UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA

ADRIANA NASCIMENTO DE ARAUJO BUCHMANN

**Avaliação da qualidade dos concentrados de hemácias com
lipemia durante o armazenamento**

Ribeirão Preto
2018

ADRIANA NASCIMENTO DE ARAUJO BUCHMANN

**Avaliação da qualidade dos concentrados de hemácias com
lipemia durante o armazenamento**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Hemoterapia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado
de Saloma Rodrigues

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que
aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Hemocentro de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica

B919a

Buchmann, Adriana Nascimento de Araujo
Avaliação da qualidade dos concentrados de hemácias com
lipemia durante o armazenamento./ Adriana Nascimento de Araujo
Buchmann – Ribeirão Preto, 2018.
118f.; il. 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma
Rodrigues

1. Concentrados de Hemácias. 2. Lipemia. 3. Controle de
qualidade. 4. Lesão de armazenamento. 5. Hemólise.

CDU 615.38

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Buchmann, Adriana Nascimento de Araujo

Título: “Avaliação da qualidade dos concentrados de hemácias com lipemia durante o armazenamento”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção de título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 02/10/2018.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ivan de Lucena Ângulo

Instituição: Hemocentro de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Julgamento: Aprovada

Profª. Drª. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP)

Julgamento: Aprovada

Profª. Drª. Maria Suely Soares Leonart

Instituição: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da
Saúde, Departamento de Análises Clínicas (UFPR)

Julgamento: Aprovada

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais
Graça e Barnabel, ao meu marido
Jorge e à Nena.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força, inspiração e por ter colocado as pessoas certas em meu caminho.

Ao meu marido Jorge por sempre me apoiar e estar comigo em todas as decisões e à minha filha Helena, pela alegria que traz aos meus dias. Obrigado pelo amor e compreensão pelas minhas ausências. Amo vocês!

Aos meus pais Graça e Barnabel pelo sacrifício e apoio incondicional. Tudo o que sou devo a vocês!

Ao tio Jorjão por todo apoio e carinho.

À minha cunhada Sabrina e irmão Anderson pelo encorajamento através de palavras e exemplos de dedicação.

À Anália Breckenfeld Machado e todos colegas da Divisão de Produção do Hemepar, que contribuíram para a realização deste trabalho, seja na separação dos plasmas, troca de plantões ou palavras de encorajamento.

A Kátia Grilo pelo incentivo na realização deste Mestrado.

À Vivian Bertelli, Daniele Alves e Larissa Morato Luciani Richter pela amizade e ótimas dicas.

À Selma de Oliveira Pinto, Nicole Winter e Milton Augusto Túlio que em minha ausência mantiveram, com maestria, o laboratório de CQ de hemocomponentes funcionando.

À doutora Miriam Ribas Zambenedetti, que com sua doçura, compartilhou sua experiência para sanar minhas dúvidas na elaboração desta dissertação.

À minha co-orientadora, Maria Ângela Ottoboni, pelas valiosas ideias desde a origem até a conclusão da pesquisa.

Ao professor doutor Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues, pela valiosa orientação na pesquisa.

Ao professor doutor Railson Henneberg por abrir as portas do seu laboratório e por me orientar na validação das técnicas e avaliação dos resultados.

À doutora Priscila Bacarin Hermann por disponibilizar o seu tempo no treinamento de execução das técnicas de avaliação do stress oxidativo.

Às farmacêuticas Aline Hemer e Fernanda Bovo e à toda a equipe do laboratório escola da UFPR que contribuíram para realização dos testes.

À professora doutora Aline Borsato Hauser e às alunas do curso de farmácia da UFPR, Letícia Isabelli Accordi e Mariana Vital Silverio Boganha, por desenvolverem a pesquisa “Bolsas de plasma lipêmico: correlação entre o aspecto visual e a determinação quantitativa de triglicerídeos”.

Ao professor doutor Geraldo Pichet e à professora doutora Fabiane Rego por cederem seu laboratório para a dosagem das ERO.

À farmacêutica Claudia Dib e a todos os profissionais do laboratório de bioquímica do Hospital do trabalhador pela realização das análises nos sobrenadantes dos CH e plasmas lipêmicos.

A Raquel Botelho e Vinícius Moreno pela acolhida e prestatividade.

Aos amigos do “Quequel’s Crazy Team” pelo companheirismo em todos os momentos dessa jornada.

Ao Andryas Waurzenczak e ao Waldemar Volanski pela análise e assessoria estatística.

À Coordenação Geral do Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde e à equipe do Hemocentro de Ribeirão Preto por fornecerem as condições para este Mestrado acontecer, proporcionando melhorias aos serviços de hemoterapia.

Gratidão a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho!

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”. (Aristóteles)

RESUMO

Buchmann, Adriana Nascimento de Araujo. **AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS COM LIPEMIA DURANTE O ARMAZENAMENTO**. 2018. 114f. Dissertação (Mestrado em Hemoterapia e Medicina Transfusional) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O sangue total passa por processo de fracionamento por centrifugação para que o paciente possa receber apenas o componente sanguíneo do qual necessita. O controle de qualidade, inicia com inspeção visual, na qual são avaliados: coloração, lipemia, presença de coágulos e vazamentos. No Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Curitiba, Paraná, Brasil), a principal causa de descarte de plasma fresco (PF) é a lipemia. Os PF turvos são descartados e os respectivos concentrados de hemácias (CH) permanecem em estoque. Durante o armazenamento, os CH passam por processo de alterações bioquímicas e morfológicas conhecido como lesão de armazenamento, culminando com hemólise. Desta forma, é comprometida a função terapêutica e segurança transfusional. Alguns autores relatam a relação entre lipemia e hemólise. A lipemia confere aspecto turvo ao plasma, devido à presença de lipoproteínas e tem relação principalmente com a dieta do doador. O objetivo deste estudo foi comparar os parâmetros de qualidade dos CH que tiveram os plasmas descartados por lipemia (n=59) com os CH de plasmas límpidos (n=35). Os PF lipêmicos foram separados e foi realizado registro por fotografia e dosagem dos triglicerídeos. Conforme o grau de turbidez os plasmas foram classificados como: ligeiramente turvos, moderadamente turvos, intensamente turvos ou leitosos. Conforme a concentração de triglicerídeos foram classificados como normal (<175 mg/dl), limítrofe (175 a 199 mg/dl), elevado (200 a 499 mg/dl) ou muito elevado (>500 mg/dl). Os respectivos CH foram avaliados durante o período de validade, entre 1º e 10º; 11º e 22º; 23º e 34º; e 35º e 42º dias de armazenamento. Foram determinados: esterilidade, índices hematimétricos, Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), metemoglobina. Nos sobrenadantes dos CH foram determinados: Na⁺, K⁺, Cl⁻, lactato, glicose, pH e grau de hemólise. Os experimentos também foram realizados com controles, CH de plasmas límpidos dos mesmos dias de doação do grupo teste. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de Na⁺, K⁺, Cl⁻, lactato, glicose, pH e índices hematimétricos. Nas concentrações de ERO e TBARS não houve diferença estatisticamente significativa, mas percebeu-se tendência de valores mais altos nos CH de doações lipêmicas. Houve aumento da hemólise mais expressivo nos CH teste, demonstrando que a lipemia impacta negativamente na qualidade do CH durante o armazenamento. A partir dos resultados do estudo foram elaboradas estratégias para processamento, controle de qualidade, modificação e distribuição dos CH de doações com lipemia, garantindo a distribuição de hemocomponentes seguros e eficazes, minimizando descarte por hemólise e efeitos adversos à transfusão.

Palavras chaves: Concentrado de hemácias, Lipemia, Controle de qualidade, Lesão de Armazenamento, Hemólise.

ABSTRACT

Buchmann, Adriana Nascimento de Araujo. **ASSESSMENT OF THE QUALITY OF LIPEMIC RED BLOOD CELLS DURING STORAGE**. 2018. 114f. Dissertação (Mestrado em Hemoterapia e Medicina Transfusional) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The blood processing allows the recipient transfuses only the blood component that he needs. The quality control starts with visual inspection and the components are inspected for abnormal appearance like coloration, lipemia, clots and leaks. At center of Hematotherapy and Hematology of Paraná (Curitiba, Paraná, Brazil), the main loss of fresh plasma (FP) is caused by lipemia. The lipemic FP are discarded and the related red blood cell (RBC) can be used in transfusion. During storage, RBCs undergoes of biochemical and morphological changes known as storage lesion, culminating with hemolysis. Therapeutic function and transfusion safety are compromised. Some authors report the relationship between lipemia and hemolysis. Lipemia is the turbid aspect of plasma, due to the presence of lipoproteins, related to the diet of the donor. The objective of this study was to compare the quality parameters of the RBCs from lipemic donations (n=59) with RBC from clear donations (n=35). Lipemic FP were photographed and quantificated to triglycerides. According to the degree of turbidity the plasmas were classified as: slightly cloudy, moderately cloudy, intensely turbid or milky. Triglycerides concentrations were classified as normal (<175 mg / dl), borderline (175 to 199 mg / dl), high (200 to 499 mg / dl) or very high (> 500 mg / dl). The related RBCs were evaluated during the period of validity. The CH experiments were performed between 1st and 10th, 11st and 22nd, 23rd and 34th and 35th and 42nd days of storage. The following: sterility, hematimetric indexes, ROS, TBARS and methemoglobin were evaluated. In the supernatants Na⁺, K⁺, Cl⁻, lactate, glucose, pH and degree of hemolysis were evaluated. The experiments were also carried out with controls, RBC from clear donations of the same day of donation of the test group. There was no statistically significant difference in levels of Na⁺, K⁺, Cl⁻, lactate, glucose and pH; and hematimetric indexes. In the concentrations of ERO and TBARS, there was no statistically significant difference, but there was a tendency for higher values of lipemic RBC. The results showed an increased hemolysis in the lipemic RBC, demonstrating that lipemia negatively impacts the quality of RBC during storage. From the results of the study, were developed strategies for processing, quality control, modification and distribution of lipemic RBC to ensure the use of safe and effective blood product for transfusion.

Key words: Red blood cells, Lipemia, Quality control, Storage lesion, Hemolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Composição das soluções anticoagulantes, preservadoras/aditivas mais usadas	20
Figura 2 – Processamento do sangue no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná	21
Figura 3 – Temperatura de armazenamento e validade dos hemocomponentes	22
Figura 4 – A jornada do CH para transfusão	23
Figura 5 – Proteínas integrais e periféricas da membrana da hemácia	27
Figura 6 – Metabolismo da hemácia	28
Figura 7 – Curva de dissociação Hb-oxigênio	30
Figura 8 – Seleção e avaliação dos plasmas com lipemia	44
Figura 9 – Separação e estudo dos Concentrados de hemácias no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná	47
Figura 10 – Princípio do mecanismo de funcionamento da sonda 2,7 Diclorodihidrofluoresceína diacetato	49
Figura 11 – Técnica para padronização do controle interno ERO.....	50
Figura 12 – Resultados da padronização do controle das Espécies Reativas de Oxigênio	51
Figura 13 – Técnica da dosagem de metemoglobina pelo método de Naoum	55
Figura 14 - Inspeção visual x concentração de triglicerídeos nos plasmas lipêmicos	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Índice de hemólise observado com aumento da concentração de lipídeos totais	36
Tabela 2 – Diluição da amostra para dosagem de Hb livre	59
Tabela 3 – Resultados de medianas das ERO em fluorescência/g Hb	71
Tabela 4 – Resultados de medianas das TBARS em nmol/g Hb	72
Tabela 5 – Resultados de medianas da metemoglobina em%	73
Tabela 6 – Resultados mediana pH	75
Tabela 7 – Resultados mediana Na ⁺ mmol/l.....	76
Tabela 8 – Resultados mediana K ⁺ mmol/l.....	77
Tabela 9 – Resultados mediana Cl ⁻ mmol/l.....	78
Tabela 10 – Resultados mediana Glicose mg/dl	79
Tabela 11 – Resultados mediana Lactato mmol/l.....	80
Tabela 12 – Resultados mediana HT	82
Tabela 13 – Resultados mediana VCM	85
Tabela 14 – Resultados mediana HCM pg.....	87
Tabela 15 – Resultados mediana CHCM g/dl	87
Tabela 16 – Resultados mediana RDW CV %	89
Tabela 17 – Resultados mediana Hb livre g/dl	91
Tabela 18 – Resultados mediana Grau de hemólise %	92

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Percentual de descarte por hemocomponente em 2017 no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná	24
Gráfico 2 – Causas de descarte de PFC extrínsecas ao processamento em 2017 no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná.....	25
Gráfico 3 – Causas de descarte de PFC intrínsecas ao processamento em 2017 no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná.....	25
Gráfico 4 – Perfil de resultados ERO Fluorescência/g Hb nos concentrados de hemácias	69
Gráfico 5 – Histograma ERO Fluorescência/g Hb após transformação	70
Gráfico 6 – Resultados Espécies Reativas de Oxigênio nos concentrados de hemácias	70
Gráfico 7 – Resultados das TBARS	71
Gráfico 8 – Perfil dos resultados de Metemoglobina	72
Gráfico 9 – Resultados Metemoglobina	73
Gráfico 10 – Perfil de resultados pH.....	74
Gráfico 11 – Resultados pH	75
Gráfico 12 – Resultados Na+	76
Gráfico 13 – Resultados K+	77
Gráfico 14 – Resultados Cl-	78
Gráfico 15 – Resultados Glicose	79
Gráfico 16 – Resultados Lactato	80
Gráfico 17 – Resultados HT	81
Gráfico 18 – Desvio padrão do HT	82
Gráfico 19 – Resultados Hb	83
Gráfico 20 – Desvio padrão da Hb	83
Gráfico 21 – Resultados mediana Hb.....	84
Gráfico 22 – Resultados VCM	84
Gráfico 23 – Desvio padrão do VCM.....	85
Gráfico 24 – Resultados HCM.....	86
Gráfico 25 – Desvio padrão da HCM pg.....	86
Gráfico 26 – Perfil de resultados RDW.....	88

Gráfico 27 – Resultados RDW	88
Gráfico 28 - Resultados Curva de fragilidade osmótica	89
Gráfico 29 – Perfil de Resultados Hb Livre	90
Gráfico 30 - Resultados Hb livre g/dl	91
Gráfico 31 – Perfil dos resultados de hemólise	92
Gráfico 32 – Resultados hemólise.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3-DPG	2,3-Difosfoglicerato
AABB	American Association of Blood Banks
ATP	Adenosina Trifosfato
CH	Concentrado de hemácias
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CPD	Citrato-fosfato-dextrose
CPDA-1	Citrato-fosfato-dextrose-adenina
DCFH	2,7-diclorodihidrofluoresceína (reduzida)
DCFH-DA	2,7 – diclorodihidrofluoresceína diacetato
dl	Decilitro
DP	Desvio padrão
ERO	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramas
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GSSG	Glutathiona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
Hb L	Hemoglobina livre
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
HT	Hematócrito
L	Litro
LS	Líquido sobrenadante
Meta-Hb	metemoglobina
Mg	Miligramas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nm	Nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
PRP	Plasma rico em plaquetas

RDW	Amplitude de distribuição das hemácias
SAGM	Salina-adenina-glicose-manitol
SF	Solução fisiológica
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<i>t</i> -BHP	<i>terc</i> -butilhidroperóxido
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Produção de hemocomponentes	20
1.2 Controle de qualidade de hemocomponentes	23
1.3 Dados da hemorrede do Paraná	24
1.4 Membrana da hemácia.....	26
1.5 Metabolismo da hemácia	27
1.6 Lesão de armazenamento.....	31
1.7 Lipemia.....	35
1.8 Lipemia e hemólise	36
1.9 Transfusão de CH com tempo longo de armazenamento	38
1.10 Transfusão de hemocomponentes lipêmicos	39
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Delimitação	43
4.2 Casuística	43
4.3 Seleção e avaliação dos plasmas com lipemia	44
4.4 Dosagem de triglicerídeos.....	45
4.5 Separação e estudo dos CH	45
4.6 Avaliação microbiológica.....	48
4.7 Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	48
4.7.1 Princípio	48
4.7.2 Padronização do controle interno.....	49

4.7.3 Determinação das ERO nas amostras de CH.....	51
4.8 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	51
4.8.1 Princípio	51
4.8.2 Controle interno	52
4.8.3 Determinação das TBARS nas amostras de CH.....	52
4.9 Dosagem de metemoglobina	53
4.9.1 Princípio	53
4.9.2 Controle interno	53
4.9.3 Dosagem de metemoglobina nas amostras de CH.....	54
4.10 Determinações de pH, Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻	55
4.11 Glicose e lactato.....	56
4.12 Índices hematimétricos.....	56
4.13 Curva de fragilidade osmótica	58
4.14 Hemólise	59
4.14.1 Determinação da hemoglobina livre	59
4.14.2 Preparação da amostra.....	59
4.14.3 Leitura em espectrofotômetro	60
4.14.4 Controle da técnica	60
4.14.5 Cálculo da Hb livre	60
4.14.6 Cálculo do grau de hemólise.....	61
4.15 Dados da doação e processamento.....	61
4.16 Análise de resultados	61
5 RESULTADOS	63
5.1 Imagens dos plasmas lipêmicos e dosagens de triglicerídeos.....	63
5.2 Avaliação microbiológica	69
5.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	69
5.4 TBARS	71

5.5 Metemoglobina.....	72
5.6 pH.....	74
5.7 Na ⁺	75
5.8 K ⁺	76
5.9 Cl ⁻	78
5.10 Glicose	79
5.11 Lactato	80
5.12 Índices hematimétricos.....	81
5.12.1 HT%	81
5.12.2 Hb g/dl.....	82
5.12.3VCM fl	84
5.12.4 HCM pg.....	85
5.12.5 CHCM	87
5.13 Curva de fragilidade osmótica.....	89
5.14 Hemólise	90
5.14.1 Hb livre	90
5.14.2 Grau de hemólise.....	91
6 DISCUSSÃO	94
6.1 Inspeção visual e dosagem de triglicerídeos.....	94
6.2 Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	95
6.3 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	97
6.4 Metemoglobina.....	97
6.5 Glicose, pH e lactato	98
6.6 Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻	99
6.7 Índices hematimétricos.....	99
6.8 Curva de fragilidade osmótica.....	100
6.9 Hemólise e Hb livre	101

6.10 Características que interferem na qualidade dos hemocomponentes.	103
7 CONCLUSÃO.....	105
8 PERSPECTIVAS.....	107
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICE.....	113
Comitê de ética	114
Guia para inspeção visual de lipemia em PFC.....	116

1 INTRODUÇÃO

Atualmente as técnicas de processamento do sangue permitem que o paciente receba apenas os componentes sanguíneos dos quais necessita com a preservação de suas características terapêuticas e em menor volume, minimizando os riscos inerentes à terapêutica transfusional. (BRASIL, 2015)

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a utilização do sangue é mais efetiva se os componentes forem obtidos do fracionamento da bolsa de sangue total ou a partir de coleta por aférese. Com uma única doação podem ser obtidos mais de um componente, atendendo mais de um paciente, somente com o componente que cada um necessita. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018)

Os hemocomponentes são produtos de processos físicos a que foram submetidas as unidades de sangue total. Pela complexidade dos processos envolvidos e regulamentações a que estão sujeitos, o processamento do sangue pode ser considerado atividade fabril. (COVAS; UBIALI; SANTIS; 2014)

O controle de qualidade é uma etapa fundamental na produção dos hemocomponentes e inicial com a inspeção visual. Uma das principais causas de descarte de plasma é a turbidez causada por lipemia. Os plasmas com aspecto turvo são descartados e os respectivos concentrados de hemácias (CH) são mantidos em estoque e liberados com os mesmos critérios utilizados para os CH de doações não lipêmicas.

