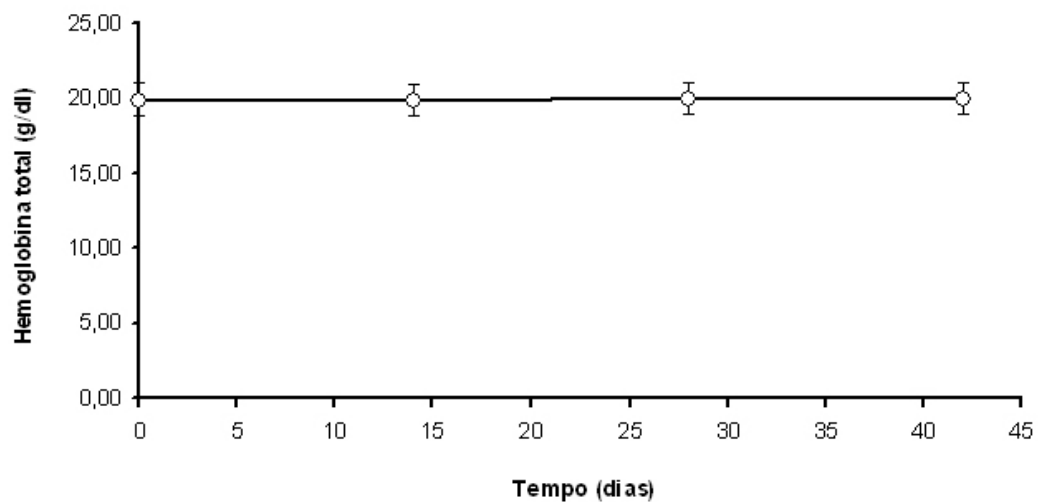


Histograma de frequência dos volumes das UTE. Foram avaliados os volumes de 16 unidades.

5.3 CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA

A concentração de hemoglobina total (g/dl) durante o armazenamento está ilustrada na Figura 4. Os resultados indicam que não há variação na concentração de hemoglobina durante o armazenamento.

FIGURA 4. CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA NA UTE DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM

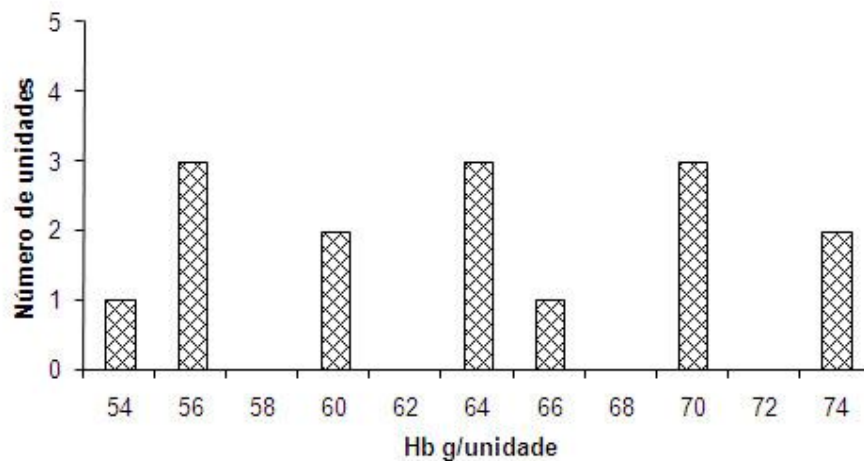


Cada ponto experimental é média da dosagem em 16 UTE. A barra de erro representa o desvio padrão.

5.4 QUANTIDADE DE HEMOGLOBINA EM UTE

A quantidade de hemoglobina (g) em cada UTE está ilustrada na Figura 5.

FIGURA 5. NÚMERO DE UTE EM FUNÇÃO DA QUANTIDADE DE HEMOGLOBINA

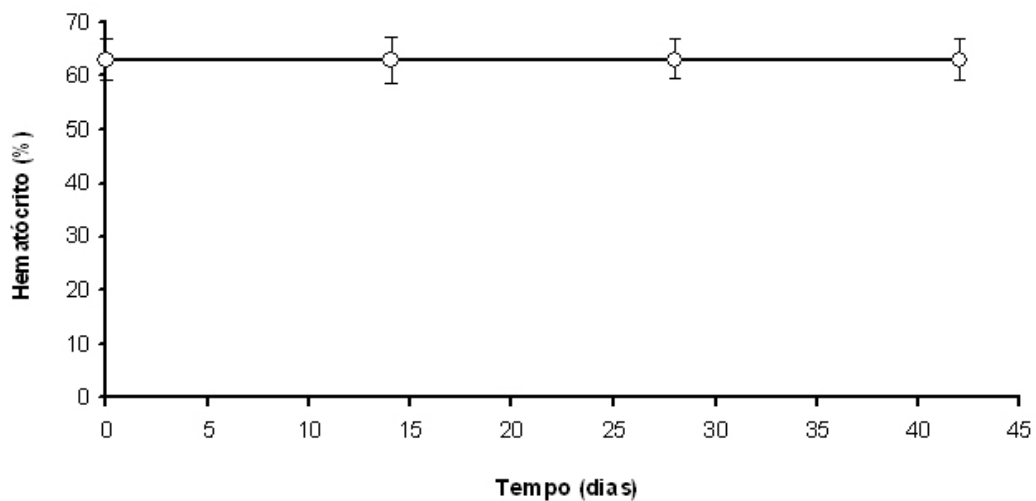


Histograma de frequência da quantidade de hemoglobina disponível por UTE. Foram avaliadas as quantidades de hemoglobina em 15 unidades.

5.5 HEMATÓCRITO

A Figura 6 ilustra os valores de hematócrito (%) em durante a preservação em SAGM. Os resultados indicam que não houve variação na porcentagem de hematócrito.

FIGURA 6. VALORES DE HEMATÓCRITO EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM

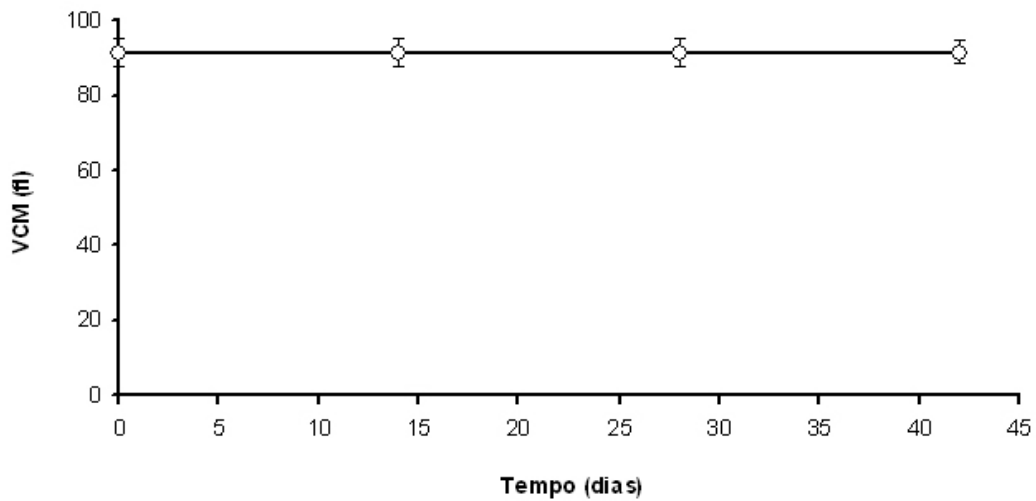


Cada ponto experimental é média da determinação em 16 unidades transfusionais eritrocitárias. As barras de erro representam os desvios padrão.

5.6 VOLUME CORPÚSCULAR MÉDIO (VCM)

A Figura 7 ilustra os valores de VCM (fl) em eritrócitos humanos durante a preservação em SAGM. Os resultados indicam que não houve variação valores de VCM.

FIGURA 7. VALORES DE VCM EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM

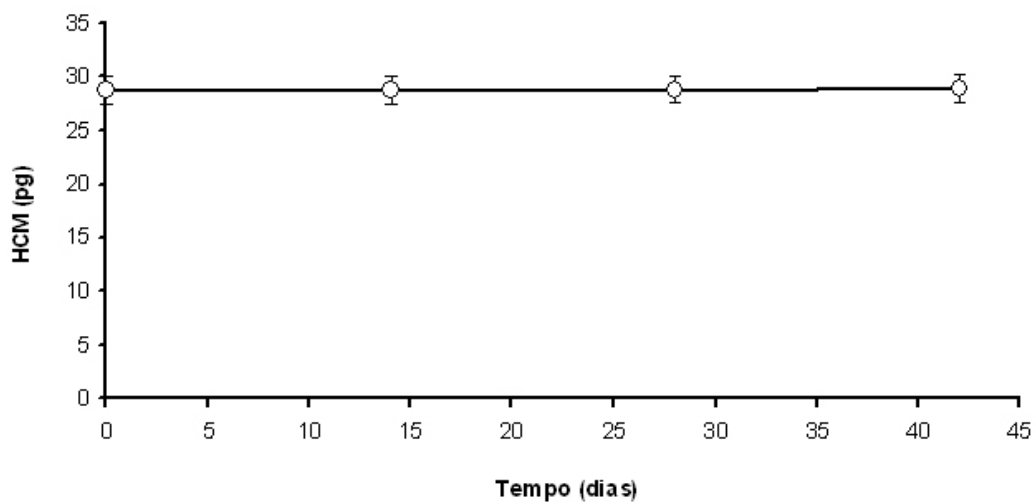


Cada ponto experimental é média da determinação em 16 UTE. As barras de erro representam os desvios padrão.

5.7 HEMOGLOBINA CORPÚSCULAR MÉDIA (HCM)

A Figura 8 ilustra os valores de HCM (pg) em eritrócitos humanos durante a preservação em SAGM. Os resultados indicam que não houve variação dos valores de HCM.