A principal causa de lipemia é a presença de lipoproteínas, em geral devido à dieta rica em gordura antes da doação.

Alguns estudos associam lipemia à hemólise, última etapa da lesão de armazenamento do CH.

A proposta deste trabalho é avaliar o impacto da lipemia na qualidade dos concentrados de hemácias e definir estratégias para liberação de hemocomponentes mais seguros e eficazes.

1.1 Produção de hemocomponentes

Após a triagem clínica, o doador é encaminhado à coleta, onde o sangue total (ST) é coletado em conjunto de bolsas plásticas duplas, triplas ou quádruplas estéreis ligadas por tubos de conexão. A bolsa de coleta de sangue possui solução anticoagulante e preservante para manutenção da viabilidade dos componentes sanguíneos. Uma das bolsas pode conter solução aditiva para aumentar o tempo de sobrevivência das hemácias. (BRASIL, 2013)

Figura 1 – Composição das soluções anticoagulantes, preservadoras/aditivas mais usadas

SOLUÇÕES	COMPONENTES	VALIDADE DO SANGUE TOTAL E CONCENTRADO DE HEMÁCIAS
CPDA-1	Citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose, adenina	35 dias
CPD + SAG-M	Citrato de sódio, fosfato, dextrose, manitol	42 dias

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2013.

Nota: os componentes têm função anticoagulantes e preservadora. A solução aditiva SAG-M, aumenta a viabilidade das hemácias, aumentando a validade do hemocomponente.

As soluções mais utilizadas são CPDA₁ e CPD + solução aditiva. (Figura 1). Cada componente tem uma função, sendo o ácido cítrico responsável pela diminuição do pH, a dextrose e a adenina como fontes de ATP, o citrato como anticoagulante, o fosfato para manutenção do pH e o manitol para conservação da membrana da hemácia. Os preservantes e anticoagulante são importantes para manutenção da viabilidade dos componentes sanguíneos e a solução aditiva aumenta o tempo de sobrevivência das hemácias. (BRASIL, 2013)

A bolsa de ST passa por processos físicos para fracionamento dos hemocomponentes. As diferenças de tamanho e densidade permitem que o sangue seja separado por centrifugação. (REDE DE SERVIÇOS TECNOLÓGICOS PARA SANGUE E HEMODERIVADOS, 2011)

A partir de uma doação de sangue total são obtidos até quatro hemocomponentes primários: concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas, plasma isento de crio e crioprecipitado. (Figura 2)

Figura 2 – Processamento do sangue no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Paraná, Brasil)

Fonte: adaptado de BRASIL, 2015.

Nota: ST (sangue total), CPD (citrato de sódio, fosfato e dextrose), PRP (plasma rico em plaquetas), CH (concentrado de hemácias), SAG-manitol (salina, adenina, glicose e manitol), CP (concentrado de plaquetas), PF (plasma fresco), PF24 (plasma fresco congelado em 24 horas), PFC (plasma fresco congelado), CRIO (crioprecipitado), PIC (plasma isento de crioprecipitado).

A cada etapa do processo é realizada inspeção visual dos hemocomponentes produzidos. Na inspeção são avaliados: coloração, lipemia, presença de coágulos e vazamento. Os critérios de aceitação deverão ser definidos pelo serviço de hemoterapia. (REDE DE SERVIÇOS TECNOLÓGICOS PARA SANGUE E HEMODERIVADOS, 2011)

A lipemia é um dos principais motivos de descarte de plasma de origem não infecciosa. (FRENES et al., 2014)

O *Visual Assessment Guide* (CANADIAN BLOOD SERVICES, 2016) afirma que os hemocomponentes lipêmicos são aceitáveis para transfusão, enquanto o *Visual Inspection Reference Guide* (AMERICAN RED CROSS, 2006)

que a lipemia não afeta diretamente a segurança dos hemocomponentes, mas pode interferir nos testes de triagem sorológica. Nos Estados Unidos é realizada a dosagem de triglicerídeos dos plasmas extremamente turvos. Só são descartados os plasmas com níveis de triglicerídeos acima da linha de corte preconizada pelos fabricantes dos kits de triagem para doenças infecciosas. (PEFFER et al., 2011)

Após a sua obtenção, os hemocomponentes, são armazenados sob condições específicas de temperatura para manutenção de suas características biológicas e terapêuticas até o final do armazenamento. (Figura 3).

Figura 3 – Temperatura de armazenamento e validade dos hemocomponentes

Hemocomponente	Temperatura	Validade
Concentrado de hemácias CPDA ₁	4 ± 2 °C	35 dias
Concentrado de hemácias SAG Manitol	4 ± 2 °C	42 dias
Plasma fresco congelado (PFC)	Inferior a -20°C	12 meses
	Inferior a -30°C	24 meses
Concentrado de plaquetas (CP)	22 ± 2 °C	3 a 5 dias
Crioprecipitado	Inferior a -20°C	12 meses
	Inferior a -30°C	24 meses

Fonte: A autora, adaptado de BRASIL, 2017.

As câmaras para conservação do sangue e hemocomponentes devem ser específicas para essa finalidade e de uso exclusivo. Devem possuir sistema de ventilação para circulação de ar e manutenção de temperatura uniforme em todos os compartimentos. Cada hemocomponente possui temperatura específica de armazenamento e transporte, a fim de manter suas características terapêuticas. A temperatura deverá ser controlada e monitorada pelo serviço de hemoterapia e deve haver um plano de contingência caso falte energia elétrica ou os equipamentos apresentem defeitos. (BRASIL, 2017)

Ainda que estejam em condições adequadas de armazenamento, as mesmas não são fisiológicas. Durante o período de armazenamento surgem alterações metabólicas e estresse oxidativo, quando a capacidade antioxidante é vencida pela oxidação. Essas alterações impactam negativamente na qualidade do hemocomponente, comprometendo a eficácia da transfusão e podendo causar efeitos adversos. (Figura 4)

Figura 4 – A jornada do CH para transfusão. As características do CH são dependentes das características do doador e do processo produtivo

Fonte: Adaptado de BARDYN; TISSOT; PRUDENT, 2017)

Nota: As características do CH são dependentes das características do doador e do processo produtivo. Durante o armazenamento, sofre o processo de lesão de armazenamento. Pode haver impacto na recuperação e função das mesmas com efeitos adversos ao paciente.

1.2 Controle de qualidade de hemocomponentes

O gerenciamento da qualidade é fundamental para garantir as boas práticas de fabricação, muito importantes para a segurança e eficácia do sangue. Nas normas regulamentadoras estão explícitos os requisitos mínimos de qualidade a serem atingidos, mas podem ser adotados critérios internos mais restritivos. Com análise crítica dos resultados do controle de qualidade (CQ) podem ser detectados desvios nos processos já validados, o que permite uma proatividade na identificação de problemas e implementação de melhorias para solucionar os mesmos. (AABB, 2014)

A Portaria de consolidação nº 5/2017 preconiza a realização do CQ em no mínimo 1% ou 10 (dez) unidades, o que for maior, de todos os hemocomponentes produzidos. Nos CH são avaliados: hematócrito (HT%), concentração de hemoglobina, grau de hemólise e controle microbiológico. O percentual mínimo de conformidade preconizado é de 75% para todos os parâmetros, com exceção do controle microbiológico, que deve ser igual a 100%.

O CQ inicia na inspeção visual dos hemocomponentes produzidos e a amostragem deve ser representativa de todo o período de armazenamento. O objetivo do controle das condições de armazenamento das hemácias é manter

a sua função e viabilidade e evitar a hemólise. Pela Portaria de consolidação nº 5/2017, o limite aceitável para grau de hemólise é de no máximo 0,8% no último dia de armazenamento.

Uma boa viabilidade requer a presença de no mínimo 75% das células transfundidas 24 h após a transfusão. (HOGMAN; MERYMAN, 1999).

Dos plasmas frescos congelados (PFC) produzidos, são avaliados: volume, fator VIII e células residuais.

1.3 Dados da hemorrede do Paraná

A Hemorrede do Estado do Paraná é composta por 1 Hemocentro Coordenador, 4 Hemocentros Regionais, 8 Hemonúcleos e 9 Unidades de Coleta e Transfusão. No total são 15 unidades fracionadoras.

Em 2017 o Hemocentro Coordenador recebeu 33918 doações, com um total de 89778 hemocomponentes produzidos. Foram descartados 22673 hemocomponentes, que correspondem a 25,3% da produção.

O hemocomponente com maior índice de descarte é o PFC (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Percentual de descarte por hemocomponente em 2017 no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Paraná, Brasil)

Fonte: a autora, adaptado de Plano de Ação de Indicadores do HEMEPAR.

O maior percentual de descarte se deve a causas extrínsecas ao processo (83,4%). Das causas extrínsecas, o maior percentual é de bolsas com lipemia (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Causas de descarte de PFC extrínsecas ao processamento em 2017 no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Paraná, Brasil)

Fonte: a autora, adaptado de Plano de Ação de Indicadores HEMEPAR

Nota: PAI (pesquisa de anticorpo irregular), ST (sangue total), sorologia reagente (testes de triagem para doenças infecciosas: teste do ácido nucleico para HIV e HCV, HBsAg, anti-HBc, anti-HTLV I/II, sífilis e doença de Chagas).

Apenas 16,6% das causas de descarte são inerentes ao processamento, sendo a contaminação por hemácias a de maior frequência (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Causas de descarte de PFC intrínsecas ao processamento em 2017 no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Paraná, Brasil)

Fonte: a autora, adaptado de Plano de Ação de Indicadores HEMEPAR

Após a inspeção visual, os plasmas classificados como lipêmicos são descartados e os respectivos concentrados de hemácias permanecem em estoque com a mesma validade dos hemocomponentes produzidos a partir de doações sem lipemia.

1.4 Membrana da hemácia

A membrana da hemácia é relativamente simples. Não possui organelas, a membrana é única e todo o seu conteúdo é liberado pela hemólise osmótica. (STRYER, 1992). Como qualquer membrana plasmática tem como função mediar o transporte de substâncias e oferecer resistência e deformabilidade à hemácia. (MURADOR; DEFFUNE, 2007)

A composição bioquímica de 52% de proteínas, 40% de lipídeos e 8% de carboidratos permite que as hemácias sejam permeáveis, flexíveis e deformáveis, durante o seu tempo de vida. A membrana da hemácia é formada por camada dupla de fosfolipídios, apoiada no citoesqueleto de proteínas. A camada de fosfolipídios é atravessada até o lado citoplasmático pelas proteínas ditas integrais. (HARMENING, 1992)

Das proteínas integrais a banda 3 é a mais abundante e faz a mediação do transporte de íons HCO_3^- e Cl^- através da membrana plasmática. A segunda proteína integral mais abundante é a sialoglicoproteína glicoforina A (GPA), responsável por formar uma rede de cargas negativas na superfície da membrana, impedindo a agregação. O citoesqueleto é formado pelas proteínas periféricas. A glicoforina C (GPC) é o receptor para *PfEBP-2* (baebl, EBA-140), local de ligação para o *Plasmodium falciparum*. Sob a camada de fosfolipídios, fica o citoesqueleto, fundamental para estabilidade da membrana sob estresse. É formado pelas proteínas periféricas – espectrina, actina e 4.1 R. (Figura 5) (MURADOR; DEFFUNE, 2007)

Figura 5 – Proteínas integrais e periféricas da membrana da hemácia

Fonte: Murador, 2007.

1.5 Metabolismo da hemácia

É uma célula altamente especializada, mas por ser anucleada é incapaz de realizar a síntese proteica. A quantidade de enzimas e proteínas não é aumentada durante o seu curto tempo de vida. (HÖGMAN; MERYMAN, 1999)

Figura 6 – Metabolismo da hemácia

Fonte: Harmening, adaptado de Hilmann, 1992

Nota: HK (hexoquinase), GPI (glicose-6-fosfato-isomerase), PFK (fosfofrutoquinase), A (aldolase), TPI (triose fosfato isomerase), GAPD (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), PGM (fosfoglicerato mutase), E (enolase), PK (piruvato cinase), LDH (desidrogenase láctica), DPGM (difosfogliceromutase), DPGP (difosfoglicerato fosfatase), G6PD (glicose-6-fosfato-desidrogenase), 6PGD (6-fosfogliconato desidrogenase), GR (glutaciona redutase), GP (glutaciona peroxidase), DHAP (diidroxiacetona-P), PGK (fosfoglicerato cinase) e R (NADH-metemoglobina redutase).

Pela ausência de mitocôndrias, a hemácia madura é incapaz de utilizar a fosforilação oxidativa para geração de ATP. 90% da produção de ATP dá-se pela via de Embden-Meyerhof ou glicolítica (Figura 6) e apenas 10% do ATP é obtido pela via da pentose fosfato, do fosfogliconato ou da hexose monofosfato. (CHEN; DEVINE; SERRANO, 2015)

Na glicólise anaeróbica, uma molécula de glicose é quebrada em duas moléculas de ácido láctico. São geradas duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH reduzido (nicotinamida adenina dinucleotídeo). (HESS, 2010)

A via oxidativa de *Lueberig-Rapaport* compete com a via glicolítica pelo substrato 1,3-PG. Permite o acúmulo de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), responsável por controlar a afinidade da Hb pelo oxigênio. A via da metemoglobina redutase é responsável por manter o ferro heme da hemoglobina em seu estado funcional ferroso. Na ausência dessa enzima e do NAD, acumula metemoglobina, sem capacidade para transportar oxigênio.(HARMENING, 1992)

Para a hemácia faz-se necessário um arsenal metabólico antioxidante pois a sua principal função, transportar oxigênio, a expõe a espécies reativas de oxigênio (ERO). (BARDYN; TISSOT; PRUDENT, 2017).

Os metais livres também são fontes de espécies reativas.(VASCONCELOS et al., 2007)

Esse arsenal é responsável por evitar a desnaturação da célula, uma vez que impede a peroxidação de lipídeos da membrana, proteínas e enzimas. (HOGMAN; MERYMAN, 1999; SILVA et al., 2013).

A proteção antioxidante das hemácias dá-se pela via das pentoses ou do fosfogliconato. Ocorre consumo da glicose, mas nenhum ATP é produzido ou consumido. (HERMANN, 2015). Essa via é regulada pela quantidade de NADP produto da oxidação do NADPH, sendo o substrato para a conversão da glutathiona oxidada (GSSG) para glutathiona reduzida (GSH). A glutathiona (GSH) é o principal antioxidante intracelular, atuando como cofator da GSH peroxidase na degradação dos radicais livres. Também atua na regeneração de antioxidantes, como a vitamina C e a E. A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (HENNEBERG, 2013)

Também são antioxidantes: tocoferóis, ácido úrico, β -caroteno e proteínas transportadoras de metais como a transferrina e a ceruloplasmina. (VASCONCELOS et al., 2007)

Segundo Harmening (1992) a hemoglobina é formada por 4 cadeias e sua função é de transportar oxigênio para os tecidos e excretar gás carbônico. Na liberação do oxigênio ocorre alargamento do espaço entre as cadeias beta da molécula de Hb a ligação de 2,3-DPG, com formação de ponte de sais iônicos entre as cadeias. Essa conformação é conhecida como forma T (tensa), com menor afinidade. Quando a Hb carrega oxigênio e se torna oxihemoglobina, as

pontes de sais são quebradas e as cadeias beta são reunidas, expulsando o 2,3-DPG. Essa forma é a relaxada, que tem alta afinidade pelo oxigênio.

Hogman e Meryman (1999) também afirmam que, por haver competição entre 2,3-DPG e oxigênio pelo mesmo sítio de ligação na molécula de Hb, um aumento da concentração do mesmo faz como que diminua a afinidade da Hb pelo oxigênio.

Figura 7 – Curva de dissociação Hb-oxigênio

Fonte: Adaptado de Harmening, 1992.