FIGURA 8. VALORES DE HCM EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM

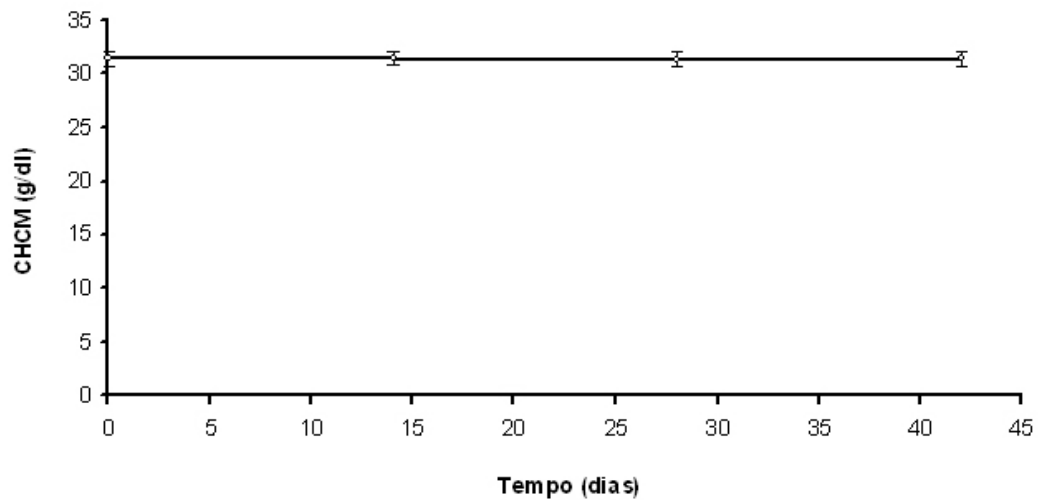


Cada ponto experimental é média da determinação em 16 unidades transfusionais eritrocitárias. As barras de erro representam os desvios padrão.

5.8 CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (CHCM)

A Figura 9 ilustra os valores de CHCM (g/dl) em eritrócitos humanos durante a preservação em SAGM. Os resultados indicam que não houve variação dos valores de CHCM.

FIGURA 9. VALORES DE CHCM EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM

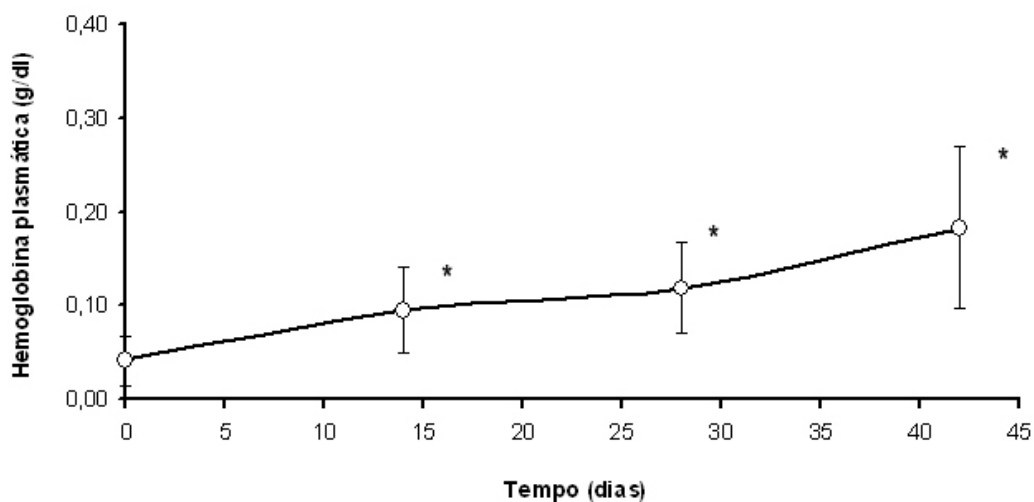


Cada ponto experimental é média da determinação em 16 UTE. As barras de erro representam os desvios padrão.

5.9 HEMOGLOBINA EXTRACELULAR

A concentração de hemoglobina extracelular em UTE durante a preservação em SAGM está ilustrada na Figura 10. Apesar de existir um aumento durante os 42 dias de preservação e os resultados serem estatisticamente significantes em relação ao início do armazenamento ($p < 0,05$), 0,1 g/dl que aparece no meio após 30 dias representa apenas 0,5% da hemoglobina eritrocitária.

FIGURA 10. CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA PLASMÁTICA EM UNIDADE TRANSFUSIONAL ERITROCITÁRIA DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM



O ponto experimental é média da dosagem em 16 UTE. As barras de erro representam os desvios padrão.

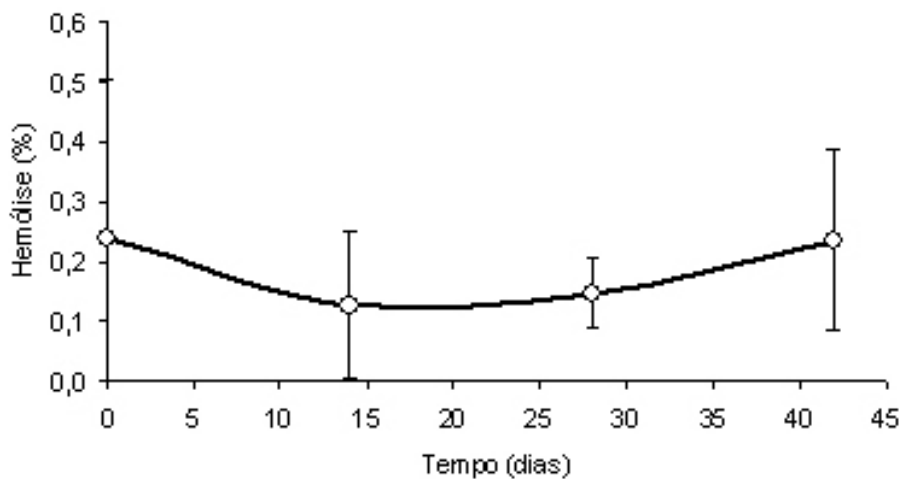
* - Diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo zero.

5.10 HEMÓLISE

5.10.1 Hemólise pelo Método da Oxihemoglobina

A Figura 11A ilustra a porcentagem de hemólise durante a preservação dos eritrócitos avaliada pelo método da oxihemoglobina. Observam-se taxas de hemólises bastante baixas, porém com coeficiente de variação médio de 80% (media geral = 0,19%; desvio padrão = 0,15%).

FIGURA 11A. PERCENTAGEM DE HEMÓLISE DURANTE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM UTE EM SAGM – MÉTODO DA OXIHEMOGLOBINA



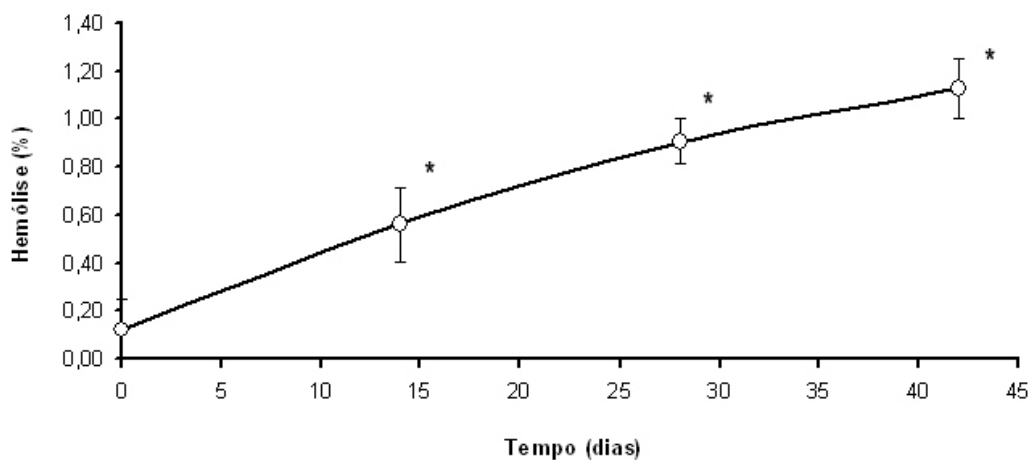
Cada ponto experimental é média do monitoramento em 16 UTE. As barras de erro representam os desvios padrão.

Não há diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo zero ($p > 0,05$).

5.10.2 Hemólise pelo Método da Cianometahemoglobina

Observa-se na Figura 11B que, por esse método, a percentagem de hemólise aumentou gradativamente durante a preservação dos eritrócitos, entretanto observam-se taxas de hemólises baixas e com boa precisão (coeficiente de variação = 18%).

FIGURA 11B. PERCENTAGEM DE HEMÓLISE DURANTE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO EM SAGM - MÉTODO DE PELISSARI et al. (1993)



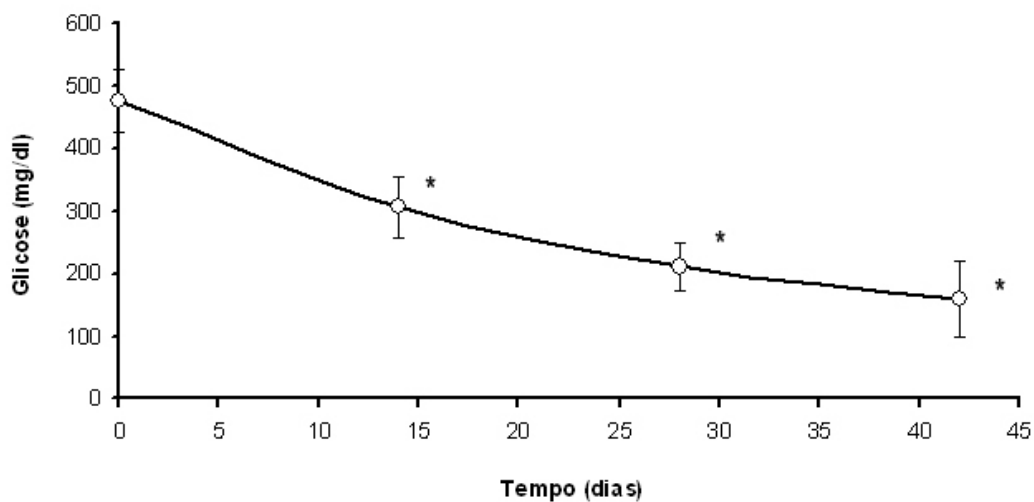
O ponto experimental é média do monitoramento em 17 unidades transfusionais eritrocitárias. A barra de erro representa o desvio padrão.

* - Diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo zero.

5.11 GLICOSE

A glicose é consumida pela glicólise anaeróbica sendo a principal fonte de energia para os eritrócitos, e consumida pelo ciclo das pentoses, gerando moléculas protetoras contra os radicais livres (referência). A figura 12A ilustra o consumo da glicose (mg/dl) durante a preservação de eritrócitos em unidades transfusionais eritrocitárias em SAGM. Pode-se calcular com auxílio da cinética de primeira ordem (figura 12B) que a glicose desaparece do meio, durante a preservação, a uma taxa de 15,3 μg glucose/dl/dia.

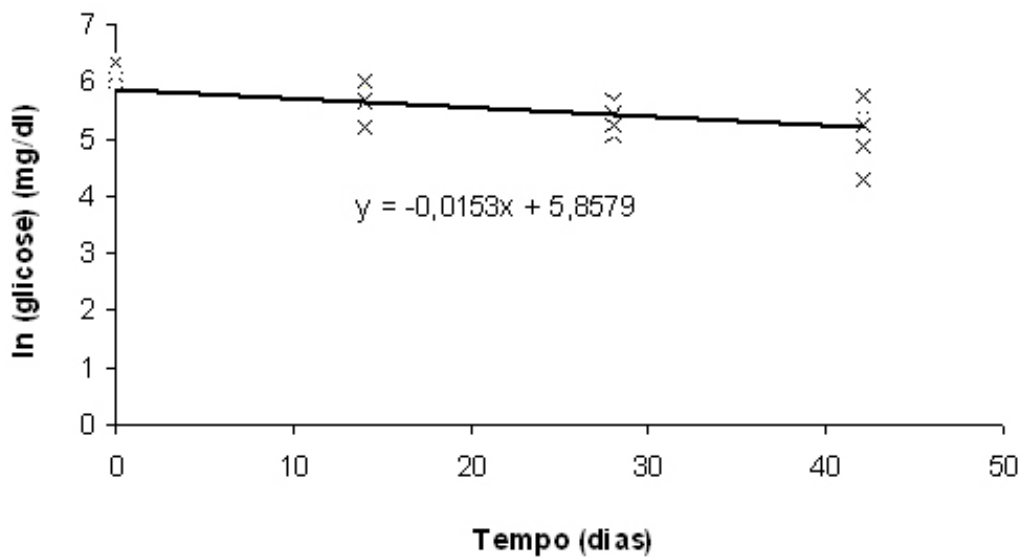
FIGURA 12A. CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE EXTRACELULAR DURANTE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM SAGM



O ponto experimental é média da contagem em 16 unidades transfusionais eritrocitárias. A barra de erro representa o desvio padrão.

*- Diferenças estatisticamente significativas em relação ao tempo zero.

Figura 12B. GRÁFICO DA CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM PARA O CONSUMO DE GLICOSE DURANTE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM SAGM

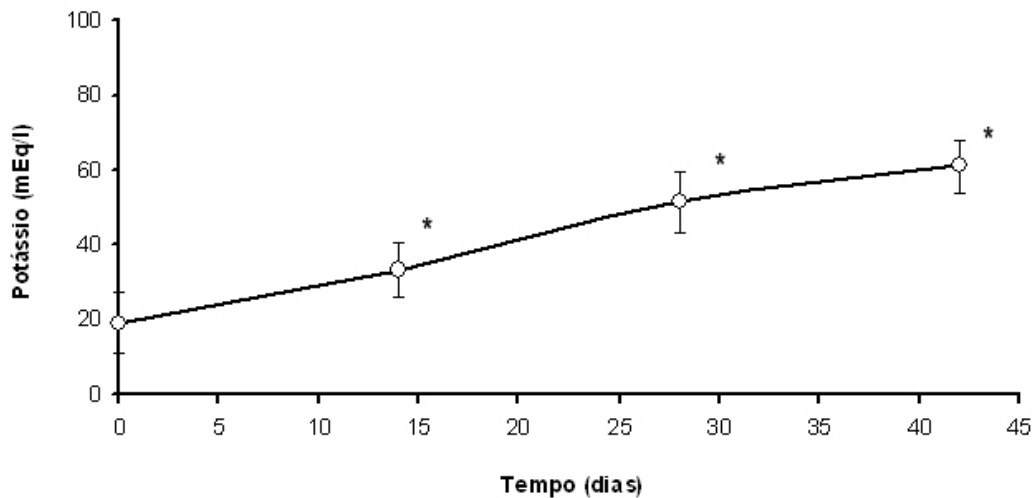


O plot \ln [glicose] versus tempo foi realizado com os dados da figura 12A em 16 unidades transfusionais eritrocitárias. Os dados ajustam-se a uma equação da reta $y = -0,0153x + 5,8579$

5.12 POTÁSSIO

A figura 13 ilustra o aumento nas concentrações extracelulares de íons potássio durante 42 dias de preservação. O teor de íons potássio variou de 20 a 60 mEq/l durante o período de preservação.

FIGURA 13. CONCENTRAÇÕES DE K^+ NO MEIO EXTRACELULAR DURANTE A PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS EM SAGM



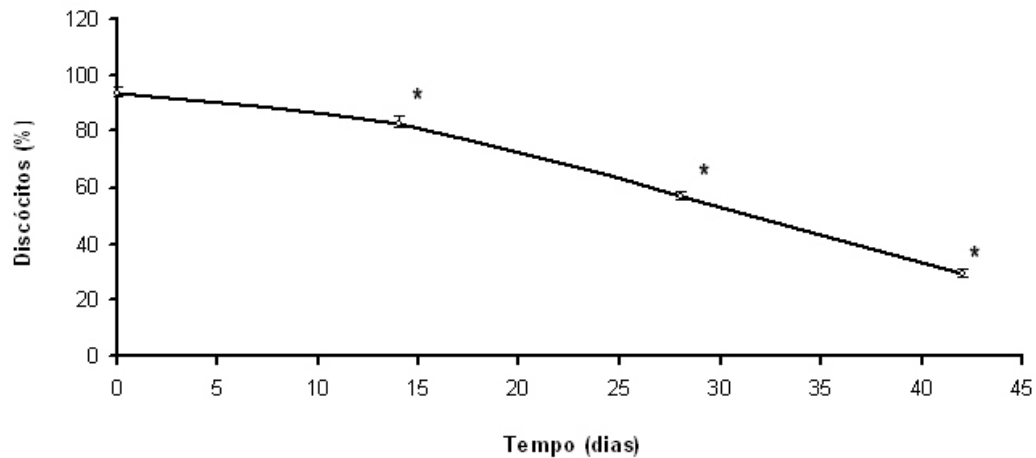
O ponto experimental é média da dosagem em 16 unidades transfusionais eritrocitárias. A barra de erro representa o desvio padrão.

* - Diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo zero.

5.13 PERCENTAGEM DE DISCÓCITOS

Foi observado uma mudança morfológica de discócitos para esferócitos durante a preservação dos eritrócitos em 42 dias. A contagem percentual de discócitos está representada na Figura 14.

FIGURA 14. PERCENTAGEM DE DISCÓCITOS EM UNIDADES TRANSFUSIONAIS ERITROCITÁRIAS DURANTE 42 DIAS EM SAGM



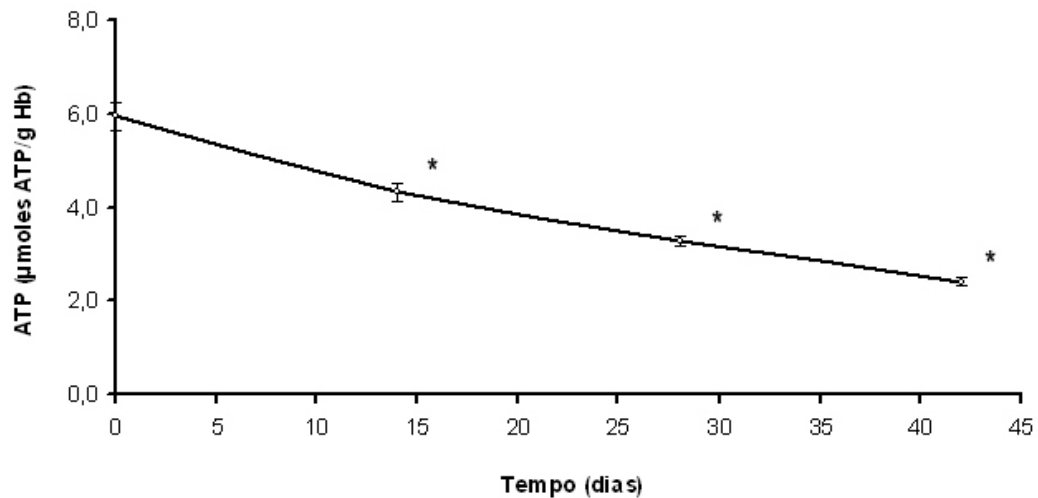
O ponto experimental é média da contagem em 19 unidades transfusionais eritrocitárias. A barra de erro representa o desvio padrão.

* - Diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo zero.

5.14 PERCENTAGEM DE ATP

A diminuição da concentração de ATP em eritrócitos durante a preservação está ilustrada na Figura 15. Pode-se observar uma queda de 70% no índice de ATP durante os 42 dias de preservação.

FIGURA 15. CONCENTRAÇÃO DE ATP EM ERITRÓCITOS DURANTE PRESERVAÇÃO POR 42 DIAS EM SAGM



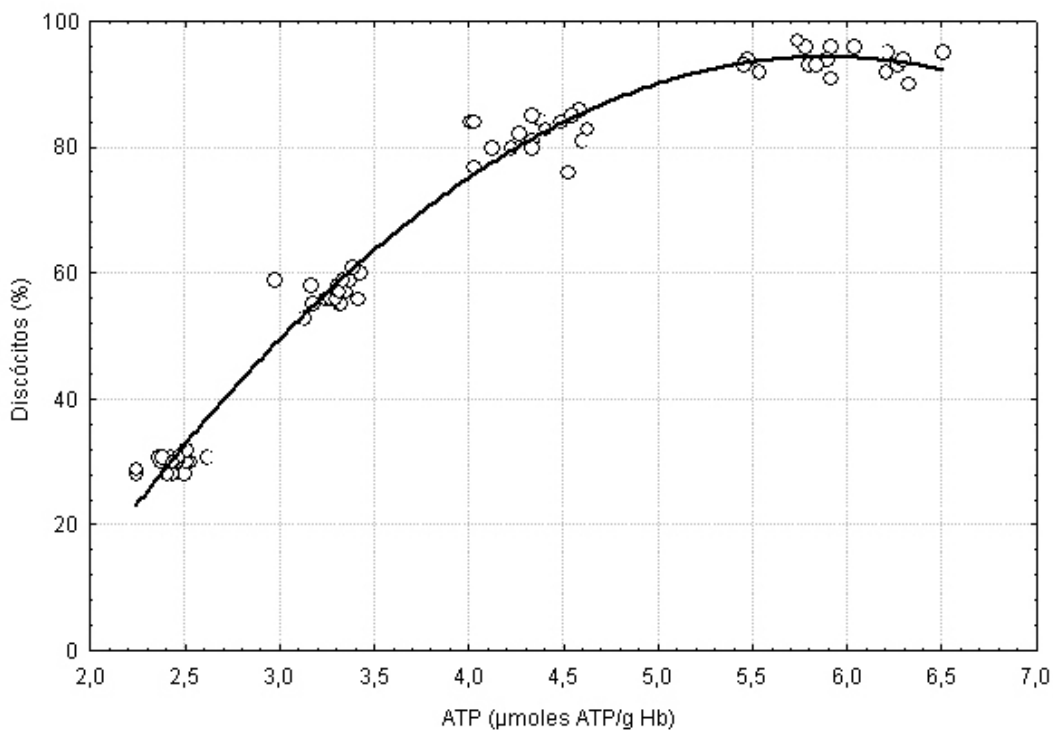
O ponto experimental é média da contagem em 17 unidades transfusionais eritrocitárias. A barra de erro representa o desvio padrão.

* - Diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo zero.

5.15 PERCENTAGEM DE DISCÓCITOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP

A figura 16 ilustra a correlação positiva que existe entre a percentagem de eritrócitos na forma de discócitos e a concentração de ATP celular ($\mu\text{moles ATP/g Hb}$), com coeficiente de correlação (r) de 0,93, durante a conservação em SAGM.

FIGURA 16. PERCENTAGEM DE DISCÓCITOS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP EM ERITRÓCITOS PRESERVADOS DURANTE 42 DIAS EM SAGM

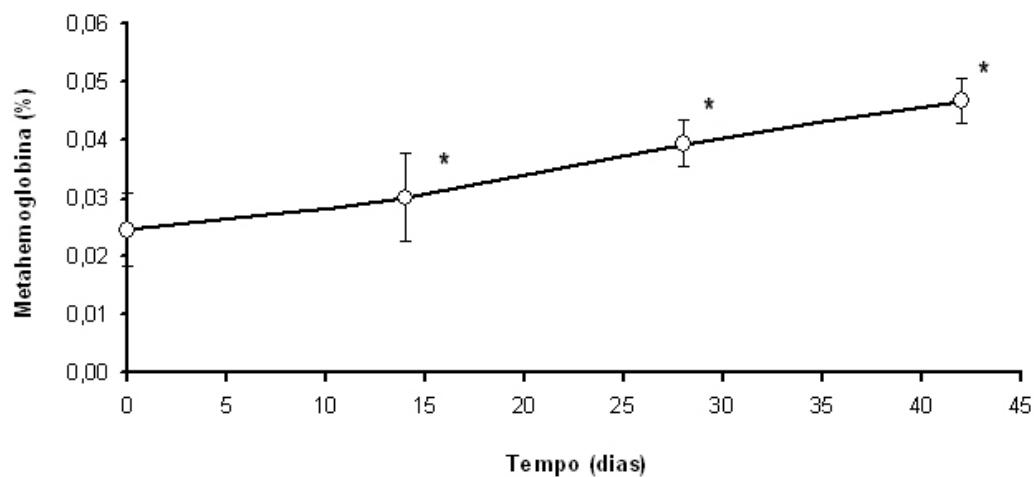


Os pontos experimentais foram obtidos em 17 unidades transfusionais eritrocitárias. A linha contínua foi desenhada com auxílio de computação, utilizando-se de um modelo de regressão exponencial.

5.16 METAHEMOGLOBINA

A figura 17 representa a formação de metahemoglobina (%) em suspensões de eritrócitos humanos armazenados durante 42 dias.

FIGURA 17. CONCENTRAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM



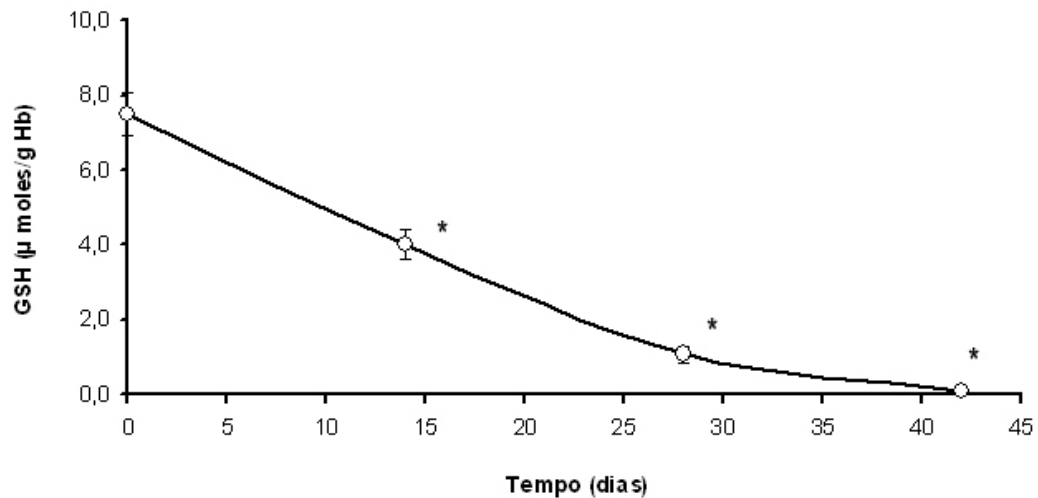
O ponto experimental é média da dosagem em 17 unidades transfusionais eritrocitárias. A barra de erro representa o desvio padrão.

* - Diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo zero.

5.17 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A figura 18 mostra as concentrações de glutatona reduzida (GSH, $\mu\text{moles/g}$ de Hb) em suspensões de eritrócitos humanos armazenados durante 42 em SAGM. Fica evidenciada a exaustão total de GSH após 42 dias.

FIGURA 18. CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM



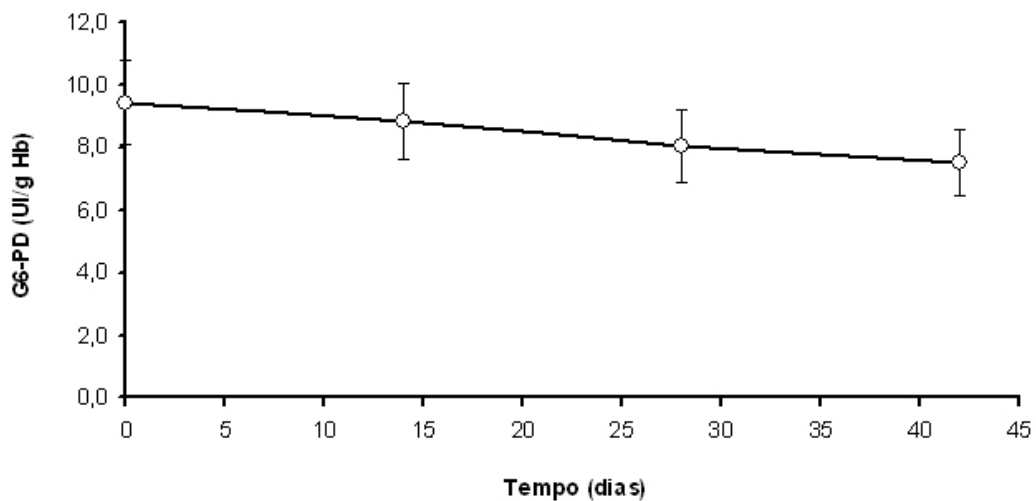
O ponto experimental é média da dosagem em 17 unidades transfusionais eritrocitárias. A barra de erro representa o desvio padrão.

* - Diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo zero.

5.18 GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6-PD)

A Figura 19 ilustra a atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD, UI/g Hb), em eritrócitos humanos durante a preservação em SAGM. Pode-se calcular a partir dos valores médios que a atividade da G6-PD cai apenas 20% durante o armazenamento. Entretanto não há diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$)

FIGURA 19. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6-PD EM ERITRÓCITOS HUMANOS DURANTE A PRESERVAÇÃO EM SAGM



O ponto experimental é média da dosagem em 17 unidades transfusionais eritrocitárias. A barra de erro representa o desvio padrão.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

No Brasil, os sistemas público e privado de hemoterapia, de um modo geral, têm melhorado sensivelmente a qualidade do atendimento nas últimas décadas. Essa melhoria ocorreu, sem dúvida, devido à evolução do conhecimento científico e ao desenvolvimento da tecnologia aliados à implantação do Sistema Único de Saúde (SUS) e ao conjunto de preceitos constitucionais e de leis que o sustentam. O Movimento Sanitário impulsionou sobremaneira tal evolução, mas houve a influência também de outros fatores, entre eles a conscientização da população quanto ao seu direito à saúde e o redobramento de cuidados quanto à contaminação por doenças graves como, por exemplo, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Nesse sentido, não só a criação da rede pública de Hemocentros Estaduais e Regionais teve papel relevante e fundamental, como tais Instituições têm representado o pilar de sustentação para tal evolução.

Apesar da evolução da hemoterapia no Brasil, muito ainda há por fazer para de alcançar os padrões internacionais de qualidade. Em relação às UTE, empregam-se os sistemas usuais para a preservação de eritrócitos, incluindo bolsas com CPD ou CPDA-1 como anticoagulante e soluções aditivas, como ADSOL ou SAGM, para a preservação dos eritrócitos entre 2 e 6° C. A RDC nº 153/2004 não determina o emprego de sistemas de filtração para retirada dos leucócitos de UTE, a não ser quando os eritrócitos são destinados a pacientes em estado crítico, ou mesmo pacientes que necessitam de transfusões freqüentes (BRASIL, 2004).

Segundo Högman e Meryman (2006), o Conselho Europeu recomendou em 2005 como critério primário para a qualidade da transfusão de unidades eritrocitárias, a preocupação com o volume de sangue coletado e a proporção de eritrócitos viáveis presentes no momento da transfusão. O padrão especificado é coleta de 450ml de sangue total e uma sobrevida pós-transfusional de 24 horas (SPT) de pelo menos 75%, a qual é determinada através da detecção de eritrócitos do doador marcados com cromo radioativo na circulação do receptor (DERN et al., 1967).

O volume de sangue total das 19 unidades coletadas para este trabalho variou de 410 a 460 ml, sendo que para a maioria delas foi de 450 ml, valor médio recomendado pela RDC 153/2004, como pode ser observado na Figura 2.