A curva de dissociação e ligação de oxigênio pela Hb tem formato sigmoide. Isso representa que não é necessária grande queda na tensão de oxigênio para que quantidade considerável de oxigênio seja liberada. (Figura 7). Nos pulmões, onde a tensão de O_2 é quase 100 mmHg, a saturação da Hb é quase 100%. Nos tecidos, onde essa pressão é de aproximadamente 40 mmHg, a saturação cai para 75% e 25% de oxigênio. Na hipóxia, *in vivo*, níveis aumentados de 2,3 DPG promovem diminuição da afinidade da Hb pelo oxigênio. A curva sofre desvio à direita, aumentando o aporte de O_2 para os tecidos. O aumento da afinidade da Hb pelo oxigênio ocasiona desvio à esquerda, com apenas 12% de oxigênio liberado. Isso ocorre na alcalose; em casos de quantidade aumentada de Hb anormais, como metemoglobina, carboxihemoglobina e Hb F; e em transfusões múltiplas, utilizando-se CH com quantidades baixas de 2,3-DPG.(HARMENING, 1992)

A permeabilidade da membrana e o transporte ativo de cátions controlam o volume, impedindo a hemólise. As bombas catiônicas, dependentes de ATP, transportam Na^+ para o exterior e K^+ para o interior da hemácia e o volume celular é mantido constante. O Ca^{2+} também é bombeado do interior da célula através

das bombas de cálcio-ATPase dependentes de energia. A membrana também é permeável a água e ânions Cl^- e HCO_3^- . (HARMENING, 1992)

1.6 Lesão de armazenamento

O armazenamento a 4°C reduz o metabolismo e dificulta o crescimento microbiano, mas mesmo assim ocorrem consumo dos nutrientes e acúmulo de metabólitos. (D'ALESSANDRO et al., 2015)

Como não há mecanismo de retirada de células não viáveis, como ocorre *in vivo*, a bolsa de CH armazenada possui as células em diferentes condições: saudáveis, velhas e restos celulares. O conjunto de alterações ocorre em três níveis: metabolismo energético, óxido-redutor e de membrana celular, resultado em alterações morfológicas, estruturais e funcionais.(ANTONELOU; SEGHAATCHIAN, 2016).

Grimes (1980) afirma que as alterações sofridas pelas hemácias refrigeradas *in vitro* são bem diferentes das que ocorrem durante o envelhecimento *in vivo* em temperatura de 37°C. A concentração de ATP *in vivo* tem uma leve queda, enquanto *in vitro* podem ser encontrados níveis próximos a zero, em armazenamento por tempo prolongado. Baixas temperaturas comprometem o transporte ativo dos íons através da bomba de cátions, apesar de preservarem as células pela manutenção do metabolismo mais lento.

Durante as duas primeiras semanas de armazenamento, a produção de energia é mantida, sem grandes diferenças bioquímicas e estruturais. Após esse período, há consumo significativo de todas as espécies metabólicas, principalmente da fase oxidativa da via das pentoses. A concentração de GSSG (glutathiona oxidada) aumenta constantemente e os níveis de GSH (glutathiona reduzida) diminuem até caírem pela metade no 42º dia de armazenamento. A quantidade de ATP cai, evidenciando que sua produção é ineficiente. (D'ALESSANDRO et al., 2012)

Durante o armazenamento além da depleção do ATP ocorre a depleção de 2,3-DPG para a produção de energia. (D'ALESSANDRO et al., 2015)

A diminuição do ATP correlaciona-se com a redução do metabolismo e redução da sobrevivência das células após a transfusão. A depleção de 2,3 DPG é mais evidente, se comparada à depleção de ATP. Com níveis reduzidos daquele, aumenta a afinidade da Hb pelo oxigênio.(GRIMES, 1980)

Baixos níveis de 2,3-DPG promovem um desvio à esquerda na curva de dissociação de oxigênio, aumentando a saturação e afinidade de Hb pelo oxigênio. Com isso é necessário maior grau de hipóxia para liberação do mesmo. No momento da transfusão os níveis podem ser baixos mas em 24 h, retornam aos níveis fisiológicos, não sendo um problema para os receptores que precisem de restauração aguda.(CHEN; DEVINE; SERRANO, 2015)

Os efeitos fisiopatológicos da transfusão de hemácias com baixo nível de 2,3 DPG, e afinidade aumentada pelo O₂, incluem aumento do débito cardíaco, diminuição na PO₂ venosa, ou combinação destes. (HARMENING, 1992)

D'Alessandro et al. (2015) afirmam que pela depleção de ATP o funcionamento da bomba de cátions é comprometido e o gradiente de Na⁺ e K⁺ é alterado. A entrada de Na⁺ é mais intensa do que a saída de K⁺, ocorrendo aumento do volume celular. Além do acúmulo de K⁺ no sobrenadante, aumenta o Ca²⁺ intracelular e conseqüentemente, abertura do canal de K⁺ dependente de Ca²⁺. Acarreta em ativação de proteases e redução da GSH (glutathiona)

Segundo Grimes(1980), os níveis de K⁺ extracelulares podem ser 5 a 10 vezes maiores que os encontrados no início do armazenamento, devido à difusão passiva e à hemólise. O balanço eletrolítico é preservado pela entrada em Cl⁻ na célula.

O desbalanceamento da concentração e depósito de Ca²⁺ na membrana das hemácias com maior tempo de armazenamento, aumenta sua rigidez e diminui a sua deformabilidade. (GREER; FOERSTER; RODGERS, 2013).

Nos CH armazenados, cujo hematócrito (HT) apresenta valores superiores aos encontrados no ST, podendo estar entre 50 e 80%, o volume de líquido disponível para diluir e neutralizar o ácido láctico produzido é limitado. Dependendo do meio celular, temperatura, solução preservadora e taxa de metabolismo, poderá ocorrer rápido aumento de lactato, CO₂ e redução no pH. O aumento da pCO₂ se deve à formação do CO₂- no *shunt* das pentoses e

principalmente à função parcial de neutralização do ácido láctico produzido, realizada pelo HCO_3^- . Caso as bolsas de sangue sejam altamente permeáveis a gases, o CO_2 pode ser liberado e é equilibrada a diminuição do pH. Vários processos celulares que dependem de energia são mantidos graças à defosforilação do ATP. A refosforilação é possível através da metabolização de glicose a ácido láctico.(HÖGMAN; MERYMAN, 1999)

A maioria dos receptores têm condições de compensar essa alteração, mas em transfusões maciças essa capacidade pode ser comprometida e gerar desequilíbrio ácido-base.(CHEN, DEVINE, SERRANO, 2015)

A acidose gerada na glicólise anaeróbica causa inibição de duas enzimas ativadoras da cadeia glicolítica, a hexoquinase e a fosfofrutoquinase e então menos moléculas de ATP e NADH são geradas. Com inibição da hexoquinase, menos glicose-fosfato está disponível para a via da hexose-monofosfato, conseqüentemente, as concentrações de NADPH e GSH não se mantêm. (HESS, 2010)

Com a diminuição da reserva de GSH, é diminuída a capacidade antioxidante, sendo superada pela formação de radicais livres. (CHEN; DEVINE; SERRANO, 2015)

Os níveis de radicais livres sofrem interferência da quantidade de leucócitos do hemocomponente. (RACEK et al., 2001).

Ocorre acúmulo das ERO e outros marcadores de oxidação (carbonilação) das proteínas e acúmulo de malondialdeído. Os níveis de ERO alcançam *plateau* em 21 dias. O aumento do malondialdeído é progressivo até o final do armazenamento, demonstrando acúmulo de lipídeos oxidados. Ocorrem alterações importantes nas proteínas, como fragmentação de-espectrina, banda 3 e banda 4.1, sendo mais precoces nos hemocomponentes não leucorreduzidos. (D'ALESSANDRO et al., 2012).

Durante o armazenamento, as hemácias apresentam progressiva alteração morfológica. A forma original discóide passa por equinócitos ou estomatócitos e chega a formas esféricas e degenerativas, os esferócitos, devido à perda da membrana na forma de microvesículas. As formas de equinócitos e estomatócitos representa a compensação de perda da membrana e são reversíveis. Os esferoquinócitos e esferócitos são formas irreversíveis, tendo baixa sobrevida após a transfusão. (ANTONELOU et al., 2012)

Leonart et al. (1997) demonstraram forte correlação entre o percentual de discócitos e a concentração de ATP.

Há direta ligação entre a quantidade de ATP da hemácia e sua sobrevivência após a transfusão. (BANGHAM; HORNE, 1962)

A forma de disco bicôncavo possui superfície que garante eficaz troca gasosa e deformabilidade para atravessar os capilares. As formas alteradas possuem menor superfície, perda de deformabilidade e são retiradas precocemente da circulação. (CHEN; DEVINE; SERRANO, 2015)

Segundo D'Alessandro et al. (2012), em tempo longo de armazenamento é observado aumento da fragilidade osmótica das hemácias devido à diminuição da relação superfície/volume, como ocorre na esferocitose hereditária. A partir do 21º dia de armazenamento, em temperatura de 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), a microscopia eletrônica mostra alterações em 50% das células. Através de estudos de proteômica da membrana, esses achados correlacionam-se com o início da vesiculação.

As lesões sofridas durante o armazenamento estão associadas a alterações reológicas, aumento da viscosidade e redução do fluxo nos sistemas capilares. As vesículas liberadas dos esferócitos contêm produtos da oxidação, mediadores de sinalização de morte e fosfatidilserina. A composição das mesmas promove características pró-inflamatórias e pró-trombóticas, aumentando o risco de reações transfusionais. A suscetibilidade à vesiculação foi associada a dano das proteínas do citoesqueleto. (ANTONELOU et al., 2012)

A integridade das hemácias é negativamente influenciada pela lesão de armazenamento. Modulação metabólica, alterações morfológicas, propriedades reológicas e danos oxidativos contribuem para progressiva degradação, resultando em hemólise. Essa é a última etapa da lesão de armazenamento, a célula não é mais viável, ou seja, não apresenta mais as funções terapêuticas. A Hb livre é indutora de estresse oxidativo, que contribui para aumentar ainda mais a lesão de armazenamento. (D. CHEN. K. SERRANO, 2015)

1.7 Lipemia

Lipemia apresenta turbidez detectável no plasma devido à concentração de lipoproteínas e estas diferem quanto ao tipo e tamanho. Os quilomícrons são as maiores e com maior potencial de apresentar turbidez. (NIKOLAC, 2014)

Segundo Peffer et al. (2011), o aspecto turvo pode estar presente no plasma de doadores com dislipidemias familiares, mas é mais comumente encontrado em doadores saudáveis após dieta rica em gordura antes da doação.

A concentração plasmática de triglicerídeos sofre interferência da ingestão de gordura, ao contrário do colesterol total e HDL, entretanto alguns plasmas têm aparência turva e concentração de triglicerídeos normal (3,4%). Isso pode ocorrer pela subjetividade na avaliação da lipemia ou por turbidez devido a outras causas. (PEFFER et al., 2011)

A concentração dos triglicerídeos plasmáticos aumentada proveniente da dieta é mais prolongada em homens do que em mulheres. Em estudo, homens e mulheres ingeriram a mesma quantidade de gordura e foram medidas as concentrações de quilomicrons, VLDL e triglicerídeos. Houve disponibilidade prolongada do lípideo em quilomicrons no sexo masculino, sem haver diferença na incorporação hepática dos lipídeos ingeridos em VLDL. (HOROWITZ, 2006).

Devido à sua natureza hidrófoba, os lipídeos precisam ser transportados para exercer sua ação no organismo. São transportados na forma de micelas compostas por camada externa polar de proteína e lipídeos polares, e interna de lipídeos neutros, como o colesterol esterificado e os triglicerídeos. As lipoproteínas são divididas em classes: quilomícron, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte dos lipídeos da dieta e 80% do seu peso é composto por triglicerídeos. (BURTIS; CARL; ASHWOOD, 1996)

1.8 Lipemia e hemólise

Em estudo, a administração parenteral de emulsão de lipídeos foi associada à peroxidação lipídica e a sua incubação com hemácias foi associada a hemólise, dependente de radicais livres. (KLJUCHNIKOV et al., 1993)

A presença de lipemia nos concentrados de hemácias pode estar associado à presença de sobrenadante com característica de “*milk-shake* de morango”. Segundo CANTIN et al.(1992), a deficiência de lipoproteína lipase (LPL) ocasiona lipemia persistente no plasma e pode promover alterações na membrana das hemácias tornando-as mais frágeis.

A deficiência de LPL é uma doença autossômica recessiva, causada por mutação no gene da LPL. Os acometidos apresentam hipertrigliceridemia grave, com aumento sérico de quilomícrons remanescentes, VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa) e LDL (lipoproteína de densidade baixa). Têm diminuição das HDL (lipoproteínas de alta densidade) e maior risco de doença arterial coronariana. O paciente apresenta plasma intensamente lipêmico e o sangue pode apresentar-se róseo. (TAKATA et al., 2010)

Tabela 1 – Índice de hemólise observado com aumento da concentração de lipídeos totais

Triglicerídeos mmol/l	Colesterol mmol/l	n	Média (dp) hemólise mg/dl
< 7	< 7	11614	11 (25)
< 7	> 7	569	14 (32)
7-12	< 7	105	24 (35)
7-12	> 7	35	20 (44)
> 12	< 7	22	55 (52)
> 12	> 7	57	47 (61)

Fonte: Dimeski et al, 2005.

Nota: a hemólise foi representada pelo índice hemolítico (IH), calculado pela diferença entre as absorbâncias medidas em 570 e 600 nm das amostras diluídas em solução fisiológica. A conversão do resultado em absorbância a mg/dl deu-se por meio de multiplicação por fator.

A relação entre lipídeos no soro e fragilidade da membrana eritrocitária é complexa. Amostras laboratoriais com hipertrigliceridemia ou hipertrigliceridemia mais hipercolesterolemia apresentam característica leitosa e com bastante frequência apresentam-se leitosas e róseas, semelhante a “*milk-shake* de morango” devido ao aumento da hemólise. DIMESKI *et al* (2005)

estudaram a relação entre o aumento da concentração de lipídeos (colesterol e triglicerídeos) e hemólise em amostras de pacientes. Realizou a determinação de colesterol, triglicerídeos e hemólise em amostras leitosas. O índice de hemólise foi calculado pela diferença de absorbância entre 570 e 600 nm e convertido em mg/dl de hemoglobina livre. Amostras foram divididas em 6 grupos, de acordo com a concentração de lipídeos. Os dados da Tabela 1 sugerem que a concentração dos triglicerídeos tem uma maior influência na hemólise, do que a concentração de colesterol. Em relação a amostras com concentrações similares de triglicerídeos, aquelas com maior concentração de colesterol apresentaram hemólise ligeiramente menor.

É possível que o aumento da concentração dos lipídeos altere a composição de lipídeos da membrana da hemácia, aumentando sua fragilidade. Isso tem sido notado em doenças metabólicas, como: deficiência de lipoproteína lipase (LPL), doença de Tangier, deficiência de lecitina-colesterol aciltransferase. (DIMESKI et al, 2005)

No estudo de Bashir et al (2013), foi utilizado plasma lipêmico para resuspensão de hemácias, como pool de CH X Pool de plasmas lipêmicos e não lipêmicos ABO compatíveis, em HT entre 50 e 55%.

Empregou-se plasmas tratados e não tratados com azul de metileno, autólogos ou alogênicos, com diferentes temperaturas de armazenamento e de frações de posições diferentes do tubo de coleta deixado em repouso. O grau de hemólise foi avaliado em 2, 24 e 48 h.

CH de doações lipêmicas mostraram aumento da hemólise, apesar de os triglicerídeos e colesterol estarem dentro dos valores normais. Com os plasmas grosseiramente lipêmicos (triglicerídeos > 4,0 mmol/L), ocorreu aumento da hemólise em níveis que ultrapassaram os 0,8% preconizados pela legislação. Não houve diferença significativa entre os plasmas tratados ou não com azul de metileno, bem como entre os autólogos e os alogênicos. Maior hemólise foi encontrada nos plasmas que haviam sido congelados e descongelados e menor nos que permaneceram em repouso em temperatura ambiente.

Essa alteração não foi observada quando foi utilizado plasma não lipêmico na resuspensão das hemácias. A provável causa de hemólise atribui-se às lipoproteínas ricas em triglicerídeos, visto não haver diferença significativa entre os níveis de colesterol ao se comparar plasmas lipêmicos e não lipêmicos,

mas sim concentrações significativamente maiores de triglicerídeos em plasmas lipêmicos. (BASHIR et al, 2013)

1.9 Transfusão de CH com tempo longo de armazenamento

O ato transfusional pode salvar vidas, mas não está isento de riscos. Em pacientes muito críticos está associada ao aumento da mortalidade, principalmente com o uso de CH armazenados por muito tempo. Uma das hipóteses é a destruição das hemácias após a transfusão promove uma resposta inflamatória associada ao depósito de ferro tecidual (baço e fígado) e aumento de ferro circulante não ligado à transferrina. (HOD et al., 2010)

Segundo Chen, Devine e Serrano (2015), as microvesículas que são liberadas da membrana eritrocitária, possuem fosfolipídeos pró-inflamatórios e pró-coagulantes, podendo aumentar o risco de complicações pró-trombóticas. A diminuição da superfície/volume aumenta a rigidez da célula e reduz sua deformabilidade. Isso pode levar a oclusão de vasos e ruptura das hemácias na circulação.

Recentemente, têm sido realizados estudos relacionando lesão de armazenamento na patogênese da Injúria pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI), com atenção aos produtos da degradação de membrana da hemácia e às micro vesículas.(BABAEV; POZZI, 2014)

Para Tzounakas et al. (2015) o tempo de armazenamento é apenas um critério de qualidade relativa para avaliação da lesão de armazenamento de hemácias. Esta depende da capacidade das células em lidar com as condições não fisiológicas.

Estudos retrospectivos mostram riscos no uso de CH com tempo prolongado de armazenamento, mas isso não se observa em estudos mais recentes. Nenhum mostrou efeitos negativos, com a transfusão de CH com tempo longo de armazenamento dentro da faixa de validade, mas há um limite para o armazenamento, além do qual os riscos são maiores do que os benefícios. (CHEN; DEVINE; SERRANO, 2015)

Alguns ensaios clínicos não mostraram diferença significativa entre a utilização de CH recente e CH com tempo prolongado de armazenamento. Existem lacunas nos estudos, como não terem sido usados CH novos em comparação com CH com tempo de armazenamento próximo à data de validade, devido a questões éticas. Ainda que a quantidade de efeitos adversos seja pequena, podem afetar a vida de pessoas, o que se torna uma questão ética e econômica. Vale a pena estudar e tentar preveni-los. (ZIMRING; SPITALNIK, 2017)

As microvesículas liberadas pelas hemácias durante a lesão de armazenamento contribuem para a ativação dos neutrófilos, aumentando a resposta inflamatória. O mecanismo requer mais estudos e a retirada das microvesículas poderia ser benéfica aos receptores. (BELIZARE et al., 2012)

Alguns estudos retrospectivos contraindicam o uso de CH armazenados por mais de duas semanas. Sabe-se que as alterações bioquímicas e morfológicas o tornam diferente de um hemocomponente recém produzido, mas ainda não está claro até que ponto essas alterações podem comprometer a eficácia e segurança transfusional. Algumas estratégias podem fornecer alternativas para otimização do armazenamento como a criopreservação, desoxigenação, rejuvenescimento, meio com pH alcalino ou substâncias antioxidantes nas bolsas de armazenamento. (D'ALESSANDRO et al., 2015)

1.10 Transfusão de hemocomponentes lipêmicos

A Farmacopeia Europeia preconiza separar plasma com aspecto límpido a ligeiramente turvo e sem hemólise antes do congelamento, mas não especifica como quantificar essa turbidez. (PEFFER et al., 2011)

O envelhecimento dos glóbulos vermelhos resulta no aparecimento progressivo de marcadores de stress oxidativo sobre os lipídeos na forma de malondialdeído ou prostaglandinas, como 8-isoprostano. O acúmulo de altos níveis de prostaglandinas ou lipídios oxidados nos sobrenadantes podem promover eventos adversos no receptor, como lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão. (D'ALESSANDRO et al., 2015)

Após estudo onde foi observado aumento de hemólise nos CH com lipemia, um serviço de hemoteria optou por não produzir componentes celulares e fornecer informações aos doadores sobre como evitar a lipemia.

(DE LALEIJNE-LIEFTING et al., 2017)

O significado clínico de doações de plaquetas ou plasmas lipêmicos ainda não é bem conhecido. São necessários mais estudos a respeito dos efeitos da transfusão de plasma lipêmico, mas deve ser levada em consideração a relação entre hemólise e lipemia no momento de selecionar os plasmas para reconstituição dos hemocomponentes na exsanguíneo transfusão e transfusões neonatais.(BASHIR et al., 2013)

2. JUSTIFICATIVA

Mesmo em condições adequadas de armazenamento, o metabolismo celular provoca alterações bioquímicas e morfológicas nos concentrados de hemácias, características que diferenciam um hemocomponente recente de um com tempo prolongado de estocagem. (D'ALESSANDRO et al., 2015)

No processo de lesão de armazenamento, ocorrem alterações metabólicas, morfológicas, reológicas e ocorrem danos oxidativos, contribuindo para progressiva degradação, o que resulta em hemólise. Esta é a última etapa da lesão, na qual a hemácia não é mais viável, portanto não tem função terapêutica. O K^+ extracelular pode aumentar o risco de arritmia nos receptores e a Hb livre é indutora de estresse oxidativo, acentuando ainda mais a lesão de armazenamento. (D. CHEN. K. SERRANO, 2015)

Alguns metabólitos podem promover reações transfusionais. Foi relatada associação entre as vesículas liberadas pelas hemácias em seu envelhecimento e a ativação de neutrófilos e ocorrência de TRALI. (PROVIDENCE, 2012)

A hipótese de que a hiperlipidemia pode estar relacionada com alterações bioquímicas e morfológicas nas bolsas de concentrados de hemácias acelerando o processo de envelhecimento parece adequada.

Existem poucos dados publicados relativos à associação da lipemia com a hemólise, mas já foram observados graus de hemólise superiores a 0,8%, máximo preconizado pela legislação vigente, em CH com plasmas lipêmicos.

Visto que a ocorrência de doações lipêmicas é significativa, conhecendo sua consequência na qualidade dos concentrados de hemácias, será definida estratégia nos setores de processamento, controle de qualidade e distribuição para evitar o uso de concentrados de hemácias com menor segurança e eficácia transfusional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade dos CH de doações das quais foram descartados os plasmas frescos por lipemia, em comparação com CH de plasmas límpidos, durante o armazenamento.

3.2 Objetivos específicos

- Reconhecer a concentração de triglicerídeos dos plasmas descartados e classifica-los por níveis de triglicerídeos;
- Reconhecer as doações das quais foram descartados os plasmas frescos por lipemia e avaliar a qualidade dos respectivos CH CPD SAG Manitol durante o período de armazenamento, através dos parâmetros: pH, potássio extracelular, índices hematimétricos, glicose, grau de hemólise, TBARS, ERO e metemoglobina durante o período de validade das bolsas, considerando-se 1º a 10º, 11º a 22º, 23º a 34º; e 35º a 42º dias de armazenamento;
- Avaliar a fragilidade osmótica nos CH;
- Comparar os resultados com os obtidos nos CH CPD SAG Manitol, de mesma data de coleta, que não tiveram os plasmas descartados por lipemia;
- Definir protocolo para tempo de armazenamento de CH obtidos de doações com lipemia que garanta distribuição de hemocomponente com qualidade;
- Estabelecer faixa de corte para o limite do grau de lipemia do plasma cujo CH também deveria ser descartado por apresentar lesão de estocagem precoce.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delimitação

A pesquisa é um estudo exploratório com análise quantitativa.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital do Trabalhador/Secretaria de Saúde do Paraná em outubro/2015, com parecer de número 1.304.496 e Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número 48619415.6.0000.5225.

As determinações dos índices hematimétricos, grau de hemólise, controle microbiológico, meta-hemoglobina, TBARS e curva de fragilidade osmótica foram realizados no laboratório de controle de qualidade de hemocomponentes do HEMEPAR. As determinações de Na, K, Cl, Lactato, pH e triglicerídeos foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital do Trabalhador. A determinação das ERO foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Curso de Farmácia da UFPR.

4.2 Casuística

Foram analisados 59 plasmas de doadores do sexo masculino, com idade entre 20 e 50 anos, descartados por lipemia, bem como seus respectivos CH. Esses hemocomponentes foram obtidos de coleta em bolsas com CPD/SAG-M Comploflow® (Fresenius Kabi) no HEMEPAR.

Foram utilizados como controle negativo, 35 CH de doadores do sexo masculino com idade entre 20 e 50 anos, que não tiveram os plasmas descartados por lipemia. Foram selecionados bolsas controle com mesma data de coleta das amostras.

4.3 Seleção e avaliação dos plasmas com lipemia (Figura)

Figura 8 – Seleção e avaliação dos plasmas com lipemia

Fonte: A autora (2018)

Nota: ST=sangue total; PRP=plasma rico em plaquetas; CH=concentrado de hemácias; CP=concentrado de plaquetas.

Os plasmas com aspecto turvo (lipêmico) foram separados através da inspeção visual, após o fracionamento do sangue total. Foi realizado registro através de fotografia, contra fundo de cor preta, com a palavra lipemia escrita em fonte Arial Black tamanho 20. A coleta de amostra das bolsas de plasma para dosagem dos triglicerídeos foi realizada em tubos BD Vacutainer® SST II Advance contendo gel, a partir de corte do tubo de conexão da mesma. A bolsa de CH produzido da mesma doação do plasma descartado por lipemia foi selecionada para a pesquisa. Como controle, foi selecionada bolsa de CH com plasma límpido do mesmo dia de doação. (Figura 8)

4.4 Dosagem de triglicerídeos

A avaliação da concentração de triglicerídeos nos plasmas foi feita pela técnica de Micro Slide Vitros® Ortho Clinical Diagnostics. (Johnson & Johnson, Estados Unidos). Nesta técnica o contato entre a amostra e o surfactante Triton X-100 presente na camada de distribuição promove dissociação dos triglicerídeos dos complexos de lipoproteínas presentes. Os triglicerídeos são hidrolisados pela lipase para produzir glicerol e ácidos graxos. O glicerol difunde-se para a camada reagente, onde é fosforilado pelo glicerol quinase na presença de trifosfato de adenosina (ATP). Na presença de L- α -glicerol-fosfato oxidase, L- α -glicerofosfato é oxidado em fosfato de di-hidroxiacetona e peróxido de hidrogênio. A reação entre indicador e o peróxido de hidrogênio gera um produto colorido, cuja absorbância é medida pela espectrofotometria em 540 nm. A intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de triglicerídeos na amostra.

4.5 Separação e estudo dos CH

As bolsas de CH produzidas a partir das doações cujo plasma foi descartado por lipemia foram selecionadas para a pesquisa. Como controle,

foram selecionadas bolsas de CH separadas de plasma límpido, do mesmo dia de doação.

Como ilustrado na Figura 9, foi realizada conexão estéril entre o tubo de conexão da bolsa de CH e tubo de conexão de conjunto de bolsas de transferência (BT) quádrupla de 150 ml CompoFlex® (Fresenius Kabi). A cada experimento, parte do conteúdo da bolsa-mãe, previamente homogeneizado, foi transferido para uma das BT. A BT foi separada da bolsa-mãe através de selagem com CompoSeal® (Fresenius Kabi).

Foram realizados 4 experimentos durante todo o período de validade da bolsa. O experimento 1 foi realizado entre o 1º e 10º dias de armazenamento, o experimento 2 entre o 11º e 22º dias; o experimento 3 entre o 23º e o 34º dias; e o experimento 4 entre o 35º e o 42º dias. Durante o período de validade, os hemocomponentes permaneceram em refrigerador para armazenamento de sangue, com temperatura controlada entre 2 e 6°C.

Entre os experimentos, o conteúdo da tubulação da bolsa-mãe e outras bolsas de transferência foram ordenhados para o interior da bolsa-mãe através de alicate de ordenha AL1 01 (Stramedical). O retorno do conteúdo foi impedido através de *clamp* plástico.

As alíquotas para determinação dos índices hematimétricos, curva de fragilidade osmótica, ERO, TBARS, metemoglobina e controle microbiológico foram coletadas com seringa e agulha, após inserir Sampling Site Coupler (Fenwal) em um dos opérculos da BT contendo amostra de CH. O material foi transferido para tubos plásticos de uso único.

Figura 9 – Separação e estudo dos Concentrados de hemácias no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Paraná, Brasil)

Fonte: A autora (2018)

Nota: CH=concentrado de hemácias; BT=bolsa de transferência; PBS=tampão salina fosfato; ERO=espécies reativas de oxigênio; TBARS=espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; Meta Hb=meta hemoglobina; Hb=hemoglobina.

Para as determinações de glicose, lactato, pH, Cl⁻, Na⁺, K⁺ e Hb plasmática foi realizada coleta a partir de corte do tubo de conexão da BT. O material foi transferido para tubos BD Vacutainer® SST II Advance com gel separador.

4.6 Avaliação microbiológica

Foi realizado controle microbiológico no período de 1 a 10 dias e no período de 35 a 42 dias de armazenamento. O processo de separação e coleta dos CH envolveu muitas etapas. Fez-se necessário descartar a contaminação bacteriana no momento da doação ou em algumas das etapas da coleta. A presença de microrganismos pode alterar os parâmetros de qualidade dos hemocomponentes. Em câmara de fluxo laminar, foram transferidos 4 ml do CH para frasco de hemocultura Bact Alert PF Plus® (Biomérieux, França). Esse frasco contém meio de cultura estéril e sensor colorimétrico que muda de cor na presença de CO₂, que é produzido no crescimento de microrganismos. Os frascos foram incubados por 7 dias no Sistema de Detecção Microbiana Bact Alert 3D (Biomérieux, França). O equipamento faz leitura dos sensores dos frascos a cada 10 minutos e emite sinal quando é detectada positividade.

4.7 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

4.7.1 Princípio

O método utilizado foi descrito por Henneberg (2013), adaptado de López-Revuelta *et al* (2006). Durante incubação a 37°C por 30 minutos, a sonda lipossolúvel, 2,7– diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) atravessa a membrana das hemácias, sofrendo diacetilação por estearases. A diclorodihidrofluoresceína (DCFH) formada é oxidada pelos radicais livres intracelulares (O₂⁻ e H₂O₂). O produto da oxidação é o diclorofluoresceína (DCF), cuja fluorescência é diretamente proporcional a quantidade de ERO na célula. (Figura10) (HENNEBERG,2013) (HERMANN, 2015) (ANTONELOU et al., 2012)

A quantidade de radicais livres da hemácia aumenta, à medida em que a sua capacidade antioxidante é superada pela oxidação. A técnica é altamente sensível e a sonda específica para H₂O₂.

Figura 10 – Princípio do mecanismo de funcionamento da sonda 2,7 Diclorodihidrofluoresceína diacetato

Fonte: (SILVEIRA, 2004)

4.7.2 Padronização do controle interno

A técnica não possui controle comercial, portanto foi padronizada a utilização da solução de *tert*-butilhidroperóxido (*t*BHP) (SIGMA-ALDRICH) para promover a formação de ERO em amostra recente de CH. A amostra foi centrifugada a 2000 g por 5 minutos e lavada 3 vezes com tampão fosfato salina (PBS), constituído de NaCl 137 mmol/l; KH₂PO₄ 1,47mol/l; Na₂HPO₄ 8,17 mmol/l e KCl 2,70 mmol/l, pH 7,4, com o mesmo programa de centrifugação. Após lavagem foi preparada suspensão a 10% no mesmo tampão.

No micro tubo “branco” foi adicionado 1000 µl da suspensão de CH. No micro tubo “teste”, foram adicionados 995 µl da suspensão de CH e 5 µl da sonda DCFH-DA 10 µmoles/l. Foram incubados por 30 minutos em estufa a 37°C, ao abrigo da luz.

Após os 30 minutos, o conteúdo dos micro tubos foi diluído em 9 ml de tampão PBS. Em placa escura de 96 poços, foram dispostos branco (B) e teste em quadruplicata. Para o controle interno também foi realizado branco (B) e teste, este último com adição de 50µl de concentrações de *t*-BHP entre 50 µmoles/l e 5mmoles/l, obtidas a partir da diluição do agente oxidante em tampão PBS. O teste basal (TB) correspondeu ao tubo teste da amostra recente para controle interno, sem adição do agente oxidante.

Após incubação da placa por 15 minutos, ao abrigo da luz, foi realizada leitura no GloMax®-Multi fluorímetro para leitura de microplacas, Promega) em 528 nm de emissão e 488 nm de excitação. (Figura 11)

Figura 11 – Técnica para padronização do controle interno ERO

Fonte: A autora (2016)

Nota: CH=concentrado de hemácias; HT=hematócrito; PBS=tampão salina fosfato; *t*-BHP=terc-butilhidroperóxido.

As soluções de *t*-BHP promoveram formação de ERO, evidenciada pelo aumento da fluorescência nas amostras tratadas com o agente oxidante, em comparação à amostra basal. A partir da concentração 200 µmoles/l a fluorescência começou a diminuir, provavelmente devido à hemólise provocada pelo *t*-BHP. Foram selecionadas para controle interno as concentrações entre 50 µmoles/l e 150 µmoles/l de *t*-BHP, como controle baixo e controle alto, respectivamente. (Figura 12)

Figura 12 – Resultados da padronização do controle das Espécies Reativas de Oxigênio

Fonte: A autora (2016)

4.7.3 Determinação das ERO nas amostras de CH

As amostras de CH, foram tratadas como na padronização do controle interno. Foram incubados branco e teste nos micro tubos. Nas placas foram incubados branco, amostra teste (com lipemia), amostra controle (sem lipemia) e controles internos alto e baixo.

A concentração de ERO foi expressa em Fluorescência/g de Hb, obtida dividindo-se o valor de fluorescência pela concentração de Hb (g/dl) da suspensão de CH com HT 10%.

4.8 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

4.8.1 Princípio

O método descrito por Cesquini et al., (2003) foi adaptado para pequenos volumes. O malondialdeído, produto da peroxidação lipídica, é usado como marcador de dano oxidativo, reagindo com o ácido tiobarbitúrico a 100°C

e formando um composto de cor rósea, cuja absorbância é medida em espectrofotômetro de 532 a 535 nm. (Herman et al., 2014).

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) representam a quantificação indireta do malondialdeído (MDA) e de outros aldeídos resultantes da peroxidação lipídica (HENNEBERG, 2013) e são marcadores da peroxidação lipídica, mecanismo comum de lesão e morte celular. (CHAUDHARY; KATHARIA, 2012)

4.8.2 Controle interno

Realizada padronização do controle interno da técnica. 580 µl da suspensão a 10% de CH em PBS foram mantidas por 15 minutos em temperatura ambiente, com concentrações 20 µl de solução de *t*-BHP sob agitação. Foram testadas concentrações entre 50 µmoles/l e 5mmoles/l. Selecionada como controle interno da técnica a solução de *t*-BHP a 5 mmoles/l.

4.8.3 Determinação das TBARS nas amostras de CH

Empregou-se a técnica de Stocks & Dormandy (1971). apud Henneberg (2013). Os eritrócitos foram lavados três vezes com tampão PBS. A 600 µl da suspensão a 10% de CH, foram adicionados 250 µl de ácido tricloroacético a 25%. Após homogeneização vigorosa, centrifugou-se por 5 minutos a 1200 g. Alíquotas de 600 µl do sobrenadante foram adicionadas a 600 µl de ácido tiobarbitúrico 10 g/l em NaOH 0,05 mmoles/l. O tubo foi incubado a 100°C por 15 minutos, verificando formação de produto de cor rósea. Após resfriamento dos tubos em banho de gelo por 5 minutos, foi realizada determinação da absorbância em 532 nm, descontando-se a absorbância a 600 nm para eliminar interferentes. O espectrofotômetro utilizado foi o Cirrus 80 (Femto).