O volume de sangue coletado é considerado crítico porque, considerando-se 45 g como uma quantidade de hemoglobina mínima em uma UTE, como recomenda o Conselho da Europa de 2005, deve-se levar em conta que variações de 10%, aceitas para o volume total de sangue, podem levar a variações da ordem de 4,5 g de hemoglobina. Adicionalmente, a concentração de hemoglobina dos doadores varia, de modo geral, entre 13 e 18 g/dl, o que pode contribuir para variações ainda maiores. Eventuais perdas de eritrócitos ocorridas durante o processo promovem, ainda, diminuição do conteúdo de hemoglobina na UTE, especialmente se houver filtração para retirada de leucócitos (HÖGMAN & MERYMAN, 2006).

Como se pode observar na Figura 3, os volumes obtidos após preparação das Unidades Transfusionais Eritrocitárias variaram de 290 a 390 ml, sendo na maioria dos casos de 310 a 350 ml. A Figura 3 mostra a concentração de hemoglobina (g/dl) nas UTE, que apresentou coeficiente de variação de 5 %. Não houve variação da concentração de hemoglobina durante a preservação, do tempo zero até 42 dias. Estes dados mostram que houve uniformidade no preparo das UTE, bem como a estabilidade da hemoglobina durante a preservação.

A partir da concentração de hemoglobina e do volume das UTE, calculou-se a quantidade total de hemoglobina, que variou de 54 a 74 g por UTE, como se pode verificar na Figura 4. Estes valores são condizentes com as normas nacionais e internacionais relativas à quantidade mínima de 45 g de hemoglobina por UTE (WHO, 2002; BRASIL, 2004)

As determinações hematimétricas (hematócrito, VCM, HCM e CHCM), representadas nas Figuras 6 a 9, não apresentaram variações detectáveis durante os 42 dias de armazenamento. Entretanto, a aparente integridade celular do eritrócito não exclui o comprometimento de suas funções metabólicas.

LEONART (1994), durante o armazenamento de eritrócitos em ADSOL, observou aumento gradativo do VCM, que foi explicado pela entrada de água na célula devido à hipertonidade do meio; acompanhando uma tendência à diminuição no valor de CHCM. Outros autores encontraram estabilidade no VCM e no CHCM durante a preservação (HEATON, 1981), ou mesmo alterações variadas, dependendo do meio e das condições de preservação (HALBHUBER et al., 1987; GREENWALT, 1990). Turner et al. (1987) observaram que, eritrócitos armazenados em CPDA-1 por mais de 21 dias, quando adicionados a plasma autólogo por 24 horas, murcharam, com aumento do CHCM. Variações no VCM e no CHCM podem

ser devidas tanto à tendência natural de aumento da densidade do eritrócito durante o seu envelhecimento, quanto ao seu mascaramento, por ação do meio extracelular. Quando as células são transfundidas, retornam ao seu volume natural em função do tempo em que haviam sido preservadas *in vitro*, com conseqüente aumento do CHCM e diminuição da filtrabilidade, podendo vir a ocasionar problemas clínicos no receptor (CHIN-YEE et al., 1997).

Na Figura 10, pode-se observar os resultados obtidos para hemoglobina extracelular, pelo método empregado rotineiramente no HEMEPAR. Nas Figuras 11 A e B estão representadas as porcentagens de hemólise, calculadas a partir da hemoglobina extracelular, hematócrito e concentração de hemoglobina. Ao se comparar os resultados obtidos pelos dois métodos realizados, observa-se que, em ambos os casos, os valores encontrados ficaram dentro dos limites preconizados pela legislação brasileira e por padrões internacionais, de acordo com os quais, os índices de hemólise não devem ultrapassar 1% durante a preservação (BEUTLER, 1984; POLK & GARRISSON, 1995; MURPHY, 2001; BRASIL, 2004). No entanto, os valores obtidos com o primeiro método (Figura 11A), o qual se baseia na medida da oxihemoglobina em solução salina, se apresentaram oscilantes ao longo do tempo, enquanto os obtidos com o segundo método (Figuras 11B) permaneceram mais estáveis. A estabilidade da cianometahemoglobina, formada por ação do reagente de Drabkin, conferiu a este método a categoria de referência internacional para a dosagem de hemoglobina. A adaptação proposta por Pelissari et al. (1993) permite que o mesmo seja empregado para pequenas concentrações, que ocorrem durante a preservação de eritrócitos, ou mesmo por hemólise intravascular, em certas situações clínicas.

O grau de hemólise dos eritrócitos durante a preservação depende do meio de suspensão dos eritrócitos. Os resultados mostrados indicam baixos índices de hemólise durante 42 dias de preservação (<1,2%). Desde os primeiros estudos sobre o armazenamento de eritrócitos até a atualidade, os autores consideram a taxa de hemólise espontânea como marcador fundamental da preservação (RAPOPORT & WING, 1947; HÖGMAN & MERYMAN, 2006).

Pode ser observado nas Figuras 12 A e B, que a glicose foi consumida com velocidade constante até os 42 dias de preservação, com taxa de consumo de 15,3 µg de glicose/dl/dia, calculada com auxílio da cinética de primeira ordem

(Figura 12B). Estes valores representam redução de cerca de 50% da glicose inicial em 4 semanas e estão de acordo com os descritos por Leonart, 1994.

A glicose é consumida pela glicólise anaeróbica, sendo a principal fonte de energia para os eritrócitos, e consumida pelo ciclo das pentoses, gerando moléculas protetoras contra os radicais livres (LEE et al., 1999).

O aumento gradativo da concentração de K^+ no meio extracelular, como observado na Figura 13, ocorre devido à sua fuga do interior dos eritrócitos e indica a falha no funcionamento da $Na^+-K^+-ATPase$ da membrana HÖGMAN & MERYMAN, 1999; KURUP et al., 2003; HOLME, 2005). Este fato é bem conhecido em estudos sobre a preservação de eritrócitos. À medida que a glicose é consumida para produção de ATP e conseqüente manutenção da integridade da célula, acumula-se o lactato, produto final da atividade da via glicolítica. Isto provoca uma acidificação do meio, um dos grandes problemas na preservação do eritrócito em condições usuais (HÖGMAN & MERYMAN, 1999; TINMOUTH & CHIN-YEE, 2001; HESS & GREENWALT, 2002). A diminuição do pH acaba sendo responsável pelo comprometimento das enzimas glicolíticas e, conseqüentemente, da produção de ATP e do funcionamento da $Na^+-K^+-ATPase$. Este é um importante fator limitante para a viabilidade do eritrócito. Assim, a determinação de K^+ no meio extracelular pode ser um marcador válido para o controle de qualidade durante a preservação.

Ocorreu diminuição da concentração de ATP durante a preservação (Figura 15), com perdas de 60% até o 42º dia. Sem dúvida, esta redução dos níveis de ATP causou a falha na manutenção do gradiente iônico pela bomba de Na^+K^+ . A concentração de ATP é considerada como um dos marcadores mais importantes a serem empregados no estudo da preservação de UTE, por representar a reserva de energia do eritrócito e por se correlacionar estreitamente com a SPT (HESS & GREENWALT, 2002; HOLME, 2005; HESS, 2006). Existem estudos bastante claros que mostram a importância dos níveis de ATP e que apontam para as limitações das soluções aditivas que são empregadas rotineiramente em muitos países (HESS & GREENWALT, 2002; ALMAC & INCE, 2007). Outro marcador considerado importante para a avaliação das UTE é o 2,3 BPG, por ser a molécula responsável pela modulação da função da hemoglobina na liberação de oxigênio aos tecidos. A partir da constatação de que, tanto o ATP quanto o 2,3 BPG são exauridos em poucas semanas em UTE preparadas com as soluções aditivas usuais, é que diversos autores desenvolveram novas soluções, com as quais se consegue manter

a viabilidade e a funcionalidade dos eritrócitos por tempos maiores (HAMASAKI & YAMAMOTO, 2000; HESS & GREENWALT, 2002; HESS, 2006; HÖGMAN & MERYMAN, 2006a).

As determinações laboratoriais de ATP e 2,3 BPG se baseiam em técnicas enzimáticas reprodutíveis e bem estabelecidas na literatura (BEUTLER, 1985). Entretanto, não constam da RDC nº 153/2004 e, de um modo geral, não são realizadas rotineiramente no acompanhamento de UTE em nosso país, possivelmente devido à necessidade de equipamentos específicos e por apresentarem certa complexidade, nem sempre comportada pelos recursos e infraestrutura disponíveis nos Hemocentros e Bancos de Sangue.

A Figura 14 apresenta os valores obtidos pela contagem de discócitos nas UTE estudadas. Esta determinação se baseia na contagem diferencial das formas eritrocitárias, feita após uma simples diluição de alíquotas das UTE em líquido diluente para contagem de eritrócitos, em câmara de Neubauer, ao microscópio de luz. Ao se empregar os critérios morfológicos propostos por Bessis (1972) e modificados por Leonart (1994) para as formas eritrocitárias encontradas durante a preservação, ou seja, discócitos, equinócitos, estomatócitos e esferócitos, é possível obter a porcentagem de discócitos, incluindo discoequinócitos e equinócitos I, da nomenclatura original de Bessis (1972). A contagem de eritrócitos na forma de discócitos correlacionou-se positivamente com a concentração celular de ATP (Figura 15), que é também um indicativo da integridade funcional da membrana (FEO & MOHANDAS, 1977; LEONART, 1999; HESS & GREENWALT, 2002; HOLME, 2005). A partir do alto grau de correlação encontrado ($r = 0,93$), pode-se inferir que a porcentagem de discócitos poderia ser empregada alternativamente, por representar uma estimativa da concentração do ATP. Esse fenômeno pode constituir uma excelente ferramenta para o controle de qualidade das UTE, por poder indicar a viabilidade dos eritrócitos durante a preservação. Esses resultados são consistentes com os observados por Leonart et al. (1997) em eritrócitos preservados em ADSOL, que propuseram a utilização da porcentagem de discócitos como um marcador a ser utilizado para controle de qualidade em Hemocentros, na avaliação dos eritrócitos durante o armazenamento. Importante lembrar que a correlação entre porcentagem de discócitos foi estabelecida durante a preservação de eritrócitos em ADSOL (LEONART et al., 1997) e em SAGM neste trabalho, e que pode não ser

reproduzida, para UTE preservadas como concentrados ou mesmo em outras soluções aditivas.