A concentração das TBARS foi calculada com a fórmula abaixo e expressa em nmol/g Hb:

$$TBARS = \frac{\Delta ABS}{1,56 \times 10^5 \times [Hb]}$$

Onde:

ΔABS = Valor da absorbância em 532 nm – absorbância em 600 nm

$1,56 \times 10^5 \times l/mm$ = coeficiente de extinção molar

[Hb] = concentração de hemoglobina da suspensão a 10% (g/l)

4.9 Dosagem de metemoglobina

4.9.1 Princípio

A metemoglobina tem grande importância como marcador de processos oxidativos. O método utilizado foi padronizado por Naoum et al (2004), de alta especificidade e baixo custo, fundamenta-se na determinação da solução de Hb, estabilizada em solução tampão fosfato 60 moles/l em dois comprimentos de onda específicos para hemoglobina (540 nm) e metemoglobina (630 nm).

4.9.2 Controle interno

Foi realizada a padronização do controle interno da técnica. A 250 µl da suspensão com HT a 10% de CH em PBS, foram adicionados 50 µl de solução de *t*-BHP e mantidos sob agitação em temperatura ambiente por 15 minutos. Foram testadas concentrações entre 50 µmoles/l e 5mmoles/l. A solução de *t*-BHP a 1 mmol/l foi selecionada para controle da técnica.

4.9.3 Dosagem de metemoglobina nas amostras de CH

A oxihemoglobina, apresenta no grupo heme o ferro em seu estado reduzido ou ferros (Fe^{2+}). Durante os processos metabólicos são liberados produtos com potencial oxidativo que oxidam o ferro, alterando-o para seu estado férrico (Fe^3), quando a oxihemoglobina é convertida a metemoglobina, estado não funcional, sem a capacidade de transportar oxigênio. (NAOUM, 2004)

Foi feita adaptação do método de Naoum para pequenos volumes. (HERMANN, 2015)

A determinação foi realizada na suspensão do CH com HT a 10% em tampão PBS. (Figura 13). O tampão fosfato 60 mmol/l foi preparado a partir de diluição da solução estoque de tampão fosfato 15 mmol/l (Na_2HPO_4 25 mmol/l e KH_2PO_4 42 mmol/l). Do tubo A foi realizada leitura da absorbância (A_1) em 630nm, utilizando-se tampão fosfato 60 mmol/l como branco. Do tubo B, foi medida a absorbância (A_2) em 540nm.

A concentração de metemoglobina foi calculada como uma porcentagem da concentração total de hemoglobina, através da fórmula:

$$\%metemoglobina = \frac{A_1 \times 100}{A_1 + (A_2 \times 10)}$$

Onde:

A_1 - absorbância em 630nm

A_2 - absorbância em 540nm

A absorbância A_2 é multiplicada por 10 para corrigir a diluição realizada no tubo B, para entrar na linearidade da técnica da dosagem espectrofotométrica da oxihemoglobina em 540 nm (NAOUM *et al.*, 2004).

Figura 13 – Técnica da dosagem de metemoglobina pelo método de Naoum

Fonte: a autora, 2016.

Nota: CH=concentrado de hemácias; HT=hematócrito; tampão fosfato M60=preparado a partir de diluição tampão fosfato 15 mmol/l (Na_2HPO_4 25 mmol/l e KH_2PO_4 42 mmol/l); ABS=absorbância.

4.10 Determinações de pH, Na^+ , K^+ e Cl^-

Durante o armazenamento do CH, a homeostase dos cátions é comprometida devido à baixa temperatura e concentração de ATP. São alterados gradativamente os gradientes de concentração e, no sobrenadante dos CH, é observado acúmulo de K^+ e diminuição das concentrações de Cl^- e Na^+ , enquanto aumentam no interior da célula.

A principal via metabólica da hemácia é a glicólise, com formação de lactato ou ácido láctico, que leva à gradativa diminuição do pH.

As determinações foram realizadas nos sobrenadantes dos CH, coletados em tubo com gel separador BD no sistema Rapid Point 500 (Siemens, Reino Unido), pela metodologia de eletrodo seletivo para íons. Este consiste em uma membrana separando um eletrodo e a respectiva solução de referência, de uma amostra a ser analisada. (HENRY, 1999).

O equipamento possui eletrodos seletivos para medição de cada íon a ser analisado. Nas determinações, quantidades iguais da amostra e do fluido de referência são utilizadas e a diferença de potencial entre os dois é diretamente proporcional à concentração do íon na amostra. (BAYER HEALTHCARE, 2006)

As amostras com resultados de K^+ superiores a 15 mmol/l, por extrapolarem a linearidade do método, foram processadas por Química seca no equipamento Vitros 250 Ortho Clinical Diagnostics -Johnson & Johnson, que utiliza a metodologia de eletrodo seletivo para íons em *slides* de uso único.

4.11 Glicose e lactato

Durante o armazenamento do CH ocorre consumo gradativo de glicose e produção de lactato na via glicolítica. A concentração de glicose foi realizada na Rapid Point 500 (Siemens, Reino Unido), pelo método amperométrico. É aplicada determinada tensão elétrica a um eletrodo e realizada medição da corrente gerada. Os eletrodos contêm glicose oxidase e lactato oxidase, respectivamente.

Para concentrações de Lactato > 30 mmol/l, as amostras foram processadas por Química seca no equipamento Vitros 250 Ortho Clinical Diagnostics -Johnson & Johnson. O lactato existente na amostra é oxidado pela oxidase de lactato em piruvato e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio gerado oxida o sistema de corantes da 4-aminoantipirina e do 1,7-diidroxinaftaleno, gerando um produto colorido, cuja intensidade é medida por espectrofotometria.

4.12 Índices hematimétricos

O VCM é uma medida do volume médio corpuscular para avaliar a turgescência sofrida pelas hemácias suspensa em solução aditiva SAGM. (LAGERBERG et al., 2017)

A variação do RDW reflete o aumento da esferocitose e da fragmentação das hemácias. Em pacientes com doença renal, valores extremos de RDW correlacionaram-se com a quantidade de equinócitos e acúmulo intracelular de ERO. (ANTONELOU et al., 2012)

As determinações dos parâmetros HT (hematócrito), Hb (hemoglobina), VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) e RDW (amplitude de distribuição das hemácias) foram realizadas no analisador hematológico Sysmex XS 1000 i em alíquotas coletadas previamente em tubos plásticos.

O equipamento aspira e dilui a amostra de CH, previamente homogeneizada. A amostra diluída é aspirada para o detector de hemácias e plaquetas. As células atravessam a abertura do detector e ao passarem por ela, causam uma resistência elétrica, gravada como pulso de impedância. O foco hidrodinâmico impede que a célula seja contada mais de uma vez. A amplitude do pulso de impedância é diretamente proporcional ao tamanho da célula. De acordo com o tamanho, as células são classificadas como hemácias ou plaquetas e são gerados os histogramas das respectivas contagens.

O VCM corresponde ao volume médio real das hemácias contadas.

A amplitude de distribuição das hemácias (RDW) é uma estimativa da variação do tamanho das hemácias. É o desvio padrão do volume, expresso em percentual, inversamente proporcional à homogeneidade da amostra. (HORNE et al., 2015)

O HT% é calculado através da fórmula:

$$HT\% = \frac{VCM \text{ fl} \times N^{\circ} \text{Hemácias} \times 10^6 / \text{ml}}{10}$$

Após a contagem de plaquetas e hemácias, é adicionado reagente lisante laurel-sulfato. A absorbância da Hb liberada é medida em 555 nm.

Outros índices calculados:

HCM: hemoglobina corpuscular média

$$HCM \text{ pg} = \frac{Hb \text{ g/dl} \times 10}{N^{\circ} \text{Hemácias} \times 10^6 / \text{ml}}$$

CHCM (concentração da hemoglobina corpuscular média)

$$CHCM = \frac{Hb \text{ g/dl}}{HT\%}$$

4.13 Curva de fragilidade osmótica

As principais substâncias que regulam as propriedades osmóticas são os cátions (Na^+ e K^+) e ânions (Cl^- e HCO_3^-). Em tempo longo de armazenamento é observado aumento da fragilidade osmótica das hemácias. (D'ALESSANDRO et al., 2012).

O grau de resistência das hemácias à lise em concentrações decrescentes de NaCl é o princípio do teste de fragilidade osmótica. (WALSKI et al., 2014)

A curva de fragilidade osmótica mede a quantidade de Hb liberada das hemácias em tubos contendo mesmo volume de concentrações decrescentes de NaCl. Foram utilizados 9 tubos com concentrações de 0.9 a 0.1% de NaCl, preparados a partir de uma solução mãe de NaCl 10% em água destilada. Após 30 minutos de incubação, os tubos foram centrifugados por 4 minutos a 1750 x g. A absorbância do sobrenadante foi medida em 540 nm no espectrofotômetro Cirrus 80 (Femto, São Paulo) do laboratório de CQ de hemocomponentes do HEMEPAR. Antes da leitura, foi realizado branco da reação com o tubo 0.9. A quantidade de hemoglobina liberada é diretamente proporcional à lise ocorrida. O tubo 0.1 corresponde a 100% de hemólise.

A hemólise dos tubos 0.8 a 0.2% de NaCl é calculada através da fórmula:

$$\% \text{Hemólise do tubo} = \frac{\text{Absorbância do tubo}}{\text{Absorbância do tubo 0,1}} \times 100$$

4.14 Hemólise

4.14.1 Determinação da hemoglobina livre

A hemólise é a última etapa da lesão de armazenamento, a célula não é mais viável e não apresenta mais as funções terapêuticas. A Hb livre é indutora de stress oxidativo, que contribui para aumentar ainda mais a degradação. (CHEN; SERRANO, 2015)

Foi utilizado o método da espectrofotometria direta de Harboe com absorção máxima da oxihemoglobina em 415 nm (Banda de Soret) e fórmula para a correção da absorção por substâncias interferentes (lipídeos e bilirrubina) lidas em 380 e 450 nm. Na fórmula ocorre conversão direta da absorbância em hemoglobina. O método é de fácil execução, tem baixo custo e proporciona resultados fidedignos. (GRILO, 2016).

4.14.2 Preparação da amostra

As determinações foram realizadas nos sobrenadantes dos CH, coletados em tubo com gel separador BD. Os tubos foram centrifugados a 1070 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubo limpo e seco com auxílio de micropipeta. O sobrenadante foi diluído, de acordo com o aspecto visual, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Diluição da amostra para dosagem de Hb livre

Aspecto visual do sobrenadante	Diluição	Volume do sobrenadante μL	Volume de SF μL
Límpido	1:2	1000	1000
Límpido	1:5	400	1600
Hemólise 1+	1:10	200	1800
Hemólise 2+	1:20	100	1900
Hemólise 3+	1:50	40	1960
Hemólise 4+	1:100	20	1980

Fonte: Adaptado de GRILO, 2016

4.14.3 Leitura em espectrofotômetro

As absorbâncias das amostras foram lidas no espectrofotômetro Cirrus 80 (Femto, São Paulo) em 380 nm, 415 nm e 450 nm, zerando previamente com solução fisiológica (SF).

4.14.4 Controle da técnica

Como controle foi utilizada amostra recente de CH (até dois dias da coleta), com concentração conhecida. A amostra foi hemolisada pela adição de água deionizada (diluição 1:100). O tubo foi centrifugado e pelo aspecto sobrenadante foi diluído conforme a tabela 2 para posterior leitura das absorbâncias. O valor de referência para o controle é o valor da concentração de Hb do CH dividido por 100.

4.14.5 Cálculo da Hb livre

A concentração de Hb livre foi calculada através da fórmula: (HAN, 2010)

$$Hb \text{ g/dl} = 167,2 \times A_{415} - 83,6 \times A_{380} - 83,6 \times A_{450} \times \frac{1}{1000} \times \text{diluição},$$

Onde:

A₄₁₅=absorvância em 415 nm

A₃₈₀=absorvância em 380 nm

A₄₅₀=absorvância em 450 nm

4.14.6 Cálculo do grau de hemólise

O grau de hemólise foi calculado a partir da fórmula:

$$\% \text{ de hemólise} = (100 - HT) \times HbL \div Hb$$

Onde:

HbL = hemoglobina livre (em g/dl)

HT= hematócrito do CH

Hb= hemoglobina em g/dl do CH

4.15 Dados da doação e processamento

As informações do doador e dos hemocomponentes produzidos foram obtidos dos relatórios Report. Smith a partir dos dados alimentados no Sistema Hemovida. e dos relatórios do Sistema SBS.

4.16 Análise de resultados

Os dados foram representados na forma de box-plot. Para a estatística descritiva foi utilizado o programa Excel 2016 (Microsoft®) para cálculo de média, mediana, desvio padrão, quartis, mínimos e máximos.

As análises estatísticas foram realizadas pelo método de modelos mistos. A escolha do método deu-se pela estrutura do problema - dependência espacial entre os períodos e, conseqüentemente, correlação entre as 4 observações ao longo do tempo.

Foi realizada análise exploratória dos resultados dos ensaios para teste e controle através dos gráficos de perfil.

A distribuição foi avaliada através de histograma, análise dos resíduos por envelope simulado e teste de Shapiro-Wilk. Os componentes que não tiveram aderência à distribuição normal foram transformados por função log ou método box-cox.

As variáveis com distribuições não normais foram comparadas pelo teste t de *Student* (não pareado) ou análise de variância (ANOVA) quando foram comparados mais de dois grupos.

As variáveis sem distribuição normal foram comparadas pelo teste *Wilcoxon-Mann-Whitney*, ou *Kruskal-wallis* para comparação entre mais de dois grupos.

As análises e gráficos foram realizados no software R e uma probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Imagens dos plasmas lipêmicos e dosagens de triglicerídeos

Os plasmas que apresentaram turbidez leve e de fácil visualização da palavra “Lipemia” foram classificados como ligeiramente turvos. As bolsas cuja turbidez permitiu leitura com dificuldade da palavra “Lipemia” foram classificados como moderadamente turvos. Foram classificados como intensamente turvos, sem visualização da palavra, mas visualização do rótulo e como leitosos aqueles nos quais não se pode visualizar nem a palavra, nem o rótulo. (Figura 14)

Os níveis de triglicerídeos foram classificados como muito elevado (>500 mg/dl), elevado (200 a 499 mg/dl) e limítrofe (175 a 199 mg/dl). Foi incluída a categoria normal para concentração de triglicerídeos inferior a 175 mg/dl, valor de referência para indivíduos sem jejum de 12 h. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017)

Em 90% dos plasmas classificados como lipêmicos, observou-se resultados das dosagens de triglicerídeos superiores a 175 mg/dl.

Em 91% dos plasmas com dosagens de triglicerídeos >500 mg/dl observou-se aspecto leitoso (11/12), mas apenas 44% dos que apresentaram aspecto leitoso apresentaram dosagem de triglicerídeos >500 mg/dl (11/24). Dos 13 plasmas leitosos que não apresentaram concentração de triglicerídeos >500 mg/dl, 12 apresentam concentração de triglicerídeos entre 200 e 499 mg/dl e apenas 1 apresentou concentração de triglicerídeos inferior a 175 mg/dl.

Dos plasmas leitosos, 4 apresentaram coloração rósea (11, 21, 26 e 37).

Figura 14A – Fotos dos plasmas descartados por lipemia no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Paraná, Brasil)

Fonte: A autora (2018)

Nota: Os círculos representam a classificação pelo aspecto visual como ligeiramente turvo (verde), moderadamente turvo (amarelo), intensamente turvo (laranja) e leitoso (vermelho). Os retângulos representam a classificação pela concentração de triglicerídeos em mg/dl: normal (inferior a 175), limítrofe (175 a 199), elevado (200 a 499) e muito elevado (superior a 500).

Figura 14B – Fotos dos plasmas descartados por lipemia no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Paraná, Brasil)

Fonte: A autora (2018)

Nota: Os círculos representam a classificação pelo aspecto visual como ligeiramente turvo (verde), moderadamente turvo (amarelo), intensamente turvo (laranja) e leitoso (vermelho). Os retângulos representam a classificação pela concentração de triglicérides em mg/dL: normal (inferior a 175), limítrofe (175 a 199), elevado (200 a 499) e muito elevado (superior a 500).

Figura 14C – Fotos dos plasmas descartados por lipemia no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Paraná, Brasil)

Fonte: A autora (2018)

Nota: Os círculos representam a classificação pelo aspecto visual como ligeiramente turvo (verde), moderadamente turvo (amarelo), intensamente turvo (laranja) e leitoso (vermelho). Os retângulos representam a classificação pela concentração de triglicerídeos em mg/dl: normal (inferior a 175), limítrofe (175 a 199), elevado (200 a 499) e muito elevado (superior a 500).

Figura 14D – Fotos dos plasmas descartados por lipemia no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Paraná, Brasil)

Fonte: A autora (2018)

Nota: Os círculos representam a classificação pelo aspecto visual como ligeiramente turvo (verde), moderadamente turvo (amarelo), intensamente turvo (laranja) e leitoso (vermelho). Os retângulos representam a classificação pela concentração de triglicerídeos em mg/dL: normal (inferior a 175), limítrofe (175 a 199), elevado (200 a 499) e muito elevado (superior a 500).

Figura 14E – Fotos dos plasmas descartados por lipemia no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR, Curitiba, Paraná, Brasil)

Fonte: A autora (2018)

Nota: Os círculos representam a classificação pelo aspecto visual como ligeiramente turvo (verde), moderadamente turvo (amarelo), intensamente turvo (laranja) e leitoso (vermelho). Os retângulos representam a classificação pela concentração de triglicerídeos em mg/dL: normal (inferior a 175), limítrofe (175 a 199), elevado (200 a 499) e muito elevado (superior a 500).