Na literatura é descrita correlação entre os níveis de ATP, manutenção da morfologia eritrocitária e sobrevida pós-transfusional (DERN et al., 1967). Diversos autores estudaram as alterações morfológicas durante a preservação de eritrócitos para hemoterapia, indicando as mesmas alterações encontradas neste trabalho, sendo que alguns deles citam o chamado índice morfológico, que representa a proporção de discócitos, como um dos marcadores a serem empregados durante a preservação (FEO & MOHANDAS, 1977; LEONART, 1999; HESS et al., 2001; HESS & GREENWALT, 2002; HOLME, 2005). Observou-se ainda que a depleção rápida de ATP reproduz alterações morfológicas observadas durante o estoque, enquanto a restauração de ATP reverte estas mudanças (NAKAO et al., 1960; TINMOUTH et al., 2006). Assim, a contagem diferencial das formas eritrocitárias durante a preservação de eritrócitos é considerada um parâmetro no estudo de UTE, com resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho para eritrócitos mantidos em SAGM (HÖGMAN et al., 1985).

Durante a preservação ocorre diminuição da concentração do ATP (Figura 15) e do potássio intracelular (Figura 13), e hemólise, que são fenômenos relacionados com a permeabilidade funcional da membrana plasmática. Esses resultados são consistentes com os observados por Leonart et al., 1997.

Algumas indicações sobre o estado redox dos eritrócitos pode ser obtida pela avaliação dos teores de metahemoglobina e de GSH. A metahemoglobina é resultante de degradação oxidativa da hemoglobina, pela ação de espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres, que ocasionam também a peroxidação lipídica da membrana. Observa-se, na Figura 17, muito pouca formação de metahemoglobina durante o armazenamento dos eritrócitos em SAGM durante 42 dias, flutuando dentro da normalidade. Os valores de referência para indivíduos normais são de até 1% (BEUTLER et al., 1955). Outros autores também encontraram baixas concentrações de metahemoglobina durante a preservação de eritrócitos, mesmo sem o emprego de soluções aditivas, com valores menores que 1% em CPDA-1 (FAGIOLO et al., 1986) e de até 3% em ACD (SCAROINA et al., 1989).

A manutenção dos níveis de GSH é essencial para a manutenção do estado reduzido dos tióis de enzimas e proteínas das membranas e na remoção de

espécies reativas de oxigênio. A oxidação do GSH leva à formação de glutathiona oxidada (GSSG) e a conseqüente exaustão dos níveis de NADPH e NADH, que são os principais carreadores de elétrons dentro da célula (JÓZWIK et al.,1997). Os resultados ilustrados na Figura 18 indicam que os índices de GSH diminuíram gradativamente, chegando a zero após os 42 dias de armazenamento.

Há melhor manutenção do ATP, bem como da carga de energia dos adenilatos e da flexibilidade da membrana, acompanhados de concentração levemente mais baixa de glutathiona oxidada em condições de estoque anaeróbicas em relação às aeróbicas (HÖGMAN, 1986). Estes achados levaram à hipótese de que a presença de oxigênio causou maior demanda de grupos SH e de grupos P de alta energia, possivelmente para proteção dos lipídeos e proteínas da membrana contra a peroxidação. Józwik et al. (1997), ao analisarem os níveis de GSH e outros marcadores de oxidação em eritrócitos lavados e preservados durante 25 dias em condições de laboratório, encontraram exaustão dos mecanismos antioxidantes do eritrócito. Porém, outros autores consideram que há poucas evidências de que o dano oxidativo tem papel significativo para a explicação da perda de viabilidade durante a preservação usual dos eritrócitos (HÖGMAN & MERYMAN, 1999). Eritrócitos de doadores de sangue portadores heterozigotos de hemoglobina S (AS) preservados em SAGM, quando comparados aos de doadores normais, apresentam exacerbação do processo oxidativo, com aumento significativo da formação de corpos de Heinz acompanhado de redução de GSH, aliados a aumento significativo da hemólise. A resposta desses eritrócitos a estresse oxidativo por terc-butilhidroperóxido foi significativa, com níveis de hemólise cerca de três vezes superiores em relação a eritrócitos normais, o que poderia levar à hipótese de que eritrócitos sujeitos a processo oxidativo exacerbado poderiam ser inadequados para transfusão (CHAVES, 2007).

Os resultados de perda de GSH, somados às perdas de ATP (Figura 15), diminuição da concentração de glicose (Figura 12), alterações morfológicas (Figura 14) e vazamento de íons potássio para o meio extracelular (Figura 13), indicam alto grau de desenergização celular durante os 42 dias de preservação.

A enzima G6-PD se mostrou bastante resistente ao estado redox do eritrócito (Figura 19). Foi observado um decaimento de apenas 20% na atividade da G6-PD durante o armazenamento. Esses resultados são consistentes com observados por Leonart et al., 2000, em eritrócitos preservados em ADSOL. A estabilidade da

enzima G6-PD eritrocitária foi observada em estudos de Chaves et al. (2008), quando indicam que a utilização de anti-oxidantes, como as vitaminas C e E não causa nenhum efeito sobre a atividade da G6-PD em eritrócitos normais e de indivíduos portadores de hemoglobina S.

Apesar de a lesão de estoque ser estudada há décadas, a compreensão de todos os mecanismos envolvidos, bem como de suas possíveis conseqüências clínicas, ainda permanece incompleta (TINMOUTH et al., 2006).

Existe consenso em relação à importância da viabilidade dos eritrócitos, bem representada pela determinação da SPT *in vivo* e sua correlação com os níveis de ATP durante a preservação *in vitro*, bem como da correlação entre a concentração de 2,3 BPG e a liberação de oxigênio nos tecidos e dos baixos índices de hemólise durante a preservação (HESS & GREENWALT, 2002; HESS, 2006; HÖGMAN & MERYMAN, 2006a; ALMAC & INCE, 2007). Já é bem conhecido também que a retirada dos leucócitos, em especial através de métodos eficientes de filtração, melhora a preservação *in vitro* e pode evitar reações adversas no receptor, decorrentes de infecções virais, reações pela presença de citocinas, aloimunização (HESS & GREENWALT, 2002; HESS, 2006; HÖGMAN & MERYMAN, 2006a; KLEIN, 2007).

Atualmente, se discute a relevância de aspectos clínicos, especialmente quando o receptor dos eritrócitos transfundidos se encontra em condições mais críticas e corre o risco de não ter acesso aos níveis de oxigênio que necessita para sua sobrevivência naquele momento, ou mesmo de sofrer efeitos adversos em decorrência da transfusão, tais como problemas circulatórios graves devidos à perda das propriedades reológicas normais dos eritrócitos ou mesmo à formação de coágulos, entre outros (TINMOUTH et al., 2006; ALMAC & INCE, 2007). Os efeitos da duração do estoque dos eritrócitos têm sido ressaltados através de estudos que demonstram maiores riscos para os receptores que receberam UTE mantidas por períodos maiores que 18 dias nas condições usuais (ALMAC & INCE, 2007).

Em relação ao desenvolvimento do conhecimento na área da preservação de eritrócitos para hemoterapia, os avanços são importantes nas últimas décadas. Infelizmente, na maioria dos países, passará mais algum tempo para que tais avanços possam ser aplicados, devido ao rigor nos critérios e à conseqüente demora de órgãos reguladores, como o FDA, na liberação do uso de novos produtos na área da saúde, como é o caso de novas soluções preservadoras de eritrócitos

(HAMASAKI & YAMAMOTO, 2000; HESS & GREENWALT, 2002; HÖGMAN & MERYMAN, 2006b).

A RDC nº 153/2004 foi cuidadosamente elaborada e apresenta normas importantes a serem cumpridas para se manter a qualidade nos serviços de hemoterapia em nosso país. No HEMEPAR, as determinações da RDC são cumpridas integralmente, o que contribui fundamentalmente para se manter a qualidade dos serviços oferecidos pela Instituição, bem como para assegurar a vida e ajudar a manter a qualidade de vida de milhares de usuários.

Sem dúvida, no entanto, todas as leis, normas e resoluções, por melhores que possam parecer, são transitórias e tendem a ser aperfeiçoadas a médio e longo prazo, até mesmo em função do avanço da ciência. Além disso, propostas de aperfeiçoamento de qualquer sistema, para além de normas já definidas, podem ser bem-vindas se contribuírem para determinar benefícios.

Na análise do estado da arte relativo ao avanço da ciência na área da preservação de eritrócitos, assunto de que trata este trabalho, já existem elementos suficientes para se poder afirmar que se pode avançar ainda mais, tanto no que se refere à metodologia de preparo de Unidades Transfusionais Eritrocitárias e a soluções aditivas mais adequadas, quanto ao monitoramento da preservação e, conseqüentemente, ao seu controle de qualidade.

Desta forma, os conhecimentos acumulados sobre o metabolismo dos eritrócitos e o seu envelhecimento *in vitro* permitem apresentar marcadores alternativos ou mesmo somatórios, em relação aos preconizados pela RDC nº 153/2004, os quais podem trazer informações mais precisas a respeito da viabilidade e do estado funcional do eritrócito.

Nesse sentido, o monitoramento dos níveis de ATP e de 2,3 BPG, este último não estudado neste trabalho, sem dúvida, podem informar com precisão a respeito da viabilidade e do estado funcional dos eritrócitos. A manutenção da forma de discócito, por estar fortemente correlacionada com a concentração de ATP, também pode informar a respeito da viabilidade do eritrócito. Além disso, as concentrações de metahemoglobina e de glutatona reduzida informam, respectivamente, a respeito do estado redox da hemoglobina e da capacidade de resposta ao dano oxidativo da célula. O monitoramento destas últimas pode prevenir, desta forma, a transfusão de eritrócitos seriamente danificados pelo efeito de radicais livres, entre eles as espécies reativas de oxigênio, e poderiam ser úteis, em especial para a liberação de

UTE para UTI neo-natal ou mesmo para outros pacientes críticos. As medidas hematimétricas do eritrócito, como VCM, HCM e CHCM, trazem informações a respeito do estado osmótico e do envelhecimento do eritrócito e, se forem avaliadas de acordo com a forma como as UTE foram preparadas e em que meio são preservadas, podem ser importantes para se prever o seu comportamento na circulação do receptor. A literatura recente traz, ainda, informações importantes a respeito de possíveis riscos para o receptor após a transfusão de eritrócitos, especialmente se os mesmos já estiverem preservados há mais tempo, e muitas vezes relacionados a alterações importantes das suas propriedades reológicas. Alguns autores apontam para medidas a serem efetuadas nas UTE relativas a tais propriedades do eritrócito, no sentido de evitar reações adversas graves, como as que atingem a microcirculação ou a hemostasia (TINMOUTH et al., 2006).