5.2 Avaliação microbiológica

Foram obtidos resultados negativos para contaminação microbiana dos testes e controles.

5.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

No gráfico de perfil os resultados dos testes estão representados pela cor vermelha e os controles pela cor azul. Pela análise exploratória dos resultados há poucos indicativos de diferença entre a concentração de ERO fluorescência/g Hb dos CH com lipemia (teste) e os CH sem lipemia (controle). (Gráfico 4)

Gráfico 4 – Perfil de resultados ERO Fluorescência/g Hb nos concentrados de hemácias

Fonte: A autora (2018)

Nota: os resultados em fluorescência/g Hb dos testes estão representados na cor vermelha e o controle na cor azul. Os períodos estão representados no eixo x e a fluorescência por g/Hb está representada no eixo y. Não há indicativos de diferença entre os dois grupos pois os dados de ambos se apresentam sobrepostos.

Como os dados não seguiam uma distribuição normal, foi realizada transformação BOX-COX. Para os dados transformados foi realizado teste de Shapiro-Wilk, sem rejeição da hipótese de normalidade. O histograma também mostrou distribuição gaussiana. (Gráfico 5)

Gráfico 5 – Histograma ERO Fluorescência/g Hb após transformação

Fonte: A autora (2018)

Nota: no eixo x estão representados os valores de fluorescência/g Hb transformados e no eixo y a frequência

O box-plot mostrou aumento da ERO durante o armazenamento. Foi observada maior quantidade de resultados extremos no grupo teste, indicando tendência a fluorescências mais altas em comparação com o grupo controle. (Gráfico 6)

Gráfico 6 – Resultados Espécies Reativas de Oxigênio nos concentrados de hemácias

Fonte: A autora (2018)

Nota: no gráfico box-plot o conjunto de dados é representado através de um retângulo, cuja linha inferior representa o 1º quartil, a superior o 3º quartil e a central a mediana. A altura do box-plot representa a variabilidade, sendo que a extremidade inferior corresponde ao valor mínimo e a superior ao valor máximo. Valores extremos são pontos fora do box-plot.

Pela presença de valores extremos, os resultados de ERO foram descritos por mediana, mínimo e máximo. (Tabela 3)

A análise de variância (ANOVA) dos dados transformados indicou variação estatisticamente significativa entre os períodos, mas não entre os grupos.

Tabela 3 – Resultados de medianas das ERO em fluorescência/g Hb

	1 a 10 dias	11 a 22 dias	23 a 34 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	842,0 (249,7 - 2866,8)	895,1 (296,2 - 4491,5)	1056 (284,2 - 3975,6)	1048,3 (311,9 - 2427,7)
Não Lipêmica	761 (278,3 - 4415,8)	789,9 (243,12 - 1967,4)	990,4 (256,1 - 2012,9)	1054,8 (400,4 - 2526,5)

Fonte: A autora, 2018

5.4 TBARS

A análise exploratória não mostrou diferença entre teste e controle.

Como não seguiam uma distribuição normal, os dados foram transformados com a função log.

Não foi observado aumento das TBARS durante o armazenamento. Foram observados 10 resultados extremos no grupo teste e 7 no grupo controle. Foram observados resultados mais altos no grupo teste. (Gráfico 7)

Fonte: A autora (2018)

Os resultados das TBARS foram descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela 4).

A ANOVA não indicou variação significativa para os resultados das TBARS entre os períodos, nem entre os grupos teste e controle

Tabela 4 – Resultados de medianas das TBARS em nmol/g Hb

	1 a 10 dias	11 a 22 dias	23 a 34 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	0,152 (0,013 - 1,446)	0,129 (0,024 - 1,946)	0,151 (0,013 - 1,763)	0,154 (0,031 - 0,781)
Não Lipêmicas	0,128 (0,012 - 0,287)	0,165 (0,038 - 1,692)	0,123 (0,027 - 0,494)	0,122 (0,007 - 0,417)

Fonte: A autora, 2018.

5.5 Metemoglobina

Gráfico 8 – Perfil dos resultados de Metemoglobina

Fonte: A autora (2018)

Pelo gráfico 8, não é observada diferença entre os grupos.

Como os dados não assumiram distribuição normal, foi necessária a transformação BOX-COX.

Gráfico 9 – Resultados Metemoglobina

Fonte: A autora (2018)

Pelo gráfico 9, não se observa aumento da concentração de metemoglobina durante o armazenamento. Foram observados valores extremos em ambos os grupos, mas valores mais altos foram obtidos no grupo teste.

Os resultados foram descritos por mediana, mínimo e máximo.

Tabela 5 – Resultados de medianas da metemoglobina em%

	1 a 10 dias	1 a 22 dia	23 a 34 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	3,54 (2,38 - 16,82)	3,42 (2,26 - 17,24)	3,28 (2,22 - 22,97)	3,19 (2,51 - 22,72)
Não Lipêmicas	3,45 (2,37 - 6,93)	3,31 (1,94 - 12,67)	3,24 (2,45 - 14,89)	3,26 (2,09 - 17,35)

Fonte: A autora, 2018

Pela ANOVA, não há evidência significativa de diferença entre os grupos e nem sobre o período.

5.6 pH

A análise exploratória não mostrou diferença entre os grupos para os valores de pH, mas mostrou diferença entre os períodos. O pH mostrou queda durante o período de armazenamento. (Gráfico 10)

Gráfico 10 – Perfil de resultados pH

Fonte: A autora (2018)

Foi necessária a transformação BOX-COX. A análise de variância (ANOVA) mostrou diferença significativa entre os períodos, mas não mostrou diferença entre os grupos.

O gráfico 11 mostrou diminuição do pH no período avaliado, ao se comparar valores do primeiro e do último período.

Fonte: A autora (2018)

Os dados foram descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela 6)

Tabela 6 – Resultados mediana pH		
	1 a 10 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	7,665 (7,010 - 8,000)	6,86 (6,422 - 7,370)
Não Lipêmicas	7,462 (7,099 - 8,000)	6,84 (5,980 - 7,210)

Fonte: A autora, 2018.

5.7 Na⁺

A análise exploratória não mostrou diferença entre os grupos, mas mostrou diferença entre os períodos. À medida que aumenta o tempo de armazenamento, a concentração de Na⁺ diminui no sobrenadante dos CH.

Foi necessária a transformação BOX-COX. Pela ANOVA, há evidência significativa de diferença entre os períodos, mas não há entre os grupos.

Fonte: A autora (2018)

Os resultados foram representados por gráfico tipo box-plot (Gráfico 12) e descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela 7)

Tabela 7 – Resultados mediana Na⁺ mmol/l

	1 a 10 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	127,8 (110,2 - 138)	109 (100 - 121)
Não Lipêmicas	130,6 (105 - 140)	111 (101,4 - 121)

Fonte: A autora, 2018

5.8 K⁺

Na análise exploratória não foi observada diferença entre os grupos, somente entre os períodos. Os níveis de K⁺ no sobrenadante dos CH aumentaram com o tempo de armazenamento.

Os dados foram transformados com BOX-COX e após a transformação o histograma distribuição normal.

A ANOVA confirmou diferença entre os períodos, mas não indicou diferença entre os grupos.

Fonte: A autora (2018)

Os resultados foram representados por gráfico tipo box-plot (Gráfico 13) e descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela 8)

Tabela 8 – Resultados mediana K+ mmol/l

	1 a 10 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	14,61 (4,78 - 33,1)	52,05 (18,9 - 79,5)
Não Lipêmicas	11,655 (4,62 - 25,4)	47,1 (19,8 - 69,4)

Fonte: A autora, 2018.

5.9 Cl⁻

O gráfico de perfil não mostrou diferença entre os grupos, somente entre os períodos. À medida em que aumenta o tempo de armazenamento, os resultados de Cl⁻ diminuem no sobrenadante dos CH.

Foi necessária a transformação BOX-COX. ANOVA confirmou diferença entre os períodos, mas não indicou entre os grupos.

Fonte: A autora (2018)

Os resultados foram representados por gráfico tipo box-plot (Gráfico 14) e descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela 9)

Tabela 9 – Resultados mediana Cl⁻ mmol/l

	1 a 10 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	106 (97 - 117)	94 (85 - 104)
Não Lipêmicas	104 (95 - 112)	96 (88 - 105)

Fonte: A autora, 2018.

5.10 Glicose

A análise exploratória mostrou diferença entre os períodos, mas não entre os grupos.

Foi necessária a transformação BOX-COX. Pela ANOVA a diferença entre os períodos foi estatisticamente significativa, mas entre os grupos não.

Fonte: A autora (2018)

Os resultados foram representados por gráfico tipo box-plot (Gráfico 15) e descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela 10)

Tabela 10 – Resultados mediana Glicose mg/dl

	1 a 10 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	436 (322 - 549)	189 (78 - 324)
Não Lipêmicas	429 (295 - 498)	207 (92 - 350)

Fonte: A autora, 2018.

5.11 Lactato

A análise exploratória mostrou diferença entre os períodos, mas não mostrou diferença entre os grupos.

Para esse componente foi necessária a transformação BOX-COX. A ANOVA indicou diferença entre os períodos, mas não entre os grupos.

Fonte: A autora (2018)

Os resultados foram representados por gráfico tipo box-plot (Gráfico 16) e descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela 11)

Tabela 11 – Resultados mediana Lactato mmol/l

	1 a 10 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	10,68 (4,08 - 19,55)	30,15 (22,29 - 40,4)
Não Lipêmicas	10,55 (5,49 - 21,39)	30,6 (21,05 - 38,9)

Fonte: A autora, 2018

5.12 Índices hematimétricos

Foi realizada comparação entre as variâncias dos grupos teste e controle.

5.12.1 HT%

O gráfico 17 mostra aumento do HT% do teste e do controle durante o período de armazenamento.

Fonte: A autora (2018)

O box-plot do desvio padrão dos resultados de HT% do teste e do controle mostrou diferença (Gráfico 18). Pelo teste t de *Student*, a diferença não foi estatisticamente significativa.

Fonte: A autora (2018)

Estão representados os desvios-padrão do HT, sendo a coloração rosa para o grupo teste e a azul para o grupo controle.

Os resultados foram descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela 12)

Tabela 12 – Resultados mediana HT

	1 a 10 dias	11 a 22 dias	23 a 34 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	58,7 (51,6 - 63,9)	61,8 (55,3 - 69,8)	64,3 (56,4 - 71,5)	66,1 (56,6 - 78,3)
Não Lipêmicas	58 (49,4 - 62,4)	60,5 (50,6 - 66,1)	62,7 (53,1 - 67,8)	63,7 (55,9 - 68,8)

Fonte: A autora, 2018.

5.12.2 Hb g/dl

A concentração de Hb g/dl se manteve constante durante o período de armazenamento. (Gráfico 19)

Gráfico 19 – Resultados Hb

Fonte: A autora (2018)

O box-plot do desvio padrão e o teste de *Wilconxon-Mann-Whitney* não mostraram diferença entre o desvio padrão do teste e controle.

Gráfico 20 – Desvio padrão da Hb

Fonte: A autora (2018)

Os resultados foram descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela

21)

Tabela 21 – Resultados mediana Hb

	1 a 10 dias	11 a 22 dias	23 a 34 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	20,2 (17,6 - 22,5)	20,3 (17,5 - 22,6)	20,25 (17,5 - 22,4)	20,05 (17,4 - 24,5)
Não Lipêmicas	19,5 (17,5 - 22)	19,75 (17,6 - 22,4)	19,7 (17,7 - 22,3)	19,55 (17,8 - 22,2)

Fonte: A autora, 2018.

5.12.3VCM fl

Foi observado aumento do VCM do teste e do controle durante o período de armazenamento. (gráfico 22)

Gráfico 22 – Resultados VCM

Fonte: A autora (2018)

O box-plot do desvio padrão mostrou pequena diferença entre o teste e controle, mas não foi considerada estatisticamente significativa pelo teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*.

Os resultados foram descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela

13)

Tabela 13 – Resultados mediana VCM

	1 a 10 dias	11 a 22 dias	23 a 34 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	86,3 (74,7 - 94,5)	91,7 (80,9 - 98,3)	93,95 (85,2 - 102,1)	96,3 (85,90 - 104,5)
Não Lipêmicas	88,2 (66,4 - 97,8)	91,2 (85,5 - 10,21)	93,7 (69,9 - 103)	97,15 (88,8 - 105,3)

Fonte: A autora, 2018.

5.12.4 HCM pg

A HCM não sofreu alteração durante o período de armazenamento. (Gráfico 24)

Gráfico 24 – Resultados HCM

Fonte: A autora (2018)

O box-plot mostrou pequena diferença entre o desvio padrão do teste e controle (Gráfico 25), mas não foi confirmada pelo teste de *Wilconxon-Mann-Whitney*.

Gráfico 25 – Desvio padrão da HCM pg

Fonte: A autora (2018)

Os resultados foram descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela

14)

Tabela 14 – Resultados mediana HCM pg

	1 a 10 dias	11 a 22 dias	23 a 34 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	29,6 (25,1 - 32,3)	30 (25,4 - 32,2)	29,7 (25,6 - 33,1)	30 (25,6 - 31,0)
Não Lipêmicas	30,1 (21,4 - 33,9)	30,3 (27,1 - 33,0)	29,8 (21,3 - 34,3)	30,05 (26,1 - 33,6)

Fonte: A autora, 2018.

5.12.5 CHCM

Não houve diferença entre os resultados do teste e do controle durante o armazenamento.

Os resultados foram descritos com mediana, mínimo e máximo.

(Tabela 15)

Tabela 15 – Resultados mediana CHCM g/dl

	1 a 10 dias	11 a 22 dias	23 a 34 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	34,4 (32,5 - 36,8)	32,3 (30,3 - 34,9)	31,5 (28,9 - 34,5)	30,8 (29,3 - 33,6)
Não Lipêmicas	34,3 (32,2 - 37,6)	32,3 (30,6 - 35,9)	31,7 (29,3 - 34,1)	31,1 (28,5 - 33,5)

Fonte: A autora, 2018.

5.12.6 RDW

Gráfico de perfil mostra poucos indicativos de diferença entre os grupos.

Gráfico 26 – Perfil de resultados RDW

Fonte: A autora (2018)

Foi necessária a transformação BOX-COX. A ANOVA mostrou diferença significativa entre os períodos, mas não mostrou diferença entre os grupos.

Gráfico 27 – Resultados RDW

Fonte: A autora (2018)

No gráfico box-plot foram observados mais valores extremos no grupo teste, desde o primeiro período. (gráfico 27)

Os resultados foram descritos com mediana, mínimo e máximo. (tabela 16)

Tabela 16 – Resultados mediana RDW CV %

	1 a 10 dias	11 a 22 dias	23 a 34 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	14,5 (12,4 - 17,7)	14,3 (12,5 - 18,0)	14,35 (12,4 - 17,9)	15,2 (12,8 - 18,5)
Não Lipêmicas	14,1 (12,5 - 20,1)	14 (12,6 - 16,7)	14 (12,7 - 17,2)	14,3 (13,0 - 17,5)

Fonte: A autora, 2018.

5.13 Curva de fragilidade osmótica

Comparando os resultados, não houve diferença entre o teste e o controle.

Gráfico 28 - Resultados Curva de fragilidade osmótica

Fonte: A autora (2018)

Nota: FO T=fragilidade osmótica do teste; FO C=fragilidade osmótica do controle.

5.14 Hemólise

5.14.1 Hb livre

O gráfico 29 mostrou diferença entre os dois grupos e os quatro períodos. A hemoglobina livre aumenta com o período de armazenamento e o maior aumento se dá nos CH obtidos de doações com lipemia, sendo que os resultados do teste são quase o dobro do valor do controle. A quantidade de Hb livre do período inicial dos CH com lipemia excede a quantidade de Hb livre no quarto período dos CH sem lipemia.

Fonte: A autora (2018)

Os resultados de Hb livre dos testes estão representados na cor vermelha e do controle na cor azul. Os períodos estão representados no eixo x e a Hb livre está representada no eixo y. Há indicativo de diferença entre os dois grupos pois os dados dos grupos estão bem discriminados.

Os dados foram transformados por log e o histograma não rejeitou a hipótese de normalidade.

A ANOVA mostrou diferença entre os grupos e entre os períodos ao nível de 0.05 de significância.

Pelo gráfico box-plot são observados valores extremos no grupo teste. (Gráfico 30).

Fonte: A autora (2018)

Os resultados foram descritos com mediana, mínimo e máximo. (Tabela 17)

Tabela 17 – Resultados mediana Hb livre g/dl

	1 a 10 dias	11 a 22 dias	23 a 34 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	0,010 (0,010 - 1,386)	0,160 (0,028 - 1,047)	0,247 (0,047 - 1,449)	0,369 (0,054 - 1,551)
Não Lipêmicas	0,046 (0,015 - 0,140)	0,072 (0,019 - 0,300)	0,129 (0,031 - 0,284)	0,186 (0,054 - 0,589)

Fonte: A autora, 2018.

A técnica para determinação de Hb livre, descrita por Grilo (2016) utiliza leitura das absorbâncias em 380 e 450 nm para excluir os interferentes. Foi observado aumento da absorbância em 380 nm para a amostras lipêmicas, mas como descrito na metodologia, no cálculo final as absorbâncias dos interferentes são subtraídas.

5.14.2 Grau de hemólise

O gráfico 31 mostra diferença significativa entre os grupos. O percentual de hemólise aumenta com o tempo de armazenamento. O aumento é mais evidente nos CH com lipemia.

Gráfico 31 – Perfil dos resultados de hemólise

Fonte: A autora (2018)

A hemoglobina livre aumenta com o período de armazenamento e o maior aumento se dá nos CH obtidos de doações com lipemia, sendo que os resultados do teste são quase o dobro do valor do controle. (Tabela 18)

Tabela 18 – Resultados mediana Grau de hemólise %

	1 a 10 dias	11 a 22 dias	23 a 34 dias	35 a 42 dias
Lipêmicas	0,205 (0,027 - 2,640)	0,306 (0,046 - 2,011)	0,441 (0,096 - 2,465)	0,593 (0,105 - 2,482)
Não Lipêmicas	0,094 (0,043 - 0,327)	0,140 (0,053 - 0,588)	0,224 (0,058 - 0,532)	0,349 (0,134 - 0,957)

Fonte: A autora, 2018

Das 59 bolsas de CH testadas, 24 apresentaram grau de hemólise superior a 0,8% durante o período de armazenamento, 7 entre 1 e 10 dias, 2 entre 11 e 22 dias, 4 entre 23 e 34 dias e 11 entre 35 e 42 dias de armazenamento. O valor de referência preconizado pela legislação vigente é de 0,8% no último dia de armazenamento. Uma amostra controle apresentou hemólise superior a 0,8% no último período de armazenamento.

Dos 24 CH que apresentaram hemólise superior a 0,8%, 15 foram obtidos de doações com plasma de aspecto leitoso, 2 de intensamente turvos, 5 de moderadamente turvos e 2 de ligeiramente turvo.

Foi necessária a transformação dos dados com a função log. Após a transformação os dados aderiram à distribuição normal.

Pela ANOVA verificou-se diferença entre o grupo Teste e o grupo Controle para ao nível de 0.05 de significância. Também foi observada diferença entre os períodos.

O box-plot mostra grande diferença entre os grupos, com muitos valores extremos no grupo teste. (Gráfico 32)

Fonte: A autora (2018)

6 DISCUSSÃO

6.1 Inspeção visual e dosagem de triglicerídeos

Peffer et al. (2011) verificaram a incidência de concentração normal de triglicerídeos em plasmas com aparência turva, e atribuíram essa discrepância à subjetividade na avaliação da lipemia ou por turbidez devido a outras causas.

Em estudo realizado por Simundic et al.(2009), foram comparados métodos espectrofotométricos semi quantitativo e de inspeção visual para avaliação da lipemia, sendo que em 38% das amostras classificadas visualmente como lipêmicas, não se observou resultados concordantes com espectrofotometria.

Em nosso estudo, quanto à comparação da inspeção visual com a classificação do nível de triglicerídeos, houve 46% de concordância entre o aspecto visual turvo e a dosagem de triglicerídeos, ou seja, bolsas classificadas como leitosas com concentração de triglicerídeos superior a 500 mg/dl, bolsas intensamente turvas com concentração de triglicerídeos entre 200 e 499 mg e bolsas moderadamente turvas com concentração de triglicerídeos entre 175 e 199 mg/dl. Em 36% das bolsas a inspeção visual superestimou a concentração de triglicerídeos. 14/16 plasmas leitosos apresentaram dosagem de triglicerídeos inferior a 500 mg/dl. Dos 13 plasmas classificados como intensamente turvos, 1 apresentou concentração de triglicerídeos inferior a 175 mg/dl, 2 apresentaram concentração de triglicerídeos inferior a 200 mg/dl e 10 apresentaram concentração de triglicerídeos entre 200 e 499 mg/dl. Dos 14 plasmas classificados como moderadamente turvos, 4 apresentaram concentração de triglicerídeos inferior a 175 mg/dl. Isso mostra que o método é inespecífico e pode detectar turbidez de causas não relacionadas à concentração dos triglicerídeos. (Figura 14)

Figura 14 - Inspeção visual x concentração de triglicerídeos nos plasmas lipêmicos

Nº PF por aspecto visual		Nº de PF por concentração de triglicerídeos			
		< 175 mg/dl)	175 a 199 mg/dl)	200 a 499 mg/dl)	>500 mg/dl)
		6	5	37	11
Ligeiramente turvo	6		3	3	
Moderadamente turvo	14	4		10	
Intensamente turvo	13	1	2	10	
Leitoso	26	1		14	11

Fonte: A autora (2018).

No entanto, 90% dos plasmas turvos, separados para a pesquisa, apresentaram resultados de triglicerídeos superiores a 175 mg/dl, demonstrando que a inspeção visual da turbidez é uma técnica sensível para avaliação da lipemia. Essa sensibilidade também se confirma por 91% dos plasmas com dosagens de triglicerídeos maiores do que 500 mg/dl terem apresentado aspecto leitoso.

Plasmas leitosos com coloração rósea podem ocorrer devido à contaminação por hemácias no processamento da bolsa. Para impedir essa contaminação, os extratores automáticos dispõem de sensor óptico, mas a sua sensibilidade pode ser comprometida pela intensa turbidez plasmática, deixando passar hemácias para a bolsa de plasma. Dos 4 plasmas com aspecto róseo, 3 apresentaram hemólise.

Em nosso estudo percebe-se que a inspeção visual detecta turbidez de outras causas, que não a concentração dos triglicerídeos. Não é específica para prever a concentração dos triglicerídeos do doador, mas demonstra ser bastante sensível e adequada para classificar os plasmas no processamento, como adequados ou não para uso.

6.2 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Em estudo de Antonelou et al (2012), houve um aumento gradual das ERO durante o armazenamento. Valores máximos de fluorescência, foram apresentados com 38 dias e reduziram significativamente no último dia de armazenamento. A redução nos níveis de ERO ao final do armazenamento foi atribuída à perda da sonda através da hemólise e a menor atividade de

estearases na hemácias senescentes. A origem das ERO pode ser atribuída à senescência celular, oxidação de Hb, decomposição de lipídios de membrana e, finalmente, a alterações associadas ao metabolismo nas defesas antioxidantes celulares, que contribuem para a redução da sobrevida pós-transfusional.

Diederich et al. (2018) observaram aumento nos níveis intracelulares de ERO em hemácias de pacientes hipertensos, o que poderia ser causa da diminuição da deformabilidade, devido à oxidação das proteínas. Porém citaram uma lacuna no estudo, uma vez que os pacientes usados no estudo eram fumantes, fator que contribui para o estresse oxidativo. O nível de substâncias oxidantes e antioxidantes também não era conhecido.

Em nosso estudo foi identificado aumento da concentração das ERO durante o armazenamento (Gráfico 6). Do primeiro ao terceiro período foram obtidos valores mais altos no teste em relação ao controle, com exceção de uma amostra do grupo controle que no primeiro período mostrou resultado fora da variação, voltando a normalizar no período seguinte, possivelmente por erro analítico pontual.

No quarto período, foram obtidos resultados mais baixos no grupo teste, em comparação ao grupo controle, possivelmente pela perda da sonda, pela hemólise ocorrida nas amostras com lipemia.

Conforme descrito na metodologia, foram utilizadas duas concentrações de *t*-BHP para preparação do controle de qualidade interno. Em todos os experimentos, a fluorescência da amostra sem oxidante foi mais baixa do que a fluorescência das amostras tratadas. Entretanto, não houve um aumento linear na fluorescência à medida em que aumentou a concentração do agente oxidante e para algumas dosagens, a fluorescência foi menor com a maior concentração de *t*-BHP. Como foi utilizada amostra fresca para preparo do controle, pode se atribuir à perda da sonda através da hemólise.

6.3 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Durante o armazenamento ocorre aumento progressivo dos lipídeos oxidados, demonstrado pelo aumento das concentrações de malondialdeído. (CHAUDHARY; KATHARIA, 2012) (D'ALESSANDRO et al., 2012)

Chaudhary e Katharia (2012) observaram relação direta entre a peroxidação lipídica e hemoglobina plasmática.

Os protocolos usados para avaliar as TBARS tem muita variabilidade na especificidade e sensibilidade e são altamente dependentes de fatores como o pH da reação. (MOREL; DICORLETO; CHISOLM, 1984)

O método TBARS não é específico, visto que mede várias substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico.

Não foi observado aumento das TBARS durante o armazenamento. As concentrações mais altas foram obtidas no grupo teste em relação ao controle, podendo indicar uma tendência de maior oxidação nas amostras lipêmicas. (Tabela 4)

Estudando os fatores que podem atuar na formação de TBARS após a estimulação oxidante, foram considerados: composição lipídica da membrana; colesterol e ácidos graxos com mais de duas ligações duplas, mais suscetíveis a lesão oxidativa; o estado antioxidante, incluindo os antioxidantes não-enzimáticos (vitaminas A e E) e enzimáticos (GSH-P, SOD), e oligoelementos que agem como pró-oxidantes (cobre) ou antioxidantes (zinco). (GIRELLI et al., 1994)

6.4 Metemoglobina

Nesta pesquisa foram observados valores extremos em ambos os grupos, mas valores mais altos foram obtidos no grupo teste, mostrando maior tendência de oxidação no grupo teste.

Tomzack (2008) não observou formação estatisticamente significativa de metemoglobina durante o armazenamento dos CH em SAGM durante 42 dias, flutuando dentro da normalidade.

Nos estudos de Fagiolo et al (1986) e Scaroina et al (1989) foram encontrados baixos níveis de metemoglobina durante a preservação de CH, mesmo sem a utilização de soluções aditivas.

6.5 Glicose, pH e lactato

Nas hemácias a principal via de produção de ATP é a glicolítica (Chen; Serrano, 2015), onde uma molécula de glicose é quebrada, gerando duas moléculas de ácido láctico, duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH reduzido. (Hess, 2010). À medida que a glicose é consumida, aumenta o lactato e ocorre redução no pH.

Segundo Hogman & Merymann (1999), o aumento do lactato pode ser rápido, dependendo do meio celular, temperatura, tipo de preservante e taxa de metabolismo. O HCO_3^- é capaz de neutralizar parcialmente o lactato produzido e caso as bolsas de sangue tenham permeabilidade a gases, o CO_2 pode ser liberado e é equilibrada a diminuição do pH. (HÖGMAN; MERYMAN, 1999)

D'Alessandro et al. (2012) encontraram valores médios de lactato' de 20.39 ± 0.9 mmol/l, dobro dos seus níveis basais.

Em estudo de Bardyn et al (2017), os valores no final do armazenamento foram de 5-6 vezes os valores iniciais.

Seghatchian & Krailadsiri (2002) observaram ligeira diminuição do pH, mantendo-se neutro até o 25º dia, diminuindo apenas 0,3 unidades de pH na data de validade.

Em estudo de Bardyn et al (2017), a concentração inicial de glicose foi de 481 (± 33 mg/dL), sendo progressivamente consumida até valores de 180 ± 29 mg/dL, valores compatíveis aos obtidos na pesquisa.

Os resultados de glicose, pH e lactato obtidos em nosso estudo na pesquisa foram concordantes com os descritos na literatura, porém não houve

diferenças entre os dois grupos, sugerindo que não há influência da turvação do plasma no metabolismo da glicose.

6.6 Na⁺, K⁺ e Cl⁻

Em seu estado fisiológico, as bombas catiônicas auxiliam no controle do volume, bombeando Na⁺ para o exterior e K⁺ para o interior da hemácia. (HARMENING, 1992).

Segundo D'Alessandro et al. (2015), pela depleção de ATP o funcionamento da bomba de cátions é comprometido e o gradiente de Na⁺ e K⁺ é alterado. A entrada de Na⁺ é mais intensa do que a saída de K⁺, ocorrendo aumento do volume celular.

A concentração de K⁺ extracelulares podem atingir níveis 5 a 10 vezes maiores que os encontrados no início do armazenamento. A entrada de Cl⁻ na célula, mantém o equilíbrio eletrolítico. GRIMES(1980).

Neste trabalho, foram observados nos sobrenadantes dos CH, diminuição da concentração de Na⁺ e Cl⁻ e aumento da concentração de K⁺ esta mostrou queda estatisticamente significativa entre os períodos de avaliação. O K⁺ aumentou aproximadamente 4 vezes o valor inicial em ambos os grupos. Estes valores estão de acordo com a literatura. Porém não houve diferenças entre os grupos, indicando que não há influência da turvação na bomba de cátions.

6.7 Índices hematimétricos

O VCM aumentou consideravelmente durante o de armazenamento. É uma medida da turgescência sofrida pelas hemácias suspensas em SAGM. Com outras soluções aditivas esse aumento não é observado. (LAGERBERG et al., 2017). Porém não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (Gráfico 23)

Em estudo de Bardyn et al.(2017), o VCM iniciou com média de 89.5 (± 4.3 fl), no 1º dia, aumentando 5.1 fl no 43º, e 7.9 fl no 71º dia de armazenamento. Durante o armazenamento a população de hemácias se torna mais heterogênea, como indicado pelo aumento do RDW, importante marcador da anisocitose.

A variação do RDW reflete o aumento da concentração de esferócitos e da fragmentação das hemácias. Em pacientes com doença renal, valores extremos de RDW correlacionaram-se com a quantidade de equinócitos e acúmulo intracelular de ERO. (ANTONELOU et al., 2012)

Na pesquisa foi observado aumento do RDW e embora a ANOVA não tenha mostrado diferença estatisticamente significativa, o box-plot mostra tendência de resultados extremos no grupo teste. (Gráfico 27)

Foi observado aumento do HT% do teste e do controle, sem diferença significativa entre os dois. Esse aumento não é real, mas metodológico. A determinação desse parâmetro em analisador automático é realizada através da multiplicação da contagem de hemácias pelo VCM dividido por 10. Como durante o armazenamento não há diferença significativa da contagem das hemácias e é observado aumento do VCM os valores encontrados são mais altos do que seriam se fosse utilizada centrífuga de micro hematócrito.(ACKER et al.2012)

6.8 Curva de fragilidade osmótica

Segundo D'Alessandro et al (2012) ocorre um aumento na fragilidade osmótica das hemácias armazenadas, fenômeno semelhante ao que ocorre na esferocitose hereditária. Essa tendência à hemólise se dá pela diminuição da relação superfície/volume da célula que ocasiona diminuição na capacidade de responder ao estresse osmótico, dados não avaliados neste trabalho.

Em nosso estudo foi avaliada a fragilidade osmótica apenas no período inicial de armazenamento, sem diferença significativa nos resultados do teste e do controle.

6.9 Hemólise e Hb livre

Neste estudo observou-se graus de hemólise médios de 0,094; 0,140; 0,224 e 0,349 nos 4 períodos entre 1 e 42 dias para o grupo controle. Para o grupo de CH com plasmas turvos os valores foram: 0,20; 0,306; 0,441 e 0,593.

No estudo de Bardyn, et al (2017), foi observado grau de hemólise médio de $0,079 \pm 0,017\%$ no 1º dia, $0,28 \pm 0,06\%$ no 36º dia e $0,44 \pm 0,14\%$ no 43º dia, valores próximos aos encontrados nesta pesquisa. A microvesiculação e hemólise seguiram a mesma tendência para estes autores. O número de microvesículas (MV) aumentou linearmente a partir do 1º ao 36º dia (aumento de 2,4 vezes), aumentou exponencialmente no 43º dia (4,4 vezes) e 71,3 vezes no 71º. A liberação das MVs e a hemólise, refletem o acúmulo de resíduos no interior da hemácia e a aparição de lesões irreversíveis no citoesqueleto levando à desestabilização da membrana.

No estudo de Dimeski et al (2005) amostras leitosas, com concentração alta de lipídeos, mostraram relação direta com o índice de hemólise. Como já foi descrito, em doenças metabólicas nas quais há aumento dos lipídeos plasmáticos, a composição de lipídeos da membrana da hemácia é alterada, levando à fragilidade da célula.

Bashir et al.(2013) observaram em 24 h, grau de hemólise superior a 0,8% nos CH submetidos a inativação de patógenos e reconstituídos para HT entre 50 e 55%, com plasma grosseiramente lipêmico. O processo de inativação aumenta os níveis de hemólise, mas em comparação com a reconstituição com plasmas sem lipemia, os valores foram o dobro. Os autores observaram redistribuição das lipoproteínas quando o plasma fresco permaneceu *overnight* em temperatura de 2 a 6°C, sendo percebida camada de quilomícrons na parte superior do tubo contendo a amostra. Maior grau de hemólise foi observado quando CH foi reconstituído com porção superior do tubo, sugerindo que a mesma foi causada pelos quilomícrons. CH de doações lipêmicas mostraram aumento da hemólise, apesar de os triglicerídeos e colesterol estarem dentro dos valores normais.

Durante o armazenamento, as hemácias têm sua capacidade antioxidante limitada e a hiperlipidemia aumenta a peroxidação dos lipídeos,

podendo causar danos permanentes nas membranas celulares. A membrana da hemácia é mais vulnerável à peroxidação devido à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e à presença de Hb . As ligações duplas desses ácidos graxos são instáveis, tornando-os suscetíveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio. (BASHIR et al., 2013)

Em nosso estudo não foi observada relação direta entre a concentração plasmática de triglicerídeos e o grau de hemólise. Mas no estudo de (De Laleijne-Liefting et al, 2017), 81% dos CH obtidos de doações com lipemia mostraram valores superiores. Em 21 de 26 doadores com lipemia, a hemólise no 42º dia de armazenamento foi superior a 0,4%, enquanto no grupo controle a hemólise média foi inferior a esse valor. Foi observada maior ocorrência de plasma lipêmico em doações de homens acima de 50 anos com índice de massa corpórea (IMC) superior a 25.

Longini & Johnson (1943) atribuíram aos ácidos graxos livres o aumento da fragilidade das hemácias de cães após alimentação rica em gordura

Também foi reportado por Schulzki e Reinhard (2010) apud Bashir et al (2013) que os CH de doadores lipêmicos aumentam a hemólise durante o armazenamento, independente do meio de suspensão utilizado.

O colesterol confere rigidez às membranas e segundo Cantin et al.(1992), a membrana da hemácia de pacientes com deficiência de LPL (lipoproteína lipase) apresenta maior fluidez devido à menor concentração de colesterol e uma composição diferente de fosfolipídios. Não foi observada diferença quantitativa de fosfolipídios, entretanto notou-se diminuição na relação colesterol/fosfolipídeos da membrana da hemácia do grupo teste. Nas hemácias de pacientes com deficiência de LPL foi observada diminuição nas concentrações de lisofosfatidilcolina e esfingomielina, enquanto que a concentração relativa de fosfatidilcolina foi aumentada. No plasma foi observado o inverso. O colesterol tem maior afinidade pela esfingomielina, em comparação com a fosfatidilcolina. Além da diminuição da esfingomielina, a transferência de colesterol da membrana da hemácia para as lipoproteínas é um fator importante para o aumento da fluidez da membrana. 69% do colesterol dos pacientes com deficiência de LPL está presente nos quilomícrons, enquanto pequena parcela está ligada ao LDL e ao HDL. Pode haver depleção do colesterol da membrana da hemácia a partir da transferência para as lipoproteínas pobres em colesterol.

Grande quantidade de colesterol também pode ser necessária para manutenção da estabilidade dos quilomícrons e VLDL.

Em nossos resultados foi observada diferença significativa entre a concentração de Hb livre e hemólise do teste e do controle, mas não houve correlação com a hemólise e o aspecto visual ou concentração de triglicerídeos.

A maior ocorrência de hemólise deu-se com as doações com plasmas moderadamente turvos a leitosos (92%) em comparação com os ligeiramente turvos (8%), indicando uma maior tendência à hemólise.

Os CH de mesma doação de 3 dos 4 plasmas leitosos e com coloração rósea, apresentaram no primeiro período de armazenamento hemólise superior a 0,8%, máximo preconizado pela legislação vigente no último dia de armazenamento. Isso mostra que em doações cujos plasmas têm essa característica, a qualidade do CH está alterada, comprometendo a eficácia transfusional.

Os CH de plasmas moderadamente turvos, apresentaram hemólise superior a 0,8% no terceiro (2/5) e quarto (3/5) períodos, enquanto os de intensamente turvos a leitosos já apresentaram a partir do primeiro período.

Não foi observada relação direta entre a concentração de triglicerídeos ou turbidez do plasma com a hemólise, mas observou-se que a lipemia afeta negativamente a qualidade do hemocomponente, podendo comprometer a sua eficácia e segurança transfusional.

6.10 Características que interferem na qualidade dos hemocomponentes

Mesmo havendo a padronização no processo produtivo, ocorre variabilidade na qualidade dos hemocomponentes devido a diferentes características do doador. Mesmo com o cumprimento dos critérios para doação de sangue, a população de doadores não é homogênea e a variabilidade pode estar envolvida na capacidade de manutenção do sistema óxido-redutor. Alta concentração sérica de ácido úrico está associada a hemácias com melhores condições, considerando acúmulo de cálcio intracelular, alterações morfológicas irreversíveis e capacidade total antioxidante. Foi observada diminuição na

carbonilação das proteínas plasmáticas e da degradação da Banda 3. Houve aumento significativo das ERO em unidades com níveis baixos de ácido úrico. (TZOUNAKAS et al., 2015)

A heterogenicidade do sangue total devido às diferenças dos doadores, a padronização dos hemocomponentes é um desafio. Um exemplo é o conteúdo de Hb de um CH pode variar muito, considerando mesmo volume de doação e Hb do doador. É necessário compreender a variabilidade existente entre os hemocomponentes produzidos por diferentes métodos e entre os produzidos pelo mesmo método. Embora as diferenças sejam pequenas, não podem ser considerados iguais frente ao tempo de armazenamento e desfechos clínicos. (ACKER et al., 2014)

7 CONCLUSÃO

A lipemia interfere na qualidade dos CH durante o armazenamento.

Alguns parâmetros como ERO e TBARS não mostraram diferença estatisticamente significativa, mas percebeu-se tendência de valores mais altos nos CH de doações lipêmicas. A hemólise última etapa da lesão de armazenamento foi o parâmetro confirmatório do comprometimento da qualidade dos CH do grupo teste.

Um novo protocolo de tempo de armazenamento de hemocomponente obtido de doação com lipemia não pode ser definido, mas foram sugeridas estratégias para o processamento, controle de qualidade, modificação e distribuição desses hemocomponentes:

- Na ocorrência de plasma ligeiramente turvo, os respectivos CH serão liberados normalmente, submetidos à inspeção visual no momento da distribuição.
- CH de plasmas moderadamente turvos, serão liberados com indicativo de “distribuição prioritária” pois em nosso estudo esses CH só apresentaram hemólise superior ao preconizado pela legislação vigente, nas últimas semanas de armazenamento.
- CH de plasmas intensamente turvos a leitosos devem ser direcionados ao laboratório de CQ, onde após determinação do grau de hemólise deverão ser classificados como inadequados e descartados ou adequados e distribuídos prioritariamente.
- Hemocomponentes de plasma com aspecto leitoso e róseo, por presença de hemólise deverão ser descartados, pelo desvio de qualidade evidente.
- Como os procedimentos de leucorredução, lavagem e irradiação estão sujeitos à hemólise, só deverão ser realizados em CH de doações com plasma límpido a ligeiramente turvo.

Foi elaborado guia para inspeção visual de lipemia em PF, que constitui ferramenta para auxiliará na conduta dos profissionais da hemorrede frente a doações com lipemia.

As estratégias sugeridas poderão assegurar a distribuição de hemocomponentes com eficácia terapêutica, minimizando o descarte do CH e ocorrência de reações transfusionais.

8 PERSPECTIVAS

Pela impossibilidade encontrada na avaliação das bolsas coletadas com CPDA1, como constava no projeto inicial, sugerimos novas avaliações futuras. Estas com quantidade maior de plasma residual, em comparação com as bolsas CPD SAG M, possivelmente sofreriam maior interferência da lipemia.

Mais estudos acerca deste assunto faz-se necessário, pois existem poucas publicações a respeito da lipemia e sua relação com as lesões de armazenamento nos CH. Também não há consenso quanto à utilização de outros hemocomponentes (plasma, crioprecipitado e concentrados de plaquetas) com lipemia.

Novas publicações alertam sobre o impacto da variabilidade do doador na qualidade dos hemocomponentes, sendo assim, mesmo processos já padronizados geram variabilidade de hemocomponentes. Sugerimos, portanto estudos futuros que controlem as fontes de variações do doador, através da busca de amostra mais homogênea e aumento do N amostral.

REFERÊNCIAS

AABB, Technical manual. 18th ed. Bethesda: AABB, 2014.

ACKER, J. P. et al. A quality monitoring program for red blood cell components: In vitro quality indicators before and after implementation of semiautomated processing. **Transfusion**, v. 54, n. 10, p. 2534–2543, 2014.

ACKER, J. P.; M.CROTEAU, I.; YI, Q. L. An analysis of the bias in red blood cell hemolysis measurement using several analytical approaches. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 21–23, p. 1746–1752, 2012.

AMERICAN RED CROSS. **Visual Inspection Reference Guide**, 2006.

ANTONELOU, M. H. et al. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: A time-course evaluation from shape to proteome. **Journal of Proteomics**, v. 76, p. 220–238, 2012.

ANTONELOU, M. H.; SEGATCHIAN, J. Insights into red blood cell storage lesion: Toward a new appreciation. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 55, n. 3, p. 292–301, 2016.

BABAEV, A.; POZZI, F. Storage of Red Blood Cells and Transfusion- Related Acute Lung Injury. **Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine**, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2014.

BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. A Direct Relationship between Adenosine Triphosphate-level and in vivo Viability of Erythrocytes. **Nature**, v. 196, p. 952–953, 1962.

BARDYN, M. et al. Red blood cells ageing markers: A multi-parametric analysis. **Blood Transfusion**, v. 15, n. 3, p. 239–248, 2017.

BARDYN, M.; TISSOT, J. D.; PRUDENT, M. Oxidative stress and antioxidant defenses during blood processing and storage of erythrocyte concentrates. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 25, n. 1, p. 96–100, 2017.

BASHIR, S. et al. Lipaemic plasma induces haemolysis in resuspended red cell concentrate. **Vox Sanguinis**, v. 104, n. 3, p. 218–224, 2013.

BELIZAIRE, R. M. et al. Microparticles from stored red blood cells activate neutrophils and cause lung injury after hemorrhage and resuscitation. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 214, n. 4, p. 648–655, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria de consolidação nº 05 de 28 de setembro de 2017. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília-DF, 03 de out 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html

BRASIL. Ministério da Saúde. **Técnico em hemoterapia: livro texto**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para o uso de Hemocomponentes**. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BURTIS, CARL A.; ASHWOOD, E. R. Lipídeos, apolipoproteínas e lipoproteínas. In: **Tietz Fundamentos de Química Clínica**. [s.l: s.n.]. p. 368–371.
CANADIAN BLOOD SERVICES.
http://www.health.gov.nl.ca/health/bloodservices/pdf/visual_inspection.pdf.

CANTIN, B. et al. Alterations in erythrocyte membrane lipid composition and fluidity in primary lipoprotein lipase deficiency. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1139, n. 1–2, p. 25–31, 1992.

CHAUDHARY, R.; KATHARIA, R. Oxidative injury as contributory factor for red cells storage lesion during twenty eight days of storage. **Blood Transfusion**, v. 10, n. 1, p. 59–62, 2012.

COVAS, D.T.; UBIALI, M.E.; SANTIS, G. C. **Manual de Medicina Transfusional**. 2a. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

CHEN, D.; DEVINE, D.V., SERRANO, K. Introducing the red cell storage lesion. **Vox Sanguinis**, v. 109, p. 3, 2015.

D'ALESSANDRO, A. et al. Time-course investigation of sagem-stored leukocyte-filtered red blood cell concentrates: From metabolism to proteomics. **Haematologica**, v. 97, n. 1, p. 107–115, 2012.

D'ALESSANDRO, A. et al. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. **Transfusion**, v. 55, n. 1, p. 205–219, 2015.

DE LALEIJNE-LIEFTING, L. et al. **Evaluation of donor characteristics of lipemic whole blood donations**. 2017

DIEDERICH, L. et al. On the effects of reactive oxygen species and nitric oxide on red blood cell deformability. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. May, p. 1–14, 2018.

DIMESKI, G; MOLLEE, P; CARTER, A. Increased Lipid Concentration Is Associated with Increased Hemolysis. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2423–2425, 2005.

FAGIOLO, E. et al. Biochemical parameters to access viability of blood storage for transfusional use. **Folia Hematologica**, Leipzig, v.113, p.783-789, 1986.

FRENES, P. S. et al. Es útil la prueba de lipemia predonación para la selección de donantes de sangre? **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y**

Hemoterapia, v. 30, n. 3, p. 265–272, 2014.

GIRELLI, D. et al. Factors affecting the thiobarbituric acid test as index of red blood cell susceptibility to lipid peroxidation: a multivariate analysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 227, n. 1–2, p. 45–57, 1994.

GREER JP, FOERSTER J, RODGERS GM, ET AL. Destruction of erythrocytes. In: **Wintrobe's clinical hematology**. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 267 a 276.

GRILO, K.T.M. **Determinação da concentração de hemoglobina livre em Concentrados de hemácias pela espectrofotometria direta: método de Harboe**. Tese (Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

GRIMES, A. Some acquired defects of red cells. In: **Humann red cells metabolism**. 1 ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1980. p. 276–289.

HARMENING, D. **Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão**. Rio de Janeiro. RJ: Editora Revinter, 1992.

HENNEBERG, R. **Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de pacientes de hemoglobina S**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

HERMANN, P. B. **Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em crianças com doença falciforme antes e durante o tratamento com hidroxiuréia**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

HESS, J. R. Red cell changes during storage. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 43, n. 1, p. 51–59, 2010.

HOD, E. A. et al. Transfusion of red blood cells after prolonged storage produces harmful effects that are mediated by iron and inflammation. **Blood**, v. 115, n. 21, p. 4284–4292, 2010.

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

HOROWITZ JF, K. N. The elevation of ingested lipids within plasma chylomicrons is prolonged in men compared with women. **J Nutr**, v. 36, p. 1498–1503, 2006.

KLJUCHNIKOV, S. et al. Haemolysis in adult and neonatal erythrocytes caused by autoxidation of lipid emulsion (Intralipid). **Acta Pædiatrica**, v. 82, n. 4, p. 348–351, 1993.

LAGERBERG, J. W. et al. Prevention of red cell storage lesion: A comparison of five different additive solutions. **Blood Transfusion**, v. 15, n. 5, p. 456–462, 2017.

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

LONGINI, J; JOHSON, V. Increased red blood cell fragility after fast ingestion. **American Physiological Society**, p. 349–353, 1943.

MOREL, D. W.; DICORLETO, P. E.; CHISOLM, G. M. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. **Arteriosclerosis**, v. 4, n. 4, p. 357–364, 1984.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 168–178, 2007.

NAOUM, P.C. RADISPIEL, J.; MORAES, M. S. Dosagem espectrométrica de meta-hemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 26, n. 1, p. 19-22, 2004.

NIKOLAC, N. Lipemia: Causes, interference mechanisms, detection and management. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 1, p. 57–67, 2014.

PEFFER, K. et al. Turbid plasma donations in whole blood donors: Fat chance? **Transfusion**, v. 51, n. 6, p. 1179–1187, 2011.

PROVIDENCE, W. C.; RI, I. Discussion. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 214, n. 4, p. 656–657, 2012.

RACEK, J. et al. What is the source of free radicals causing hemolysis in stored blood? **Physiological Research**, v. 50, n. 4, p. 383–388, 2001.

REDE DE SERVIÇOS TECNOLÓGICOS PARA SANGUE E HEMODERIVADOS. **Manual para controle da qualidade do sangue total e hemocomponentes**. São Paulo, Redsang-Sibratec, 2011.

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.

SEGHATCHIAN, J.; KRAILADSIRI, P. Red cell storage lesion assessed by the levels of potassium, haemoglobin and Annexin V in supernatants. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 26, n. 2, p. 139–143, 2002.

SILVA, D. G. H. et al. Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies.

Free Radical Biology and Medicine, v. 65, p. 1101–1109, 2013.

SIMUNDIC, A. M. et al. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: Can we rely on a human eye? **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 11, p. 1361–1365, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Arquivos Brasileiros de Cardiologia: Atualização das Diretrizes Brasileiras de Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose. Rio de Janeiro, v.109, n.2, 2017.

STRYER, L. Introdução ao estudo da membranas biológicas. In: **Bioquímica**. 3 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1992. p. 231–252.

TAKATA, R. T. et al. Primeiro relato de uma criança brasileira portadora da mutação G188E do gene da lipoproteína lipase. **Revista Paulista de Pediatria**, 2010.

TOMCZAK, A.C.T.Q. **Estudos sobre o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias**. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

TZOUNAKAS, V. L. et al. Uric acid variation among regular blood donors is indicative of red blood cell susceptibility to storage lesion markers: A new hypothesis tested. **Transfusion**, v. 55, n. 11, p. 2659–2671, 2015.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

WALSKI, T et al. Individual Osmotic Fragility Distribution: A New Parameter for Determination of the Osmotic Properties of Human Red Blood Cells. **BioMed Research International**. v. 2014, 6 p.

ZIMRING, JC; SPITALNIK, S. Large retrospective effects, clear differences in animals, and multiple negative randomised controlled trials: this is exactly how it is supposed to work. **Blood Transfusion**, v. 15, p. 104–106, 2017.

APÊNDICE

Comitê de ética

HOSPITAL DO
TRABALHADOR/SES/PR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto da lipemia na qualidade dos concentrados de hemácias durante o armazenamento

Pesquisador: ADRIANA NASCIMENTO DE ARAUJO BUCHMANN

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 48819415.6.0000.5225

Instituição Proponente: SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.304.496

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa refere que os concentrados de hemácias, cuja transfusão melhora a oxigenação tecidual, a volemia e viscosidade do sangue, passam por alterações bioquímicas e morfológicas durante o armazenamento. O estudo pretende avaliar os critérios de qualidade dos concentrados de hemácias lipêmicos, por meio da análise dos marcadores de lesões de estocagem dos produtos sob estocagem.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a relação da lipemia nos padrões de qualidade de concentrados de hemácias CPDA-1 e SAG-Manitol durante o armazenamento; Estabelecer faixa de corte para o descarte dos concentrados de hemácias; Avaliar valor preditivo positivo do teste visual.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Garantia da distribuição de concentrados de hemácias com segurança e eficácia para o receptor.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há comentários/considerações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os termos de apresentação obrigatória.

Endereço: Avenida República Argentina nº 4406 - Bloco Centro de Estudos

Bairro: Novo Mundo

CEP: 81.050-000

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3212-5871

E-mail: cepht@sesa.pr.gov.br

HOSPITAL DO TRABALHADOR/SES/PR

Continuação do Parecer: 1.304.496

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências e/ou inadequações.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_578903.pdf	16/10/2015 12:09:19		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoAdrianaNdeABuchmannCEP.docx	26/08/2015 18:43:49	ADRIANA NASCIMENTO DE ARAUJO BUCHMANN	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	26/08/2015 18:43:37	ADRIANA NASCIMENTO DE ARAUJO BUCHMANN	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoAdriana.pdf	26/08/2015 18:43:22	ADRIANA NASCIMENTO DE ARAUJO BUCHMANN	Aceito
Folha de Rosto	rosto.pdf	26/08/2015 18:39:53	ADRIANA NASCIMENTO DE ARAUJO BUCHMANN	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 30 de Outubro de 2015

Assinado por:
adonis nasr
(Coordenador)

Endereço: Avenida República Argentina nº 4406 - Bloco Centro de Estudos

Bairro: Novo Mundo

CEP: 81.050-000

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3212-5871

E-mail: cepht@sesa.pr.gov.br

Guia para inspeção visual de lipemia em PFC

Leitosos e róseos

Descartar PFC e CH

Leitosos

Descartar PFC e separar CH para CQ

Intensamente turvos

Moderadamente turvos

Descartar PFC e identificar CH para "distribuição prioritária"

Ligeiramente turvos

Descartar PFC e liberar CH

Límpidos

Liberar PFC e CH