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho e com base no atual estado do conhecimento sobre o emprego e o controle de qualidade de Unidades Transfusionais Eritrocitárias, pode-se sugerir o uso adicional de alguns métodos adequados para a monitoração, a cada duas semanas, dessas Unidades, quais sejam, a avaliação morfológica dos eritrócitos pela determinação das porcentagem de discócitos; a determinação dos índices de hemólise a partir da determinação da concentração de cianometahemoglobina extracelular; a determinação dos índices hematimétricos, VCM, HCM e CHCM; determinação das concentrações de metahemoglobina e de GSH.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Na avaliação de 19 Unidades Transfusionais Eritrocitárias, preparadas a partir de Unidades de Sangue Total com 450 ± 30 ml, preservadas em SAGM entre 2 e 6°C, no HEMEPAR, por monitoramento nos tempos 0 e de 14, 28 e 42 dias, obteve-se os seguintes resultados:

- Volume de 290 a 390 ml, na maioria dos casos de 310 a 350 ml;
- Concentração estável de hemoglobina, de 20 ± 1 g/dl;
- Hemoglobina total de 54 a 74 g;
- Hematócrito, VCM, HCM e CHCM estáveis durante o armazenamento;
- Índices de hemólise de até 1,2%;
- Consumo de glicose constante, de 15,3 µg de glicose/dl/dia;
- Aumento gradativo da concentração de K^+ no meio extracelular,
- Diminuição gradativa dos níveis de ATP, com perdas de 60% no 42º dia;
- Diminuição gradativa da porcentagem de discócitos, com alta correlação positiva em relação aos níveis de ATP ($r=0,93$);
- Concentrações de metahemoglobina menores que 1%;
- Diminuição gradativa dos níveis de GSH, chegando a zero em 42 dias;
- Manutenção das atividades de G6-PD acima de 80% do normal.

A partir da análise do conhecimento científico atualizado, das normas preconizadas pela RDC nº 153/2004 da ANVISA, das atividades rotineiras praticadas no HEMEPAR e dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a implementação de alguns métodos para o monitoramento das UTE poderia contribuir com a qualidade da hemoterapia, entre eles, a avaliação morfológica dos eritrócitos pela determinação das porcentagens de discócitos; a determinação dos índices de hemólise a partir da determinação da concentração de cianometahemoglobina extracelular; a determinação dos índices hematimétricos, VCM, HCM e CHCM; a determinação das concentrações de metahemoglobina e de GSH.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ALLAN, D.; RAVAL, P. J. A sphingomyelinase-resistant pool of sphingomyelin in the nuclear membrane of hen erythrocytes. Biochimica et biophysica acta. v. 897, n. 3, p:355 – 363, 1987.

ALMAC, E.; INCE, C. The impact of storage on red cell function in blood transfusion. Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology; Münster, v. 21, n. 2, p. 195 – 208, 2007.

ARTZ C. P. et al. Plastic bags for intravenous infusions: observations in Korea with saline, dextran and blood. in Howard JM (eds): Battle Casualties in Korea: Studies of the Surgical Research Team, Washington, v. 2, p. 219–224, 1954.

AUBUCHON, J. P.; ESTEP, T. N.; DAVEY, R. J. The effect on the plasticized di-2-ethylhexyl phthalate on the survival of stored RBCs. Blood, New York, v. 71, n. 2, p. 448 – 452, 1988.

BEASLEY, R.; MCNAUGHTON, A.; ROBINSON, G. New look at the oxyhaemoglobin dissociation curve. The Lancet, Oxford, v.367, p. 1124–1126, 2006.

BESSIS, M. Red cell shapes: an illustrated classification and its rationale. Nouvelle revue française d'hématologie, Paris, v.12, p. 721 – 745, 1972.

BEUTLER E.; DERN R. J.; ALVING A. S. The hemolytic effect of primaquine. VI. An *in vitro* test for sensitivity of erythrocytes to primaquine Journal of Laboratory and Clinical Medicine; v. 45, n. 1, p. 40 – 50, 1955.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods. 3. ed. Orlando: Grune & Stratton, 1984.

BEUTLER, E. How do cell enzymes age? A new perspective. British Journal of Haematology, Oxford, v. 61, p.377 – 384, 1985.

BRASIL. ANVISA - agência nacional de vigilância sanitária. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. Resolução RDC nº 153, de 24 de junho de 2004. Também disponível em : <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=11662>>. Acesso em: 02 jun. 2008.

BRASIL. Lei nº 10205, de 21 de março de 2001, Regulamenta o § 4º do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução adequada dessas atividades, e dá outras providências D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 22 de março de 2001, Brasília, 21 de março de 2001. Seção 1. Também disponível em: < [http://e-](http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=11662)

legis.anvisa.gov.br/leisref

/public/showAct.php?id=7479>. Acesso em: 02 jun. 2008.

BRATOSIN, D. et al. Molecular and cellular mechanisms of erythrocyte programmed cell death: impact on blood transfusion. Vox Sanguinis, Basel, v. 83, p. 307 – 310, 2002.

CHABANEL, A. Increased red blood cell aggregation in retinal vein occlusion. British Journal of Haematology, Oxford, v. 75, n. 1, p. 127 – 131, 1987.

CHAILLEY, B. et al. Formes échinocytaires et stomatocytaires du globule rouge. Nouvelle revue française d'hématologie, Paris, v.13, p.71 – 88, 1973.

CHAVES, M. A. F. ;. Ação antioxidante das vitaminas c e e no processo oxidativo em eritrócitos de indivíduos portadores de hemoglobina s. 2007. 130p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007..

CHIN-YEE, I.; ARYA, N.; D'ALMEIDA, MARK S. The red cell storage lesion and its implication for transfusion. Transfusion Science, v. 18, n. 3, p. 447 – 458, 1997.

DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. Practical Haematology. 8.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.

DE VROEGE, R. et al. Washing of stored red blood cells by an autotransfusion device before transfusion. Vox Sanguinis, Basel, v. 92, n. 2, p. 130 – 135, 2007.

DERICK, L.H.; LIU, S. C.; CHISHTI, A. H.; PALEK, J. Protein immunolocalization in the spread erythrocyte membrane skeleton. European journal of cell biology v. 57, n. 2, p. 317 – 320, 1992.

DERN, R. J.; BREWER, G. J.; WIORKOWSKI, J. J. Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other *in vitro* measures to red cell storageability. The Journal of laboratory and clinical medicine. New York, v. 69, n. 6, p. 968 – 978, 1967.

ELGSAETER, A.; MIKKELSEN, A. Shapes and shape changes *in vitro* in normal red blood cells. Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes, Stockholm, v. 1071, n. 3, p. 273 – 290, 1991.

FAGIOLO E. et al. Biochemical parameters to assess viability of blood storage for transfusional use. Folia haematologica, Leipzig, v. 113, p. 783 – 789, 1986.

FEO, C.; MOHANDAS, N. Clarification of role of ATP in red-cell morphology and function. Nature, London, v. 265, p.166 – 168, 1977.

FERRELL, J. E.; HUESTIS, W. H. Calcium does not mediate the shape change that follows ATP depletion in human erythrocytes. Biochimica et biophysica acta, Amsterdam, v. 687, p. 321 – 328, 1982.

GAMBERO, S. et al. Anti-A and anti-B hemolysin frequencies in blood donors from the Hemotherapy Center of Unesp, Botucatu. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São José do Rio Preto, v. 26, n. 1, p.28 – 34, 2004.

GIANGRANDE, P. L. F. The history of blood transfusion. British Journal of Haematology, Oxford, v. 110, n. 4, p. 758 – 767, 2000.

GRATZER, W. More read than dead. Nature, London, v. 310, p. 368 – 369, 1984.

GREENWALT, T. J.; SOSTOK, C. Z.; DUMASWALA, U. J. Studies in red blood cell preservation. Comparison of vesicle formation, morphology, and membrane lipids during storage in AS-1 and CPDA-1. Vox Sanguinis, Basel, v. 58, p. 90 – 93, 1990.

GRIMES, A. T.; Human red cell metabolism. Oxford: Blackwell, 1980, 384p.

GUERRA, C. C. C. 50 anos da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São José do Rio Preto; v. 22, n. 2, p. 67, 2000.

HALBHUBER, K. J. et al. Preservation of red cell concentrates. Dependence on storage time of IgG binding, osmotic fragility, MCV, and surface area index. Folia haematologica, Leipzig, v. 114, n. 4, p. 467 – 468, 1987.

HAMASAKI, N.; YAMAMOTO, M: Red blood cell function and blood storage. Vox Sanguinis, Basel, v. 79, n. 9, p. 191 – 197, 2000.

HEATON, A. et al. Improved storage of high hematocrit cell concentrates using a mannitol, adenine, saline, glucose solution. Transfusion, Philadelphia, v. 21, p. 600 – 601, 1981.

HESS, J. R. An update on solutions for red cell storage. Vox Sanguinis, Basel, v.91, n. 1, p. 13 – 19, 2006 a.

HESS, J. R. et al. Buffering and dilution in red blood cell storage. Transfusion; Philadelphia, v. 46, p. 50 – 54, 2006 b.

HESS, J. R. et al. The role of electrolytes and pH in RBC Ass. Transfusion, Philadelphia, v. 41, N. 8, p.1045 – 1051, 2001.

HESS, J. R.; GREENWALT, T. G. Storage of red cells: new approaches. Transfusion Medicine Reviews, Hamilton, v. 16, n. 4, p. 283 – 295, 2002.

HÖGMAN, C. F.; HEDLUND, K.; SAHLESTROM, Y. Red cell preservation in protein-poor media. Protection against *in vitro* hemolysis. Vox Sanguinis, Basel. v. 41. p. 274 – 281, 1981.

HÖGMAN, C. F. et al. Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4° *in vitro*. I: Cell shape and total adenylate concentration as determinant factors for posttransfusion survival. Vox Sanguinis, Basel, v. 48, n. 5, p. 257 – 268, 1985.

HÖGMAN, C. F. et al. Effects of oxygen on red cells during liquid storage at + 4° C. Vox Sanguinis, Basel, v. 51, p. 27 – 34, 1986.

HÖGMAN, C. F. et al. Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4° *in vitro*. Vox Sanguinis, Basel, v. 53, p. 84 – 88, 1987.

HÖGMAN, C. F.; LÖF, H.; MERYMAN, H. T. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate. Transfusion, Philadelphia, v. 46, n. 9, p. 1543 – 1552, 2006a .

HÖGMAN, C. F.; MERYMAN, H. T. Red blood cells intended for transfusion: quality criteria revisited Transfusion, Philadelphia, v. 46, n. 1, p. 137 – 142, 2006b.

HÖGMAN, C.F. et al. Storage of saline-adenine-glucose-mannitol-suspended red cells in a new plastic container: polyvinylchloride plasticized with butyryl-n- trihexyl-citrate. Transfusion, Philadelphia, v. 31, n. 1, p. 26 – 29, 1991.

HÖGMAN, C; MERYMAN, H. T. Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion. Transfusion Medicine Reviews, Hamilton, v. 13, n. 4, p. 275 – 296, 1999.

HOLME, S. Current issues related to the quality of stored RBCs. Transfusion and Apheresis Science, Ottawa, v. 33, n. 1, p. 55 – 61, 2005.

JANDL, J. H. Blood: Pathophysiology. Blackwell Scientific Publications, Inc., Boston: 1991.

JÓŹWIK, M. et al. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. Clinica Chimica Acta, Gent, v. 267, n. 2, p. 129 – 142, 1997.

JUNQUEIRA, P. C.; ROSENBLIT, J.; HAMERSCHLAK, N. História da hemoterapia no Brasil. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; São José do Rio Preto, v. 27, n. 3, p. 201 – 207, 2005.

KOPEC-SZLEZAK, J.; GRABARCZYK, M.; SZCZEPANKA, D.W.; et al. Protective effects of vitamins E and C in erythrocyte in blood preserved in ACD solution and stored at 4 ° C. Haematology. Budapest: v.21. p.219 – 226, 1988.

KLEIN, H.; SPAHN, D.; CARSON, J. Red blood cell transfusion in clinical practice. The Lancet, Oxford, v. 370, n. 9585, p. 415 – 426, 2007.

KLEINBONGARD, P. et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. Blood, New York, v. 107, n. 7, p. 2943 – 2951, 2007.

KLINKEN, S. P. Red blood cells. The international journal of biochemistry & cell biology, London, v. 34, n. 12, p. 1513-1518, 2002.

KURUP PA, Modified formulation of CPDA for storage of whole blood, and of SAGM for storage of red blood cells, to maintain the concentration of 2,3-diphosphoglycerate. Vox Sanguinis, Basel, v. 85, n. 4, p. 253 – 261, 2003.

LEE G. R. et al. Wintrobe's Clinical Hematology. 10 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 196 – 217, 1999.

LEONART, M.S.S. Estudos sobre a preservação de eritrócitos. 1994. 131 p. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

LEONART, M. S. S. et al. Enzymes and membrane proteins of ADSOL preserved red blood cells. São Paulo Medical Journal, São Paulo, v. 118, n. 2, p. 41 – 45, 2000.

LEONART, M. S. S. Estudos sobre eritrócitos e plaquetas: preservação, morfologia e fisiopatologia. 1999. 190 p. Tese (Concurso Público para Professor Titular na área de Análises Clínicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

LEONART, M. S. S. et al. Correlation of discocyte frequency and ATP concentration in preserved blood. A morphological indicator of red cell viability. Brazilian Journal Medical Biological Research, Ribeirão Preto, v. 30, n. 6, p.745 – 747, 1997.

LICHTMAN, M. A.; MARINETTI, G. V.; GORDESKY, S. E. the effect of incubated plasma and lysolecithin on the shape and membrane lipid composition of red cells studies *in vitro*. Nouvelle revue française d'hématologie, Paris, v. 14, p. 5 - 24, 1974.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J. A. red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. Seminars in Hematology, New York, v. 30, p. 171 – 192, 1993.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J. A.; SHOHET, S. B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties and shape. Seminars in Hematology, New York, v. 20, p. 225 – 242, 1983.

MOLLISON P. L.; ENGELFRIET, C. P.; CONTRERAS, M. Blood transfusion in clinical medicine. 10th ed. Oxford: Blackwell Science; p. 61-115, 1997.

MOLLISON P. L. et al. The introduction of citrate as an anticoagulant for transfusion and of glucose as a red cell preservative British Journal of Haematology, v. 108, n.1 , p. 13 – 18, 2000.

MOORE, G. L. et al. Post-thaw storage at 40°C of previously frozen red cells with retention of 2,3 DPG. Vox Sanguinis, Basel, v. 53, p.15 - 18, 1987.

MOROFF, G.; SOHMER, P.R.; BUTTON, L.N. Proposed standardization of methods for determining the 24-hour survival of stored red cells. Transfusion. v.24, n.2, p.109-14, 1984.

MURPHY, M. F. et al. Guidelines for the clinical use of red cell transfusions. British journal of haematology, London, v.113, n.1, p. 24 – 31, 2001.

NAKAO, M.; NAKAO, T.; YAMAZOE, S. Adenosine Triphosphate and Maintenance of Shape of the Human Red Cells. Nature, London, v. 187, p. 945 – 946, 1960.

PELISSARI, C. B.; STIGHEN, S.T; NASCIMENTO, A.J.; LEONART, M.S.S. Padronização para a dosagem de hemoglobina extracelular pelo método da cianometahemoglobina. Revista Brasileira de Análises Clínicas. v. 25, p. 14 -16, 1993.

POLK, H. C. & GARRISON, J. R. Blood Management Practice Guidelines: Conference Highlights. The American Journal of Surgery. Birmingham, v.170, n. 6, p. S1 – S2, 1995.

RAPOPORT S, WING M: Dimensional, osmotic, and chemical changes of erythrocytes in stored blood. I. Blood preserved in sodium citrate, neutral, and acid citrate-glucose (ACD) mixtures. The Journal of Clinical Investigation, Ann Arbor v. 26, p. 591 – 615, 1947.

RAZOUK, F. H.; REICHE, E. M. V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São José do Rio Preto, v.26, n.2, p.126 – 134, 2004.

REINHART, W. H.; CHIEN, S. Echinocyte-stomatocyte transformation and shape control of human red blood cells: morphological aspects. The American Journal of Physiology, Bethesda, v.24, p. 1 – 14, 1987.

ROUS, P.; TURNER, J. R. The preservation of living red blood cells *in vitro* : i. Methods of preservation. The Journal of Experimental Medicine, New York, v. 23, p. 219 – 237, 1916.

RUDELL, J.P.; LIPPERT, L.E.; BABCOCK, J.G.; et al. Effect of 24 hour storage at 25 degree C on the *in vitro* storage characteristics of CPDA-1 packed red cells. Transfusion. Philadelphia : v.38. p.424 – 428, 1998.

SCAROINA, F. et al. A follow-up on functional parameters of blood stored in ACD at +4 degrees C. Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale, Napoli, v. 65, n. 2, p. 117 – 124, 1989.

SCHWABBAUER, M. Normal erythrocyte production, physiology and destruction. Clinical hematology: principles, procedures and correlations. Philadelphia, Lippincott, p. 52 – 72, 1998.

SCOTT, K.; LECAK, J.; ACKER, J. Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future. Transfusion Medicine Reviews, Hamilton, v. 19, n. 2, p. 127 – 142, 2005.

SHEETZ, M. P.; SINGER, S. J. Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 71, n. 11, p. 4457 – 4461, 1974.

SHEETZ, M. P.; SINGER, S. J. On the mechanism of ATP-induced shape changes in human erythrocyte membranes. I. The role of the spectrin complex. The Journal of Cell Biology, USA, v.73, n.3, p.638-46, 1977

SHI, P. A.; NESS, P. M. Two-unit red cell apheresis and its potential advantages over traditional whole-blood donation. Transfusion; Philadelphia, v. 39, p. 218 – 225, 1999.

SHONAT, R. D.; JOHNSON, P. C. Oxygen tension gradients and heterogeneity in venous microcirculation: a phosphorescence quenching study. The American Journal of Physiology, Bethesda, v. 272, n. 5, s. 2, p. h2233 – h2240, 1997.

SOARES, B.M.D. Política Nacional de Hemoderivados – Desafios e Perspectivas. 2002. 90p. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

STIENE-MARTIN, E.A. et al; Clinical Hematology - Principles, Procedures, Correlations; New York, Lippincott Williams & Wilkins, p. 817, 1998.
The Journal of Cell Biology, New York, v. 73, p. 638 – 646, 1977.

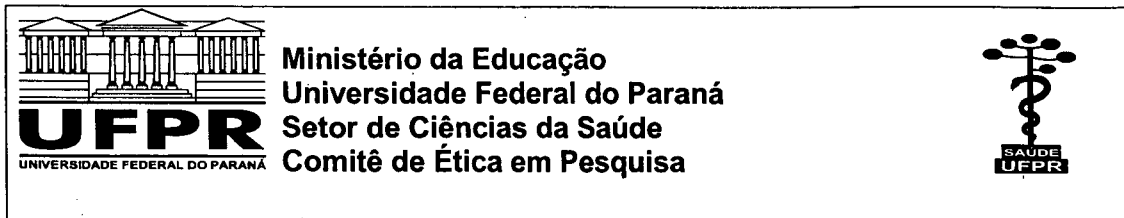
STRYER, L. Biochemistry. 4. ed. New York: W.H.Freeman and Company, 1995. p. 131 – 135.

TINMOUTH, A. et al. Clinical consequences of red cell storage in the critically ill. Transfusion, Philadelphia, v. 46, n. 2, p. 2014 – 2027, 2006.

TURNER, S.; WILLIAMS, A. R.; REES, J. M. The role of mean corpuscular haemoglobin concentration in limiting the storage life of human blood. Vox Sanguinis, Basel, v. 52, n. 3, p. 177 – 181, 1987.

WOLFE, L. C. The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. Tranfusion, v. 25, n. 3, p. 185 – 202, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Quality Systems for Blood Safety, 2002. disponível em: <http://www.who.int/bloodproducts/quality_safety/en/AM_quality_system.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2008.



Curitiba, 12 de dezembro de 2007.

Ilmo (a) Sr. (a)
Ana Carolina Ternes Quadrado Tomczak

Nesta

Prezado (a) Pesquisador (a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Estudos sobre o Controle de Qualidade de Unidades Transfusionais Eritrocitárias**”, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 12 de dezembro de 2007.

Registro **CEP/SD:456.136.07.12**

CAAE:0088.0.091.000-07

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 12/06/2008.

Atenciosamente

Prof. Dra. Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Prof. Dra. Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR