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

FLÁVIA NAVES GIVISIEZ

Avaliação da qualidade de concentrados de hemácias
submetidos a temperaturas inadequadas de transporte

Ribeirão Preto
2018

FLÁVIA NAVES GIVISIEZ

Avaliação da qualidade de concentrados de hemácias
submetidos a temperaturas inadequadas de transporte

Versão corrigida

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kelen Cristina Ribeiro
Malmegrim de Farias

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.

Ficha Catalográfica

G539a

Givisiez, Flávia Naves

Avaliação da qualidade de concentrados de hemácias submetidos a temperaturas inadequadas de transporte./ Flávia Naves Givisiez – Ribeirão Preto, 2018.

146 f.; 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: Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias

1. Concentrado de hemácias. 2. Transporte.
3. Temperatura. 4. Controle de qualidade

CDU 616.15-045.85

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Flávia Naves Givisiez

Título: Avaliação da qualidade de concentrados de hemácias submetidos a temperaturas inadequadas de transporte.

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

Área de concentração: Hemoterapia

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof . Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Prof . Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Prof . Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação aos meus amados pais Célio e Angela
e aos meus queridos pais emprestados João Batista e Teresinha.
Meus maiores exemplos... de determinação, respeito,
humildade, honestidade e amor ao trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Gratidão! A Deus que me ilumina e fortalece sempre.

A todas as pessoas que tornaram possível este trabalho, amigos, colegas e, em especial, aos doadores de sangue.

Ao Eduardo, meu amigo, companheiro amado de todos os dias, e à Mariana, amor em forma de filha, pela ajuda incansável e compreensão por minhas ausências.

À minha mãe Angela e ao meu pai Célio, que sempre me fizeram acreditar em mim mesma e que me contagiaram com essa paixão por nossa profissão.

Aos meus queridos pais-sogros, Teresinha e João Batista, pelo apoio e torcida gostosa.

Aos meus irmãos, Tyta, Digo e Guto, alicerces de minha vida.

À toda minha família, cunhados e sobrinhos pela paciência, amor e confiança.

À Noemia, por cuidar de mim e de minha família com tanto carinho.

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

À Fundação *HEMOMINAS* por sempre me proporcionar capacitação técnica e profissional.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias, professora nata, que me acolheu, direcionou e transformou meu simples projeto em pesquisa.

À Maria Angela Ottoboni, co-orientadora e amiga do coração, pelo suporte técnico e emocional, pelas idéias instigantes, sugestões, ricas discussões e vibração positiva.

À Dr.^a Júnia Mourão Cioffi e ao Dr. Fernando Basques, pelo estímulo, ideias propostas e desafios compartilhados.

À equipe da Gerência de Controle de Qualidade, que me apoiou e aceitou com tanto carinho nessa minha nova função, transformando em alegria os meus dias de testes.

Aos colegas e amigos da TEC, pela compreensão e ajuda.

À Dr.^a Priscila Rodrigues pelo otimismo e apoio às necessidades deste projeto.

Aos amigos e colegas do setor de Produção e Fracionamento e do laboratório de Hematologia do Hemocentro de Belo Horizonte, que abriram as portas para que este trabalho pudesse ocorrer sem transtornos.

À Inês Yunes e Ana Cacilda, sempre prontas a me ajudar na busca de literatura.

Aos meus colegas do mestrado, companheiros de aprendizados, experiências e casos. É sempre maravilhoso compartilhar a vida com vocês.

À Raquel Botelho e Vinicius Moreno, pela prontidão em solucionar e apoiar.

À Ana Paula, pela companhia agradável e por todos ensinamentos, do laboratório e da vida.

Ao Matheus e Anna Luiza, por me acompanharem nos testes e digitações.

À Angela, Gabriela, Valéria e Katia Grilo, pelas maravilhosas dicas e suporte incondicional.

À Ana Cristina e ao Marcelo Lima, meu preceptor, pela disponibilidade amiga.

À Dr.^a Eugênia M. Amorim Ubiali e Dr.^a Karen Prata pelas valiosas sugestões.

"Não aprende da diversidade
quem só quer ouvir o que acredita"

Frei Cláudio van Balen

RESUMO

Givisiez FN. Avaliação da qualidade de concentrados de hemácias submetidos a temperaturas inadequadas de transporte. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 2018.

Segundo a legislação brasileira e normas internacionais, os concentrados de hemácias (CH) devem ser mantidos sob controle rigoroso de temperatura, armazenados de 2 a 6°C e transportados de 1 a 10°C, por até 24 horas. Entretanto, não existem evidências científicas de que estes valores sejam relevantes para manutenção de qualidade, segurança e viabilidade dos CH. O objetivo deste trabalho foi monitorar parâmetros laboratoriais *in vitro* em dois tipos de CH (CPDA-1, preparado pela metodologia do plasma rico em plaquetas e em SAGM preparado pelo *buffy-coat*), no decorrer de condições normais de armazenamento e em temperaturas de transporte inadequadas. O trabalho foi executado em três etapas. Na primeira etapa, foram estabelecidos os valores de referência para os dois tipos de CH armazenados em condições normais, através de testes laboratoriais semanais para determinação de hematócrito, hemoglobina total, hemoglobina plasmática, grau de hemólise, glicose, lactato, desidrogenase láctica e potássio. Na segunda etapa, amostras de CH foram submetidas a temperaturas entre -2°C e +1°C, ou entre 11 e 15°C, por um período de 6 horas ou 24 horas, no 14º dia de armazenamento. Na terceira etapa os CH foram expostos a condições de estresse extremo, submetendo-os a temperaturas entre -2°C e +1°C ou entre 22°C e 25°C, por período de 48 horas. Os resultados dos testes laboratoriais das segunda e terceira etapas foram comparados com controles e aos valores de referência da primeira etapa. Nas unidades de CH em CPDA-1 foram encontrados valores significativamente mais elevados de potássio, hemoglobina livre, grau de hemólise, lactato e LDH do que nos CH em SAGM, enquanto que a concentração de glicose foi muito mais baixa em CH-CPDA1. Na 2ª etapa, exposições por até 24 horas em temperaturas de até -2°C ou até 15°C não causaram diferenças significativas nas dosagens de hemoglobina livre, grau de hemólise, glicose, lactato, LDH e potássio quando comparados aos controles. Amostras de CH-CPDA1, quando avaliadas imediatamente após período de 48 horas de exposição, apresentaram resultados de glicose superiores aos controles quando submetidas a -2°C e inferiores ao controle quando a 25°C. Exposições por até 48 horas em temperaturas de até -2°C ou até 25°C não causaram diferenças significativas na hemoglobina livre, grau de hemólise, lactato, LDH e potássio quando comparados aos controles, nos dois tipos de CH. Nesse trabalho foram elaborados perfis padrão de parâmetros laboratoriais para dois tipos de CH. Estes perfis padrão constituirão uma ferramenta de grande utilidade para controle de qualidade e monitoramento das lesões de armazenamento em bolsas de CH produzidas na Fundação HEMOMINAS. Nossos resultados demonstraram que bolsas dos dois tipos de CH submetidas a temperaturas de -2°C ou 14°C por períodos inferiores a 24 horas não apresentam alterações significativas nos parâmetros laboratoriais avaliados *in vitro* e permitiram algumas elaboramos recomendações práticas e importantes para serviços de hemoterapia. Entretanto, ainda não existem ainda evidências suficientes na literatura para modificação das normas de temperatura e tempo de transporte atualmente preconizadas pela legislação nacional e internacional.

Palavras chaves: Concentrado de hemácias, Transporte, Temperatura, Controle de qualidade, hemólise

ABSTRACT

Givisiez FN. Assessment of the quality of red blood cell concentrates submitted to inadequate transport temperatures. (Master Degree) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 2018.

The Brazilian legislation and international guidelines require that red blood cell concentrates (RBC) are kept under a strict temperature control, stored between 2 and 6°C and transported between 1 and 10°C for up to 24 hours. Nevertheless, there is no scientific evidence that these values are relevant to maintain RBC quality, safety and viability. This study was performed in order to monitor *in vitro* laboratorial variables of two different RBC types (CPDA-1, prepared using the platelet-rich plasma methodology, or SAGM, prepared using the buffy-coat) stored under normal conditions or under inadequate temperatures during transportation. The study had three phases. In the first phase, weekly laboratorial tests were performed to establish the reference values of hematocrit, total hemoglobin, plasma hemoglobin, rate of hemolysis, glucose, lactate, lactic acid dehydrogenase (LDH) and potassium, for each of the RBC types stored under normal conditions. In the second phase, RBC samples were submitted to temperatures between -2°C and +1°C, or between 11 and 15°C, for 6 hours or 24 hours, on the 14th storage day. Laboratorial test results were compared to a control group (2-6°C) and to the reference values established in the 1st phase. In the third phase, RBCs were exposed to extreme stress, i.e., temperatures between -2°C and +1°C or between 22°C and 25°C, for 48 hours, and the laboratory test results were compared to a control group. CPDA1-RBC had higher levels of potassium, free hemoglobin, rate of hemolysis, lactate and LDH compared to SAGM-RBC, whereas glucose was significantly lower in CPDA1. In the second phase, exposure for up to 24 hours in temperatures until -2°C or 15°C had no effect on free hemoglobin, rate of hemolysis, glucose, lactate, LDH and potassium when compared to control. CPDA1 samples right after the 48-h exposure had higher glucose levels than controls when kept at -2°C and lower than control if exposed to 25°C. Exposures up to -2°C or 25°C for up to 48 hours had no effect on free hemoglobin, rate of hemolysis, lactate, LDH and potassium when compared to control groups, both for CPDA1-RBC and SAGM-RBC. In this study, it was established standards for laboratory analyses for two different RBC types. Such standards will comprise valuable and useful tools for the quality control and monitoring of storage lesions of RBC units produced by Fundação HEMOMINAS. Our results demonstrate that units from both RBC types submitted to -2°C or 14°C for up to 24 hours had no significant changes in *in vitro* laboratory variables and allow some practical and important recommendations for hemotherapy services. Nevertheless, there are not enough evidences in the literature to support changes in the current guidelines for transportation recommended by national and international legislation.

Keywords: Hemolysis, Quality control, Red blood cell concentrate, Transportation, Temperature.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - Brasil

BC – *buffy-coat*

CH – concentrado de hemácias

CPD – ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato, dextrose

CPDA-1 – citrato, fosfato, dextrose, adenina

FH – Fundação *HEMOMINAS*

Hb- hemoglobina

Ht- hematócrito

MS – Ministério da Saúde - Brasil

nm - nanômetro

PRP – plasma rico em plaquetas

SAG – salina-adenina- glicose

SAGM- salina-adenina-glicose-manitol

UFH – unidades da Fundação *HEMOMINAS*

VCM – volume corpuscular médio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Requisitos dos órgãos reguladores para controle de qualidade em concentrados de hemácias.	24
Tabela 2 - Requisitos dos órgãos reguladores para controle de qualidade em concentrados de hemácias com camada leucoplaquetária removida.....	25
Tabela 3 – Condições para transporte de sangue total e componentes.....	28
Tabela 4 - Delineamento experimental de trabalhos que avaliaram efeitos do transporte inadequado sobre a qualidade de concentrados de hemácias.....	32
Tabela 5 - Resultados de trabalhos que avaliaram efeitos do transporte inadequado sobre a qualidade e parâmetros laboratoriais de concentrados de hemácias.	34
Tabela 6 - Planejamento da segunda etapa.....	47
Tabela 7 - Planejamento da terceira etapa.	52
Tabela 8 - Média e intervalo de confiança de 95% para hemoglobina total (g/dL) e hematócrito (%) em CH-CPDA1.....	61
Tabela 9 - Média e intervalo de confiança de 95% para hemoglobina total (g/dL) e hematócrito (%) em CH-SAGM.	61
Tabela 10 - Perfil padrão de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em CH-CPDA1: média e intervalo de confiança de 95%, a cada semana.....	63
Tabela 11 - Perfil padrão de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em CH-SAGM: média e intervalo de confiança de 95%, a cada semana.	65
Tabela 12 - Perfil padrão de potássio (mmol/L), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e glicose (mg/dL) em CH-CPDA1: média e intervalo de confiança de 95%	68
Tabela 13 - Perfil padrão de potássio (mmol/L), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e glicose (mg/dL) em CH-SAGM: média e intervalo de confiança de 95%.....	71
Tabela 14 - Comparação de médias entre os grupos CH-CPDA1 D35 e CH-SAGM D42....	74
Tabela 15 - Hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) em amostras CH-CPDA1: comparação dos cinco grupos da segunda etapa.	76
Tabela 16 - Hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) em amostras CH-SAGM, no dia D14: comparação dos cinco grupos c.	76
Tabela 17 - Hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em amostras CH-CPDA1: comparação dos cinco grupos da segunda etapa	79
Tabela 18 - Hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em amostras CH-SAGM: comparação dos cinco grupos da segunda etapa.	80
Tabela 19 - Dosagens plasmáticas de glicose, lactato, LDH e potássio, em CH-CPDA1: comparação dos cinco grupos da segunda etapa.	82
Tabela 20 - Dosagens plasmáticas de glicose, lactato, LDH e potássio, em CH-SAGM: comparação dos cinco grupos da segunda etapa.....	84
Tabela 21 - Dosagens de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%), em CH-CPDA1: comparação dos controles normais da primeira etapa com grupos da segunda etapa	88
Tabela 22 - Dosagens de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%), em CH-SAGM,: comparação dos controles normais da primeira etapa com grupos da segunda etapa	89

Tabela 23 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em CH-CPDA1: comparação dos controles normais com grupos da segunda etapa.....	91
Tabela 24 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em CH-SAGM: comparação dos controles normais da primeira etapa com grupos da segunda etapa.....	93
Tabela 25 - Hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) em amostras CH-CPDA1: comparação dos três grupos da terceira etapa.....	96
Tabela 26 - Hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) em amostras CH-SAGM: comparação dos três grupos da terceira etapa.....	97
Tabela 27 - Hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em CH-CPDA1: comparação dos três grupos da terceira etapa.....	99
Tabela 28 - Hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em CH-SAGM: comparação dos três grupos da terceira etapa.....	100
Tabela 29 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em CH-CPDA1: comparação dos três grupos da terceira etapa.	102
Tabela 30 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em CH-SAGM: comparação dos três grupos da terceira etapa.....	104
Tabela 31 - Dosagens de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%), em CH-CPDA1: comparação dos controles normais com grupos da terceira etapa.....	107
Tabela 32 - Dosagens de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%), em CH-SAGM: comparação dos controles normais com grupos da terceira etapa.....	108
Tabela 33 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em CH-CPDA1: comparação dos controles normais com grupos da terceira etapa.....	110
Tabela 34 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em amostras CH-SAGM, nos dias D14, D16, D21 e D42: comparação dos controles normais com grupos da terceira etapa.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Metodologia do plasma rico em plaquetas (PRP) para preparo de hemocomponentes	16
Figura 2 Metodologia da camada leucoplaquetária ou buffy-coat (BC) para preparo de hemocomponentes	17
Figura 3 Representação esquemática do grupo de amostras. Montagem do pool.....	44
Figura 4 Perfil padrão de hemoglobina livre (g/dL) em CH-CPDA1	63
Figura 5 Perfil padrão de grau de hemólise (%) em CH-CPDA1	64
Figura 6 Perfil padrão de hemoglobina livre (g/dL) em CH-SAGM	66
Figura 7 Perfil padrão de grau de hemólise (%) em CH-SAGM.....	66
Figura 8 Perfil padrão da dosagem de potássio (mmol/L) em CH-CPDA1	69
Figura 9 Perfil padrão da dosagem de lactato (mg/dL) em CH-CPDA1	69
Figura 10 Perfil padrão da dosagem de LDH (UI/dL) em CH-CPDA1.....	70
Figura 11 Perfil padrão da dosagem de glicose (mg/dL) em CH-CPDA1	70
Figura 12 Perfil padrão da dosagem de potássio (mmol/L) em CH-SAGM.....	71
Figura 13 Perfil padrão da dosagem de lactato (mg/dL) em CH-SAGM	72
Figura 14 Perfil padrão da dosagem de LDH (UI/dL) em CH-SAGM	73
Figura 15 Perfil padrão da dosagem de glicose (mg/dL) em CH-SAGM.....	73

SUMÁRIO

1	Introdução	14
1.1	Preparo de componentes a partir do sangue total	15
1.2	Armazenamento e lesões de estocagem de hemácias	19
1.3	Soluções preservativas e anticoagulantes	21
1.4	Controle de qualidade de concentrados de hemácias	24
1.5	Transporte de concentrados de hemácias	26
2	Justificativa	36
3	Hipótese	38
4	Objetivos	39
4.1	Objetivo geral	39
4.2	Objetivos específicos	39
5	Métodos	40
5.1	Coleta do sangue total	40
5.2	Preparo de concentrado de hemácias	40
5.3	Delineamento do estudo	41
5.3.1	Primeira etapa – Definição do perfil laboratorial padrão dos concentrados de hemácias	41
5.3.2	Segunda etapa – Efeito da exposição por tempo menor que 24 horas a temperaturas inadequadas para transporte	43
5.3.3	Terceira etapa – Efeito da exposição por tempo de 48 horas a temperaturas inadequadas para transporte	49
5.4	Temperaturas de exposição	54
5.5	Análises laboratoriais	55
5.5.1	Coleta de amostras para análises laboratoriais	55
5.5.2	Hematócrito e hemoglobina total	56
5.5.3	Hemoglobina plasmática e grau de hemólise	56
5.5.4	Testes bioquímicos	57
5.5.5	Testes microbiológicos	58
6	Resultados	59
6.1	Primeira etapa - Definição do perfil laboratorial padrão dos concentrados de hemácias	59
6.1.1	Caracterização das amostras	59
6.1.2	Resultados do perfil laboratorial padrão	62
6.1.3	Comparação de análises laboratoriais entre as metodologias	74

6.1.4	Culturas microbiológicas	74
6.2	Segunda etapa – Efeitos da exposição por tempo igual ou menor que 24 horas a temperaturas inadequadas para transporte	75
6.2.1	Caracterização das amostras	75
6.2.2	Parâmetros laboratoriais: comparações entre os grupos dos <i>pools</i>	77
6.2.3	Comparação das amostras da segunda etapa com os controles normais da primeira etapa	86
6.2.4	Culturas microbiológicas	95
6.3	Terceira etapa - Efeitos da exposição por tempo de 48 horas a temperaturas inadequadas para transporte	95
6.3.1	Caracterização das amostras	96
6.3.2	Parâmetros laboratoriais: comparações entre os grupos dos <i>pools</i>	97
6.3.3	Comparação das amostras da terceira etapa com controles normais da primeira etapa.....	106
7	Discussão.....	114
7.1	Armazenamento de concentrados de hemácias	114
7.2	Delineamento do estudo da segunda e terceira etapas	118
7.3	Efeitos de desvios de temperatura durante o transporte de concentrados de hemácias	120
7.4	Comparações dos parâmetros laboratoriais com as curvas padrão	128
7.5	Indicação das melhores análises laboratoriais para detecção de anormalidades no CH decorrentes de desvios na temperatura	130
8	Recomendações	133
9	Conclusão	136
	Referencias	137
	Anexo	140

1 Introdução

A segurança transfusional dos componentes sanguíneos é determinada por diversos fatores tais como saúde do doador, quadro clínico do receptor, qualidade da triagem laboratorial e prova de compatibilidade, além das condições de armazenamento e transporte dos hemocomponentes.

O desenvolvimento de soluções preservativas para sangue permitiu a separação entre doador e receptor, tanto no espaço quanto no tempo, devido, respectivamente, ao citrato e à glicose, presentes nas suas composições e que possibilitaram anticoagulação e suporte nutricional às células. Estas descobertas embasaram a organização dos serviços de hemoterapia, garantindo maior segurança e melhor gerenciamento do suprimento de sangue (MOLLISON, 2000).

Por outro lado, sabe-se que durante o armazenamento, imprescindível para a prática hemoterápica, existe perda progressiva da viabilidade celular, o que parece reduzir a eficácia e segurança do sangue, mesmo em condições rigorosamente controladas. Como a velocidade desta deterioração é retardada pela refrigeração, preconiza-se que os concentrados de hemácias (CH), quando em estado líquido, sejam mantidos de 1 a 6°C (HESS, 2014; KLEIN, 2010).

A qualidade dos CH está intimamente relacionada às condições de estocagem, de modo que diversas variáveis, tais como temperatura do refrigerador, circunstâncias de transporte e manipulação das bolsas em temperatura ambiente, podem intensificar e/ou acelerar as lesões celulares que normalmente ocorrem durante armazenamento (HESS, 2014). Os diferentes métodos de preparo dos hemocomponentes, as soluções preservativas e anticoagulantes e outros fatores como desleucocitação e irradiação também podem ter efeito no produto final, interferindo na qualidade dos CH (LAGERBERG et al., 2017).

Existem diversas regulamentações determinando que as bolsas sejam mantidas sob controle rigoroso de temperatura, para preservar a qualidade das hemácias. Um destes requisitos diz respeito ao transporte de CH. A legislação brasileira e diversas normativas internacionais estabelecem que CH devem ser transportados na faixa de temperatura de 1 a 10°C, pelo tempo máximo de 24 horas (BRASIL, 2017; .COUNCIL OF EUROPE, 2017; AABB, 2014b).

Entretanto, na rotina dos serviços de hemoterapia existem circunstâncias, no decorrer do período de validade de CH, em que estes componentes podem ser expostos a situações fora destes limites de temperatura, como casos de falhas em equipamentos de armazenamento e condições inadequadas de transporte (THOMAS; HANCOCK; CARDIGAN, 2012). Trabalhos científicos têm sido conduzidos mundialmente, para analisar a qualidade *in vitro* de CH expostos a temperaturas inferiores a 1°C e/ou a temperaturas superiores a 10°C, por intervalos de tempo variados. Estes trabalhos têm sugerido que estas situações não afetam negativamente a qualidade das unidades de concentrados de hemácias. Entretanto, o grande número de variáveis envolvidas em cada estudo não permite que as conclusões sejam aplicadas indiscriminadamente em qualquer situação de rotina (BRUNSKILL et al., 2012).

Este trabalho foi proposto com o intuito de se estabelecer o padrão laboratorial de CH no decorrer do armazenamento, em condições normais e em situações de transporte a temperaturas inadequadas, nos dois tipos de concentrados de hemácias produzidos na Fundação HEMOMINAS.

1.1 Preparo de componentes a partir do sangue total

Apesar de o sangue total ser recomendado em algumas situações específicas, uma das bases da terapia transfusional é utilizar apenas o hemocomponente adequado para a indicação clínica do paciente. Além disso, a separação do sangue total nos diversos componentes, permite a estocagem de cada um nas suas condições ideais de preservação e pelo tempo de validade mais apropriado. Aliado a isso tudo, ainda existem vantagens logísticas, éticas e econômicas (COUNCIL OF EUROPE, 2017). Tradicionalmente, o preparo de componentes a partir do sangue total pode ser feito pela metodologia do plasma rico em plaquetas (PRP) ou da camada leucoplaquetária, esta última também denominada *buffy-coat* (BC).

Em ambos os métodos são necessárias duas etapas de centrifugação, para sedimentação e separação de células e plasma, seguidas de extração de algumas destas camadas estratificadas para bolsas plásticas satélites acopladas.

No método do PRP, o sangue total é submetido inicialmente a uma

centrifugação leve, com sedimentação das hemácias, mantendo no sobrenadante o plasma rico em plaquetas, o qual é extraído para uma bolsa satélite. Posteriormente, o plasma rico em plaquetas recebe uma centrifugação pesada, que permite a sedimentação das plaquetas, produzindo o plasma e o concentrado de plaquetas (**Figura 1**).

Figura 1 Metodologia do plasma rico em plaquetas (PRP) para preparo de hemocomponentes, utilizando bolsa tripla convencional com solução anticoagulante preservativa CPDA-1.

Fonte: Próprio autor.

A primeira etapa consiste em centrifugação leve com sedimentação das hemácias, seguida pela extração do plasma sobrenadante (plasma rico em plaquetas = PRP). Na segunda fase ocorre centrifugação pesada do PRP, com separação do concentrado de plaquetas do plasma. CPDA-1: citrato, fosfato, dextrose, adenina.

Na metodologia do BC, por sua vez, o sangue total é submetido a uma centrifugação pesada, com extração das hemácias bem compactadas para uma bolsa satélite que contém solução aditiva de CH (geralmente na porção inferior, em modelos de bolsa de coleta *top and bottom*) e do plasma isento de células para uma bolsa satélite na porção superior. A camada leucoplaquetária é mantida na bolsa original de coleta (bolsa matriz) para nova centrifugação, desta vez leve, permitindo a sedimentação do resíduo do BC e mantendo no sobrenadante as plaquetas suspensas em plasma. A seguir ocorre a extração do concentrado plaquetário para a outra bolsa satélite acoplada na porção superior (**Figura 2**).

Figura 2 Metodologia da camada leucoplaquetária ou *buffy-coat* (BC) para preparo de hemocomponentes, utilizando bolsa quádrupla *top and bottom*, com anticoagulante CPD e solução aditiva para CH.

Fonte: Próprio autor

Na primeira etapa ocorre centrifugação pesada com extração de plasma para bolsa superior e do CH para bolsa satélite inferior, onde se encontra a solução aditiva. Na segunda fase, a centrifugação leve do BC permite a extração do concentrado de plaquetas para a bolsa satélite. BC: *buffy-coat*; CPD: ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato, dextrose; CH: concentrado de hemácias.

Em comparação com o PRP, a metodologia BC permite recuperação de maior volume plasmático, o que contribui com a redução de reações alérgicas em transfusões do CH, e com a disponibilidade de plasma para fracionamento industrial em hemoderivados (albumina ou globulinas ou fatores de coagulação). Além disso, a remoção da camada leucoplaquetária garante menor concentração de leucócitos e de microagregados no CH, reduzindo as reações febris não hemolíticas. Por outro lado, ocasiona perda de massa eritrocitária no CH, pois 10 a 30mL das hemácias presentes no sangue total permanece juntamente com a camada leucoplaquetária. Nos CH preparados pelo método BC é necessário o acréscimo de nutrientes por meio de solução aditiva, pois estes componentes são muito compactados, na centrifugação pesada que promove a retirada de quase todo o volume de plasma (COUNCIL OF EUROPE, 2017; AABB, 2014a).

Apesar do preparo de componentes a partir do sangue total estar centrado essencialmente nestas duas metodologias, há enorme variabilidade nos procedimentos de produção de concentrados de hemácias nos serviços de hemoterapia. Conforme descrito por VAN DE WATERING (2011) esta diversidade compreende todas as fases, por exemplo, tempo e temperatura de repouso do sangue total antes do processamento, centrifugação pesada ou leve, remoção ou não do *buffy-coat*, desleucocitação do sangue total ou do concentrado de hemácias, ou ainda ausência de desleucocitação, tipo de solução preservativa. Como resultado destas variações, as unidades de concentrados de hemácias podem ter diversos volumes de plasma, plaquetas e leucócitos residuais.

Alguns trabalhos científicos incluem concentrados de hemácias proveniente do método plasma rico em plaquetas, que mantém uma grande quantidade dos leucócitos originais. Outros utilizam concentrados de hemácias com remoção da camada leucoplaquetária, onde mais de 90% das plaquetas e 60 a 70% dos leucócitos são removidos no *buffy-coat*. Finalmente, outros estudam concentrados de hemácias desleucocitados, que são virtualmente depletados de todos os leucócitos. Além disso, há um volume variável de plasma residual e de diferentes soluções preservativas nestes produtos hemoterápicos. Infelizmente, os trabalhos científicos não têm dado a devida importância a estas diferenças, as quais interferem diretamente nos resultados encontrados (VAN DE WATERING, 2011). Além disso, como a maioria dos países desenvolvidos adotam a desleucocitação universal, torna-se difícil encontrar pesquisas que utilizem CH não desleucocitados, hemocomponente mais frequente em nosso meio e, conseqüentemente, alguns dados da literatura não podem ser totalmente aplicados em todos os serviços hemoterápicos.

1.2 Armazenamento e lesões de estocagem de hemácias

Segundo a legislação brasileira, as unidades de CH, quando em estado líquido, devem ser armazenadas à temperatura de 4 ± 2 °C, em refrigeradores apropriados e qualificados para esta finalidade, com sistema de ventilação para circulação de ar e temperatura uniformemente distribuída em todos os compartimentos. Estas câmaras de conservação devem ser equipadas com sistema de alarme sonoro e visual e, preferencialmente com registro contínuo de temperatura (BRASIL, 2017).

Durante armazenamento de unidades de CH, ocorrem modificações bioquímicas e morfológicas das hemácias que são denominadas "lesões de estocagem". Estas resultam das condições artificiais de manutenção *ex vivo*, como as baixas temperaturas e as mudanças do meio extracelular (plasmático) e das concentrações celulares. Além disso, como não existem mecanismos de depuramento, no mesmo ambiente coexistem células saudáveis com outras senescentes e gravemente danificadas e restos celulares (ANTONELOU; SEGATCHIAN, 2016). Estas alterações incluem modificações de morfologia celular e microvesiculações; redução da estabilidade das hemácias, com liberação de hemoglobina (hemoglobina livre ou plasmática) e elevação do grau de hemólise; aumento de potássio, lactato e lisofosfolípidos; diminuição de pH, adenosina trifosfato (ATP) e 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG); e alterações da curva de dissociação de oxigênio (AABB, 2014a).

Como as hemácias não possuem mitocôndrias, são totalmente dependentes da glicólise anaeróbica para suprimento de energia, gerando metabólitos, especialmente ATP, 2,3-DPG e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH). O armazenamento de CH em temperaturas refrigeradas (4 ± 2 °C) reduz o metabolismo eritrocitário, auxiliando na manutenção da funcionalidade e viabilidade celulares (ORLOV; KARKOUTI, 2015).

Segundo HÖGMAN (1998), o armazenamento do concentrado de hemácias no estado líquido, em temperaturas resfriadas, reduz em torno de 40 vezes o metabolismo celular. A diminuição de 1°C na temperatura de estocagem reduz em aproximadamente 10 a 15% a taxa de glicólise e de consumo de ATP (HESS, 2014). Os autores RUDDALL et al. (1998) demonstraram que bolsas de CH em

CPDA-1, a temperaturas de 25°C apresentaram metabolismo acelerado, com declínio nas concentrações de glicose dez vezes mais rapidamente do que aquelas unidades armazenadas a 4°C.

Como a atividade metabólica não cessa totalmente durante o armazenamento, dextrose é acrescentada às soluções preservativas para garantir glicólise eritrocitária e produção de ATP, 2,3-DPG e NADH em quantidades suficientes para manutenção de viabilidade e funcionalidade no estoque. Entretanto, a continuação da glicólise resulta no acúmulo de ácido láctico no sobrenadante, que reduz o pH do meio, levando a inibição da atividade glicolítica e queda em níveis de ATP, 2,3-DPG e NADH (FLATT, BAWAZIR, BRUCE, 2014; ORLOV; KARKOUTI, 2015). Por volta da sexta semana de estocagem, as concentrações de lactato estão muito aumentadas, o pH está abaixo de 6,5, ATP e NADH muito reduzidos e o conteúdo de 2,3-DPG encontra-se esgotado (ORLOV; KARKOUTI, 2015).

Outro efeito do resfriamento do CH a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ refere-se à bomba sódio potássio, que é praticamente paralisada, ocasionando saída de potássio da célula e entrada de sódio. Em condições fisiológicas *in vivo*, as concentrações de intracelulares de sódio e potássio são mantidas em aproximadamente 5 mmol/L e 90 mmol/L, respectivamente, enquanto no extracelular em 140 mmol/L e 5 mmol/L, respectivamente. Com o funcionamento precário da bomba de sódio-potássio, os cátions atravessam a membrana eritrocitária livremente, até atingirem equilíbrio entre níveis intra e extracelular. Após cerca de três dias de estocagem a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, a concentração extracelular de potássio pode atingir 50 mmol/L (FLATT, BAWAZIR, BRUCE, 2014; ORLOV, KARKOUTI, 2015; VAN DE WATERING, 2011). Em unidades de CH com solução preservativa CPDA-1, estima-se um aumento de 8 vezes no potássio extracelular por volta do 28º dia de armazenamento (CAMPBELL LEE et al., 2012).

As lesões de estocagem de CH relacionadas às alterações no metabolismo e *stress* oxidativo têm considerável efeito deletério na integridade da membrana eritrocitária. A funcionalidade e viabilidade das hemácias dependem da integridade da membrana celular, para manter morfologia, deformabilidade e estabilidade mecânica (ORLOV, KARKOUTI, 2015). As principais mudanças morfológicas das hemácias são transformação de discos bicôncavos para equinócitos, devido à perda de ATP. Inicialmente é um processo reversível, porém, progressivamente são formados esferoequinócitos irreversíveis, provavelmente devido à depleção

total do conteúdo disponível de adenina (ATP, ADP e AMP) (HESS, 2014; VAN DE WATERING, 2011). Estima-se que 20 a 25% das hemácias transfundidas ao final da validade do CH não são viáveis e são removidas da circulação em algumas horas. As células que sobrevivem 24 horas após transfusão demonstram meia vida normal, independente da duração do estoque (VAN DE WATERING, 2011).

A duração máxima permitida para armazenamento de CH (data de vencimento) é definida para cada solução preservativa. Para aprovação de bolsas plásticas e soluções preservativas para CH, as normas europeias e norte-americanas exigem comprovação de que pelo menos 75% das hemácias transfundidas, provenientes de unidades de CH ao final da validade, sejam viáveis 24 horas após transfusão (AABB, 2014a; COUNCIL OF EUROPE, 2017). Esta avaliação recebe várias denominações como recuperação *in vivo*, percentual de viabilidade pós-transfusional, recuperação *in vivo* 24 horas após transfusão de hemácias marcadas com radioisótopo, sendo cromo 51 o mais frequentemente utilizado.

Apesar das lesões de estocagem em CH serem bem descritas, as evidências são ainda insuficientes para se concluir a exata correlação entre duração do armazenamento e desfechos clínicos específicos, apesar dos grandes debates deste tópico na literatura (AABB, 2014a; GLYNN, 2010; ORLOV, KARKOUTI, 2015).

1.3 Soluções preservativas e anticoagulantes

Em extensa revisão das soluções de armazenamento de concentrados de hemácias, HESS (2006) relatou que desenvolvimento do anticoagulante CPDA-1 em 1968 foi fundamental para melhorias no processamento do sangue total, estocagem e preservação em concentrados de hemácias e plasma. Ao final de cinco semanas de armazenamento, concentrados de hemácias armazenados em CPDA-1 apresentam recuperação *in vivo* (células viáveis 24h após transfusão) de 72%, percentual de hemólise de 0,5% e estimativa de 70% de vesiculação.

BEUTLER e WEST (1979) demonstraram que quanto maior o hematócrito das unidades de concentrados de hemácias em CPDA-1, mais rápido é o consumo da glicose, ocasionando perda de viabilidade e piora na recuperação *in vivo*. Estes

autores concluíram que CH com hematócrito de 95%, quando em CPDA-1, tem praticamente toda a glicose exaurida em 21 dias. A legislação brasileira determina que o hematócrito de concentrados de hemácias em CPDA-1 deve ser de 65 a 80%, e define que este componente tem validade de 35 dias após coleta (BRASIL, 2017).

Segundo MOORE e BATSAKIS (1987), pelo processamento de sangue total, mais de 40% dos nutrientes presentes no anticoagulante, como glicose e adenina, são perdidos do meio líquido que envolve os eritrócitos, ao ser retirado plasma e plaquetas para as bolsas satélites. Por outro lado, soluções aditivas, como salina-adenina-glicose-manitol (SAGM), acrescentadas ao CH após extração do plasma, provêm suporte adicional de nutrientes e de volume líquido, causando diminuição do hematócrito e permitindo maior tempo de estocagem e melhor fluxo de infusão durante a transfusão (HESS, 2006). Diversas formulações têm sido desenvolvidas e adotadas para diminuir viscosidade e melhorar preservação de CH, desde meados de 1970, quando foi comercializada a primeira solução aditiva, denominada SAG (salina-adenina-glicose) (MOORE; BATSAKIS, 1987).

HÖGMAN (1998) demonstrou que manutenção de níveis normais de adenina total é ainda mais importante do que a glicose para sobrevivência pós-transfusional das hemácias. Assim, como praticamente metade desta base nitrogenada permanece no plasma a partir da sua extração, é preferível fornecer adenina ao concentrado de hemácias por meio de solução aditiva do que pelo anticoagulante. Além disso, a presença de manitol na formulação do SAGM age como estabilizador de membrana das hemácias, reduzindo a hemólise em 50% quando comparado ao SAG (MOORE; BATSAKIS, 1987). Consequentemente, concentrados de hemácias armazenados em SAGM, após seis semanas de armazenamento, apresentam recuperação *in vivo* de 77 a 84%, percentual de hemólise de 0,4% e 25% de vesiculação (HESS, 2006; MOORE; BATSAKIS, 1987). Vários trabalhos demonstraram que, independentemente do volume de plasma removido, CH estocados por 42 dias em diversas soluções aditivas apresentam acima de 75% de hemácias viáveis após 24 horas da transfusão (HÖGMAN, 1998). A legislação brasileira determina que o prazo de validade de CH em soluções aditivas deve ser de 42 dias após coleta e o hematócrito de 50 a 70% (BRASIL, 2017).

No Brasil, as soluções preservativas normalmente utilizadas em CH são o

anticoagulante CPDA-1 e as soluções aditivas SAGM e AS-3. Quando o sangue total é processado pela metodologia PRP, os serviços podem adotar tanto o CPDA-1 quanto o SAGM na conservação do CH. Por outro lado, a metodologia BC exige o acréscimo de solução aditiva ao CH, sendo adotado o SAGM, por ser a substância disponível em bolsas de coleta do mercado brasileiro. Já a solução AS-3, é exclusiva para coletas de CH por aférese no nosso meio.

Na Europa, Oceania e América do Norte, o uso do CPDA-1 é extremamente restrito. A substância preservativa usual para CH nos países europeus é o SAGM. No Canadá utilizam SAGM e AS-3 e nos Estados Unidos são mais difundidas duas variantes, AS-1 e AS-5, que têm discretas diferenças em composição de sais, açúcar e manitol. A solução aditiva AS-3, assim como outras usadas em alguns países, como MAP no Japão e Circle Pack na Austrália, dependem de uma maior concentração de dextrose no anticoagulante, que recebe a denominação de CP2D. Demonstrou-se que AS-3, como as outras soluções aditivas, está associado a 78-84% de recuperação *in vivo* e 0,4% de hemólise após seis semanas de estocagem (HESS, 2006).

Atualmente, existe no mercado internacional nova geração de soluções aditivas livres de cloreto, como PAG3M, E-Sol-5 e AS-7. LAGERBERG et al. (2017) investigaram estas três soluções em comparação ao SAGM, para preservação de concentrados de hemácias que foram preparados após repouso *overnight* do sangue total a temperatura ambiente. Concluíram que esta nova geração de soluções aditivas provê níveis mais estáveis e adequados de metabólitos essenciais (ATP, adenilato total e 2,3DPG) e melhora de forma geral a qualidade das hemácias durante a estocagem.

Está bem estabelecido na literatura científica que unidades de CH, ao final da validade, quando armazenados em SAGM e em outras soluções aditivas apresentam maior estabilidade e melhores parâmetros bioquímicos do que aqueles preservados em CPDA-1 (MOORE; BATSAKIS, 1987; HÖGMAN, 1998; HESS, 2006).

1.4 Controle de qualidade de concentrados de hemácias

Testes de controle da qualidade de hemocomponentes são fundamentais para validação, padronização e monitoramento dos procedimentos de preparo e armazenamento de hemocomponentes. São ferramentas que devem ser utilizadas para garantia de qualidade do produto hemoterápico que será disponibilizado aos pacientes.

Nas normativas brasileiras e internacionais estão descritos os testes laboratoriais obrigatórios para monitoramento da qualidade das unidades de CH produzidos, que consistem essencialmente nas análises de hemoglobina, hematócrito e grau de hemólise. Apresentamos abaixo as Tabelas 1 e 2 com os testes de controle de qualidade obrigatórios em CH preparados pelo PRP e pelo BC, respectivamente. Nestas tabelas são comparados os parâmetros estabelecidos pelos órgãos reguladores brasileiro, norte-americano e europeu (BRASIL, 2017; AABB, 2014b; COUNCIL OF EUROPE, 2017).

Tabela 1 - Requisitos dos órgãos reguladores para controle de qualidade em concentrados de hemácias (CH), preparados pela metodologia do plasma rico em plaquetas (PRP).

Órgão Regulamentador	Amostragem mínima	Percentual de conformidade exigida	Parâmetros
BRASIL	1% da produção ou 10 unidades por mês (o que for maior)	75%	Hemoglobina > 45g/unidade Hematócrito: 50 a 80% (50 a 70% para CH com solução aditiva e de 65 a 80% para CH-CPDA-1) Teste hemólise <0,8% Microbiológico: negativo
AABB	Não determinado	Não determinado	Hematócrito ≤80% (CH sem solução aditiva)
CONSELHO EUROPEU	Definido pelo Controle Estatístico do Processo	90%	Hemoglobina ≥ 45g/unidade Hematócrito: 65% a 75% (CH sem solução aditiva) ou 50 a 70% (CH com solução aditiva) Teste hemólise <0.8% Volume = 280 ± 50 mL (CH sem solução aditiva) ou definido pelo procedimento em uso (CH com solução aditiva)

Fonte: Próprio autor. Adaptado de: BRASIL - Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde do Brasil, nº 5, Anexo 6 do Anexo IV, de 28/set/17; AABB *Standards for Blood Banks and Transfusion Services*, 29th ed, 2014; e Council of Europe - *Guide to the Preparation use and Quality assurance of Blood Components*.. 19th ed, 2017.

Tabela 2 - Requisitos dos órgãos reguladores para controle de qualidade em concentrados de hemácias com camada leucoplaquetária removida, preparados pela metodologia *buffy-coat* (BC).

Órgão Regulamentador	Amostragem mínima	Percentual de conformidade exigida	Parâmetros
BRASIL	1% da produção ou 10 unidades por mês (o que for maior)	75%	Hemoglobina > 43g/unidade Hematócrito: 50 a 70% (CH com solução aditiva) Teste hemólise <0,8% Contagem de leucócitos < 1,2 x 10 ⁹ /unidade Microbiológico: negativo
AABB	Não determinado	Não determinado	Não determinado
CONSELHO EUROPEU	Definido pelo Controle Estatístico do Processo	90%	Hemoglobina ≥ 43g/unidade Hematócrito: 50% a 70% (CH com solução aditiva) ou 65% a 75% (CH sem solução aditiva) Teste hemólise <0.8% Contagem de leucócitos < 1,2 x 10 ⁹ /unidade Volume = 250 ± 50 mL (CH sem solução aditiva) ou definido pelo procedimento em uso (CH com solução aditiva)

Fonte: Próprio autor. Adaptado de: BRASIL - Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde do Brasil, nº 5, Anexo 6 do Anexo IV, de 28/set/17.; AABB *Standards for Blood Banks and Transfusion Services*, 29th ed, 2014; e *Council of Europe - Guide to the Preparation use and Quality assurance of Blood Components*. 19th ed, 2017.

A padronização dos produtos hemoterápicos e dos testes de controle de qualidade é um desafio de todo serviço de hemoterapia. A análise do controle de qualidade de CH, no decorrer do período de estocagem, comparando diferentes formas de preparo e de solução preservativa, é imprescindível para se conhecer o efeito habitual das lesões de armazenamento (ACKER et al., 2014).

Na literatura científica são descritos diversos outros testes laboratoriais, de pequena aplicação prática na rotina diária do serviço de hemoterapia, mas que são muito úteis em pesquisas, quando se necessita obter painéis mais extensos de avaliação de qualidade dos CH. Análises laboratoriais para avaliação das lesões de estocagem podem ser baseados nos testes da rotina de monitoramento e em testes especializados, porém variam quanto à facilidade de execução, robustez, precisão e utilidade do teste (HESS, 2014).

1.5 Transporte de concentrados de hemácias

Existem diversas regulamentações sobre condições de armazenamento e transporte de hemocomponentes, as quais determinam que as bolsas sejam mantidas sob controle rigoroso de temperatura, para preservar a qualidade. A faixa de temperatura preconizada para armazenamento de concentrados de hemácias (1 a 6°C) dificilmente é mantida durante transporte e em alguns procedimentos técnicos (desleucocitação, irradiação, lavagem, preparo para transfusão).

Quando expostos à temperatura ambiente, para realização de procedimentos, algumas normas internacionais exigem que as bolsas não permaneçam nesta situação por mais de 30 minutos. Caso este tempo seja atingindo, o componente deve ser recolocado, imediatamente, em temperatura de 4 ± 2 °C (BRASIL, 2017; AABB, 2014a).

Esta “regra dos 30 minutos”, como tem sido denominada por diversos autores, parece ter se originado de um estudo conduzido por PICK e FABIJANIC (1971), no qual demonstraram que unidades de sangue total, mantidas a temperatura ambiente, atingiram, no interior das bolsas, temperaturas superiores a 10°C, em aproximadamente 45 a 60 minutos. Curiosamente este trabalho não apresenta nenhum dado referente à qualidade dos concentrados de hemácias (DE GRANDMONT et al., 2014; DUMANI; GOLDFINGER; ZIMAN, 2013).

Apesar de ser um padrão universal, a “regra de 30 minutos” nunca foi oficialmente validada, mesmo sabendo-se que leva ao descarte de quantidade excessiva de bolsas. Devido a isto, trabalhos científicos têm sido conduzidos mundialmente, analisando a segurança e qualidade *in vitro* de concentrados de hemácias expostos a temperatura ambiente por tempo superior a 30 minutos. Esses trabalhos têm demonstrado que uma ou múltiplas exposições do CH por 60 minutos não afetam negativamente estes componentes. Portanto os autores têm sugerido mudanças nestas regulamentações (DE GRANDMONT et al., 2014; DUMANI; GOLDFINGER; ZIMAN, 2013; THOMAS; HANCOCK; CARDIGAN, 2013; RAMIREZ-ARCOS et al., 2013). No Canadá este requisito foi modificado recentemente, ampliando o tempo de tolerância para 60 minutos (CSA GROUP, 2015; DE BIASIO; RYMER, 2017).

Quanto ao transporte de CH, as normas técnicas brasileiras estabelecem como limites aceitáveis temperaturas de 1 a 10°C por tempo de até 24 horas. Este mesmo requisito é exigido por entidades europeias e norte americanas (COUNCIL OF EUROPE, 2017; AABB, 2014a). Já no Reino Unido, as normas determinam que bolsas de CH sejam transportadas de 2 a 10°C, por tempo máximo de 12 horas (NATIONAL BLOOD SERVICE, 2005). Interessantemente, algumas instituições alertam que quando os limites de temperatura de transporte forem extrapolados, as unidades de CH não devem ser utilizadas em transfusão, exceto a critério do diretor do laboratório. Nestas situações, é exigido que quaisquer desvios sejam claramente documentados com os produtos colocados em quarentena até decisão do seu destino (TRANSFUSION SCIENCE STANDING COMMITTEE; AUSTRALIAN & NEW ZEALAND SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION LTD, 2016; NATIONAL BLOOD SERVICE, 2005).

No Brasil, a Portaria Conjunta (ANVISA/MS SAS) Nº 370, de 7/mai/14, define no seu artigo 29, que transporte de CH deve ser realizado no intervalo de temperatura de 1 a 10°C.

Transcrevemos, abaixo, trecho do Artigo 269 e o Anexo 10 do Anexo IV da Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde do Brasil, nº 5 de 28/set/17, que também tratam deste assunto:

Art. 269. O componente sanguíneo será transportado em temperaturas adequadas para a manutenção das suas propriedades biológicas.

§ 4º Os concentrados de hemácias serão transportados de forma a assegurar a manutenção da temperatura entre 1°C (um grau Celsius) e 10°C (dez graus Celsius). (BRASIL, 2017)

Tabela 3 – Condições para transporte de sangue total e componentes

Condições de transporte	Sangue total para processamento	Concentrado de hemácias	PFC	Crio	CP
Temperatura de transporte	20° a 24°C (produção de CP) ou 1° a 10°C (não for destinado à produção de CP)	1 a 10°C	Manter estado congelado	Manter estado congelado	Temperaturas próximas das de estoque
Substância resfriadora recomendada	Gelo reciclável Placas de 1,4-butanediol	Gelo reciclável	Gelo seco ou gelo reciclável	Gelo seco ou gelo reciclável	Somente em condições de alta temperatura: gelo reciclável
Tempo máximo de transporte	18 horas	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas

PFC = plasma fresco congelado; Crio = crioprecipitado; CP = concentrados de plaquetas

Fonte: Extraído da Portaria de Consolidação do Ministério da Saúde do Brasil, nº 5 de 28/set/17 (Anexo 10 do Anexo IV)

Apesar de várias agências regulatórias internacionais estabelecerem os limites de 1 e 10°C como críticos para transporte, não existem evidências científicas de que estes valores sejam relevantes para manutenção de qualidade, segurança e viabilidade de concentrados de hemácias. Quando estas regras são discretamente violadas, há descarte indiscriminado de bolsas, com desperdício, pois em muitas destas situações a qualidade dos componentes é menos afetada do que quando transportados naqueles limites aceitos pelas normas (THOMAS; HANCOCK; CARDIGAN, 2012).

Em revisão sistemática da literatura, BRUNSKILL et al (2012) relataram dificuldades para comparar e compilar os dados de estudos publicados entre os anos de 1946 e 2010, devido à enorme variabilidade nas características dos experimentos (sangue total ou CH, frascos de vidro ou bolsas plásticas, volume de sangue, amostragem, temperatura de exposição, momento e duração do desvio, tipo das variáveis estudadas e métodos laboratoriais). Concluíram também que a maioria dos trabalhos publicados foram delineados com procedimentos, produtos e insumos que atualmente não estão mais em uso. Dos 23 estudos que foram revisados, 57% (n = 13) analisaram qualidade celular utilizando testes de hemólise

ou ATP, sete estudos avaliaram recuperação *in vivo* de CH e seis estudos investigaram crescimento bacteriano.

Os resultados de grau hemólise foram controversos nesta revisão. Dos 12 trabalhos que fizeram teste de hemólise, apenas um reportou resultado maior do que o limite aceitável de 0,8%. Dois estudos encontraram hemólise maior nas unidades de CH expostas a temperaturas mais elevadas do que naquelas unidades em refrigeração, um trabalho afirmou que o grau de hemólise foi ligeiramente inferior no grupo exposto a temperaturas altas e um experimento relatou que os resultados de hemólise nas bolsas submetidas a temperaturas elevadas por duas ocasiões foram significativamente menores do que naquelas unidades expostas apenas uma vez (revisado por BRUNSKILL et al., 2012).

De forma geral, 47% dos estudos que dosaram ATP, relataram que as bolsas em temperaturas elevadas tiveram redução mais rápida na concentração do que aquelas mantidas em refrigeração. O acréscimo de adenina e guanosina ao anticoagulante ACD e o uso de solução aditiva com adenina melhoraram a manutenção de níveis de ATP em todas as temperaturas de armazenamento. Atualmente, as soluções preservativas e aditivas utilizadas em hemoterapia têm adenina na sua composição (revisado por BRUNSKILL et al., 2012).

Quanto à viabilidade pós-transfusional *in vivo*, em cinco dos sete trabalhos revisados, foi relatado que o aquecimento do sangue total ou CH, em ACD, reduziu a recuperação em comparação ao sangue refrigerado. Um estudo citou que a adição de adenina e guanosina ao sangue em ACD melhorou os resultados. Enquanto que dois experimentos, com amostras de CH em solução aditiva, demonstraram que a exposição a temperaturas elevadas não alterou os resultados de recuperação *in vivo* (revisado por BRUNSKILL et al., 2012).

Em vinte estudos foram descritas mudanças em parâmetros bioquímicos após exposição de CH a temperaturas mais altas do que o preconizado. Os testes e conclusões variaram entre os diversos autores, existindo análises de potássio extracelular (n = 7), pH (n = 6), 2,3-DPG (n = 4), glicose (n = 3), lactato (n = 3) e sódio (n = 1). Quatro trabalhos relataram que CH ou sangue total em ACD tiveram aumento de potássio extracelular quando expostos a temperaturas mais elevadas. Entretanto, em quatro estudos com amostras de CH em SAGM não houve elevação do potássio. Como esperado, dosagens de glicose, lactato e pH, as quais são medidas da atividade metabólica, alteraram em exposições a temperaturas

mais altas. Várias limitações foram detectadas na maioria dos estudos revisados (revisado por BRUNSKILL et al., 2012). Dessa forma, os autores concluíram que ainda são necessários novos estudos robustos e modernos, com as combinações atuais e múltiplas de hemocomponentes, anticoagulantes e soluções aditivas, e com temperaturas e tempos de exposição definidos e relevantes para a prática hemoterápica.

Dentre estudos da literatura que avaliaram o efeito de condições inadequadas de transporte sobre a qualidade das hemácias com desenhos e resultados robustos, escolhemos três para detalhar (**Tabelas 4 e 5**).

O trabalho de THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2012) foi feito em duas etapas e serviu de modelo para o delineamento desta pesquisa. Na primeira fase foram montados três *pools*, cada um originado de dez CH-SAGM e com divisão em nove alíquotas. Cada alíquota foi exposta a temperaturas de -2°C ou 22°C por um, dois ou três períodos de três horas no decorrer do armazenamento (nos dias 3, 8 e 15), com mais uma exposição por 5 horas no 29º dia. Na segunda parte do estudo, foram preparados três *pools*, cada um constituído por quatro unidades de CH-SAGM e alíquotado em três bolsas, que foram submetidas a 25°C por 24 ou 48 horas, no segundo dia de armazenamento. Nas duas etapas uma das alíquotas foi mantida de 2 a 6°C, continuamente, sendo amostra controle (**Tabela 4**).

RUDDELL et al (1998) prepararam um total de oito *pools*, sendo que cada pool foi montado a partir de três CH-CPDA1 e, a seguir, dividido em três alíquotas. Cada alíquota de teste foi mantida por 24 horas a temperatura de 25°C, no 6º ou no 20º dia de armazenamento, enquanto a alíquota controle permaneceu entre 1 e 6°C (**Tabela 4**).

Os mesmos autores citados anteriormente, THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2013), em um segundo trabalho, montaram seis *pools*, cada um proveniente de oito bolsas de CH-SAGM, os quais originaram seis alíquotas modelo adulto e quatro alíquotas modelo pediátrico. RAMIREZ-ARCOS et al. (2013) fizeram dois grupos de exposição à temperatura ambiente, por diferentes períodos de tempo. Cada grupo foi composto por seis *pools*, e cada *pool* proveniente de dois CH-SAGM e dividido em duas unidades.

Já DE GRANDMONT et al. (2014) utilizaram um modelo diferente, preparando três alíquotas de 100 mL a partir de apenas uma bolsa de CH. Cada uma destas porções do CH foi mantida entre duas bolsas de transferência preenchidas com 50mL de salina. Segundo os autores, este modelo foi validado para simular o padrão de temperatura do interior de uma bolsa de CH de 310 mL quando exposta a temperatura ambiente. Este modelo tem a vantagem de consumir menor quantidade de amostras (um terço da quantidade que seria necessária para o desenho em *pool*), reduzindo o prejuízo ao estoque de CH disponíveis para transfusão.

Por outro lado, alguns autores utilizam amostras individuais. Os pesquisadores WAGNER et al. (2014) realizaram um estudo amplo e com desenho interessante, com 78 bolsas individuais, contando com 10 ou 12 unidades em cada grupo avaliado (**Tabela 4**).

Alguns anos antes, os próprios autores já citados anteriormente, HANCOCK, CARDIGAN e THOMAS (2011), desenvolveram um trabalho com 20 amostras individuais, selecionadas aleatoriamente do estoque.

Na **Tabela 5**, é apresentado um resumo dos principais resultados encontrados para teste de hemólise, potássio, glicose e lactato, nos três trabalhos que selecionamos para detalhar. Alguns destes dados são contraditórios na literatura científica, devido aos diferentes desenhos adotados pelos estudos.

Tabela 4 - Delineamento experimental de trabalhos que avaliaram efeitos do transporte inadequado sobre a qualidade e parâmetros laboratoriais de concentrados de hemácias.

(continua)

Estudo		Componente	Delineamento		
			Amostras	Temperaturas de exposição	Momento exposição de cada teste
RUDELL et al (1998)		CH em CPDA-1	Oito <i>pools</i> , cada um dividido em três alíquotas	Duas alíquotas a 25°C Uma alíquota controle	a) 25°C por 24h no dia 6 b) 25°C por 48h no dia 20 c) Controle de 2 a 6°C continuamente
THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2012)	1ª fase	CH em SAGM	Três <i>pools</i> , cada um dividido em nove alíquotas	Três alíquotas a -2°C Cinco alíquotas a 22°C Uma alíquota controle	a) -2°C por 3h no dia 15 + 5h no dia 29 b) -2°C por dois períodos de 3h distribuídos nos dias 8 e 15 + 5h no dia 29 c) -2°C por três períodos de 3h, nos dias 3, 8 e 15 + 5h no dia 29 d) 22°C por 3h no dia 3 + 5h no dia 29 e) 22°C por 3h no dia 15 + 5h no dia 29 f) 22°C por dois períodos de 3h distribuídos nos dias 8 e 15 + 5h no dia 29 g) 22°C por três períodos de 3h, nos dias 3, 8 e 15 + 5h no dia 29 h) 22°C por 5 horas no dia 29 i) Controle de 2 a 6°C continuamente
	2ª fase	CH em SAGM	Três <i>pools</i> , cada um dividido em três alíquotas	Duas alíquotas a 25°C Uma alíquota controle	a) 25°C por 24h no dia 2 b) 25°C por 48h no dia 2 c) Controle de 2 a 6°C continuamente

Tabela 4 - Delineamento experimental de trabalhos que avaliaram efeitos do transporte inadequado sobre a qualidade e parâmetros laboratoriais de concentrados de hemácias.
(conclusão)

Estudo		Componente	Delineamento		
			Amostras	Temperaturas de exposição	Momento exposição de cada teste
WAGNER et al. (2014)	1ª fase Temperatura elevada continuamente	CH desleucocitados em SAGM Técnica <i>buffy-coat</i>	36 amostras individuais	12 amostras a 13°C 12 amostras a 22°C 12 amostras controle	a) 13°C por 42 dias b) 22°C por 42 dias c) Controle de 2 a 6°C por 42 dias
	2ª fase Exposições múltiplas a temperaturas elevadas	CH desleucocitados em SAGM, técnica <i>buffy-coat</i>	42 amostras individuais	10 amostras a 10°C 10 amostras a 13°C 10 amostras a 22°C 12 amostras controle	a) Cada grupo teste exposto por 24 h, semanalmente (nos dias 7, 14, 21, 28 e 35) b) Controle de 2 a 6°C por 42 dias

Tabela 5 - Resultados de trabalhos que avaliaram efeitos do transporte inadequado sobre a qualidade e parâmetros laboratoriais (hemólise, potássio, glicose e lactato) de concentrados de hemácias.

(continua)

Estudo		Parâmetro laboratorial			
		Hemólise	Potássio	Glicose	Lactato
RUDELL et al (1998)		Diferenças não significativas	Significativas (<u>menor</u> que controle, exceto no dia 28)	Significativas (<u>menor</u> que controle)	Significativas (<u>maior</u> que controle)
THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2012)	1ª fase	Significativa apenas no grupo com 3 exp. a -2°C (<u>menor</u> que controle)	Diferenças <u>não</u> significativas	Não avaliado	Não avaliado
	2ª fase	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Não</u> significativa no grupo exposto a 25°C por 24h • Significativa no grupo exposto a 25°C por 48h (<u>maior</u> que o controle) 	<ul style="list-style-type: none"> • Significativa no grupo 25°C por 24h (<u>menor</u>, apenas no dia 8) • <u>Não</u> significativa no grupo 25°C por 48h 	Não avaliado	Não avaliado

Tabela 5 - Resultados de trabalhos que avaliaram efeitos do transporte inadequado sobre a qualidade e parâmetros laboratoriais (hemólise, potássio, glicose e lactato) de concentrados de hemácias.

(conclusão)

Estudo		Parâmetro laboratorial			
		Hemólise	Potássio	Glicose	Lactato
WAGNER et al. (2014)	1ª fase Temperaturas altas contínuas (por 42 dias)	<ul style="list-style-type: none"> • Significativas no grupo 13°C (maior) de D28 até D42 • Significativas no grupo 22°C (maior) de D14 até D42 	<ul style="list-style-type: none"> • Significativas no grupo 13°C (menor em D7, D14 e D21 e maior em D35 e D42) • Significativas no grupo 22°C (maior) de D14 até D42 	<ul style="list-style-type: none"> • Significativas no grupo 13°C (menor) de D7 até D42 • Significativas no grupo 22°C (menor) de D7 até D42 	<ul style="list-style-type: none"> • Significativas no grupo 13°C (maior) de D7 até D35 • Significativas no grupo 22°C (maior) de D7 até D28
	2ª fase Temperaturas altas Exposições múltiplas (semanais)	<ul style="list-style-type: none"> • Não significativas a 10°C • Não significativas a 13°C • Significativas no grupo 22°C (maior) apenas em D42 	<ul style="list-style-type: none"> • Não significativas nos três grupos (10°C, 13°C e 22°C) 	<ul style="list-style-type: none"> • Não significativas a 10°C • Significativas no grupo 13°C (menor) apenas em D42 • Significativas no grupo 22°C (menor) apenas em D42 	<ul style="list-style-type: none"> • Significativas a 10°C (maior) apenas em D35 • Significativas a 13°C (maior) em D21, D28 e D35 • Significativas no grupo 22°C (maior) em D14, D21 e D28

2 Justificativa

Os serviços de hemoterapia adotam variadas soluções anticoagulantes preservativas, com procedimentos heterogêneos para preparo de hemocomponentes, além de diferentes metodologias para análises de controle de qualidade e de lesões de estocagem de CH. Como não existe consenso na literatura quanto ao melhor teste laboratorial para avaliar desvios das condições de transporte e de armazenamento de CH, a variabilidade compromete a comparação de trabalhos científicos.

Além disso, apesar da maioria dos métodos demonstrarem boa precisão intra-laboratorial, alguns destes apresentam baixa reprodutibilidade inter-laboratorial, impedindo um paralelo dos resultados entre diferentes laboratórios, mesmo quando utilizam testes idênticos (HESS et al., 2005; HAN; SERRANO; DEVINE, 2010).

Diante do exposto, decidimos realizar o nosso trabalho de mestrado em três etapas. Na primeira etapa, estudamos o desempenho de diversos testes laboratoriais, no decorrer do armazenamento de CH em condições normais, nos dois tipos de concentrados de hemácias produzidos na Fundação *HEMOMINAS*. Esta etapa permitiu o estabelecimento de valores de referência para a realidade desta instituição, para cada parâmetro laboratorial e categorizado por tipo de concentrado de hemácias e por período do armazenamento.

Na segunda etapa, bolsas de concentrados de hemácias foram submetidas a temperaturas entre -2°C e +1°C, ou temperaturas entre 11°C e 15°C, por um período de 6 horas ou por um período 24 horas, no 14º dia de armazenamento, reproduzindo situações que ocasionalmente acontecem na rotina deste serviço de hemoterapia e que extrapolam os valores permitidos para transporte pela regulamentação atual. Os resultados dos testes laboratoriais destas bolsas submetidas a temperaturas consideradas inadequadas foram comparados ao grupo controle dessa etapa e aos valores de referência obtidos na primeira etapa do experimento.

Na terceira etapa, as unidades de CH foram expostas a temperaturas inadequadas para transporte (entre -2°C e +1°C, ou entre 22°C 25°C) por período de 48 horas, condições de *stress* extremo para estas bolsas. Metodologia semelhante a esta foi utilizada em trabalho científico (THOMAS; HANCOCK; CARDIGAN, 2012), com o objetivo de validar se os testes laboratoriais adotados têm sensibilidade suficiente para detectar grandes alterações na qualidade destes hemocomponentes. Este tempo de exposição não é usual em serviços de hemoterapia, pois é superior ao permitido para transporte de hemocomponentes pela legislação brasileira (BRASIL, 2017). Situações similares podem ocorrer em casos de falhas graves na cadeia de frios ou na logística de transporte. Porém, todos os concentrados de hemácias envolvidos neste tipo de falha são geralmente descartados, sem realização dos testes laboratoriais de controle de qualidade.

3 Hipótese

A exposição de bolsas de concentrados de hemácias a temperaturas inadequadas e diferentes dos limites preconizados para transporte pela legislação brasileira, por períodos iguais ou inferiores a 24 horas, não ocasiona alterações significativas nos parâmetros de controle de qualidade destes hemocomponentes.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Estabelecer os parâmetros laboratoriais de controle de qualidade de concentrados de hemácias, preparados por duas metodologias distintas, no decorrer de diferentes condições de armazenamento e transporte.

4.2 Objetivos específicos

- Definir o perfil padrão de parâmetros laboratoriais (hemoglobina plasmática, grau de hemólise, potássio, glicose, lactato e desidrogenase láctica) para controle de qualidade e monitoramento das lesões de armazenamento de:
 - Concentrado de hemácias em CPDA-1, preparados pela metodologia do plasma rico em plaquetas;
 - Concentrado de hemácias em CPD/SAG-Manitol, preparados pela metodologia da camada leucoplaquetária.
- Avaliar os efeitos da exposição, no 14º dia de armazenamento, a temperaturas diferentes do preconizado para transporte de CH nos parâmetros laboratoriais do perfil padrão de qualidade:
 - Temperaturas entre -2°C e 1°C, durante 6 horas ou 24 horas ou 48 horas;
 - Temperaturas entre 11°C e 15°C, durante 6 horas ou 24 horas;
 - Temperaturas entre 22°C e 25°C, durante 48 horas.
- Avaliar e definir quais testes laboratoriais são úteis para analisar CH submetidos a transportes com temperaturas diferentes do preconizado.

5 Métodos

5.1 Coleta do sangue total

Os procedimentos de coleta de sangue total foram programados para volume de 450mL e realizados conforme padronização da Fundação HEMOMINAS e legislação brasileira (BRASIL, 2017), utilizando os modelos de bolsas tripla convencional CPDA-1 (Fresenius Kabi®) e tripla *top and bottom* CPD/SAGM (Fresenius Kabi®).

As coletas ocorreram em unidades da Fundação HEMOMINAS, localizadas em Belo Horizonte, Minas Gerais: sendo estas o Posto de Coleta Shopping Estação, a Unidade de Coleta e Transfusão do Hospital Julia Kubitscheck e o Hemocentro de Belo Horizonte.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS em 02/set/15, com aprovação em 08/out/15 (Número do Parecer: 1.268.729 e CAAE 49443415.2.0000.5118).

5.2 Preparo de concentrado de hemácias

Os concentrados de hemácias foram preparados na Central de Produção do Hemocentro de Belo Horizonte, seguindo padronização da Fundação HEMOMINAS e legislação brasileira (BRASIL, 2017).

O sangue total coletado em bolsa tripla CPDA-1 foi processado pela metodologia do plasma rico em plaquetas (PRP) enquanto aquele coletado em bolsa tripla *top and bottom* CPD/SAGM foi processado pela metodologia da camada leucoplaquetária. Na separação dos hemocomponentes foram utilizadas centrífugas refrigeradas (Jouan KR 4i; Thermo Scientific) e extratores automatizados (Compomat® G5; Fresenius Kabi).

5.3 Delineamento do estudo

Este trabalho foi desenvolvido em três etapas, que serão descritas detalhadamente a seguir:

- Primeira etapa – Definição do perfil laboratorial padrão dos concentrados de hemácias.
- Segunda etapa – Efeitos da exposição por tempo igual ou menor que 24 horas a temperaturas inadequadas para transporte.
- Terceira etapa – Efeitos da exposição por tempo de 48 horas a temperaturas inadequadas para transporte.

5.3.1 Primeira etapa – Definição do perfil laboratorial padrão dos concentrados de hemácias

5.3.1.1 Amostragem

As amostras a serem analisadas foram obtidas de 40 bolsas de concentrado de hemácias, sendo vinte unidades coletadas em bolsas triplas com anticoagulante CPDA-1 (preparadas pela metodologia do plasma rico em plaquetas) e vinte unidades coletadas em bolsas triplas *top and bottom* com anticoagulante CPD e solução aditiva SAG-Manitol (preparadas pela metodologia da camada leucoplaquetária).

As 20 bolsas de concentrado de hemácias em CPD/SAG-Manitol foram selecionadas a partir de coletas realizadas entre 13 e 19/dez/16 e receberam identificações de S1 a S20. As 20 unidades de concentrado de hemácias em CPDA-1 foram separadas a partir de bolsas coletadas no período de 20 a 26/dez/16 e foram identificadas sequencialmente de C1 a C20.

Utilizamos bolsas reservadas para monitoramento de rotina do Laboratório de Controle de Qualidade, para não comprometer o estoque.

5.3.1.2 Delineamento da primeira etapa

Os testes laboratoriais foram realizados semanalmente, nos dois grupos de concentrados de hemácias, até a data de vencimento destes. Assim, os concentrados de hemácias em CPDA-1 (CH-CPDA1) foram analisados nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 35, e os concentrados de hemácias em CPD/SAG-Manitol (CH-SAGM) foram analisados nos dias 1, 7, 14, 21, 28, 35 e 42.

As análises laboratoriais abrangeram os critérios usuais de controle de qualidade de hemocomponentes, além de outros parâmetros *in vitro* para avaliação de lesões de estocagem, que foram selecionados na literatura científica.

Foram realizados os seguintes testes laboratoriais: hemoglobina total, hematócrito, hemoglobina plasmática, grau de hemólise, potássio extracelular, glicose plasmática, lactato e desidrogenase láctica (LDH).

No dia 1, antes do início dos testes laboratoriais, e no dia de vencimento das bolsas, foram realizadas também culturas microbiológicas, objetivando excluir hemólise secundária a contaminação bacteriana.

5.3.1.3 Análise estatística da primeira etapa

A normalidade da distribuição das variáveis numéricas contínuas foi verificada pelo teste Shapiro Wilk. As variáveis numéricas apresentaram distribuição normal gaussiana e, portanto, foram expressas em termos de média, intervalo de 95% de confiança e gráficos de intervalo para ilustrar a média e a dispersão dos dados.

Na comparação de médias de variáveis com distribuição normal gaussiana dos dois grupos independentes (CH-CPDA1 e CH-SAGM) aplicou-se o teste paramétrico t-student.

Todas as análises foram realizadas no software SPSS 18 e um nível de significância de 0,05 foi considerado.

5.3.2 Segunda etapa – Efeito da exposição por tempo menor que 24 horas a temperaturas inadequadas para transporte

5.3.2.1 Amostragem

Nesta etapa do estudo foram utilizadas 35 unidades de concentrados de hemácias, sendo 18 bolsas de concentrados de hemácias em anticoagulante CPDA-1 (preparadas pela metodologia plasma rico em plaquetas) e 17 bolsas em CPD/SAG-Manitol (preparadas pela metodologia da camada leucoplaquetária).

Estas trinta e cinco unidades foram divididas em seis grupos constituídos por cinco ou seis bolsas cada um, conforme descrito abaixo.

5.3.2.2 Preparo dos grupos de amostras

Inicialmente, no dia um (dia seguinte à coleta e preparo dos hemocomponentes), foram selecionados cinco concentrados de hemácias em CPD/SAG-Manitol (CH-SAGM) de mesmo grupo sanguíneo ABO.

Estes cinco CH-SAGM foram transferidos para uma bolsa de transferência, formando um *pool* único (denominado PS1). Esta transferência foi realizada em sistema fechado, utilizado equipamento de conexão estéril (Compodock[®], Fresenius Kabi). Após homogeneização criteriosa do *pool*, o seu conteúdo foi redistribuído em 5 bolsas de transferência (modelo 300mL, Fresenius Kabi[®]), formando 5 bolsas com conteúdos e volumes iguais. Estas cinco bolsas foram denominadas **PS1-A, PS1-B, PS1-C, PS1-D, PS1-E**. A amostra **PS1-E** foi definida como grupo controle do experimento.

Entretanto, percebeu-se que o volume destas 5 unidades ficou discretamente inferior ao volume habitual deste tipo de componente, devido a perda de material durante a montagem, redistribuição e testes de esterilidade. Para tornar as alíquotas mais condizentes com o volume normal, decidiu-se aumentar o número de constituintes utilizados na montagem dos *pools*, seguindo metodologia encontrada em alguns trabalhos científicos (THOMAS; HANCOCK; CARDIGAN, 2012).

Após realização do experimento nestas cinco bolsas originadas do primeiro *pool*, o segundo grupo de amostras foi preparado com a mudança proposta. Ou seja, seis novas unidades de CH-SAGM foram selecionadas para preparo de segundo *pool* (denominado PS2) e foram redistribuídas em cinco bolsas, com conteúdos e volumes iguais, para repetição do experimento. Após o término desta montagem, o terceiro grupo (PS3) foi preparado pelos mesmos procedimentos descritos para o segundo *pool*.

Este procedimento de montagem de um *pool* e distribuição das alíquotas está representado na **Figura 3**.

Figura 3 Representação esquemática do grupo de amostras da segunda etapa.

Montagem do *pool* contendo seis concentrados de hemácias e redistribuição do *pool* em cinco bolsas de igual volume. Todos estes procedimentos foram repetidos para cada grupo de cinco alíquotas de concentrados de hemácias, totalizando seis grupos de experimentos (três grupos de CH-CPDA1 e três grupos de CH-SAGM).

Fonte: Próprio autor

Da mesma forma, foram preparados três grupos de bolsas de concentrados de hemácias em CPDA1 (CH-CPDA1). Para formação do primeiro grupo de experimento, foram selecionadas seis unidades de CH-CPDA1, de mesmo grupo sanguíneo ABO, que constituíram um *pool* único para análise. Após homogeneização do *pool*, seu conteúdo foi redistribuído, formando 5 bolsas com semelhantes conteúdos e volumes, que foram denominadas **PC1-A, PC1-B, PC1-C, PC1-D, PC1-E**. A amostra **PC1-E** foi definida como grupo controle do experimento.

Para formação dos outros dois grupos de experimento CH-CPDA1, foram selecionadas seis unidades de CH-CPDA1, de mesmo grupo sanguíneo ABO, que constituíram um *pool* único para análise. Após homogeneização destes dois *pools*, o conteúdo de cada um foi redistribuído, formando 5 bolsas com conteúdos e volumes iguais. As cinco bolsas, originadas do segundo *pool* (**PC2**) foram denominadas **PC2-A, PC2-B, PC2-C, PC2-D e PC2-E**, sendo que esta última foi considerada o grupo controle. Da mesma forma, as cinco unidades originadas do terceiro *pool* (**PC3**) foram identificadas como **PC3-A, PC3-B, PC3-C, PC3-D e PC3-E**.

5.3.2.3 Delineamento da segunda etapa

Logo após a produção, todas as bolsas (alíquotas A, B, C, D e E) foram mantidas em condições ideais de armazenamento, em refrigerador, com temperaturas controladas de 2°C a 6°C até o 14º dia após coleta. Neste dia todas as bolsas foram retiradas do refrigerador para testes laboratoriais e desenvolvimento do experimento conforme proposto abaixo (**Tabela 6**).

As seis **alíquotas A** (CH-CPDA1 e CH-SAGM) foram submetidas a temperaturas entre -2 e +1°C, durante 24 horas, no 14º dia de armazenamento. Após este período de exposição, foram coletadas amostras para testes laboratoriais. A seguir, foram devolvidas ao refrigerador, onde permaneceram a temperaturas de 2°C a 6°C até a data de vencimento, com exceção do dia 21 quando foram retiradas brevemente para coleta de amostras laboratoriais. Os

testes descritos na primeira etapa foram realizados nos dias 14, 15, 21 e 35 no caso de CH-CPDA1 e nos dias 14, 15, 21 e 42 no caso de CH-SAGM.

As seis **alíquotas B** (CH-CPDA1 e CH-SAGM) foram submetidas a temperaturas entre -2 e +1°C, durante 6 horas, no 14^o dia de armazenamento. A seguir, foram devolvidas ao refrigerador, onde permaneceram a temperaturas de 2°C a 6°C até a data de vencimento, com exceção dos dias 15 e 21, quando foram retiradas brevemente para coleta de amostras laboratoriais. Os testes descritos na primeira etapa foram realizados nos dias 14, 15, 21 e 35 no caso de CH-CPDA1 e nos dias 14, 15, 21 e 42 no caso de CH-SAGM.

As seis **alíquotas C** (CH-CPDA1 e CH-SAGM) foram submetidas a temperaturas de 13 a 15°C, durante 24 horas, no 14^o dia de armazenamento. Após este período de exposição, foram coletadas amostras para testes laboratoriais. A seguir, foram devolvidas ao refrigerador, onde foram mantidas a temperaturas de 2°C a 6°C até a data de vencimento, com exceção do dia 21 quando foram retiradas brevemente para coleta de amostras laboratoriais. Os testes descritos na primeira etapa foram realizados nos dias 14, 15, 21 e 35 no caso de CH-CPDA1 e nos dias 14, 15, 21 e 42 no caso de CH-SAGM.

As seis **alíquotas D** (CH-CPDA1 e CH-SAGM) foram submetidas a temperaturas de 13 a 15°C, durante 6 horas, no 14^o dia de armazenamento. A seguir, foram devolvidas ao refrigerador, onde foram mantidas a temperaturas de 2°C a 6°C até a data de vencimento, com exceção dos dias 15 e 21, quando foram retiradas brevemente para coleta de amostras laboratoriais. Os testes descritos na primeira etapa foram realizados nos dias 14, 15, 21 e 35 no caso de CH-CPDA1 e nos dias 14, 15, 21 e 42 no caso de CH-SAGM.

As seis **alíquotas E** (CH-CPDA1 e CH-SAGM) foram os grupos controle, sendo mantidas em refrigerador, com temperaturas controladas entre 2°C e 6°C até a data de vencimento. Foram retiradas deste ambiente, por breve período de tempo, naqueles dias definidos para análises laboratoriais, quando foram coletadas amostras juntamente com as demais alíquotas. Os testes laboratoriais descritos na primeira etapa foram realizados nos dias 14, 15, 21 e 35 no caso de CH-CPDA1 e nos dias 14, 15, 21 e 42 no caso de CH-SAGM.

O planejamento desta segunda etapa do estudo, com enfoque nas datas de exposição a temperaturas inadequadas e datas de testes laboratoriais de cada alíquota, está representado na Erro! Fonte de referência não encontrada.**Tabela 6.**

Tabela 6- Planejamento da segunda etapa.

Alíquota	Dia 14	Dia 15	Dia 21	Dia 35*/42 [#]
A	Testes laboratoriais e, a seguir, exposição a temperaturas entre -2 e +1°C por 24 horas	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais
B	Testes laboratoriais e, a seguir, exposição a temperaturas entre -2 e +1°C por 6 horas	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais
C	Testes laboratoriais e, a seguir, exposição a 13-15°C por 24 horas	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais
D	Testes laboratoriais e, a seguir, exposição a 13-15°C por 6 horas	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais
E	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais

*Amostras de CH-CPDA1

[#] Amostras de CH-SAGM

5.3.2.4 Análise estatística da segunda etapa

A normalidade da distribuição das variáveis numéricas contínuas foi verificada pelo teste Shapiro Wilk. As variáveis numéricas que apresentaram distribuição normal gaussiana foram expressas em termos de média $\pm$ desvio padrão. Variáveis numéricas que não apresentaram distribuição normal gaussiana foram expressas em termos de mediana e valores mínimo e máximo.

Os resultados laboratoriais das alíquotas A, B, C, D e E foram comparados entre si, como 5 grupos independentes.

Os resultados laboratoriais das alíquotas A, B, C e D foram comparados com aqueles obtidos na alíquota E (amostra controle), como dois grupos independentes.

Além disso, os dados das cinco alíquotas (A, B, C, D e E) foram comparados com aqueles padrões de referência definidos na etapa 1.

Na comparação de médias de variáveis com distribuição normal gaussiana em 2 grupos independentes aplicou-se o teste paramétrico t-student. Na comparação de medianas de variáveis sem distribuição normal gaussiana em 5 grupos independentes aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Na comparação de medianas de variáveis sem distribuição normal gaussiana em dois grupos independentes aplicou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney.

Todas as análises foram realizadas no software SPSS 18, considerando-se um nível de significância de 0,05.

5.3.3 Terceira etapa – Efeito da exposição por tempo de 48 horas a temperaturas inadequadas para transporte

Nesta terceira etapa as unidades de concentrados de hemácias foram expostas a temperaturas inadequadas para transporte por 48 horas, com o objetivo de demonstrar que os testes laboratoriais utilizados têm sensibilidade suficiente para detectar alterações na qualidade destes hemocomponentes. Metodologia semelhante a esta foi encontrada em trabalho científico (THOMAS; HANCOCK; CARDIGAN, 2012).

Este tempo de exposição não é usual em serviços de hemoterapia, pois é superior ao permitido para transporte de hemocomponentes pela legislação brasileira (BRASIL, 2017) e normas internacionais (AABB, 2014a; COUNCIL OF EUROPE, 2017).

5.3.3.1 Amostragem

Foram utilizadas 23 unidades de concentrados de hemácias, sendo 12 bolsas de concentrados de hemácias em anticoagulante CPDA-1 (preparadas pela metodologia plasma rico em plaquetas, a partir de sangue total coletado em 28/dez/17) e 11 bolsas em CPD/SAG-Manitol (preparadas pela metodologia da camada leucoplaquetária, a partir de sangue total coletado em 21/dez/17).

Estas vinte e três unidades foram divididas em seis grupos constituídos por três a quatro bolsas cada um (ver item 5.3.3.2).

5.3.3.2 Preparo dos grupos de amostras

No dia um (dia seguinte à coleta e preparo dos hemocomponentes), foram selecionados onze concentrados de hemácias em CPD/SAG-Manitol (CH-SAGM), para preparo de 3 *pools*, sendo cada um constituído por três a quatro bolsas de mesmo grupo sanguíneo ABO/RhD.

O primeiro pool desta etapa do estudo foi montado com quatro bolsas de CH-SAGM do mesmo grupo sanguíneo ABO/RhD (A RhD positivo). Estes quatro CH-SAGM foram transferidos para uma bolsa de transferência (modelo 1300mL,

Fresenius Kabi), formando um *pool* único, denominado PS4. Esta transferência foi realizada em sistema fechado, utilizado equipamento de conexão estéril (Compodock®, Fresenius Kabi). Após homogeneização criteriosa do *pool*, o seu conteúdo foi redistribuído em 3 bolsas de transferência (modelo 300mL, Fresenius Kabi), formando 3 bolsas com conteúdos e volumes aproximadamente iguais. Estas três bolsas foram denominadas **PS4-A**, **PS4-B** e **PS4-C**. A amostra **PS4-C** foi definida como grupo controle do experimento.

Como as sete unidades de CH-SAGM restantes eram do mesmo grupo sanguíneo ABO/RhD (B RhD positivo), estas foram divididas igualmente para a montagem dos outros dois *pools*, cada um composto por 3,5 bolsas.

O conteúdo de 3,5 bolsas de CH-SAGM foi transferido para uma bolsa de transferência (modelo 1300mL, Fresenius Kabi, São Paulo), formando um *pool* único, denominado PS5. Esta transferência foi realizada em sistema fechado, utilizado equipamento de conexão estéril (Compodock, Fresenius Kabi). Após homogeneização criteriosa do *pool*, o seu conteúdo foi redistribuído em 3 bolsas de transferência (modelo 300 mL, Fresenius Kabi, São Paulo), formando 3 bolsas com conteúdos e volumes aproximadamente iguais. Estas três bolsas foram denominadas **PS5-A**, **PS5-B** e **PS5-C**. A amostra **PS5-C** foi definida como grupo controle do experimento.

O terceiro *pool* de CH-SAGM, denominado **PS6**, foi montado e aliquoteado pelo mesmo método utilizado para o PS5. Desta forma, uma das bolsas de CH-SAGM foi dividida em duas para compor os dois *pools* PS5 e PS6.

Foram preparados três grupos de bolsas de concentrados de hemácias em CPDA1 (CH-CPDA1), por método semelhante ao descrito acima. Para formação do primeiro grupo, foram selecionadas quatro unidades de CH-CPDA1, de mesmo grupo sanguíneo ABO, que constituíram um *pool* único para análise. Após homogeneização do *pool*, seu conteúdo foi redistribuído, formando 3 bolsas com conteúdos e volumes iguais, que foram denominadas **PC3-A**, **PC3-B** e **PC3-C**. A amostra **PC3-C** foi definida como grupo controle do experimento.

Para formação de cada um dos outros dois grupos de experimento CH-CPDA1, foram selecionadas quatro unidades de CH-CPDA1, de mesmo grupo sanguíneo ABO, que constituíram um *pool* único para análise. Após homogeneização criteriosa de cada um destes *pools*, o conteúdo foi redistribuído, formando três bolsas com conteúdos e volumes aproximadamente iguais. As três

bolsas, originadas do segundo *pool* (**PC5**) foram denominadas **PC5-A**, **PC5-B** e **PC5-C**, sendo que esta última foi considerada o grupo controle. Da mesma forma, as três unidades originadas do terceiro *pool* (**PC6**) foram identificadas como **PC6-A**, **PC6-B** e **PC6-C**.

5.3.3.3 Delineamento da terceira etapa

Logo após a produção, todas as bolsas (alíquotas A, B e C) foram mantidas em condições ideais de armazenamento, em refrigerador, com temperaturas controladas de 2°C a 6°C até o 14º dia após coleta. Neste dia todas as bolsas foram retiradas do refrigerador para testes laboratoriais e desenvolvimento do experimento conforme proposto abaixo.

As seis **alíquotas A** (CH-CPDA1 e CH-SAGM) foram submetidas a temperaturas entre -2 e +1°C, durante 48 horas, a partir do 14º dia de armazenamento. Após este período de exposição, foram coletadas amostras para testes laboratoriais. A seguir, foram devolvidas ao refrigerador, onde permaneceram a temperaturas de 2°C a 6°C até a data de vencimento, com exceção do dia 21 quando foram retiradas brevemente para coleta de amostras laboratoriais. Os testes descritos na primeira etapa foram realizados nos dias 14, 16, 21 e 35 no caso de CH-CPDA1 e nos dias 14, 16, 21 e 42 no caso de CH-SAGM.

As seis **alíquotas B** (CH-CPDA1 e CH-SAGM) foram submetidas a temperaturas entre +22 e +25°C, durante 48 horas, a partir do 14º dia de armazenamento. Após este período de exposição, foram coletadas amostras para testes laboratoriais. A seguir, foram devolvidas ao refrigerador, onde permaneceram a temperaturas de 2°C a 6°C até a data de vencimento, com exceção do dia 21, quando foram retiradas brevemente para coleta de amostras laboratoriais. Os testes descritos na primeira etapa foram realizados nos dias 14, 16, 21 e 35 no caso de CH-CPDA1 e nos dias 14, 16, 21 e 42 no caso de CH-SAGM.

As seis **alíquotas C** (CH-CPDA1 e CH-SAGM) foram os grupos controle, sendo mantidas em refrigerador, com temperaturas controladas entre 2°C e 6°C até a data de vencimento. Foram retiradas deste ambiente, por breve período de

tempo, naqueles dias definidos para análises laboratoriais, quando foram coletadas amostras juntamente com as demais alíquotas. Os testes laboratoriais descritos na primeira etapa foram realizados nos dias 14, 16, 21 e 35 no caso de CH-CPDA1 e nos dias 14, 16, 21 e 42 no caso de CH-SAGM.

O planejamento desta terceira etapa do estudo, com enfoque nas datas de exposição a temperaturas inadequadas e datas de testes laboratoriais de cada alíquota, está representado na **Tabela 7**.

Tabela 7- Planejamento da terceira etapa.

Alíquota	Dia 14	Dia 16	Dia 21	Dia 35*/42 [#]
A	Testes laboratoriais e, a seguir, exposição a temperaturas entre -2 e +1°C por 48 horas	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais
B	Testes laboratoriais e, a seguir, exposição a temperaturas entre 22 e 25°C por 48 horas	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais
C	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais	Testes laboratoriais

* Amostras de CH-CPDA1

[#] Amostras de CH-SAGM

5.3.3.4 Análise estatística da terceira etapa

A normalidade da distribuição das variáveis numéricas contínuas foi verificada pelo teste Shapiro Wilk. As variáveis numéricas que apresentaram distribuição normal gaussiana foram expressas em termos de média $\pm$ desvio padrão. Variáveis numéricas que não apresentaram distribuição normal gaussiana foram expressas em termos de mediana e valores mínimo e máximo.

Na comparação de médias de variáveis com distribuição normal gaussiana em 2 grupos independentes aplicou-se o teste paramétrico t-student. Na comparação de medianas de variáveis sem distribuição normal gaussiana em 3 grupos independentes aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal Wallis. E na comparação de medianas de variáveis sem distribuição normal gaussiana em 2 grupos independentes aplicou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney.

Todas as análises foram realizadas no software SPSS 18, considerando-se um nível de significância de 0,05.

5.4 Temperaturas de exposição

Foram utilizados equipamentos de refrigeração especialmente programados para preparar ambientes nas faixas de temperaturas definidas para estes experimentos, reproduzindo desvios de temperatura durante transporte de concentrados de hemácias.

Na segunda etapa do estudo, para preparar ambiente com temperaturas entre 13 e 15°C foi utilizado um refrigerador de imunobiológicos (modelo MCV-450, marca Frilux) com controlador de temperatura (modelo MT-543Ri plus, marca Full Gauge), o qual foi programado para esta faixa térmica. Já o ambiente em temperaturas abaixo do ideal (-2 a +1°C) foi preparado em um freezer de plasma (modelo Plasma Freezer MOD 349 FV, marca Fanem), cujo controlador foi adaptado para que o equipamento funcionasse nestas temperaturas.

Na terceira etapa, o mesmo refrigerador de imunobiológicos (modelo MCV-450, marca Frilux) teve seu controlador programado para armazenar as bolsas na faixa de temperatura de 22 a 25°C. E, para simular transporte em temperaturas abaixo do ideal (-2 a +1°C), foi utilizado um refrigerador de banco de sangue (modelo Câmara de Conservação MOD. 347 CSV, marca Fanem,), com controlador de temperaturas (modelo MT-543Ri plus, marca Full Gauge) programado para esta faixa térmica.

Durante os experimentos de exposição a temperaturas inadequadas foram mantidos dois data-loggers (Testo 174 mini data logger, marca Testo® e Escort iMINI, marca Cryopack®) em cada um destes equipamentos de armazenamento, juntamente aos CH.

5.5 Análises laboratoriais

5.5.1 Coleta de amostras para análises laboratoriais

Nas datas marcadas para realização dos testes laboratoriais, foram coletadas amostras de cada bolsa, por método não destrutivo, em sistema fechado, por meio de equipamento de conexão estéril (CompoDock[®], marca Fresenius Kabi) e bolsas de transferência (modelo 300mL, JP Fresenius Kabi). Não foi utilizado alicate de ordenha, visando reduzir o risco de hemólise mecânica. O conteúdo da bolsa foi transferido totalmente para a bolsa plástica conectada, por inversão manual, acompanhada de movimentos rotatórios para homogeneizar. A seguir, o CH que foi encaminhado para a bolsa de transferência foi retornado totalmente para a bolsa original. Novamente o conteúdo foi transferido para a bolsa acoplada e retornado para a bolsa original, sempre com movimentos giratórios e auxílio da força de gravidade. A partir desta fase, uma alíquota do CH, com volume em torno de 20 a 25mL, foi transferida para a bolsa conectada e separada da bolsa original. Após esta coleta, a bolsa original foi armazenada no equipamento adequado, conforme temperatura definida para o experimento.

A seguir, a extremidade do tubo de transferência da bolsa com a alíquota do CH foi cortada e todo o material distribuído em três tubos de polipropileno, secos, sem anticoagulante. Foram utilizados dois tubos tamanho 15x100mm e um tubo 13x75mm. O sangue do tubo menor foi reservado para determinação de hemoglobina e hematócrito.

O material contido nos dois tubos maiores foi submetido a dupla centrifugação (Heraeus™ Megafuge™ 16 Centrifuge, Thermo Scientific™). Inicialmente estes tubos foram centrifugados a 1600g, por 10 minutos. Os sobrenadantes obtidos nestes dois tubos foram transferidos para um outro tubo seco de polipropileno (13X75mm), por meio de pipetagem. O sobrenadante separado neste tubo foi novamente centrifugado (2800g por 20 minutos), visando remoção total das células. O sobrenadante final foi utilizado na determinação de hemoglobina plasmática e testes bioquímicos (potássio, glicose, lactato e desidrogenase láctica), no mesmo dia da centrifugação.

5.5.2 Hematócrito e hemoglobina total

As determinações de hemoglobina total e hematócrito foram realizadas em analisador hematológico automatizado Cell-Dyn Ruby™ (marca Abbott), no Laboratório de Hematologia do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação HEMOMINAS. As amostras foram diluídas 1/2, utilizando 500µL do CH em 500µL de solução salina 0,9%.

5.5.3 Hemoglobina plasmática e grau de hemólise

As amostras sobrenadantes foram diluídas 1:10 em água deionizada (1800µL de água e 200µL do plasma sobrenadante). A leitura da absorbância das amostras foi realizada em cinco comprimentos de onda (370nm, 415nm, 510nm, 577nm e 600nm) em espectrofotômetro (Shimadzu®, UV mini 1240, UV-VIS Spectrophotometer). O cálculo para determinação da concentração de hemoglobina livre no plasma (hemoglobina plasmática) foi efetuado de acordo com fórmulas matemáticas descritas a seguir (REDSANG, 2011).

- Nos resultados em que a leitura no comprimento de onda de 415nm foi inferior a 1,500 , a hemoglobina livre (g/dL) foi calculada pelas seguintes fórmulas:

$$X = (\text{leitura } 510\text{nm}) + [(\text{leitura } 370\text{nm}) - (\text{leitura } 510\text{nm})] \times 0,68$$

$$Y = (\text{leitura } 415\text{nm}) - X$$

$$\text{Hemoglobina livre (g/dl)} = \frac{Y}{113,22} \times 1,6125 \times \text{diluição}$$

- Nos resultados em que a leitura no comprimento de onda de 415nm foi superior a 1,500, para cálculo da hemoglobina plasmática (g/dL) foram utilizadas as seguintes expressões matemáticas:

$$X = (\text{leitura } 600\text{nm}) + [(\text{leitura } 510\text{nm}) - (\text{leitura } 600\text{nm})] \times 0,26$$

$$Y = (\text{leitura } 577\text{nm}) - X$$

$$\text{Hemoglobina livre (g/dL)} = \frac{Y}{13,64} \times 1,6125 \times \text{diluição}$$

O cálculo para determinação do grau de hemólise (%) nas unidades de concentrados de hemácias foi realizado da seguinte forma:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{[100 - \text{Hematócrito (\%)}] \times \text{Hemoglobina plasmática (g/dl)}}{\text{Hemoglobina total (g/dl)}}$$

5.5.4 Testes bioquímicos

5.5.4.1 Potássio

A dosagem de potássio plasmático (sobrenadante) foi feita manualmente, por método colorimétrico denominado Tetrafenilborato modificado por Doles[®], segundo orientações do fabricante (Potássio, marca Doles[®]). Leitura realizada em espectrofotômetro Shimadzu[®], modelo UV mini 1240, UV-VIS Spectrophotometer, na Gerência de Controle de Qualidade da Fundação HEMOMINAS.

5.5.4.2 Glicose

A dosagem de glicose foi feita com amostra do sobrenadante, pelo método da glicose oxidase, utilizando conjunto diagnóstico Glicemia enzimática AA – Linha líquida, da marca Wiener[®], no equipamento CM 250, marca Wiener[®], no Laboratório de Hematologia do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação HEMOMINAS, segundo orientações do fabricante.

5.5.4.3 Lactato

A determinação de lactato foi feita com amostra do sobrenadante, pelo método da lactato oxidase (LOD), utilizando conjunto diagnóstico Lactate, da marca Wiener[®], no equipamento CM 250, marca Wiener[®], no Laboratório de Hematologia do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação HEMOMINAS, segundo protocolo de trabalho do fabricante.

5.5.4.4 Lactato desidrogenase (LDH)

A determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi feita com amostra do sobrenadante, por técnica cinética, utilizando conjunto diagnóstico LDH-P UV AA – linha líquida, da marca Wiener®, segundo orientações do fabricante, no equipamento CM 250, marca Wiener®, no Laboratório de Hematologia do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação HEMOMINAS.

5.5.5 Testes microbiológicos

Foi realizada investigação microbiológica em todas as bolsas de CH utilizadas nos experimentos, da seguinte forma:

- a) Primeira etapa: cultura de todas as unidades analisadas, em dois momentos, sendo o primeiro no primeiro dia após coleta e o segundo na data de vencimento destas bolsas.
- b) Segunda e terceira etapas: cultura dos *pools* na data de montagem destes, e hemocultura das amostras aliqüotadas na data de vencimento das bolsas.

Os testes foram realizados em equipamento de hemocultura automatizado, marca Becton Dickinson™ (BD), modelo BD BACTEC™ FX, utilizando frascos de hemocultura BACTEC™ Standard/10 Aerobic/F Culture Vials. Os resultados finais foram obtidos após cinco dias da data da inoculação.

6 Resultados

6.1 Primeira etapa - Definição do perfil laboratorial padrão dos concentrados de hemácias

Na primeira etapa foram estudadas 20 unidades de CH-CPDA1 e 20 unidades de CH-SAGM, em condições normais de armazenamento. Todas as bolsas foram selecionadas aleatoriamente do estoque da Central de Produção de Belo Horizonte da FH, em datas pré-definidas pelo cronograma de trabalho.

As bolsas de CH-SAGM foram preparadas a partir de sangue total coletados nos dias 13, 14 e 19/12/2016. Os testes laboratoriais ocorreram semanalmente, durante todo o período de estocagem, de 14/12/2016 a 30/01/2017.

As bolsas de CH-CPDA1 foram originadas de sangue total coletados nos dias 20, 21 e 26/12/2016 e suas análises laboratoriais realizadas a cada semana do armazenamento até a data de vencimento, no período de 21/12/2016 a 30/01/2017.

Contando como zero a data da coleta do sangue total e do preparo do CH, os testes laboratoriais foram executados nos seguintes dias: primeiro dia, denominado D1, sétimo dia (D7), 14º dia (D14), 21º dia (D21), 28º dia (D28), 35º dia (D35) o qual corresponde ao vencimento do CH-CPDA1 e no 42º dia (D42) apenas para as bolsas CH-SAGM.

Nos próximos subitens descreveremos os resultados encontrados nesta etapa do estudo.

6.1.1 Caracterização das amostras

A caracterização das amostras consistiu em determinação de volume, dosagem de hemoglobina e hematócrito.

As unidades CH-CPDA1 apresentaram, em D1, volume médio de 273,5mL com desvio-padrão de 28,7mL e mediana de 267,6mL. De forma semelhante, nas bolsas CH-SAGM foram encontrados volume médio de 264,2mL e desvio-padrão de 23,8mL e mediana de 271,3mL, em D1. Os dados de volume encontrados nos

demaís dias de análise não puderam ser analisados, devido a retirada semanal de amostras para realizar testes laboratoriais.

As bolsas de CH-CPDA1 apresentaram, em D1, conteúdo de hemoglobina de $63,6 \pm 7,8$ g/unidade (média $\pm$ desvio padrão, $n = 20$), com mediana de 65,0 g/unidade, hematócrito de $69,9 \pm 3,6$ % (média $\pm$ desvio padrão, $n = 20$), com mediana de 69,8%. Já as vinte unidades de CH-CPDA1 apresentaram, em D1, conteúdo de hemoglobina de $48,9 \pm 7,5$ g/unidade (média $\pm$ desvio padrão, $n = 20$), com mediana de 50,4 g/unidade, hematócrito de $55,8 \pm 3,3$ % (média $\pm$ desvio padrão, $n = 20$), com mediana de 56,9%. Todas as amostras apresentaram conformidade maior ou igual 75% em hemoglobina (g/unidade) e hematócrito (%), atendendo ao exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2017).

Os valores médios e intervalo de confiança de 95% dos parâmetros hemoglobina total e hematócrito, a cada semana de análise, em unidades de CH-CPDA1 e CH-SAGM estão apresentados nas **Tabelas 8 e 9**, respectivamente.

Tabela 8 - Média e intervalo de confiança de 95% para hemoglobina total (g/dL) e hematócrito (%) em CH-CPDA1.

Parâmetro	Média (IC) (n=20)
Hemoglobina D1	23,24 (22,56-23,92)
Hemoglobina D7	23,20 (22,52-23,88)
Hemoglobina D14	23,26 (22,63-23,89)
Hemoglobina D21	22,74 (22,13-23,34)
Hemoglobina D28	22,75 (22,16-23,34)
Hemoglobina D35	22,90 (22,30-23,50)
Hematócrito D1	69,89 (68,21-71,57)
Hematócrito D7	69,84 (68,12-71,56)
Hematócrito D14	69,49 (68,07-70,91)
Hematócrito D21	70,61 (69,45-71,77)
Hematócrito D28	72,59 (71,08-74,10)
Hematócrito D35	73,59 (72,13-75,05)

IC: limites inferior e superior para o intervalo de confiança de 95%

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Tabela 9 - Média e intervalo de confiança de 95% para hemoglobina total (g/dL) e hematócrito (%) em CH-SAGM.

Parâmetro	Média (IC) (n=20)*
Hemoglobina D1	18,41 (17,80-19,02)
Hemoglobina D7	18,71 (18,09-19,34)
Hemoglobina D14	18,73 (18,12-19,33)
Hemoglobina D21	18,56 (17,91-19,20)
Hemoglobina D28	18,39 (17,82-18,95)
Hemoglobina D35	18,23 (17,64-18,81)
Hemoglobina D42	18,36 (17,75-18,60)
Hematócrito D1	55,83 (54,28-57,38)
Hematócrito D7	57,20 (55,55-58,85)
Hematócrito D14	56,65 (55,06-58,24)
Hematócrito D21	55,39 (53,81-56,97)
Hematócrito D28	57,37 (55,74-59,00)
Hematócrito D35	58,30 (56,44-60,17)
Hematócrito D42	58,51 (56,84-60,18)

IC: limites inferior e superior para o intervalo de confiança de 95%.

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

6.1.2 Resultados do perfil laboratorial padrão

Neste item serão apresentados os dados laboratoriais utilizados na definição do padrão normal para unidades CH-CPDA1 e CH-SAGM: hemoglobina livre, grau de hemólise, glicose, lactato, desidrogenase láctica (LDH) e potássio plasmático. Estas variáveis numéricas apresentaram distribuição normal gaussiana e, portanto, foram expressas em termos de média, intervalo de 95% de confiança, além de gráficos de intervalo para ilustrar a média e a dispersão dos dados.

Os intervalos de confiança com 95% de confiança fornecem estimativas dos parâmetros laboratoriais populacionais. Entre os limites numéricos apresentados pelos intervalos de confiança situa-se, com 95% de confiança, o verdadeiro valor da média para os parâmetros laboratoriais na população.

6.1.2.1 Hemólise

Na **Tabela 10** estão apresentados os valores médios e intervalo de confiança de 95% dos parâmetros hemoglobina livre (hemoglobina plasmática) e grau de hemólise, das unidades de CH-CPDA1, com representações destes resultados na **Figura 4** (hemoglobina livre) e na **Figura 5** (grau de hemólise).

Quanto às unidades de CH-SAGM, os valores médios e intervalo de confiança de 95% dos parâmetros hemoglobina plasmática e grau de hemólise estão apresentados na **Tabela 11**, com representações gráficas destes resultados nas **Figura 6** (hemoglobina livre) e **Figura 7** (grau de hemólise).

Foi observado aumento da hemoglobina livre e do percentual de hemólise no decorrer do armazenamento. Ao final da validade, nas bolsas CH-CPDA1, os valores médios atingidos foram mais do que dez vezes superiores aos patamares iniciais (D1). Nas amostras CH-SAGM, a elevação foi de menor magnitude, aumentando em torno de seis vezes o valor de hemoglobina plasmática e de 5,5 vezes o percentual de hemólise, ao comparamos o D42 com D1.

Encontramos 85% de conformidade nos resultados de grau de hemólise nas amostras CH-CPDA1 no 35º dia de estocagem, estando dentro do exigido pela legislação brasileira. Por outro lado, nas unidades CH-SAGM houve 100% de conformidade no percentual de hemólise no 42º dia, ou seja, todos os resultados inferiores a 0,8%.

Tabela 10 - Perfil padrão de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em CH-CPDA1: média e intervalo de confiança de 95%, a cada semana.

Parâmetro	Média (IC) (n=20)
Hemoglobina livre D1 (g/dL)	0,033 (0,023-0,044)
Hemoglobina livre D7 (g/dL)	0,073 (0,058-0,088)
Hemoglobina livre D14 (g/dL)	0,167 (0,111-0,223)
Hemoglobina livre D21 (g/dL)	0,307 (0,181-0,434)
Hemoglobina livre D28 (g/dL)	0,381 (0,270-0,491)
Hemoglobina livre D35 (g/dL)	0,470 (0,342-0,598)
Hemólise D1 (%)	0,042 (0,029-0,055)
Hemólise D7 (%)	0,092 (0,072-0,113)
Hemólise D14 (%)	0,218 (0,141-0,294)
Hemólise D21 (%)	0,389 (0,231-0,547)
Hemólise D28 (%)	0,452 (0,318-0,585)
Hemólise D35 (%)	0,539 (0,390-0,689)

IC: limites inferior e superior para o intervalo de confiança de 95%.

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 4 - Perfil padrão de hemoglobina livre (g/dL) em CH-CPDA1.

Média e intervalo de confiança de 95% a cada semana. D, dia.

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 5- Perfil padrão de grau de hemólise (%) em CH-CPDA1.

Média e intervalo de confiança de 95% a cada semana. D, dia.

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Tabela 11 - Perfil padrão de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em CH-SAGM: média e intervalo de confiança de 95%, a cada semana.

Parâmetro	Média (IC) (n=20)
Hemoglobina Livre D1 (g/dL)	0,019 (0,017-0,021)
Hemoglobina Livre D7 (g/dL)	0,028 (0,024-0,032)
Hemoglobina Livre D14 (g/dL)	0,039 (0,034-0,044)
Hemoglobina Livre D21 (g/dL)	0,050 (0,044-0,057)
Hemoglobina Livre D28 (g/dL)	0,068 (0,056-0,080)
Hemoglobina Livre D35 (g/dL)	0,088 (0,071-0,104)
Hemoglobina Livre D42 (g/dL)	0,116 (0,088-0,144)
Hemólise D1 (%)	0,046 (0,040-0,050)
Hemólise D7 (%)	0,063 (0,054-0,071)
Hemólise D14 (%)	0,089 (0,080-0,099)
Hemólise D21 (%)	0,120 (0,109-0,131)
Hemólise D28 (%)	0,154 (0,134-0,174)
Hemólise D35 (%)	0,196 (0,170-0,221)
Hemólise D42 (%)	0,254 (0,207-0,302)

IC: limites inferior e superior para o Intervalo de Confiança de 95%.

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 6 - Perfil padrão de hemoglobina livre (g/dL) em CH-SAGM, a cada semana (intervalo de confiança de 95%).

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 7 - Perfil padrão de grau de hemólise (%) em CH-SAGM, a cada semana (intervalo de confiança de 95%).

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

6.1.2.2 Parâmetros bioquímicos

Para a determinação do perfil bioquímico padrão de bolsas CH-CPDA1 e bolsas CH-SAGM, a cada semana de armazenamento, foram realizadas as seguintes dosagens: potássio, lactato, desidrogenase láctica (LDH) e glicose.

Os níveis de glicose plasmática reduziram gradativamente, enquanto os níveis de lactato e LDH aumentaram, no decorrer da estocagem. A queda nos resultados de glicose ocorreu de forma mais pronunciada nas unidades CH-CPDA1 quando comparadas às bolsas CH-SAGM. No decorrer do período de estocagem, entre D1 e D35, houve redução de aproximadamente 80% dos valores de glicose nas unidades CH-CPDA1, enquanto nas bolsas CH-SAGM, entre D1 e D42, ocorreu queda para metade dos níveis iniciais (**Tabela 12 e Tabela 13**).

Os valores de potássio plasmático se elevaram durante o armazenamento, sendo que na primeira semana ocorreu o crescimento mais acelerado, atingindo em D7 valores aproximadamente cinco vezes maiores em CH-CPDA1 e quatro vezes maiores em CH-SAGM, quando comparados com aqueles encontrados em D1. Ao final de cinco semanas (D35), os resultados de potássio nas amostras CH-CPDA1 demonstraram crescimento de 13,6 vezes em relação ao D1. Bolsas CH-SAGM apresentaram, em D42, valores 13 vezes maiores desse íon quando comparados a D1 (**Tabela 12 e Tabela 13**).

Os valores de referência para as dosagens bioquímicas nas bolsas CH-CPDA1 e CH-SAGM também foram representados pelas médias e limites dos intervalos de confiança em 95%. Desta forma, foi definido um perfil padrão em parâmetros laboratoriais (hemoglobina plasmática, grau de hemólise, potássio, glicose, lactato e desidrogenase láctica) para o controle de qualidade e monitoramento das lesões de armazenamento de CH-CPDA1 (preparados pela metodologia do plasma rico em plaquetas) e CH-SAGM (preparados pela metodologia da camada leucoplaquetária).

Na **Tabela 12** encontram-se os resultados das estimativas das médias e dos intervalos de confiança de 95% para cada uma das quatro dosagens bioquímicas (potássio, lactato, LDH e glicose), nas bolsas CH-CPDA1, nos seis dias de armazenamento em que foram analisados. Nas **Figuras 8, 9, 10 e 11** são apresentados os resultados para cada parâmetro laboratorial.

Tabela 12 - Perfil padrão de potássio (mmol/L), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e glicose (mg/dL) em CH-CPDA1: média e intervalo de confiança de 95%, nos dias de armazenamento 1 (D1), 7 (D7), 14 (D14), 21 (D21), 28 (D28) e 35 (D35) (n = 20).

Dosagens bioquímicas	Média (IC) (n=20)
Potássio D1	6,20 (4,95-7,45)
Potássio D7	32,98 (30,31-35,65)
Potássio D14	49,86 (46,82-52,90)
Potássio D21	62,67 (59,99-65,31)
Potássio D28 (n=19)	69,97 (65,97-73,96)
Potássio D35	84,15 (80,25-88,04)
Lactato D1	70,94 (66,33-75,54)
Lactato D7	161,59 (155,39-167,79)
Lactato D14	258,06 (245,83-270,28)
Lactato D21	307,83 (291,37-324,28)
Lactato D28	384,25 (365,28-403,22)
Lactato D35	427,95 (399,15-456,76)
LDH D1	379,15 (310,95-447,36)
LDH D7	1046,05 (713,64-1378,46)
LDH D14	1956,90 (1471,42-2442,38)
LDH D21 (n=19)	2987,89 (2431,46-3544,33)
LDH D28 (n=19)	3921,58 (3293,79-4549,36)
LDH D35 (n=19)	4695,26 (3944,50-5446,02)
Glicose D1	418,85 (395,19-442,51)
Glicose D7	325,90 (312,18-339,62)
Glicose D14	239,95 (221,28-258,62)
Glicose D21	177,65 (153,66-201,64)
Glicose D28	122,45 (95,83-149,07)
Glicose D35	89,60 (62,95-116,25)

IC: limites inferior e superior para o intervalo de confiança de 95%.

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 8 - Perfil padrão da dosagem de potássio (mmol/L) em CH-CPDA1.

Resultados expressos em médias e intervalos de confiança de 95%, para cada dia do armazenamento em que foi analisado (D1, D7, D14, D21, D28 e D35).

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 9 - Perfil padrão da dosagem de lactato (mg/dL) em CH-CPDA1.

Resultados expressos em médias e intervalos de confiança de 95%, para cada dia do armazenamento em que foi analisado (D1, D7, D14, D21, D28 e D35).

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 10 - perfil padrão da dosagem de LDH (UI/dL) em CH-CPDA1.

Resultados expressos em médias e intervalos de confiança de 95%, para cada dia do armazenamento em que foi analisado (D1, D7, D14, D21, D28 e D35).

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 11 - Perfil padrão da dosagem de glicose (mg/dL) em CH-CPDA1

Resultados expressos em médias e intervalos de confiança de 95%, para cada dia do armazenamento em que foi analisado (D1, D7, D14, D21, D28 e D35).

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Na **Tabela 13** são apresentados os resultados das estimativas das médias e dos intervalos de confiança de 95% para cada uma das quatro dosagens bioquímicas (potássio, lactato, LDH e glicose), nas bolsas CH-SAGM, nos sete dias de armazenamento em que foram analisados. Nas **Figuras 12, 13, 14 e 15** são apresentados esses resultados também para cada parâmetro laboratorial.

Tabela 13 - Perfil padrão de potássio (mmol/L), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e glicose (mg/dL) em CH-SAGM: média e intervalo de confiança de 95%, nos dias de armazenamento 1 (D1), 7 (D7), 14 (D14), 21 (D21), 28 (D28), 35 (D35) e 42 (D42). (n = 20).

Dosagens bioquímicas	Média (IC) (n=20)
Potássio D1	3,75 (3,48-4,01)
Potássio D7	15,77(14,86-16,67)
Potássio D14	26,00 (24,63-27,38)
Potássio D21	33,67 (32,04-35,30)
Potássio D28	39,88 (38,14-41,60)
Potássio D35 (n=19)	45,04 (42,83-47,25)
Potássio D42	48,90 (46,31-51,49)
Lactato D1	45,15 (42,34-47,95)
Lactato D7	117,63 (112,37-122,88)
Lactato D14	172,62 (166,75-178,49)
Lactato D21 (n=19)	230,45 (219,63-241,27)
Lactato D28	252,30 (241,79-262,81)
Lactato D35	298,60 (287,49-309,71)
Lactato D42	335,30 (324,46-346,14)
LDH D1	69,05 (61,60-76,50)
LDH D7	189,40 (124,66-254,14)
LDH D14	407,25 (272,69-541,81)
LDH D21	698,90 (479,51-918,29)
LDH D28	1026,80 (746,55-1307,05)
LDH D35 (n=18)	1263,44 (940,25-1586,64)
LDH D42	1405,50 (1067,50-1743,50)
Glicose D1	576,50 (566,34-586,66)
Glicose D7	494,10 (477,16-511,04)
Glicose D14 (n=19)	432,63 (414,67-450,59)
Glicose D21 (n=19)	384,89 (370,05-399,74)
Glicose D28	354,75 (338,54-370,96)
Glicose D35	320,70 (304,79-336,61)
Glicose D42	298,75 (281,62-315,88)

IC: limites inferior e superior para o intervalo de confiança de 95%.

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 12 - Perfil padrão de potássio (mmol/L) em CH-SAGM. Resultados expressos em médias e intervalos de confiança de 95%, para cada dia do armazenamento em que foi analisado (D1, D7, D14, D21, D28, D35 e D42).

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 13 - Perfil padrão de lactato (mg/dL) em CH-SAGM. Resultados expressos em médias e intervalos de confiança de 95%, para cada dia do armazenamento em que foi analisado (D1, D7, D14, D21, D28, D35 e D42).

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 14 - Perfil padrão de LDH (UI/dL) em CH-SAGM. Resultados expressos em médias e intervalos de confiança de 95%, para cada dia do armazenamento em que foi analisado (D1, D7, D14, D21, D28, D35 e D42).

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

Figura 15 - Perfil padrão de glicose (mg/dL) em CH-SAGM. Resultados expressos em médias e intervalos de confiança de 95%, para cada dia do armazenamento em que foi analisado (D1, D7, D14, D21, D28, D35 e D42).

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

6.1.3 Comparação de análises laboratoriais entre as metodologias

Na **Tabela 14** são apresentados os resultados da comparação de médias dos parâmetros laboratoriais entre as metodologias CPDA1 e SAGM, nas datas de vencimento destas bolsas.

Houve diferenças significativas entre as médias desses parâmetros laboratoriais entre as duas metodologias avaliadas ($p < 0,05$).

Durante o armazenamento, o aumento de hemoglobina livre, grau de hemólise, potássio, lactato e LDH foi mais pronunciado nas amostras de CH-CPDA1, com diferenças estatisticamente significativas quando em comparação a bolsas CH-SAGM. O mesmo ocorreu na redução de glicose, com quedas abruptas nos níveis deste açúcar em algumas amostras de CH-CPDA1, atingindo valores abaixo de 20mg/dL na data de vencimento (35 dias).

Tabela 14 - Comparação de médias entre os grupos CH-CPDA1 D35 e CH-SAGM D42.

Parâmetro	CPDA1 D35 (n=20)	SAGM D42 (n=20)	P-valor
Potássio	84,15(±8,32)	48,90(±5,54)	<0,001*
Lactato	427,95(±61,55)	335,30(±23,17)	<0,001*
LDH	4695,26(±1557,64)	1405,50(±722,20)	<0,001*
Glicose	89,60(±56,93)	298,75(±36,59)	<0,001*
Hemoglobina livre	0,470(±0,273)	0,116(±0,060)	<0,001*
Grau de hemólise	0,540(±0,318)	0,254(±0,100)	<0,001*
Hemoglobina	22,90(±1,29)	18,36(±1,29)	<0,001*
Hematócrito	73,59(±3,12)	58,51(±3,56)	<0,001*

Média (±desvio padrão); * $p < 0,05$; Teste t-student.

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

6.1.4 Culturas microbiológicas

Todas as amostras apresentaram resultados negativos nas culturas microbiológicas, tanto nas análises do primeiro dia quanto naquelas da data de vencimento.

6.2 Segunda etapa – Efeitos da exposição por tempo igual ou menor que 24 horas a temperaturas inadequadas para transporte

Foram analisados 3 experimentos com amostras CH-SAGM e 3 experimentos com amostras CH-CPDA1, conforme descrito nos métodos.

Todas as bolsas foram selecionadas aleatoriamente do estoque da Central de Produção do Hemocentro de Belo Horizonte da FH, em datas pré-definidas pelo cronograma de trabalho. As bolsas que originaram os *pools* de CH-SAGM foram preparadas a partir de sangue total coletados nos dias 21, 26 e 28/12/2016. As bolsas que originaram os *pools* de CH-CPDA1 foram preparadas a partir de sangue total coletados nos dias 12 e 13/01/2017.

Contando como zero a data da coleta do sangue total e do preparo do CH, foram montados três *pools* no dia seguinte à coleta, ou seja, no dia um (D1). Neste mesmo dia cada *pool* foi aliquotado em cinco bolsas (grupos A, B, C, D e E).

Os testes laboratoriais ocorreram no dia 14 (D14, pré-exposição), no dia 15 (D15), no dia 21 (D21) e no dia 35 (D35) para unidades de CH-CPDA1 ou no dia 42 (D42) para aquelas unidades CH-SAGM.

Nos próximos subitens descreveremos os resultados encontrados na segunda etapa deste estudo.

6.2.1 Caracterização das amostras

A caracterização das alíquotas da segunda etapa consistiu em determinação de volume, dosagem de hemoglobina e hematócrito.

As amostras CH-CPDA1, após aliquotagem, apresentaram volume de $260,0 \pm 3,8$ mL (média $\pm$ desvio padrão, $n = 15$), com mediana de 261,0 mL, conteúdo de hemoglobina de $61,5 \pm 0,8$ g/unidade (média $\pm$ desvio padrão, $n = 15$), com mediana de 61,4 g/unidade, hematócrito de $75,7 \pm 1,8$ % (média $\pm$ desvio padrão, $n = 15$), com mediana de 75,2%. Todas as alíquotas atenderam às exigências da legislação brasileira para valores de hemoglobina por unidade e hematócrito (BRASIL, 2017). Na **Tabela 15** são apresentados os valores de mediana dos parâmetros hematócrito e hemoglobina (g/dL) em cada grupo de alíquota e as comparações entre as cinco alíquotas, demonstrando que não houve diferença significativa nestes resultados.

Tabela 15 - Hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) em amostras CH-CPDA1, no dia D14: comparação de medianas entre os cinco grupos da segunda etapa.

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)					P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)	
Hemoglobina D14	23,6 (23,2-24,6)	23,4 (23,0-24,2)	23,8 (22,8-24,6)	23,6 (22,8-24,2)	23,4 (23,2-24,4)	0,970
Hematócrito D14	75,4 (72,8-78,4)	75,0 (74,0-76,2)	76,8 (73,8-78,4)	75,2 (74,6-77,8)	75,0 (74,2-77,8)	0,963

D14: 14º dia de armazenamento

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação entre os cinco grupos independentes (A, B, C, D e E).

Fonte: elaborado pelo autor (2018)

As amostras CH-SAGM, após alíquotagem, apresentaram volume de 270,4 ±7,2mL (média ±desvio padrão, n = 15), com mediana de 274,2mL, conteúdo de hemoglobina de 49,9 ±0,5 g/unidade (média ±desvio padrão, n = 15), com mediana de 49,9 g/unidade, hematócrito de 60,7 ±1,3% (média ± desvio padrão, n = 15), com mediana de 60,0%. Todas as alíquotas atenderam às exigências da legislação brasileira para valores de hemoglobina por unidade e hematócrito (BRASIL, 2017). Na **Tabela 16** são apresentados os valores de mediana dos parâmetros hematócrito e hemoglobina (g/dL) em cada grupo de alíquota e as comparações entre as cinco alíquotas, demonstrando que não houve diferença significativa nestes resultados.

Tabela 16 - Hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) em amostras CH-SAGM, no dia D14: comparação de medianas entre os cinco grupos da segunda etapa.

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)					P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)	
Hemoglobina D14	18,2 (18,1-19,3)	18,5 (18,1-19,1)	18,4 (17,8-19,1)	18,3 (17,9-18,9)	18,4 (18,2-19,0)	0,973
Hematócrito D14	60,0 (59,8-62,4)	59,9 (59,5-62,1)	59,4 (59,3-62,5)	60,0 (59,5-62,7)	60,2 (60,1-62,4)	0,726

D14: 14º dia de armazenamento

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação entre os cinco grupos independentes (A, B, C, D e E).

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

6.2.2 Parâmetros laboratoriais: comparações entre os grupos dos *pools*

Foram realizadas análises estatísticas pelo teste de Kruskal Wallis, para comparações entre os cinco grupos independentes (A, B, C, D e E) dos *pools* de CH-CPDA1 e de CH-SAGM, nos tempos D14, D15, D21 e D35 (ou D42), para cada parâmetro laboratorial.

Também foram comparados cada um dos grupos testes (A, B, C e D) com o grupo E (grupo controle), utilizando o teste estatístico Mann Whitney.

Além disso, cada um dos cinco grupos foi comparado com os valores do controle normal estudado na primeira etapa, nos tempos correspondentes e para as duas metodologias, CH-CPDA1 e CH-SAGM.

6.2.2.1 Hemólise

As variáveis hemoglobina livre e percentual de hemólise não apresentaram distribuição normal gaussiana e, desta forma, foram expressas em termos de mediana e valores mínimo e máximo.

Na **Tabela 17** encontram-se os valores destas estimativas para as amostras CH-CPDA1, em cada dia de teste laboratorial, comparados entre os cinco grupos independentes (A, B, C, D e E) e comparados entre cada grupo teste (A, B, C e D) com o grupo controle E.

Na **Tabela 18** são apresentados os valores das estimativas das medianas de hemoglobina plasmática e percentual de hemólise, para as amostras CH-SAGM, em cada dia de teste laboratorial, com as comparações entre os cinco grupos independentes (A, B, C, D e E) e comparações entre cada grupo teste (A, B, C e D) com o grupo controle E.

Como os p-valores foram superiores a 0,05 em todas as comparações realizadas, conclui-se que, não houve significância estatística suficiente para se afirmar que há diferença entre os grupos com relação às medianas do CH-CPDA1 e do CH-SAGM. Ou seja, as bolsas de CH que, no 14º dia de estocagem, foram

expostas a temperaturas de até -2°C ou 15°C, por 6 horas ou 24 horas, não apresentaram diferença significativa em grau de hemólise, até a data de vencimento, em comparação a bolsas controle mantidas em $4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante todo o período de armazenamento.

Vale ressaltar que em um dos *pools* de CH-CPDA1, todas as alíquotas (inclusive o grupo controle) atingiram valores de grau de hemólise acima de 0,8% no 35° dia de armazenamento, ultrapassando o limite superior definido pela legislação brasileira (BRASIL, 2017).

Tabela 17 - Hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em amostras CH-CPDA1, nos dias D14, D15, D21 e D35: comparação de medianas entre os cinco grupos (última coluna) e comparação de medianas de cada grupo teste (A, B, C e D) com o grupo controle (E).

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)					P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)	
Hb livre	0,348	0,302	0,321	0,297	0,313	0,746
D14	(0,297-0,363)	(0,256-0,484)	(0,278-0,440)	(0,244-0,345)	(0,269-0,317)	
p-valor²	0,275	0,827	0,275	0,827	-	
Hb livre	0,540	0,555	0,391	0,496	0,467	0,959
D15	(0,468-0,657)	(0,466-0,584)	(0,376-0,805)	(0,340-0,725)	(0,411-0,666)	
p-valor²	0,513	0,827	0,513	0,827	-	
Hb livre	0,687	0,726	0,510	0,701	0,639	0,821
D21	(0,685-1,038)	(0,671-0,986)	(0,453-1,150)	(0,501-0,964)	(0,597-0,854)	
p-valor²	0,275	0,275	0,513	0,827	-	
Hb livre	0,897	0,781	0,601	0,748	0,777	0,547
D35	(0,858-1,260)	(0,724-1,076)	(0,567-1,243)	(0,667-1,090)	(0,671-0,895)	
p-valor²	0,127	0,513	0,513	0,827	-	
Hemólise	0,309	0,342	0,282	0,312	0,297	0,939
D14	(0,305-0,426)	(0,273-0,476)	(0,271-0,506)	(0,224-0,384)	(0,285-0,342)	
p-valor²	0,275	0,658	0,513	0,827	-	
Hemólise	0,602	0,518	0,381	0,356	0,434	0,699
D15	(0,453-0,728)	(0,455-0,573)	(0,342-0,878)	(0,337-0,719)	(0,387-0,687)	
p-valor²	0,275	0,513	0,513	0,513	-	
Hemólise	0,687	0,717	0,464	0,743	0,693	0,943
D21	(0,662-1,178)	(0,678-1,088)	(0,431-1,310)	(0,439-1,080)	(0,562-0,936)	
p-valor²	0,827	0,513	0,513	0,827	-	
Hemólise	0,794	0,779	0,591	0,741	0,744	0,873
D35	(0,732-1,175)	(0,699-1,160)	(0,475-1,308)	(0,580-1,156)	(0,584-0,973)	
p-valor²	0,513	0,513	0,827	0,827	-	

Hb: hemoglobina; Hemólise: grau de hemólise

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação dos cinco grupos independentes (A, B, C, D e E); ²Teste de Mann Whitney: p-valor de cada grupo em relação ao grupo controle (E).

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

Tabela 18 - Hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em amostras CH-SAGM, nos dias D14, D15, D21 e D42: comparação de medianas entre os cinco grupos (última coluna) e comparação de medianas de cada grupo teste (A, B, C e D) com o grupo controle (E).

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)					P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)	
Hb livre	0,040	0,043	0,038	0,044	0,047	0,646
D14	(0,031-0,048)	(0,032-0,043)	(0,034-0,039)	(0,032-0,047)	(0,038-0,050)	
p-valor²	0,513	0,268	0,184	0,376	-	
Hb livre	0,042	0,046	0,039	0,045	0,046	0,155
D15	(0,042-0,048)	(0,039-0,054)	(0,036-0,041)	(0,043-0,054)	(0,043-0,057)	
p-valor²	0,268	0,658	0,050	0,658	-	
Hb livre	0,078	0,081	0,061	0,070	0,065	0,102
D21	(0,065-0,080)	(0,075-0,107)	(0,051-0,064)	(0,054-0,071)	(0,056-0,081)	
p-valor²	0,658	0,184	0,275	0,827	-	
Hb livre	0,097	0,103	0,086	0,099	0,112	0,595
D42	(0,092-0,130)	(0,091-0,120)	(0,086-0,109)	(0,093-0,112)	(0,093-0,114)	
p-valor²	0,827	0,827	0,121	0,500	-	
Hemólise	0,088	0,093	0,086	0,099	0,103	0,709
D14	(0,061-0,105)	(0,064-0,097)	(0,066-0,087)	(0,063-0,103)	(0,076-0,108)	
p-valor²	0,513	0,275	0,275	0,376	-	
Hemólise	0,092	0,100	0,086	0,095	0,101	0,520
D15	(0,084-0,108)	(0,079-0,123)	(0,071-0,087)	(0,090-0,119)	(0,081-0,121)	
p-valor²	0,827	0,827	0,275	0,827	-	
Hemólise	0,165	0,173	0,127	0,152	0,147	0,125
D21	(0,130-0,176)	(0,167-0,201)	(0,102-0,143)	(0,106-0,161)	(0,112-0,173)	
p-valor²	0,513	0,184	0,275	0,827	-	
Hemólise	0,195	0,206	0,181	0,205	0,241	0,918
D42	(0,186-0,283)	(0,177-0,266)	(0,177-0,243)	(0,176-0,250)	(0,179-0,249)	
p-valor²	0,827	0,827	0,513	0,827	-	

Hb livre: hemoglobina livre; Hemólise: grau de hemólise

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação dos cinco grupos independentes (A, B, C, D e E); ²Teste de Mann Whitney: p-valor de cada grupo em relação ao grupo controle (E).

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

6.2.2.1 Parâmetros bioquímicos

As dosagens de glicose, lactato, LDH e potássio plasmático não apresentaram distribuição normal gaussiana e, desta forma, foram expressas em mediana e valores mínimo e máximo.

Na **Tabela 19** encontram-se os valores das estimativas das medianas e dos valores mínimo e máximo para as amostras CH-CPDA1, em cada um dos quatro parâmetros bioquímicos, nos dias D14, D15, D21 e D35, sendo comparados entre os cinco grupos independentes (A, B, C, D e E) e comparados entre cada grupo teste (A, B, C e D) com o grupo controle E. Como os p-valores foram superiores a 0,05 em todas as comparações realizadas entre os cinco grupos e entre os grupos A, B, C e D com o grupo E, conclui-se que não houve significância estatística para se afirmar que há diferença em dosagens de glicose, lactato, LDH e potássio, entre os grupos com relação às medianas do CH-CPDA1.

Da mesma forma, na **Tabela 20** são apresentados os valores das estimativas das medianas e dos valores mínimo e máximo para as amostras CH-SAGM, nas dosagens bioquímicas, nos dias D14, D15, D21 e D42, com as comparações entre os cinco grupos independentes (A, B, C, D e E) e as comparações de cada grupo teste (A, B, C e D) com o grupo controle E. Os p-valores foram superiores a 0,05 nas comparações realizadas entre os cinco grupos e entre os grupos A, B, C e D com o grupo E, com exceção no parâmetro LDH D15 na comparação do grupo A com o Grupo E ($p=0,049$). Desta forma, não houve significância estatística para se afirmar que houve diferença entre os grupos com relação às medianas do CH-SAGM. A única exceção foi para LDH D15, nas alíquotas denominadas A, o que sugere que temperaturas abaixo de 0°C, por períodos de 24 horas, ocasionam aumento nos valores de LDH, em bolsas de CH-SAGM, imediatamente após a exposição, com normalização dos níveis desta enzima no restante do armazenamento.

Tabela 19 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em amostras CH-CPDA1, nos dias D14, D15, D21 e D35: comparação de medianas entre os cinco grupos (última coluna) e comparação de medianas de cada grupo teste (A, B, C e D) com o grupo controle (E).

(continua)

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)					P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)	
Glicose D14	212,0 (207,0-235,0)	214,0 (211,0-226,0)	211,0 (209,0-231,0)	212,0 (208,0-233,0)	210,0 (210,0-237,0)	0,989
p-valor²	0,825	0,507	0,825	0,825	-	
Glicose D15	209,0 (204,0-225,0)	204,0 (194,0-216,0)	188,0 (179,0-194,0)	193,0 (189,0-204,0)	202,0 (198,0-209,0)	0,070
p-valor²	0,184	0,827	0,050	0,275	-	
Glicose D21	178,0 (163,0-202,0)	168,0 (163,0-194,0)	160,0 (133,0-178,0)	168,0 (150,0-194,0)	171,0 (155,0-194,0)	0,705
p-valor²	0,513	1,000	0,513	0,658	-	
Glicose D35	104,0 (91,0-130,0)	98,0 (86,0-122,0)	88,0 (70,0-112,0)	94,0 (80,0-124,0)	96,0 (80,0-126,0)	0,792
p-valor²	0,513	0,827	0,513	0,658	-	
Lactato D14	305,5 (300,5-329,5)	300,5 (299,5-329,5)	312,5 (301,0-329,0)	306,0 (298,5-332,0)	314,0 (298,0-335,0)	0,964
p-valor²	0,827	0,827	0,827	0,827	-	
Lactato D15	333,0 (318,0-347,5)	331,0 (321,0-344,0)	346,5 (345,5-353,0)	331,0 (328,0-348,5)	327,0 (321,5-341,5)	0,292
p-valor²	0,827	0,827	0,050	0,275	-	
Lactato D21	362,0 (356,0-400,0)	365,0 (352,0-395,0)	381,0 (369,0-416,0)	374,0 (358,0-386,0)	354,0 (340,0-365,0)	0,307
p-valor²	0,275	0,376	0,050	0,127	-	
Lactato D35	441,0 (423,0-457,0)	454,0 (438,0-462,0)	466,0 (444,0-484,0)	443,0 (440,0-492,0)	437,0 (434,0-469,0)	0,520
p-valor²	0,827	0,513	0,275	0,275	-	

(conclusão)

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)					P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)	
LDH	2455	2265	2530	2425	2370	0,730
D14	(2390-3060)	(2100-3435)	(2425-3100)	(2265-2735)	(2160-2845)	
p-valor²	0,275	0,827	0,275	0,827	-	
LDH	3845	3340	3325	3265	3315	0,261
D15	(3725-4210)	(3170-4065)	(2990-3810)	(3205-3575)	(3030-3400)	
p-valor²	0,050	0,513	0,827	0,827	-	
LDH	6350	5130	5200	5000	4660	0,054
D21	(6130-6890)	(5100-5800)	(4430-5730)	(4700-5190)	(4500-4910)	
p-valor²	0,050	0,050	0,513	0,127	-	
LDH	7880	6770	7030	6960	6920	0,262
D35	(7220-8120)	(6640-7740)	(6550-7700)	(6830-7800)	(6770-7110)	
p-valor²	0,050	0,658	0,827	0,513	-	
Potássio	54,15	52,4	53,9	53,5	54,3	0,939
D14	(46,7-55,2)	(49,3-55,7)	(50,7-56,2)	(50,6-56,2)	(50,2-59,0)	
p-valor²	0,513	0,513	0,827	0,827	-	
Potássio	58,15	60,2(52,7-71,1)	55,5(52,0-57,8)	55,6(52,7-56,1)	55,29(54,0-57,7)	0,792
D15	(53,8-61,0)					
p-valor²	0,513	0,827	0,827	0,827	-	
Potássio	71,3	68,0	68,6	69,0	69,7	0,455
D21	(70,8-74,3)	(68,0-71,3)	(68,0-72,8)	(68,6-69,7)	(67,5-71,5)	
p-valor²	0,275	0,825	0,827	0,658	-	
Potássio	87,3	89,3	92,4	91,0	88,6	0,575
D35	(84,3-93,7)	(89,0-100,0)	(87,8-96,8)	(91,0-118,8)	(88,3-92,7)	
p-valor²	0,513	0,275	0,827	0,268	-	

LDH: desidrogenase láctica.

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação dos cinco grupos independentes (A, B, C, D e E); ²Teste de Mann Whitney: p-valor de cada grupo em relação ao grupo controle (E).

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

Tabela 20 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em amostras CH-SAGM, nos dias D14, D15, D21 e D42: comparação de medianas entre os cinco grupos (última coluna) e comparação de medianas de cada grupo teste (A, B, C e D) com o grupo controle (E).

(continua)

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)					P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)	
Glicose D14	427 (407-430)	438 (413-440)	428 (423-448)	443 (412-445)	434 (408-437)	0,663
p-valor²	0,275	0,275	0,827	0,275	-	
Glicose D15	413 (406-438)	419 (409-445)	401 (397-429)	415 (399-439)	421 (402-447)	0,699
p-valor²	0,827	0,827	0,275	0,513	-	
Glicose D21	377 (372-400)	385 (370-400)	373 (362-387)	382 (368-403)	380 (378-397)	0,887
p-valor²	0,513	0,827	0,275	0,827	-	
Glicose D42	306 (268-324)	305 (275-317)	305 (276-315)	310 (264-311)	311 (267-313)	0,991
p-valor²	0,827	0,827	0,827	0,376	-	
Lactato D14	178,0 (177,0-196,0)	185,0 (176,0-200,0)	186,0 (182,0-208,0)	181,0 (177,0-196,0)	187,5 (176,0-205,0)	0,849
p-valor²	0,827	0,513	0,827	0,827	-	
Lactato D15	188,0 (183,0-201,0)	193,0 (187,0-201,0)	202,0 (199,0-218,0)	199,5 (193,0-211,0)	200,5 (185,0-204,0)	0,470
p-valor²	0,513	0,658	0,513	0,827	-	
Lactato D21	240,5 (204,0-242,5)	234,0 (212,5-238,5)	240,5 (226,5-243,5)	235,0 (222,5-238,0)	237,0 (226,0-239,5)	0,654
p-valor²	0,513	0,513	0,275	0,513	-	
Lactato D42	320,0 (318,0-355,0)	317,0 (317,0-349,0)	328,0 (314,0-350,0)	317,0 (316,0-344,0)	326,0 (309,0-355,0)	0,907
p-valor²	1,000	0,825	0,827	0,827	-	

(conclusão)

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)					P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)	
LDH	339	366	356	369	372	0,948
D14	(283-388)	(307-381)	(306-387)	(299-371)	(312-387)	
p-valor²	0,827	0,513	0,658	0,275	-	
LDH	493	416	382	409	422	0,165
D15	(429-460)	(377-460)	(358-418)	(371-417)	(349-426)	
p-valor²	0,049*	0,827	0,513	0,513	-	
LDH	670	666	600	612	623	0,165
D21	(645-719)	(580-676)	(569-645)	(528-640)	(538-635)	
p-valor²	0,050	0,275	0,827	0,827	-	
LDH	1020	1030	940	940	1000	0,403
D42	(890-1160)	(970-1190)	(910-970)	(890-1070)	(970-1160)	
p-valor²	1,000	0,658	0,077	0,275	-	
Potássio	25,9	25,5	26,1	25,6	25,4	0,918
D14	(21,4-25,9)	(21,8-26,5)	(21,3-26,4)	(21,6-25,9)	(21,6-25,7)	
p-valor²	0,513	0,513	0,513	0,658	-	
Potássio	27,4	26,8	26,07	26,9	25,8	0,764
D15	(24,5-29,6)	(24,1-27,0)	(24,1-26,9)	(24,9-27,4)	(24,9-27,1)	
p-valor²	0,513	0,827	0,827	0,827	-	
Potássio	32,1	31,7	29,8	29,8	31,6	0,539
D21	(28,9-37,0)	(29,1-31,7)	(28,0-31,1)	(28,5-31,5)	(28,3-34,3)	
p-valor²	0,513	0,827	0,275	0,513	-	
Potássio	41,8	47,6	49,1	47,9	48,6	0,478
D42	(37,7-48,6)	(43,8-48,6)	(45,0-49,1)	(47,5-48,3)	(47,1-50,3)	
p-valor²	0,184	0,376	0,825	0,513	-	

LDH: desidrogenase láctica.

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação dos cinco grupos independentes (A, B, C, D e E); ²Teste de Mann Whitney: p-valor de cada grupo em relação ao grupo controle (E); *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

6.2.3 Comparação das amostras da segunda etapa com os controles normais da primeira etapa

Foram feitas comparações dos valores das estimativas da média e do desvio padrão de cada um dos 5 grupos com os valores encontrados na primeira etapa (controle normal composto por 20 amostras), para cada um dos parâmetros laboratoriais, nos tempos correspondentes, tanto para CH-CPDA1 quanto para CH-SAGM.

Aplicou-se o teste paramétrico t-student, comparando dois grupos independentes (média dos controles normais em relação ao grupo A ou B ou C ou D ou E). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6.2.3.1 Hemólise

Na **Tabela 21** encontram-se os valores das estimativas da média e do desvio padrão para os testes hemoglobina livre e percentual de hemólise, sendo comparados os controles normais da primeira etapa deste estudo com as amostras CH-CPDA1 da segunda etapa. Em hemoglobina plasmática, no dia 14 (D14) foi encontrada diferença significativa na comparação dos controles normais com os grupos A, B e C. Nos dias D15 e D21, houve diferença significativa nas comparações de todos os cinco grupos. Em D35 a diferença só não foi significativa para os grupos C e E. Por fim, para o percentual de hemólise, nos tempos D14 e D35 não houve diferenças significativas. No tempo D15 todos os 5 grupos se diferiram significativamente do controle normal. Enquanto no tempo D21 apenas os grupos A e B se diferiram significativamente dos controles normais.

Na **Tabela 22** apresentamos os valores das estimativas da média e do desvio padrão para os testes hemoglobina livre e grau de hemólise em amostras CH-SAGM, com as comparações entre os controles normais da primeira etapa e cada um dos cinco grupos da segunda etapa. Em hemoglobina livre foi encontrada diferença significativa apenas nos grupos A e B no tempo D21. Em hemólise essa diferença significativa também se deu apenas nos grupos A e B no tempo D21. Ou seja, as amostras CH-SAGM submetidas a temperaturas mais frias

(aproximadamente -1°C), por pelo menos 6 horas, apresentaram hemoglobina plasmática e percentual de hemólise mais altos do que as amostras controle (curva padrão), apenas uma semana após a exposição. Esta diferença não se manteve na data de vencimento das bolsas.

Observou-se que, em todas as comparações com diferença estatística significativa, a média do CH nos controles normais é sempre inferior à média dos demais grupos. Porém, esta diferença não era esperada nas comparações com o grupo E, pois são amostras controle da segunda etapa, que foram mantidas em condições normais de armazenamento durante todo o experimento.

Tabela 21 - Dosagens de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%), em amostras CH-CPDA1, nos dias D14, D15, D21 e D35: comparação de médias dos controles normais da primeira etapa do estudo com cada um dos cinco grupos da segunda etapa (A, B, C, D e E).

Variável	Resultados dos grupos - Média ($\pm$ DP)					
	Controles normais (n=20)	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)
Hb livre D14	0,167 ($\pm$ 0,1)	0,336 ($\pm$ 0,1)	0,347 ($\pm$ 0,1)	0,346 ($\pm$ 0,1)	0,295 ($\pm$ 0,1)	0,300 ($\pm$ 0,1)
p-valor		0,026*	0,024*	0,021*	0,085	0,073
Hb livre D15	0,167 ($\pm$ 0,1)	0,555 ($\pm$ 0,1)	0,535 ($\pm$ 0,1)	0,524 ($\pm$ 0,2)	0,520 ($\pm$ 0,2)	0,515 ($\pm$ 0,1)
p-valor		<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Hb livre D21	0,307 ($\pm$ 0,3)	0,803 ($\pm$ 0,2)	0,794 ($\pm$ 0,2)	0,704 ($\pm$ 0,4)	0,722 ($\pm$ 0,2)	0,697 ($\pm$ 0,1)
p-valor		0,006*	0,007*	0,035*	0,021*	0,025*
Hb livre D35	0,470 ($\pm$ 0,3)	1,000 ($\pm$ 0,2)	0,860 ($\pm$ 0,2)	0,804 ($\pm$ 0,4)	0,835 ($\pm$ 0,2)	0,781 ($\pm$ 0,1)
p-valor		0,004*	0,028*	0,073	0,040*	0,069
Hemólise D14	0,217 ($\pm$ 0,2)	0,347 ($\pm$ 0,1)	0,364 ($\pm$ 0,1)	0,353 ($\pm$ 0,1)	0,307 ($\pm$ 0,1)	0,308 ($\pm$ 0,1)
p-valor		0,197	0,151	0,187	0,369	0,357
Hemólise D15	0,217 ($\pm$ 0,2)	0,594 ($\pm$ 0,1)	0,515 ($\pm$ 0,1)	0,533 ($\pm$ 0,3)	0,471 ($\pm$ 0,2)	0,503 ($\pm$ 0,2)
p-valor		0,001*	0,006*	0,010*	0,025*	0,010*
Hemólise D21	0,389 ($\pm$ 0,3)	0,842 ($\pm$ 0,3)	0,828 ($\pm$ 0,2)	0,735 ($\pm$ 0,5)	0,754 ($\pm$ 0,3)	0,730 ($\pm$ 0,2)
p-valor		0,039*	0,043*	0,131	0,094	0,106
Hemólise D35	0,539 ($\pm$ 0,3)	0,900 ($\pm$ 0,2)	0,879 ($\pm$ 0,2)	0,791 ($\pm$ 0,5)	0,826 ($\pm$ 0,3)	0,767 ($\pm$ 0,2)
p-valor		0,076	0,093	0,236	0,159	0,247

Hb livre: hemoglobina livre; Hemólise: grau de hemólise

Média ($\pm$ desvio-padrão); Teste t-student: p-valor de cada grupo em relação aos controles normais da primeira etapa; *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

Tabela 22 - Dosagens de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%), em amostras CH-SAGM, nos dias D14, D15, D21 e D42: comparação de médias dos controles normais da primeira etapa do estudo com cada um dos cinco grupos da segunda etapa (A, B, C, D e E).

Variável	Resultados dos grupos - Média ($\pm$ DP)					
	Controles normais (n=20)	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)
Hb livre D14	0,039 ($\pm$ 0,01)	0,040 ($\pm$ 0,01)	0,039 ($\pm$ 0,01)	0,037 ($\pm$ 0,01)	0,041 ($\pm$ 0,01)	0,045 ($\pm$ 0,01)
p-valor	-	0,903	0,942	0,776	0,747	0,355
Hb livre D15	0,039 ($\pm$ 0,01)	0,044 ($\pm$ 0,01)	0,046 ($\pm$ 0,01)	0,039 ($\pm$ 0,01)	0,047 ($\pm$ 0,01)	0,049 ($\pm$ 0,01)
p-valor	-	0,432	0,267	0,977	0,206	0,149
Hb livre D21	0,051 ($\pm$ 0,01)	0,074 ($\pm$ 0,01)	0,088 ($\pm$ 0,01)	0,059 ($\pm$ 0,01)	0,065 ($\pm$ 0,01)	0,067 ($\pm$ 0,01)
p-valor	-	0,009*	<0,001*	0,342	0,097	0,061
Hb livre D42	0,116 ($\pm$ 0,06)	0,106 ($\pm$ 0,02)	0,105 ($\pm$ 0,01)	0,094 ($\pm$ 0,01)	0,101 ($\pm$ 0,01)	0,106 ($\pm$ 0,01)
p-valor	-	0,788	0,752	0,537	0,683	0,787
Hemólise D14	0,089 ($\pm$ 0,02)	0,085 ($\pm$ 0,02)	0,085 ($\pm$ 0,02)	0,080 ($\pm$ 0,01)	0,088 ($\pm$ 0,02)	0,096 ($\pm$ 0,02)
p-valor	-	0,713	0,707	0,432	0,934	0,618
Hemólise D15	0,089 ($\pm$ 0,02)	0,095 ($\pm$ 0,01)	0,100 ($\pm$ 0,02)	0,081 ($\pm$ 0,01)	0,101 ($\pm$ 0,02)	0,101 ($\pm$ 0,02)
p-valor	-	0,670	0,384	0,522	0,343	0,365
Hemólise D21	0,120 ($\pm$ 0,02)	0,157 ($\pm$ 0,02)	0,180 ($\pm$ 0,02)	0,124 ($\pm$ 0,02)	0,140 ($\pm$ 0,03)	0,144 ($\pm$ 0,03)
p-valor	-	0,021*	<0,001*	0,794	0,210	0,131
Hemólise D42	0,254 ($\pm$ 0,10)	0,221 ($\pm$ 0,05)	0,216 ($\pm$ 0,05)	0,200 ($\pm$ 0,037)	0,210 ($\pm$ 0,04)	0,223 ($\pm$ 0,04)
p-valor	-	0,589	0,533	0,377	0,470	0,606

Hb livre: hemoglobina livre; Hemólise: grau de hemólise

Média ($\pm$ desvio-padrão); Teste t-student: p-valor de cada grupo em relação aos controles normais da primeira etapa. *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

6.2.3.2 Parâmetros bioquímicos

Na **Tabela 23** encontram-se os valores das estimativas da média e do desvio padrão dos parâmetros laboratoriais bioquímicos das amostras CH-CPDA1, comparados entre os controles normais da estabelecidos na primeira etapa e cada um dos cinco grupos da segunda etapa (A, B, C, D, E).

Dos parâmetros laboratoriais avaliados (glicose, lactato, LDH e potássio) houve diferença significativa entre alguns grupos quando comparados com o grupo controle normal.

Nos resultados de glicose houve diferenças significativa apenas no tempo D15 e para o grupo C ($p=0,035$), que corresponde às amostras que foram mantidas a temperaturas elevadas por 24 horas.

Na análise de lactato a diferença só não foi significativa no tempo D35, data de vencimento. Nos demais tempos (D14, D15 e D21) todos os grupos se diferiram significativamente do controle normal, inclusive o grupo E de amostras normais.

Em LDH essa diferença só não foi significativa no tempo D14, para os demais tempos todos os grupos se diferiram significativamente do controle normal.

Em potássio o grupo A e C se diferiram significativamente do controle normal no tempo D21 ($p=0,011$ e $p=0,048$, respectivamente), o grupo B no tempo D15 ($p=0,024$) e o grupo D no tempo D35 ($p=0,011$).

Em todas as comparações com diferença estatística significativa, a média do concentrado de hemácias nos controles normais é sempre inferior à média dos demais grupos, exceto para o parâmetro glicose.

Na **Tabela 24** são apresentados os valores das estimativas da média e do desvio padrão, em CH-SAGM, para cada um dos testes bioquímicos (glicose, lactato, LDH e potássio), com comparação dos controles normais da primeira fase com cada um dos cinco grupos (A, B, C, D e E).

Dos parâmetros laboratoriais avaliados de CH-SAGM, apenas em lactato houve diferença significativa entre alguns grupos com o controle normal. Esta diferença significativa se deu no grupo C nos tempos D14 ($p=0,024$) e D15 ($p<0,001$); no grupo D no tempo D15 ($p=0,001$) e no grupo E nos tempos D14 ($p=0,045$) e D15 ($p=0,005$). Nestes pontos com diferenças significativas, a média do lactato em CH-SAGM nos controles normais é sempre inferior à média dos demais grupos.

Tabela 23 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em amostras CH-CPDA1, nos dias D14, D15, D21 e D35: comparação de médias dos controles normais da primeira etapa do estudo com cada um dos cinco grupos da segunda etapa (A, B, C, D e E).

(continua)

Variável	Controles normais (n=20)	Resultados dos grupos - Média ($\pm$ DP)				
		A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)
Glicose D14	239,9 ($\pm$ 39,9)	218 ($\pm$ 14,9)	217,0 ($\pm$ 7,9)	217,0 ($\pm$ 12,1)	217,6 ($\pm$ 13,4)	219,0 ($\pm$ 15,5)
p-valor	-	0,364	0,341	0,342	0,357	0,386
Glicose D15	239,9 ($\pm$ 39,9)	212,6 ($\pm$ 10,9)	204,6 ($\pm$ 11,0)	187,0 ($\pm$ 7,5)	195,3 ($\pm$ 7,7)	202,0 ($\pm$ 6,0)
p-valor	-	0,260	0,150	0,035*	0,072	0,122
Glicose D21	177,65 ($\pm$ 51,3)	181 ($\pm$ 19,6)	175,0 ($\pm$ 16,6)	157,0 ($\pm$ 22,6)	170,6 ($\pm$ 22,1)	173,3 ($\pm$ 19,6)
p-valor	-	0,913	0,931	0,506	0,821	0,888
Glicose D35	89,6 ($\pm$ 56,9)	108,3 ($\pm$ 19,8)	102,0 ($\pm$ 18,3)	90,0 ($\pm$ 21,0)	99,3 ($\pm$ 22,4)	100,6 ($\pm$ 23,3)
p-valor	-	0,585	0,717	0,991	0,776	0,747
Lactato D14	258,1 ($\pm$ 26,1)	311,8 ($\pm$ 15,5)	309,6 ($\pm$ 16,7)	314,1 ($\pm$ 14,0)	312,1 ($\pm$ 17,5)	315,6 ($\pm$ 18,5)
p-valor	-	0,003*	0,004*	0,002*	0,002*	0,002*
Lactato D15	258,1 ($\pm$ 26,1)	332,8 ($\pm$ 14,7)	332,0 ($\pm$ 11,5)	348,3 ($\pm$ 4,0)	335,8 ($\pm$ 11,0)	330,0 ($\pm$ 10,3)
p-valor	-	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Lactato D21	307,8 ($\pm$ 35,2)	372,6 ($\pm$ 23,8)	370,6 ($\pm$ 22,0)	388,6 ($\pm$ 24,4)	372,6 ($\pm$ 14,0)	353,0 ($\pm$ 12,5)
p-valor	-	0,006*	0,007*	0,001*	0,005*	0,042*
Lactato D35	428,0 ($\pm$ 61,5)	440,3 ($\pm$ 17,0)	451,3 ($\pm$ 12,2)	464,6 ($\pm$ 20,0)	458,3 ($\pm$ 29,1)	446,6 ($\pm$ 19,3)
p-valor	-	0,737	0,527	0,325	0,417	0,613

(conclusão)

Variável	Controles normais (n=20)	Resultados dos grupos - Média ($\pm$ DP)				
		A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)
LDH D14	1956,9 ($\pm$ 1037,3)	2635 ($\pm$ 369,4)	2600,0 ($\pm$ 727,8)	2685,0 ($\pm$ 363,2)	2475,0 ($\pm$ 238,9)	2458,3 ($\pm$ 350,9)
p-valor	-	0,283	0,316	0,250	0,407	0,424
LDH D15	1956,9 ($\pm$ 1037,3)	3926,6 ($\pm$ 252,6)	3525,0 ($\pm$ 475,3)	3375,0 ($\pm$ 412,2)	3348,3 ($\pm$ 198,5)	3248,3 ($\pm$ 193,7)
p-valor	-	0,004*	0,019*	0,032*	0,034*	0,047*
LDH D21	2987,9 ($\pm$ 1154,5)	6456,6 ($\pm$ 391,0)	5343,3 ($\pm$ 395,7)	5120,0 ($\pm$ 653,6)	4963,3 ($\pm$ 247,0)	4690,0 ($\pm$ 206,6)
p-valor	-	<0,001*	0,003*	0,006*	0,009*	0,021*
LDH D35	4695,3 ($\pm$ 1557,6)	7740 ($\pm$ 466,0)	7050,0 ($\pm$ 601,0)	7093,3 ($\pm$ 577,6)	7196,6 ($\pm$ 526,5)	6933,3 ($\pm$ 170,3)
p-valor	-	0,004*	0,019*	0,017*	0,014*	0,024*
Potássio D14	49,9 ($\pm$ 6,5)	52 ($\pm$ 4,6)	52,4 ($\pm$ 3,2)	53,6 ($\pm$ 2,7)	53,4 ($\pm$ 2,8)	54,5 ($\pm$ 4,3)
p-valor	-	0,590	0,512	0,338	0,366	0,247
Potássio D15	49,9 ($\pm$ 6,5)	57,6 ($\pm$ 3,6)	60,1 ($\pm$ 9,6)	55,1 ($\pm$ 2,9)	54,7 ($\pm$ 1,8)	55,6 ($\pm$ 1,8)
p-valor	-	0,058	0,024*	0,188	0,213	0,147
Potássio D21	62,7 ($\pm$ 5,7)	72,1 ($\pm$ 1,8)	69,1 ($\pm$ 1,9)	69,8 ($\pm$ 2,6)	69,1 ($\pm$ 0,5)	69,5 ($\pm$ 2,0)
p-valor	-	0,011*	0,071	0,048*	0,069	0,054
Potássio D35	84,1 ($\pm$ 8,3)	88,4 ($\pm$ 4,7)	92,7 ($\pm$ 6,2)	92,3 ($\pm$ 4,5)	100,2 ($\pm$ 16,0)	89,8 ($\pm$ 2,4)
p-valor	-	0,401	0,102	0,114	0,011*	0,259

LDH: desidrogenase láctica.

Média ($\pm$ desvio-padrão); Teste t-student: p-valor de cada grupo em relação aos controles normais da primeira etapa. . *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.**Fonte:** elaborado pelo autor (2018).

Tabela 24 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em amostras CH-SAGM, nos dias D14, D15, D21 e D42: comparação de médias dos controles normais da primeira etapa do estudo com cada um dos cinco grupos da segunda etapa (A, B, C, D e E).

(continua)

Variável	Controles normais (n=20)	Resultados dos grupos - Média ($\pm$ DP)				
		A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)
Glicose D14	432,6 ($\pm$ 37,3)	421,3 ($\pm$ 12,5)	430,3 ($\pm$ 15,0)	433 ($\pm$ 13,2)	433,3 ($\pm$ 18,5)	426,3 ($\pm$ 15,9)
p-valor	-	0,615	0,918	0,987	0,975	0,779
Glicose D15	432,6 ($\pm$ 37,3)	419 ($\pm$ 16,8)	424,3 ($\pm$ 18,6)	409 ($\pm$ 17,4)	417,7 ($\pm$ 20,1)	423,3 ($\pm$ 22,6)
p-valor	-	0,546	0,713	0,300	0,510	0,683
Glicose D21	384,9 ($\pm$ 30,8)	383 ($\pm$ 14,9)	385 ($\pm$ 15,0)	374 ($\pm$ 12,5)	384,3 ($\pm$ 17,6)	385 ($\pm$ 10,4)
p-valor	-	0,919	0,995	0,559	0,976	0,995
Glicose D42	298,8 ($\pm$ 36,6)	299,3 ($\pm$ 28,6)	299 ($\pm$ 21,6)	298,7 ($\pm$ 20,3)	295 ($\pm$ 26,9)	297 ($\pm$ 26,0)
p-valor	-	0,979	0,991	0,997	0,867	0,938
Lactato D14	172,6 ($\pm$ 12,6)	183,7 ($\pm$ 10,7)	186,7 ($\pm$ 12,1)	191,7 ($\pm$ 13,9)	184,7 ($\pm$ 10,0)	189,5 ($\pm$ 14,6)
p-valor	-	0,164	0,089	0,024*	0,130	0,045*
Lactato D15	172,6 ($\pm$ 12,6)	190,5 ($\pm$ 9,5)	193,3 ($\pm$ 7,0)	206 ($\pm$ 10,1)	201 ($\pm$ 8,8)	196,3 ($\pm$ 10,4)
p-valor	-	0,029	0,012	<0,001*	0,001*	0,005*
Lactato D21	230,4 ($\pm$ 22,4)	229 ($\pm$ 21,7)	228,3 ($\pm$ 13,9)	236,8 ($\pm$ 9,1)	231,8 ($\pm$ 8,2)	234,2 ($\pm$ 7,2)
p-valor	-	0,918	0,877	0,638	0,918	0,783
Lactato D42	335,3 ($\pm$ 23,2)	331 ($\pm$ 20,8)	327,7 ($\pm$ 18,5)	330,7 ($\pm$ 18,1)	325,7 ($\pm$ 15,9)	330 ($\pm$ 23,3)
p-valor	-	0,765	0,594	0,745	0,498	0,716

(conclusão)

Variável	Controles normais (n=20)	Resultados dos grupos - Média ($\pm$ DP)				
		A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	D (n = 3)	E (n = 3)
LDH D14	407,3 ($\pm 287,5$)	336,7 ($\pm 52,5$)	351,3 ($\pm 39,1$)	349,7 ($\pm 40,9$)	346,3 ($\pm 41,0$)	357 ($\pm 39,7$)
p-valor	-	0,682	0,745	0,737	0,723	0,770
LDH D15	407,3 ($\pm 287,5$)	460,7 ($\pm 32,0$)	417,7 ($\pm 41,5$)	386,0 ($\pm 30,2$)	399,0 ($\pm 24,6$)	399,0 ($\pm 43,3$)
p-valor	-	0,756	0,952	0,901	0,962	0,962
LDH D21	698,9 ($\pm 468,8$)	678 ($\pm 37,6$)	640,7 ($\pm 52,8$)	604,7 ($\pm 38,2$)	593,3 ($\pm 58,3$)	598,7 ($\pm 52,9$)
p-valor	-	0,940	0,835	0,736	0,706	0,720
LDH D42	1405,5 ($\pm 722,2$)	1023,3 ($\pm 135,0$)	1063,3 ($\pm 113,7$)	940 ($\pm 30,0$)	966,7 ($\pm 92,9$)	1043,3 ($\pm 102,1$)
p-valor	-	0,380	0,431	0,286	0,314	0,405
Potássio D14	26,0 ($\pm 2,9$)	24,4 ($\pm 2,6$)	24,6 ($\pm 2,4$)	24,6 ($\pm 2,8$)	24,4 ($\pm 2,4$)	24,2 ($\pm 2,3$)
p-valor	-	0,387	0,437	0,442	0,373	0,325
Potássio D15	26,0 ($\pm 2,9$)	27,2 ($\pm 2,6$)	26 ($\pm 1,6$)	25,7 ($\pm 1,4$)	26,4 ($\pm 1,3$)	26 ($\pm 1,1$)
p-valor	-	0,524	0,977	0,848	0,831	0,978
Potássio D21	33,7 ($\pm 3,5$)	32,6 ($\pm 4,1$)	30,8 ($\pm 1,5$)	29,6 ($\pm 1,5$)	29,9 ($\pm 1,5$)	31,4 ($\pm 3,0$)
p-valor	-	0,648	0,186	0,065	0,084	0,291
Potássio D42	48,9 ($\pm 5,5$)	42,7 ($\pm 5,5$)	46,7 ($\pm 2,5$)	47,7 ($\pm 2,3$)	47,9 ($\pm 0,4$)	48,6 ($\pm 1,6$)
p-valor	-	0,083	0,508	0,722	0,765	0,939

LDH: desidrogenase láctica.

Média ($\pm$ desvio-padrão); Teste t-student: p-valor de cada grupo em relação aos controles normais da primeira etapa.*p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.**Fonte:** elaborado pelo autor (2018).

6.2.4 Culturas microbiológicas

Quanto às culturas microbiológicas, todas as amostras apresentaram resultados negativos, tanto nas análises do primeiro dia (data de montagem dos *pools*) quanto naquelas da data de vencimento.

6.3 Terceira etapa - Efeitos da exposição por tempo de 48 horas a temperaturas inadequadas para transporte

Foram analisados 3 experimentos com amostras CH-SAGM e 3 experimentos com amostra CH-CPDA1, conforme metodologia descrita anteriormente.

As bolsas de CH foram selecionadas aleatoriamente do estoque da Central de Produção do Hemocentro de Belo Horizonte da FH, em datas pré-definidas pelo cronograma de trabalho. As bolsas que originaram os *pools* de CH-SAGM foram preparadas a partir de sangue total coletados no dia 21/12/2016. As bolsas que originaram os *pools* de CH-CPDA1 foram preparadas a partir de sangue total coletados no dia 28/12/2017.

Os parâmetros laboratoriais foram avaliados nos tempos D14 (antes da exposição), D16, D21 e D35 (ou D42) entre os três grupos (A, B e C) de três *pools* de CH provenientes das duas metodologias de preparo e armazenamento (CH-CPDA1 e CH-SAGM). Também foram comparados cada um dos grupos teste A e B com o grupo C (controle).

E, finalmente, cada um dos três grupos foi comparado com os valores do controle normal de 20 amostras (curva padrão da primeira etapa) nos tempos correspondentes e para as duas metodologias CH-CPDA1 e CH-SAGM (**item 6.3.4**).

Nos próximos subitens serão descritos os resultados encontrados na terceira etapa deste estudo.

6.3.1 Caracterização das amostras

A caracterização das alíquotas da terceira etapa consistiu em determinação de volume, dosagem de hemoglobina e hematócrito.

As amostras CH-CPDA1, após alíquotagem, apresentaram volume de $276,6 \pm 2,0$ mL (média $\pm$ desvio padrão, $n = 9$), com mediana de 279,9 mL, conteúdo de hemoglobina de $62,8 \pm 0,5$ g/unidade (média $\pm$ desvio padrão, $n = 9$), com mediana de 62,9 g/unidade, hematócrito de $70,0 \pm 1,2$ % (média $\pm$ desvio padrão, $n = 9$), com mediana de 69,6%. Todas as alíquotas atenderam às exigências da legislação brasileira para valores de hemoglobina por unidade e hematócrito (BRASIL, 2017). Na **Tabela 25** são apresentados os valores de mediana dos parâmetros hematócrito e hemoglobina (g/dL) em cada grupo de alíquota e as comparações entre as três alíquotas, demonstrando que não houve diferença significativa nestes resultados.

Tabela 25 - Hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) em amostras CH-CPDA1, no dia D14: comparação de medianas entre os três grupos da terceira etapa.

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)			P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n = 3)	C (n = 3)	
Hemoglobina D14	22,4 (22,4-22,4)	22,6 (22,6-22,6)	22,2 (22,2-22,6)	0,114
Hematócrito D14	69,4(69,0-71,6)	69,8(69,4-71,0)	69,6(68,6-71,8)	0,904

D14: 14º dia de armazenamento

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação entre os três grupos independentes (A, B e C). * $p < 0,05$: diferenças consideradas estatisticamente significativas.

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

As amostras CH-SAGM, após alíquotagem, apresentaram volume de $272,6 \pm 2,1$ mL (média $\pm$ desvio padrão, $n = 9$), com mediana de 272,2 mL, conteúdo de hemoglobina de $51,2 \pm 0,8$ g/unidade (média $\pm$ desvio padrão, $n = 9$), com mediana de 51,2 g/unidade, hematócrito de $59,8 \pm 1,3$ % (média $\pm$ desvio padrão, $n = 9$), com mediana de 60,4%. Todas as alíquotas atenderam às exigências da legislação brasileira para valores de hemoglobina por unidade e hematócrito (BRASIL, 2017). Na **Tabela 26** são apresentados os valores de mediana dos parâmetros

hematócrito (%) e hemoglobina (g/dL) em cada grupo de alíquota e as comparações entre as três alíquotas, demonstrando que não houve diferença significativa nestes resultados.

Tabela 26 - Hemoglobina (g/dL) e hematócrito (%) em amostras CH-SAGM, no dia D14: comparação de medianas entre os três grupos da terceira etapa.

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)			P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	
Hemoglobina D14	18,9 (18,8-19,0)	18,6 (18,4-18,9)	19,0 (18,2-19,2)	0,430
Hematócrito D14	60,6 (60,4-61,2)	59,4 (59,0-59,8)	60,4 (57,0-60,6)	0,143

D14: 14º dia de armazenamento

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação entre os três grupos independentes (A, B e C). *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

6.3.2 Parâmetros laboratoriais: comparações entre os grupos dos *pools*

Foram realizadas análises estatísticas pelo teste de Kruskal Wallis, para comparações entre os três grupos independentes (A, B e C) dos *pools* de CH-CPDA1 e de CH-SAGM, nos tempos D14, D16, D21 e D35 (ou D42), para cada parâmetro laboratorial. Também foram comparados cada um dos grupos testes (A e B) com o grupo C (grupo controle), utilizando o teste estatístico Mann Whitney. Em todas as comparações, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p<0,05.

6.3.2.1 Hemólise

As variáveis hemoglobina livre e percentual de hemólise não apresentaram distribuição normal gaussiana e, desta forma, foram expressas em termos de mediana e valores mínimo e máximo.

Na **Tabela 27** encontram-se os valores destas estimativas para as amostras

CH-CPDA1, em cada dia de teste laboratorial, comparados entre os três grupos independentes (A, B e C) e comparados entre cada grupo teste (A e B) com o grupo controle C.

Na **Tabela 28** apresentamos os valores das estimativas das medianas de hemoglobina plasmática e percentual de hemólise, para as amostras CH-SAGM, em cada dia de teste laboratorial, com as comparações entre os três grupos independentes (A, B e C) e comparações entre cada grupo teste (A e B) com o grupo controle C.

Como os p-valores foram superiores a 0,05 em todas as comparações realizadas, conclui-se que, em hemólise, não houve significância estatística para se afirmar que há diferença entre os grupos com relação às medianas do CH-CPDA1 e do CH-SAGM. Ou seja, as bolsas de CH que, no 14º dia de estocagem, foram expostas a temperaturas de aproximadamente -1°C ou 24°C, por 48 horas, não apresentaram diferença significativa em grau de hemólise, até a data de vencimento, em comparação a bolsas controle mantidas em $4 \pm 2^\circ\text{C}$ durante todo o período de armazenamento.

Ressaltamos o fato de que todas as alíquotas (inclusive o grupo controle), de todos os três *pools* de CH-CPDA1, atingiram valores de grau de hemólise acima de 0,8% no 35º dia de armazenamento, ultrapassando o limite superior definido pela legislação brasileira (BRASIL, 2017).

Tabela 27 - Hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em amostras CH-CPDA1, na terceira etapa do estudo, nos dias D14, D16, D21 e D35: comparação de medianas entre os três grupos (última coluna) e comparação de medianas de cada grupo teste (A e B) com o grupo controle (C).

Variável	Resultados dos grupos			P-valor ¹
	Mediana (mínimo-máximo)			
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	
Hb livre D14	0,352 (0,169-0,469)	0,295 (0,168-0,344)	0,337 (0,164-0,357)	0,561
p-valor ²	0,513	0,827	-	
Hb livre D16	0,74 (0,37-1,09)	0,40 (0,21-0,59)	0,57 (0,26-0,77)	0,491
p-valor ²	0,513	0,513	-	
Hb livre D21	1,10 (0,52-1,71)	0,67 (0,38-1,11)	0,99 (0,33-1,31)	0,733
p-valor ²	0,513	0,827	-	
Hb livre D35	1,58 (1,09-2,29)	1,55 (1,47-1,95)	1,29 (0,69-1,91)	0,587
p-valor ²	0,513	0,275	-	
Hemólise D14	0,49 (0,22-0,68)	0,40 (0,22-0,46)	0,46 (0,21-0,50)	0,670
p-valor ²	0,513	0,513	-	
Hemólise D16	0,99 (0,51-1,48)	0,44 (0,23-0,71)	0,74 (0,33-1,03)	0,252
p-valor ²	0,513	0,275	-	
Hemólise D21	1,50 (0,63-2,32)	0,77 (0,48-1,42)	1,26 (0,44-1,71)	0,561
p-valor ²	0,513	0,827	-	
Hemólise D35	2,16 (1,39-3,05)	2,08 (1,98-2,67)	1,58 (0,88-2,52)	0,587
p-valor ²	0,513	0,275	-	

Hb: hemoglobina; Hemólise: grau de hemólise

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação dos três grupos independentes (A, B e C); ²Teste de Mann Whitney: p-valor de cada grupo em relação ao grupo controle (C). *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

Tabela 28 - Hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%) em amostras CH-SAGM, na terceira etapa do estudo, nos dias D14, D16, D21 e D42: comparação de medianas entre os três grupos (última coluna) e comparação de medianas de cada grupo teste (A e B) com o grupo controle (C).

Variável	Resultados dos grupos			P-valor ¹
	Mediana (mínimo-máximo)			
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	
Hb livre D14	0,052 (0,047-0,070)	0,061 (0,052-0,067)	0,069 (0,067-0,075)	0,193
p-valor ²	0,275	0,050	-	
Hb livre D16	0,085 (0,064-0,109)	0,068 (0,053-0,070)	0,072 (0,069-0,090)	0,301
p-valor ²	0,827	0,127	-	
Hb livre D21	0,129 (0,096-0,164)	0,092 (0,088-0,116)	0,108 (0,098-0,125)	0,252
p-valor ²	0,513	0,275	-	
Hb livre D42	0,227 (0,204-0,331)	0,295 (0,249-0,325)	0,220 (0,176-0,294)	0,329
p-valor ²	0,513	0,127	-	
Hemólise D14	0,109 (0,098-0,143)	0,135 (0,110-0,147)	0,155 (0,138-0,155)	0,148
p-valor ²	0,127	0,127	-	
Hemólise D16	0,168 (0,137-0,232)	0,130 (0,112-0,155)	0,158 (0,140-0,188)	0,193
p-valor ²	0,827	0,127	-	
Hemólise D21	0,269 (0,212-0,353)	0,189 (0,176-0,232)	0,222 (0,218-0,265)	0,252
p-valor ²	0,513	0,275	-	
Hemólise D42	0,470 (0,449-0,731)	0,611 (0,559-0,696)	0,436 (0,387-0,622)	0,363
p-valor ²	0,275	0,275	-	

Hb: hemoglobina; Hemólise: grau de hemólise

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação dos três grupos independentes (A, B e C); ²Teste de Mann Whitney: p-valor de cada grupo em relação ao grupo controle (C). *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

6.3.2.2 Parâmetros bioquímicos

As dosagens plasmáticas de glicose, lactato, LDH e potássio não apresentaram distribuição normal gaussiana e, desta forma, foram expressas em mediana e valores mínimo e máximo.

Na **Tabela 29** encontram-se os valores das estimativas das medianas e dos valores mínimo e máximo para as amostras CH-CPDA1, em cada um dos quatro parâmetros bioquímicos, nos dias D14, D16, D21 e D35, sendo comparados entre os três grupos independentes (A, B e C) e comparados entre cada grupo teste (A e B) com o grupo controle C. Em glicose, no tempo D16, o grupo A foi diferente significativamente do controle (C) e também o grupo B em relação ao controle (C). Além disso, o teste estatístico teste de Kruskal Wallis, identificou diferença significativa entre os três grupos independentes, no parâmetro glicose nos dias 16, 21 e 35. Importante ressaltar que em CH-CPDA1 os níveis de glicose foram maiores no grupo A, composto por amostras submetidas a temperaturas inferiores a 0°C por 48 horas, quando comparado ao grupo controle e, ao contrário, foram menores no grupo B, representado por alíquotas expostas a temperaturas elevadas (24°C) por 48 horas, em relação ao controle. Nas demais dosagens bioquímicas, os p-valores foram superiores a 0,05 em todas as comparações realizadas. Desta forma, conclui-se que não houve significância estatística para se afirmar que há diferença em dosagens de lactato, LDH e potássio, entre os grupos com relação às medianas do CH-CPDA1.

Da mesma forma, na **Tabela 30** são apresentados os valores das estimativas das medianas e dos valores mínimo e máximo para as amostras CH-SAGM, nas dosagens bioquímicas, nos dias D14, D16, D21 e D42, com as comparações entre os três grupos independentes (A, B e C) e as comparações de cada grupo teste (A e B) com o grupo controle C. O p-valor foi inferior a 0,05 apenas no parâmetro glicose, no D16, que apresentou uma diferença significativa entre as medianas na comparação dos três grupos independentes ($p = 0,039$). Apesar das análises de glicose não demonstrarem diferença significativa nos testes estatísticos Mann Whitney, os valores do grupo B (temperaturas elevadas) sugerem ser inferiores ao grupo controle em D16, D21 e D42 (valor $p=0,050$). Nas demais dosagens bioquímicas (lactato, LDH e potássio), em todas as comparações realizadas entre

os três grupos e entre os grupos A e B com o grupo controle, os p-valores foram sempre iguais ou superiores a 0,05, concluindo-se que não houve significância estatística para se afirmar que houve diferença entre os grupos com relação às medianas do CH-SAGM.

Tabela 29 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em amostras CH-CPDA1 da terceira etapa, nos dias D14, D16, D21 e D35: comparação de medianas entre os três grupos (última coluna) e comparação de medianas de cada grupo teste (A e B) com o grupo controle (C).

(continua)

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)			P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	
Glicose D14	264 (261-277)	269 (260-286)	268 (263-293)	0,837
p-valor²	0,513	0,827	-	
Glicose D16	274 (267-274)	125 (113-128)	245 (245-257)	0,026*
p-valor²	0,043*	0,046*	-	
Glicose D21	230 (224-242)	107 (97-115)	208 (206-219)	0,027*
p-valor²	0,050	0,050	-	
Glicose D35	155 (152-176)	90 (89-99)	144 (141-154)	0,039*
p-valor²	0,127	0,050	-	
Lactato D14	229,5 (216,0-261,0)	231,5 (214,5-232,5)	228,0 (226,0-229,0)	0,733
p-valor²	0,513	0,513	-	
Lactato D16	252,0 (239,0-253,0)	357,0 (350,0-364,0)	249,0 (248,0-253,0)	0,066
p-valor²	1,000	0,050	-	
Lactato D21	287,0 (271,0-288,0)	380,0 (375,0-394,0)	286,0 (276,0-292,0)	0,066
p-valor²	0,827	0,050	-	
Lactato D35	338,0 (333,0-351,0)	425,0 (410,0-434,0)	350,0 (311,0-360,0)	0,066
p-valor²	0,827	0,050	-	

(conclusão)

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)			P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	
LDH D14	2350 (2245-3730)	2265 (2105-3395)	2205 (2180-1235)	0,587
p-valor²	0,275	0,827	-	
LDH D16	3880 (3310-6020)	3160 (2890-4860)	3030 (2650-4920)	0,430
p-valor²	0,275	0,827	-	
LDH D21	5370 (4160-7860)	4700 (3810-6430)	4590 (3240-6350)	0,670
p-valor²	0,513	0,513	-	
LDH D35	7110 (5350-9610)	7030 (5540-8550)	5940 (4020-8320)	0,733
p-valor²	0,513	0,513	-	
Potássio D14	47,14 (44,1-47,5)	47,14 (40,8-47,8)	47,30 (41,3-47,5)	0,989
p-valor²	1,000	0,827	-	
Potássio D16	54,4 (49,2-59,2)	48,4 (43,2-54,0)	52,0 (45,4-55,6)	0,329
p-valor²	0,513	0,513	-	
Potássio D21	62,98 (51,4-63,8)	58,72 (53,9-60,7)	59,30 (54,8-62,0)	0,670
p-valor²	0,513	0,513	-	
Potássio D35	73,64 (70,4-78,6)	81,32 (76,6-82,6)	73,88 (73,6-77,6)	0,184
p-valor²	0,658	0,127	-	

LDH: desidrogenase láctica.

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação dos três grupos independentes (A, B e C); ²Teste de Mann Whitney: p-valor de cada grupo em relação ao grupo controle (C). *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

Tabela 30 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em amostras CH-SAGM da terceira etapa, nos dias D14, D16, D21 e D35: comparação de medianas entre os três grupos (última coluna) e comparação de medianas de cada grupo teste (A e B) com o grupo controle (C).

(continua)

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)			P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	
Glicose D14	449 (443-470)	443 (439-443)	448 (443-458)	0,160
p-valor²	0,658	0,105	-	
Glicose D16	438 (434-441)	335 (319-341)	431 (426-437)	0,039*
p-valor²	0,127	0,050	-	
Glicose D21	404 (403-421)	323 (307-334)	401 (400-409)	0,051
p-valor²	0,275	0,050	-	
Glicose D42	313 (302-341)	276 (259-277)	313 (300-334)	0,063
p-valor²	0,658	0,050	-	
Lactato D14	175,5 (171,5-186,5)	173,0 (170,0-183,5)	177,5 (177,5-190,0)	0,390
p-valor²	0,268	0,268	-	
Lactato D16	180,5 (176,5-200,0)	267,5 (262,0-290,5)	184,0 (180,0-202,5)	0,061
p-valor²	0,513	0,050	-	
Lactato D21	211,5 (197,0-227,0)	294,5 (275,0-302,0)	211,5 (211,0-235,0)	0,063
p-valor²	0,658	0,050	-	
Lactato D42	279,0 (261,0-308,0)	321,0 (315,0-335,0)	292,0 (263,0-305,0)	0,066
p-valor²	0,827	0,050	-	

(conclusão)

Variável	Resultados dos grupos - Mediana (mínimo-máximo)			P-valor ¹
	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)	
LDH D14	700 (533-765)	645 (574-763)	688 (590-790)	0,837
p-valor²	0,827	0,513	-	
LDH D16	760 (736-944)	901 (739-934)	708 (656-774)	0,288
p-valor²	0,275	0,127	-	
LDH D21	1035(1000-1290)	1110 (1010-1350)	880 (815-1000)	0,077
p-valor²	0,077	0,050	-	
LDH D42	1460 (1300-1690)	1510 (1500-1710)	1420 (1250-1470)	0,148
p-valor²	0,513	0,050	-	
Potássio D14	27,63 (25,6-28,9)	27,04 (24,4-27,6)	27,75 (24,8-28,3)	0,505
p-valor²	0,827	0,275	-	
Potássio D16	30,24 (26,8-31,5)	27,44 (26,0-28,5)	28,66 (27,3-30,7)	0,430
p-valor²	0,827	0,275	-	
Potássio D21	31,85 (31,5-33,2)	29,23 (27,5-30,9)	32,31 (31,5-33,4)	0,063
p-valor²	0,658	0,050	-	
Potássio D42	49,43 (46,2-52,6)	49,6 (49,7-54,3)	51,89 (47,7-52,9)	0,558
p-valor²	0,513	0,825	-	

LDH: desidrogenase láctica.

Mediana (mínimo-máximo); ¹Teste de Kruskal Wallis: p-valor em comparação dos três grupos independentes (A, B e C); ²Teste de Mann Whitney: p-valor de cada grupo em relação ao grupo controle (C). *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

6.3.3 Comparação das amostras da terceira etapa com controles normais da primeira etapa

Foram feitas comparações dos valores das estimativas da média e do desvio padrão de cada um dos 3 grupos com os valores encontrados na primeira etapa (controle normal de 20 amostras), para cada um dos parâmetros laboratoriais, nos tempos correspondentes, tanto para CH-CPDA1 quanto para CH-SAGM.

Aplicou-se o teste paramétrico t-student, comparando dois grupos independentes (média dos controles normais em relação ao grupo A ou B ou C). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6.3.3.1 Hemólise

Na **Tabela 31** encontram-se os valores das estimativas da média e do desvio padrão para os testes hemoglobina livre e percentual de hemólise, sendo comparados os controles normais da primeira etapa deste estudo com as amostras CH-CPDA1 da terceira etapa. Nesta terceira etapa, encontramos diferenças significativas em relação aos controles normais da primeira etapa, tanto em hemoglobina livre quanto em grau de hemólise, nas alíquotas A em todos os dias de testes (D14, D16, D21 e D35) e nas alíquotas B e C nos dias D16, D21 e D35. Ou seja, a alíquota A apresentou diferenças em comparação à primeira fase, mesmo antes de ser exposta a temperaturas inferiores a 0°C e a alíquota C demonstrou diferenças durante o experimento, apesar de ter sido mantida em armazenamento adequado ($4 \pm 2^\circ\text{C}$).

Apresentamos na **Tabela 32** os valores das estimativas da média e do desvio padrão para hemoglobina plasmática e grau de hemólise, com as comparações entre os controles normais da primeira etapa deste estudo e cada um dos três grupos CH-SAGM desta terceira etapa. Em todas as três alíquotas (A, B e C), em todos os dias analisados (D14, D16, D21 e D42), foi demonstrado diferença significativa com relação aos controles normais da primeira fase, tanto em hemoglobina livre quanto em percentual de hemólise.

Em todas essas situações de diferença significativa, a média do CH nos controles normais da primeira etapa é sempre inferior à média dos grupos da terceira fase.

Tabela 31 - Dosagens de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%), em amostras CH-CPDA1, nos dias D14, D16, D21 e D35: comparação de médias dos controles normais da primeira etapa do estudo com cada um dos três grupos da terceira etapa (A, B e C).

Variável	Resultados dos grupos - Média ($\pm$ DP)			
	Controles normais (n=20)	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)
Hb livre D14	0,167 ($\pm$ 0,1)	0,339 ($\pm$ 0,16)	0,269 ($\pm$ 0,09)	0,286 ($\pm$ 0,11)
p-valor	-	0,036*	0,172	0,118
Hb livre D16	0,167 ($\pm$ 0,1)	0,733 ($\pm$ 0,36)	0,400 ($\pm$ 0,19)	0,531 ($\pm$ 0,26)
p-valor		<0,001*	0,008*	<0,001*
Hb livre D21	0,307 ($\pm$ 0,3)	1,110 ($\pm$ 0,60)	0,721 ($\pm$ 0,37)	0,876 ($\pm$ 0,50)
p-valor		0,001*	0,027*	0,006*
Hb livre D35	0,470 ($\pm$ 0,3)	1,652 ($\pm$ 0,60)	1,658 ($\pm$ 0,26)	1,295 ($\pm$ 0,61)
p-valor		<0,001*	<0,001*	<0,001*
Hemólise D14	0,217 ($\pm$ 0,2)	0,460 ($\pm$ 0,23)	0,358 ($\pm$ 0,13)	0,389 ($\pm$ 0,16)
p-valor		0,032*	0,170	0,103
Hemólise D16	0,217 ($\pm$ 0,2)	0,994 ($\pm$ 0,48)	0,461 ($\pm$ 0,24)	0,706 ($\pm$ 0,35)
p-valor		<0,001*	0,033*	<0,001*
Hemólise D21	0,389 ($\pm$ 0,3)	1,488 ($\pm$ 0,84)	0,889 ($\pm$ 0,48)	1,138 ($\pm$ 0,64)
p-valor		<0,001*	0,033*	0,004*
Hemólise D35	0,539 ($\pm$ 0,3)	2,220 ($\pm$ 0,83)	2,242 ($\pm$ 0,37)	1,661 ($\pm$ 0,83)
p-valor		<0,001*	<0,001*	<0,001*

Hb livre: hemoglobina livre; Hemólise: grau de hemólise

Média ($\pm$ desvio-padrão); Teste t-student: p-valor de cada grupo em relação aos controles normais da primeira etapa.). *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

Tabela 32 - Dosagens de hemoglobina livre (g/dL) e grau de hemólise (%), em amostras CH-SAGM, nos dias D14, D16, D21 e D42: comparação de médias dos controles normais da primeira etapa do estudo com cada um dos três grupos da terceira etapa (A, B e C).

Variável	Resultados dos grupos - Média ($\pm$ DP)			
	Controles normais (n=20)	A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)
Hb livre D14	0,039($\pm$ 0,01)	0,056($\pm$ 0,1)	0,060($\pm$ 0,1)	0,070($\pm$ 0,01)
p-valor	-	0,018*	0,004*	<0,001*
Hb livre D16	0,039($\pm$ 0,01)	0,086($\pm$ 0,1)	0,064($\pm$ 0,1)	0,077($\pm$ 0,1)
p-valor	-	<0,001*	0,001*	<0,001*
Hb livre D21	0,051($\pm$ 0,01)	0,129($\pm$ 0,1)	0,099($\pm$ 0,1)	0,110($\pm$ 0,1)
p-valor	-	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Hb livre D42	0,116($\pm$ 0,06)	0,254($\pm$ 0,1)	0,290($\pm$ 0,1)	0,230($\pm$ 0,1)
p-valor	-	0,002*	<0,001*	0,006*
Hemólise D14	0,089($\pm$ 0,02)	0,117($\pm$ 0,1)	0,132($\pm$ 0,1)	0,149($\pm$ 0,1)
p-valor	-	0,044*	0,003*	<0,001*
Hemólise D16	0,089($\pm$ 0,02)	0,179($\pm$ 0,1)	0,132($\pm$ 0,1)	0,162($\pm$ 0,1)
p-valor	-	<0,001*	0,003*	<0,001*
Hemólise D21	0,120($\pm$ 0,02)	0,278($\pm$ 0,1)	0,199($\pm$ 0,1)	0,235($\pm$ 0,1)
p-valor	-	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Hemólise D42	0,254($\pm$ 0,10)	0,55($\pm$ 0,2)	0,62($\pm$ 0,1)	0,482($\pm$ 0,1)
p-valor	-	<0,001*	<0,001*	0,002*

Hb livre: hemoglobina livre; Hemólise: grau de hemólise

Média ($\pm$ desvio-padrão); Teste t-student: p-valor de cada grupo em relação aos controles normais da primeira etapa.). *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.

Fonte: elaborado pelo autor (2018).

6.3.3.2 Parâmetros bioquímicos

Na **Tabela 33** encontram-se os valores das estimativas da média e do desvio padrão dos parâmetros laboratoriais bioquímicos (glicose, lactato, LDH e potássio) das amostras CH-CPDA1, comparados entre os controles normais da estabelecidos na primeira etapa e cada um dos três grupos da terceira etapa (A, B e C).

Em relação aos parâmetros laboratoriais avaliados houve diferença significativa entre alguns grupos quando comparados com o grupo controle normal.

Nos resultados de glicose, houve diferenças significativas nas alíquotas B, com valores mais baixos do que os controles normais, nos dias D16 e D21, e no grupo A no D35, que apresentou níveis mais elevados do que os controles. Quanto ao lactato, encontramos diferença significativa no grupo B, nos dias D16 e D21, com resultados mais elevados do que os controles, e nos grupos A e C em D35, com valores mais baixos do que os controles da primeira etapa. Ou seja, as amostras de CH-CPDA1 expostas a temperaturas elevadas por 48 horas (grupo B) apresentaram queda em glicose e aumento em lactato, enquanto temperaturas abaixo de 0°C por 48 horas (grupo A) demonstraram aumento de glicose e redução de lactato. O grupo C (controle da terceira etapa) não demonstrou diferença significativa em relação aos controles da primeira fase, em glicose, em nenhum dia de armazenamento.

Nas análises de LDH, nos dias D16 e D21, houve diferenças significativas em relação aos controles da primeira etapa, em todos os grupos (A, C e E). Porém, no D35 apenas os grupos teste (A e B) demonstraram resultados significativamente maiores em relação aos controles da primeira etapa.

Quanto às dosagens de potássio, não foi detectada nenhuma diferença estatística entre os grupos da terceira etapa e os controles da primeira.

São apresentados na **Tabela 34** os valores das estimativas da média e do desvio padrão, em CH-SAGM, para cada um dos testes bioquímicos (glicose, lactato, LDH e potássio), em comparação dos controles normais da primeira fase com cada um dos três grupos (A, B e C). Foram detectadas diferenças em algumas alíquotas.

Os resultados de glicose do grupo B, nos dias D16 e D21, foram significativamente menores do que dos controles da primeira fase. Os valores de

lactato foram mais elevados do que os controles no grupo B nos dias D16 e D21 e no grupo C em D16. Já no dia D42, os valores de lactato foram menores do que os controles no grupo A e no grupo C.

Quanto à dosagem de LDH, tanto o grupo B quanto alíquota A demonstraram resultados significativamente mais altos do que os controles da primeira etapa, no dia D16.

Interessantemente, os valores de potássio da alíquota B, no dia D21, foram significativamente menores do que os resultados dos controles da primeira fase.

Tabela 33 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em amostras CH-CPDA1, nos dias D14, D16, D21 e D35: comparação de médias dos controles normais da primeira etapa do estudo com cada um dos três grupos da terceira etapa (A, B e C).

(continua)

Variável	Controles normais (n=20)	Resultados dos grupos Média (± DP)		
		A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)
Glicose D14	239,9(±39,9)	267,3(±8,5)	271,7(±13,2)	274,7(±16,1)
p-valor	-	0,258	0,194	0,158
Glicose D16	239,9(±39,9)	271,7(±4,0)	122,0(±7,9)	249,0(±6,9)
p-valor	-	0,192	<0,001*	0,704
Glicose D21	177,65(±51,3)	232,0(±9,2)	106,3(±9,0)	211,0(±7,0)
p-valor	-	0,087	0,028*	0,282
Glicose D35	89,6(±56,9)	161,0(±13,1)	92,7(±5,5)	146,3(±6,8)
p-valor	-	0,046*	0,928	0,106
Lactato D14	258,1(±26,1)	235,5(±23,09)	226,17(±10,12)	227,67(±1,53)
p-valor	-	0,173	0,052	0,062
Lactato D16	258,1(±26,1)	248,0(±7,81)	357,0(±7,00)	250,0(±2,65)
p-valor	-	0,522	<0,001*	0,606
Lactato D21	307,8(±35,2)	282,0(±9,54)	383,0(±9,85)	284,7(±8,08)
p-valor	-	0,228	0,002*	0,277
Lactato D35	428,0(±61,5)	340,7(±9,30)	423,0(±12,20)	340,3(±25,9)
p-valor	-	0,025*	0,893	0,026*

(conclusão)

Variável	Controles normais (n=20)	Resultados dos grupos - Média ($\pm$ DP)		
		A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)
LDH D14	1956,9($\pm$ 1037,3)	2775,0($\pm$ 828,7)	2588,3(703,2)	2600,0($\pm$ 705,9)
p-valor	-	0,209	0,324	0,316
LDH D16	1956,9($\pm$ 1037,3)	4403,3($\pm$ 1428,8)	3636,7($\pm$ 1068,0)	3533,3($\pm$ 1215,8)
p-valor	-	0,001*	0,016*	0,025*
LDH D21	2987,9($\pm$ 1154,5)	5796,7($\pm$ 1886,5)	4980,0($\pm$ 1332,3)	4726,7($\pm$ 1559,5)
p-valor	-	0,002*	0,013*	0,030*
LDH D35	4695,3($\pm$ 1557,6)	7356,7($\pm$ 2140,7)	7040,0($\pm$ 1505,0)	6093,3($\pm$ 2154,1)
p-valor	-	0,016*	0,025*	0,182
Potássio D14	49,9($\pm$ 6,5)	46,3($\pm$ 1,8)	45,3($\pm$ 3,8)	45,4($\pm$ 3,5)
p-valor	-	0,358	0,250	0,260
Potássio D16	49,9($\pm$ 6,5)	54,3($\pm$ 5,0)	48,5($\pm$ 5,4)	51,0($\pm$ 5,2)
p-valor	-	0,276	0,741	0,775
Potássio D21	62,7($\pm$ 5,7)	59,4($\pm$ 6,9)	57,8($\pm$ 3,5)	58,7($\pm$ 3,6)
p-valor	-	0,373	0,167	0,264
Potássio D35	84,1($\pm$ 8,3)	74,2($\pm$ 4,1)	80,2($\pm$ 3,1)	75,0($\pm$ 2,2)
p-valor	-	0,058	0,429	0,078

LDH: desidrogenase láctica.

Média ($\pm$ desvio-padrão); Teste t-student: p-valor de cada grupo em relação aos controles normais da primeira etapa. *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.**Fonte:** elaborado pelo autor (2018).

Tabela 34 - Dosagens plasmáticas de glicose (mg/dL), lactato (mg/dL), LDH (UI/dL) e potássio (mmol/L), em amostras CH-SAGM, nos dias D14, D16, D21 e D42: comparação de médias dos controles normais da primeira etapa do estudo com cada um dos três grupos da terceira etapa (A, B e C).

(continua)

Variável	Controles normais (n=20)	Resultados dos grupos Média (± DP)		
		A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)
Glicose D14	432,6(±37,3)	454,0(±14,2)	441,7(±2,3)	449,7(±7,6)
p-valor	-	0,346	0,685	0,448
Glicose D16	432,6(±37,3)	437,7(±3,51)	331,7(±11,4)	431,3(±5,5)
p-valor	-	0,821	<0,001*	0,953
Glicose D21	384,9(±30,8)	409,3(±10,1)	321,3(±13,6)	403,3(±4,9)
p-valor	-	0,196	0,002*	0,323
Glicose D42	298,8(±36,6)	318,7(±20,1)	270,7(±10,1)	315,7(±17,2)
p-valor	-	0,373	0,208	0,446
Lactato D14	172,6(±12,6)	177,8(±7,8)	175,5(±7,1)	181,7(±7,2)
p-valor	-	0,497	0,705	0,242
Lactato D16	172,6(±12,6)	185,7(±12,6)	273,3(±15,1)	188,8(±12,0)
p-valor	-	0,108	<0,001*	0,048*
Lactato D21	230,4(±22,4)	211,8(±15,0)	290,3(±13,7)	219,0(±13,4)
p-valor	-	0,185	<0,001*	0,406
Lactato D42	335,3(±23,2)	282,7(±23,7)	323,7(±10,3)	286,7(±21,5)
p-valor	-	0,001*	0,408	0,003*

(conclusão)

Variável	Controles normais (n=20)	Resultados dos grupos - Média ($\pm$ DP)		
		A (n = 3)	B (n =3)	C (n =3)
LDH D14	407,3($\pm$ 287,5)	660,0($\pm$ 119,7)	660,7($\pm$ 95,5)	689,3($\pm$ 100,0)
p-valor	-	0,145	0,152	0,113
LDH D16	407,3($\pm$ 287,5)	813,3($\pm$ 113,8)	858,0($\pm$ 104,4)	712,7($\pm$ 59,1)
p-valor	-	0,027*	0,015*	0,086
LDH D21	698,9($\pm$ 468,8)	1108,3($\pm$ 158,3)	1156,7($\pm$ 174,8)	898,3($\pm$ 93,9)
p-valor	-	0,155	0,115	0,479
LDH D42	1405,5($\pm$ 722,2)	1483,3($\pm$ 196,0)	1573,3($\pm$ 118,5)	1380,0($\pm$ 115,3)
p-valor	-	0,857	0,698	0,953
Potássio D14	26,0($\pm$ 2,9)	27,4($\pm$ 1,7)	26,4($\pm$ 1,7)	26,9($\pm$ 1,9)
p-valor	-	0,439	0,840	0,596
Potássio D16	26,0($\pm$ 2,9)	29,5($\pm$ 2,4)	27,3($\pm$ 1,3)	28,9($\pm$ 1,7)
p-valor	-	0,063	0,461	0,115
Potássio D21	33,7($\pm$ 3,5)	32,2($\pm$ 0,9)	29,2($\pm$ 1,7)	32,4($\pm$ 0,9)
p-valor	-	0,485	0,045*	0,548
Potássio D42	48,9($\pm$ 5,5)	49,4($\pm$ 3,2)	51,2($\pm$ 2,7)	50,8($\pm$ 2,7)
p-valor	-	0,876	0,488	0,567

LDH: desidrogenase láctica.

Média ($\pm$ desvio-padrão); Teste t-student: p-valor de cada grupo em relação aos controles normais da primeira etapa. *p<0,05: diferenças consideradas estatisticamente significativas.**Fonte:** elaborado pelo autor (2018).

7 Discussão

7.1 Armazenamento de concentrados de hemácias

Mesmo durante armazenamento em condições ótimas de refrigeração, os concentrados de hemácias sofrem alterações biofísicas, bioquímicas e morfológicas, denominadas lesões de estocagem (ANTONELOU; SEGATCHIAN, 2016). O grau destes lesões é influenciada por diversos fatores como metodologia de processamento do sangue, condições de estocagem e soluções anticoagulantes ou preservativas (LAGERBERG et al., 2017).

A primeira etapa deste trabalho visou estabelecer valores de referência semanais para diversos parâmetros laboratoriais, que podem ser úteis como marcadores de lesões de estocagem em condições normais de armazenamento de concentrados de hemácias não desleucocitados, produzidos pela Fundação HEMOMINAS (FH).

Classicamente, para preparo de componentes a partir do sangue total, existem apenas duas metodologias: plasma rico em plaquetas (PRP) ou camada leucoplaquetária (*buffy-coat* - BC). No entanto, há uma enorme variabilidade nestes procedimentos entre os serviços de hemoterapia, levando a heterogeneidade nas propriedades dos CH produzidos. As características dos CH são influenciadas por diferenças que podem existir em todas as fases do processamento, como, por exemplo, tempo e temperatura de repouso do sangue total, força e tempo de centrifugação, método de extração, remoção ou não das plaquetas, suspensão das hemácias em plasma ou solução aditiva e desleucocitação ou não do CH ou do sangue total (HÖGMAN, 1998; VAN DE WATERING, 2011; ACKER et al., 2014). Geralmente os trabalhos científicos não fornecem informações suficientes destes procedimentos os quais interferem diretamente nos resultados encontrados (VAN DE WATERING, 2011). Ressaltamos também o fato que vários países adotaram a desleucocitação universal, dificultando o encontro de pesquisas que utilizaram concentrados de hemácias não desleucocitados, estudadas no nosso trabalho.

Desta forma, alguns dados e valores de referência da literatura não podem ser

transcritos na integridade para a realidade de todas as instituições. Além disso, torna-se imprescindível identificar adequadamente as amostras utilizadas nesta pesquisa.

Na Fundação *HEMOMINAS* (FH) as unidades de CH são preparadas pelo método BC com acréscimo de solução aditiva, designadas como CH-SAGM nesta pesquisa, ou pelo método PRP, sem solução aditiva, que foram denominadas CH-CPDA1 neste trabalho. Vale ressaltar que, conseqüentemente, os valores de hematócrito esperados para CH-SAGM são menores (50 a 70%) do que para aquelas unidades preparadas pelo PRP (65 a 80%). Os detalhes da preparação do CH interferiram diretamente nas diferenças encontradas nos resultados laboratoriais e nas lesões de estocagem. Além disso, a maior parte dos CH produzidos na FH não são desleucocitados.

Quanto às soluções preservativas, o anticoagulante CPDA-1 ainda é largamente utilizado no Brasil, com adoção também, por alguns serviços, das soluções aditivas SAGM e AS-3, esta última em pequena proporção, para coleta de concentrados de hemácias por aférese. Já na Europa e América do Norte o uso do CPDA-1 é extremamente restrito, onde existe nítida preferência para soluções aditivas.

Devido a este cenário mundial, existem poucos trabalhos recentes sobre desempenho do CPDA-1 como preservante em concentrados de hemácias. De qualquer forma, já foi bem estabelecido que concentrados de hemácias, quando armazenados em SAGM e em outras soluções aditivas, apresentam maior estabilidade e melhores parâmetros bioquímicos do que aqueles preservados em CPDA-1, ao final da validade (MOORE; BATSAKIS, 1987; HÖGMAN, 1998; HESS, 2006).

MOORE e BATSAKIS (1987) destacaram algumas propriedades de CH numa tabela comparativa entre CPDA-1 e várias soluções aditivas (SAG, SAGM, AS-1 e AS-3). Segundo estes dados, unidades de concentrados de hemácias em CPDA-1, com hematócrito de até 75%, aos 35 dias, apresentam valores de glicose de 75 ± 50 mg/dL, potássio plasmático de 60 ± 20 mmol/L, percentual de hemólise de 0,77%, média de células viáveis 24h pós transfusional de $71 \pm 16\%$, redução de ATP para $45 \pm 12\%$ dos valores do dia zero e redução de 2,3-DPG para menos de 10% dos valores iniciais. As informações apresentadas para concentrados de hemácias em SAGM, com hematócrito de 50 a 60%, aos 42 dias, são percentual

de hemólise de 0,30%, média de sobrevivência após transfusão de $77 \pm 4,7\%$, redução de ATP para $70 \pm 12\%$ dos valores iniciais e redução de 2,3-DPG a valores inferiores a 10% dos valores iniciais. Neste trabalho não foram apresentados dados de glicose e potássio para SAGM, porém, os autores afirmam que os parâmetros bioquímicos são semelhantes aos encontrados nos CH em SAG, que, ao final do armazenamento atingem 250 mg/dL e 40 ± 10 mmol/L, para glicose e potássio, respectivamente.

Na 17ª edição do AABB - *Technical Manual* é apresentada a tabela 9-2 (p. 277) com alguns resultados de modificações bioquímicas durante estocagem de sangue total e CH não desleucocitados, em diversas soluções preservativas. Esta tabela demonstra, para CH armazenados em CPDA-1, valores de hemoglobina plasmática de 0,078 g/dL no dia 0 e de 0,658 g/dL no dia 35, enquanto que, para unidades de CH armazenadas em AS-3 os resultados são de 0,386 g/dL, no dia 42. Quanto ao ATP no final da validade dos CH, quando em CPDA-1 os valores são reduzidos a 45% dos valores do dia zero, enquanto aqueles em AS-1, AS-3 e AS-5 atingem, respectivamente, 60%, 59% e 68,5% do dia zero. Em todas as soluções preservativas apresentadas, a diminuição de 2,3-DPG é importante, atingindo menos de 10% do valor do dia inicial, sendo mais marcante em AS-1 e AS-5 (inferior a 5%). Nos dados de potássio extracelular, esta tabela mostra, para CH armazenados em CPDA-1, potássio equivalente a 5,1 mmol/L no dia 0 e 78,5 mmol/L no dia 35, enquanto que, nas unidades de CH em AS-1, AS-3 e AS-5, no dia 42 os valores de potássio são de 50,0 mmol/L, 46,0 mmol/L e 45,6 mmol/L, respectivamente.

Com dados semelhantes sobre potássio, STRAUSS (2000) relata que a concentração extracelular deste íon, nos concentrados de hemácias em CPDA-1, com hematócrito em torno de 70%, aos 35 dias após coleta, atinge valores de 70 a 80 mmol/L, enquanto aquelas unidades em solução aditiva (AS-1, AS-3, AS-5), com hematócrito de 60%, os níveis de potássio extracelular são de aproximadamente 50 mmol/L, aos 42 dias após coleta.

Em concordância com a literatura, os resultados da primeira etapa do nosso trabalho, mostraram diferenças significativas entre as bolsas CH-CPDA1 e CH-SAGM, ao vencimento, por influência tanto da solução preservativa (CPDA-1 ou CPD/SAG-Manitol) quanto do método de preparo (plasma rico em plaquetas ou camada leucoplaquetária). Desta forma, encontramos valores muito mais elevados

de potássio, hemoglobina livre, grau de hemólise, lactato e LDH nas unidades de CH-CPDA1 do que CH-SAGM, enquanto os resultados de glicose foram muito mais baixos em CH-CPDA1.

Os valores de potássio, glicose, hemoglobina plasmática e percentual de hemólise em CH-CPDA1 e CH-SAGM, ainda na primeira etapa deste estudo, assemelham-se aos trabalhos da literatura, tanto no dia 0 quanto ao vencimento. Porém, percebemos pequenas diferenças que podem ser explicadas pelos variados métodos de processamento do sangue e técnicas de laboratório. Por exemplo, resultados de potássio em CH-CPDA1 estão discretamente mais elevados nos nossos dados do que naqueles relatados por MOORE e BATSAKIS (1987), AABB (2011) e STRAUSS (2000). Quanto às unidades CH-SAGM, na data de vencimento nossos resultados são praticamente idênticos aos destes autores. Já para glicose, ao final da validade encontramos valores discretamente mais altos, tanto em CH-CPDA1 quanto em CH-SAGM, do que aqueles citados por MOORE e BATSAKIS (1987). Em relação à hemoglobina livre e percentual de hemólise, nossos resultados são pouco menores do que os relatados por MOORE e BATSAKIS (1987) e no *Technical Manual* da AABB (2011).

Assim, para a rotina profissional da Fundação HEMOMINAS, nosso trabalho passa a ser um referencial importante, pois foram construídos valores de referência semanais para serem utilizados exatamente nos produtos hemoterápicos que disponibilizamos aos pacientes. A partir de então, a Gerência de Controle de Qualidade da Fundação HEMOMINAS dispõe de curvas padrão, para utilizar na avaliação de qualidade dos CH desta instituição. Serão aplicadas em situações diversas, como validações de novas metodologias; qualificações de novos insumos; análises de desvios em processos técnicos, cadeia do frio e transporte.

Além disso, foi estabelecida uma meta institucional de, em médio prazo, minimizar o uso do anticoagulante CPDA-1 nas coletas de sangue da FH e restringir seu uso a casos específicos como transfusão intrauterina e exsanguíneo transfusão em neonatos.

7.2 Delineamento do estudo da segunda e terceira etapas

Como demonstrado pelos intervalos de confiança que foram calculados na primeira etapa deste trabalho, existe uma grande variabilidade nas dosagens laboratoriais entre os doadores, em condições normais de armazenamento do sangue. Por isso, na segunda e terceira etapas foram preparados *pools* de concentrados de hemácias, com aliquotagem do material, gerando amostras de CH com constituição semelhante para cada grupo de análise. Cada experimento foi repetido três vezes.

Este modelo de delineamento tem sido frequentemente utilizado em trabalhos que analisam desvios de temperaturas de estocagem e transporte, pois permite avaliação mais precisa dos resultados nas diferentes condições de armazenamento (THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN, 2012). Além disso, torna possível a utilização de número menor de amostras do que desenhos com amostras individuais. Uma das desvantagens deste tipo de estudo é a impossibilidade de se realizar testes de recuperação *in vivo*, mas esses não eram objeto desta pesquisa. Outro ponto negativo, que provavelmente interferiu em nossos resultados, são as manipulações excessivas das bolsas para procedimentos de montagem, homogeneização e aliquotagem, os quais podem introduzir efeitos deletérios no material (RUDDELL et al., 1998; HANCOCK, CARDIGAN e THOMAS, 2011).

O trabalho de THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2012) foi feito em duas etapas e foi utilizado como modelo para o delineamento da nossa pesquisa. Na primeira fase foram montados três *pools*, cada um originado de dez CH-SAGM e com divisão em nove alíquotas. Na segunda parte do estudo, foram preparados três *pools*, cada um constituído por quatro unidades de CH-SAGM e aliquotado em três bolsas (**Tabela 4**). Semelhantemente, na segunda etapa do nosso estudo foram preparados três *pools* para cada tipo de CH (CH-CPDA1 e CH-SAGM), cada um originado de seis ou cinco unidades de CH e divididos em cinco alíquotas. Na terceira etapa do nosso estudo, também preparamos três *pools* para cada tipo de CH, a partir de três a quatro unidades e divididos em três alíquotas.

Alguns outros trabalhos que encontramos na literatura utilizaram um maior número de *pools* do que o nosso estudo, representando aumento de amostragem.

Encontramos na literatura pesquisas com três, seis ou oito *pools*. RUDDELL et al (1998) prepararam um total de oito *pools*, sendo que cada *pool* foi montado a partir de três CH-CPDA1 e, a seguir, dividido em três alíquotas (**Tabela 4**). Os mesmos autores citados anteriormente, THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2013), em um segundo trabalho, montaram seis *pools*, cada um proveniente de oito bolsas de CH-SAGM, os quais originaram seis alíquotas modelo adulto e quatro alíquotas modelo pediátrico. RAMIREZ-ARCOS et al. (2013) fizeram dois grupos de exposição à temperatura ambiente, por diferentes períodos de tempo. Cada grupo foi composto por seis *pools*, e cada *pool* proveniente de dois CH-SAGM e dividido em duas unidades.

Por outro lado, DE GRANDMONT et al. (2014) utilizaram um modelo diferente, preparando três alíquotas de 100 mL a partir de apenas uma bolsa de CH. Cada uma destas porções do CH foi mantida entre duas bolsas de transferência preenchidas com 50mL de salina. Segundo os autores, este modelo foi capaz de simular as temperaturas de uma unidade de CH de 310 mL exposta a temperatura ambiente, com a vantagem de consumir menor quantidade de amostras, reduzindo o prejuízo ao estoque de CH disponíveis para transfusão. Apesar disso, este modelo não foi adotado no nosso trabalho pelas dificuldades em validação (instrumentos de medição de temperatura, faixas variadas de temperaturas, dois tipos de CH, etc).

Ademais, alguns autores utilizam amostras individuais. WAGNER et al. (2014) realizaram um estudo interessante, contando com 10 ou 12 unidades bolsas individuais em cada grupo avaliado (**Tabela 4**). Alguns anos antes, os próprios autores já citados anteriormente, HANCOCK, CARDIGAN e THOMAS (2011), desenvolveram um trabalho com 20 amostras individuais, selecionadas aleatoriamente do estoque. Não adotamos este modelo de amostras individuais, devido às vantagens já expostas do delineamento em *pool*.

7.3 Efeitos de desvios de temperatura durante o transporte de concentrados de hemácias

As normas técnicas brasileiras e diversas diretrizes internacionais, relativas a transporte de CH, estabelecem como limites aceitáveis temperaturas entre 1 e 10°C por tempo de até 24 horas. Porém, não existem evidências científicas de que este valor seja realmente relevante para manutenção de qualidade, segurança e viabilidade de concentrados de hemácias (THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN, 2013; WAGNER et al., 2014).

Em nossa experiência, e também conforme relatado por alguns autores, as intercorrências térmicas durante transporte e armazenamento geralmente ocorrem em episódios de menor duração e em temperaturas mais extremas do que o previsto nas diretrizes. Não existem evidências capazes de definir exatamente quais desvios causam danos aos CH. As anormalidades de temperatura, por períodos curtos de tempo (inferiores a 12 horas), parecem ter efeitos menos graves sobre a qualidade dos componentes do que aqueles limites de temperatura e tempo aceitos pelas normas. Consequentemente, as intercorrências térmicas que ocasionalmente ocorrem durante transporte de CH têm levado ao descarte indiscriminado e desperdício de sangue (THOMAS; HANCOCK; CARDIGAN, 2012).

Estudos publicados nesta década têm demonstrado que não existe perda de qualidade em CH que sofreram uma única ou múltiplas exposições a temperaturas acima de 10°C ou abaixo de 1°C, por períodos variados de tempo. Entretanto, existe enorme diversidade nas características destes estudos (faixa de temperatura, tempo, frequência e momento do desvio e dos testes laboratoriais) dificultando comparação de dados e aplicação direta em algumas situações rotineiras (BRUNSKILL et al., 2012).

Na segunda etapa deste trabalho optamos por simular exposições de bolsas de concentrados de hemácias por tempo e temperaturas semelhantes ao que encontramos na nossa rotina. Desta forma, selecionamos as temperaturas de aproximadamente -1°C e +14°C por períodos de tempo de 6 horas, situações que abrangem a maioria dos desvios de temperatura durante transporte de CH entre as unidades da Fundação HEMOMINAS. Apesar de não ser usual as bolsas de CH

serem expostas a temperaturas inadequadas por tempo tão longo como 24 horas, incluímos este grupo por ser a duração máxima permitida para transporte. Os resultados destas análises não demonstraram diferença estatística significativa entre os grupos de desvios de temperatura, por 6 ou 24 horas, e o controle, confirmando a hipótese formulada no início deste projeto. Na terceira etapa do nosso estudo, as unidades de CH foram expostas a temperaturas inadequadas para transporte (entre -2 e +1°C, ou entre 22 e 25°C) por período de 48 horas, situação de *stress* intenso, com o objetivo de avaliar o perfil dos testes laboratoriais nestas alterações extremas de temperaturas.

De forma semelhante, THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2012) avaliaram exposição de CH em SAGM a temperaturas de -2°C ou 22°C por um, dois ou três períodos de três horas no decorrer do armazenamento (distribuídas nos dias 3, 8 e 15) e mais uma exposição por 5 horas no 29º dia. Ampliaram o estudo para uma segunda fase, onde bolsas de CH foram expostas a 25°C por 24 ou 48 horas, no segundo dia de armazenamento, para avaliar sensibilidade dos testes laboratoriais. Nas duas partes do estudo os autores analisaram parâmetros *in vitro* e compararam os resultados com amostras controle mantidas de 2 a 6°C. Concluíram que CH em SAGM, quando submetidas a temperaturas elevadas (25°C) por períodos longos (24 horas ou mais), podem perder qualidade, mas que, por outro lado, desvios repetidos (por até três períodos de três horas mais um período de cinco horas) a -2°C ou 22°C, não parecem ocasionar danos. Na primeira parte do estudo, não encontraram diferenças significativas para potássio, pH, ATP ou 2,3-DPG em nenhum dos grupos teste em relação ao controle. Curiosamente, e diferente dos nossos resultados, o grupo com três exposições a -2°C apresentou menor grau de hemólise do que o grupo controle (única diferença significativa em hemólise nesta etapa do trabalho). Os autores afirmam que este achado não pode ser considerado indício de melhor preservação celular em temperaturas negativas, porque os outros parâmetros laboratoriais não apresentaram esta tendência. Todas as amostras, nas duas etapas estudadas, se mantiveram abaixo do limite da norma europeia de 0,8% de hemólise até o 43º dia de estocagem.

Na segunda fase do estudo de THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2012), nas exposições por 24 horas, da mesma forma que na segunda etapa do nosso trabalho, não houve diferença significativa nos resultados de hemólise entre o

controle e o grupo exposto a altas temperaturas (25°C no caso destes autores e 14°C no nosso trabalho). Porém, nas exposições por 48 horas, nossos resultados não foram concordantes. Os autores encontraram diferença significativa nos resultados de hemólise entre o controle e o grupo exposto a altas temperaturas (25°C), nos testes realizados nos dias 36 e 43 (33 dias e 40 dias após o início do desvio térmico) (THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN, 2012). Enquanto que, na terceira fase do nosso estudo, não houve diferença significativa em hemólise entre os controles e as amostras submetidas a 25°C por 48 horas, tanto em CH-CPDA1 quanto em CH-SAGM. Apesar de não termos encontrado esta significância estatística em hemólise, ressaltamos o fato de que nossos testes laboratoriais foram realizados mais precocemente (no máximo 21 dias e 28 dias após início da exposição, para CH-CPDA1 e CH-SAGM, respectivamente), em relação ao momento dos testes realizados por THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2012; **Tabelas 4 e 5**).

Já nos resultados de potássio, estes autores encontraram diferença significativa em relação ao controle no grupo exposto por 24 horas a 25°C, apenas no dia 8 (resultados inferiores ao controle). De forma contraditória, eles não demonstraram diferença significativa nos resultados de potássio no grupo de 48 horas a 25°C, apesar do tempo de exposição ser duas vezes maior. Quanto ao nosso trabalho, não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa em resultados de potássio, na segunda nem na terceira etapa, ao compararmos grupos de exposição a -2°C ou 14°C ou 25°C com os controles. Apesar de não ter encontrado diferenças significativas para potássio, é importante relatar que na terceira etapa os valores dos grupos submetidos a temperatura de 25°C por 48 horas foram ligeiramente inferiores ao grupo controle e ao grupo teste a -2°C, nos dias 16 e 21, semelhante ao encontrado por aqueles autores no grupo de 24 horas a 25°C. Ainda ressaltamos que no dia 21, em CH-SAGM o valor p foi igual a 0,05, quando em comparação com a alíquota controle. Diferentemente do nosso estudo, THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2012) não realizaram dosagens de glicose, lactato e nem LDH, e, por outro lado, acrescentaram os testes de 2,3-DPG, ATP e pH.

Na literatura existem poucos trabalhos avaliando qualidade de concentrados de hemácias CPDA-1 em desvios de temperatura de transporte. RUDELL et al (1998; **Tabelas 4 e 5**) analisaram o efeito de estocagem por 24 horas a

temperatura de 25°C, no 6º ou no 20º dia de armazenamento, em bolsas de concentrados de hemácias CPDA-1 e concluíram que este efeito foi equivalente ao metabolismo que ocorre em 10 dias de armazenamento de 1 a 6°C. Os autores sugerem que a exposição a 25°C por duas horas reduziria a validade de uma unidade de CH-CPDA1 em apenas um dia. Além disso, sugerem que pequenas variações das normas regulatórias, como por exemplo temperaturas inferiores a 25°C por períodos mais curtos do que duas horas, provavelmente não comprometam a qualidade destes componentes. Os resultados foram semelhantes tanto para o grupo de exposição precoce (6º dia) quanto aquele tardio (20º dia). Entre os testes laboratoriais realizados, nas determinações de hemoglobina livre e grau de hemólise não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, tanto no nosso trabalho quanto neste de RUDDELL et al. (1998), o que foi corroborado pelos dados de THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2012) já discutidos acima.

Por outro lado, e diferentemente dos nossos resultados, em comparação ao grupo controle, RUDDELL et al. (1998) encontraram diferenças significativas durante todo o armazenamento, nas dosagens de glicose (reduzidas nos grupos teste), lactato (maiores nos grupos testes) e potássio (menores nos grupos testes, exceto no dia 28 quando não houve diferença significativa).

Na segunda etapa do nosso trabalho não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma destas dosagens quando comparamos os grupos expostos a temperaturas elevadas (por 24 e 6 horas, grupos C e D, respectivamente) com os grupos controle (E). Estas diferenças de respostas nos trabalhos podem ser parcialmente explicadas pelas temperaturas de exposição, que foram mais altas no estudo de RUDDELL et al. (1998) (25°C) do que no nosso (14°C).

Já, na terceira fase do nosso estudo (desvios de temperatura por 48 horas), nas amostras CH-CPDA1 submetidas a 25°C, encontramos resultados de glicose semelhantes a estes de RUDDELL et al. (1998), mas apenas no dia 16. Apesar dos nossos resultados de glicose nos dias 21 e 35 não apresentarem diferença estatística, eles tendem a ser inferiores aos do controle, reforçando os resultados destes autores. Nas nossas amostras de CH-SAGM da terceira fase também não foram demonstradas diferenças estatisticamente significativas para glicose ($p = 0,05$). Entretanto, as dosagens de glicose nos dias 16, 21 e 42, no grupo exposto

por 48 horas a 25°C, são inferiores ao controle e ao grupo de temperaturas mais baixas (-2°C), semelhante aos resultados relatados por estes autores.

Quanto ao lactato, na terceira etapa do nosso trabalho, não foi detectada significância estatística ($p = 0,05$) tanto nas amostras CH-CPDA1 quanto nas CH-SAGM submetidas a 25°C por 48 horas, mas todos os valores foram superiores aos grupos controle e de temperaturas negativas (-2°C), em concordância com estes autores e com a resposta esperada pelo metabolismo eritrocitário em temperaturas elevadas. Por outro lado, os resultados de potássio, na segunda e terceira etapas da nossa pesquisa, não demonstraram nenhuma diferença estatisticamente significativa, contrastando com os achados de RUDDELL et al. (1998) e, parcialmente, com aqueles resultados de THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN (2012), conforme já discutido acima. De forma diferente do nosso trabalho, RUDDELL et al. (1998) não realizaram dosagens de LDH, mas, por outro lado, foram realizadas análises de morfologia eritrocitária e dosagem de ATP.

WAGNER et al. (2014; **Tabelas 4 e 5**) realizaram uma pesquisa com bolsas individuais de concentrados de hemácias desleucocitados, em CPD/SAGM, provenientes da técnica *buffy-coat*, em condições mais extremas, por maiores tempos de exposição a temperaturas elevadas, com os objetivos de conhecer as influências da estocagem durante 42 dias a temperaturas altas e os efeitos de múltiplos ciclos de aquecimento durante o armazenamento. Os autores avaliaram unidades de CH armazenadas por 42 dias a temperaturas de 1 a 6°C (grupo de referência), 13°C e 22°C (dois grupos teste de temperatura alta continuamente), além de outros três grupos teste com exposições múltiplas a temperaturas elevadas (10°C ou 13°C ou 22°C) por períodos de 24 horas, repetidas semanalmente por cinco vezes no decorrer do estoque (dias 7, 14, 21, 28 e 35). Concluíram neste estudo que as exposições repetidas não causaram sinais importantes de deterioração ou perda de qualidade (WAGNER et al., 2014). Nas dosagens de potássio, os autores não encontraram diferença significativa nas exposições múltiplas em relação ao grupo controle, em concordância com os resultados da segunda e terceira etapas do nosso estudo, porém contrastando com os resultados dos autores já discutidos acima (THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN, 2012; RUDDELL et al., 1998). Quanto à hemoglobina livre, apenas no grupo de 22°C, no 42º dia de armazenamento, foram detectados valores significativamente mais elevados em relação ao controle, porém, sem extrapolar os

limites normais de 0,8% no grau de hemólise. Nas análises de glicose, os dois grupamentos de maior temperatura (13°C e 22°C), tiveram resultados estatisticamente significativos, menores do que o controle, somente no dia de vencimento. E, por fim, os valores de lactato foram significativamente maiores em relação ao controle nos dias 14, 21 e 28 para grupo de 22°C, nos dias 21, 28 e 35 naqueles de 13°C e no dia 35 no grupo de 10°C. Em contraste, na segunda etapa do nosso trabalho não foram detectadas diferenças significativas nos parâmetros hemoglobina livre, glicose nem lactato. Esta diferença dos nossos resultados em relação aos destes autores pode ser facilmente explicado pelas repetições semanais das exposições (totalizando 120 horas) e pela temperatura mais elevada (22°C) em um dos grupos do estudo de WAGNER et al. (2014).

Além disso, para os parâmetros hemoglobina livre e glicose, só houve significância estatística no 42º dia de armazenamento, ou seja, após completarem 120 horas de temperaturas inadequadas. Desta forma, seria improvável a detecção de resultados com significância estatística na segunda etapa do nosso estudo, pois os tempos de exposição (6 horas e 24 horas) foram muito menores do que as 120 horas no trabalho destes autores. De maneira semelhante, os valores de lactato do grupo de 13°C só se mostraram estatisticamente diferentes do controle após 48 horas de exposição (nas análises do 21º dia do armazenamento), enquanto na segunda etapa do nosso trabalho o tempo de exposição foi de no máximo 24 horas. Já na terceira etapa do nosso trabalho, apesar de não detectarmos nenhuma diferença significativa em hemoglobina livre, glicose e lactato nas bolsas CH-SAGM, os resultados de glicose e lactato sugerem ser, respectivamente, menores e maiores do que os grupos controle e de baixas temperaturas ($p = 0,05$). Além disso, apesar de serem hemocomponentes distintos, os CH-CPDA1 demonstraram resultados de glicose, no dia 16, concordantes com dados de WAGNER et al. (2014), além dos autores já discutidos acima (RUDELL et al., 1998). Ressaltamos aqui também o menor tempo de exposição desta terceira fase do nosso trabalho (48 horas), provavelmente foi insuficiente para detecção de alterações tão exacerbadas nestes testes.

Na outra parte do estudo de WAGNER et al. (2014; **Tabelas 4 e 5**), com dois grupos testes de temperaturas altas continuamente durante os 42 dias de armazenamento, foram encontrados dados bem intrigantes. Em relação a hemoglobina plasmática e percentual de hemólise, as bolsas estocadas

continuamente a 22°C permaneceram com resultados estáveis e dentro da faixa de referência até o 14º dia, com aumento lento a princípio e, a partir do 21º dia, mais rapidamente. Já aquelas unidades em 13°C, mantiveram resultados dentro do limite normal de hemólise (<0,8%) até o 35º dia, ultrapassando-o apenas na data de vencimento. De qualquer forma, em hemoglobina livre, diferenças significativas em relação ao grupo controle foram detectadas mais precocemente do que o descrito para faixa de normalidade (no 14º dia naquelas unidades a 22°C e no 28º dia nas bolsas a 13°C). Em dosagens de potássio o grupo a 22°C apresentou diferenças significativas, com resultados mais elevados em relação ao controle, em todas as análises a partir do 14º dia, com aumento expressivo até o 21º dia e mais lentamente a seguir. Por outro lado, e de forma aparentemente contraditória, no grupo a 13°C, encontraram resultados significativos e inferiores ao controle nos 7º, 14º e 21º dias; porém, no 28º dia não houve diferença significativa; enquanto nos dias 35 e 42 os dados foram estatisticamente diferentes e maiores do que o grupo controle (WAGNER et al. 2014; **Tabelas 4 e 5**).

Com estas informações, fica evidente que na terceira etapa dos nossos experimentos, em condições que consideramos como “extremas” (temperaturas elevadas por 48 horas), não houve tempo de exposição suficiente para detectarmos diferenças significativas em hemoglobina plasmática, percentual de hemólise nem potássio. Ou seja, nossos resultados não contradizem os achados de WAGNER et al. (2014), entretanto não temos dados suficientes para corroborá-lo. Quanto a glicose e lactato, as diferenças significativas em relação ao controle ocorreram mais precocemente do que os outros testes, a partir do dia 7, continuando assim praticamente em todos os dias analisados. Houve redução de glicose e aumento de lactato em ambos grupos de teste, sendo que a queda de glicose foi mais pronunciada naquele a 22°C. Apesar da significância estatística ter ocorrido precocemente, não houve diferença nos testes laboratoriais realizados no dia 3, quando já totalizavam 72 horas de exposição a temperaturas de 13 ou 22°C.

Desta forma, mesmo para glicose e lactato, a exposição extrema feita na terceira etapa do nosso estudo pode não ter sido suficiente para evidenciar alterações laboratoriais desta magnitude. Conforme já discutido acima, os nossos resultados da terceira etapa apenas apresentaram diferença significativa em relação aos controles, para o parâmetro glicose, nas amostras CH-CPDA1 expostas por 48 horas a 25°C, no dia 16, diferentemente destes autores que

relatam diferenças significativas até a data de vencimento de CH-SAGM.

WAGNER et al. (2014) demonstraram que, mesmo no 42º dia de armazenamento, os valores de glicose em todas as bolsas de seus experimentos ainda eram superiores ao limite aceitável de concentração *in vivo* (90 mg/dL). Nas nossas amostras CH-SAGM não encontramos nenhum resultado de glicose inferior a este limite, nem na segunda nem na terceira etapa, sendo que o menor valor foi de 259 mg/dL ao vencimento, em uma bolsa exposta por 48 horas a 25°C. Porém, as nossas análises em CH-CPDA1 apresentaram diversos resultados inferiores a 90 mg/dL, mesmo nos grupos controle das três etapas do trabalho, sendo condizente com dados da literatura sobre armazenamento de CH-CPDA1 (MOORE; BATSAKIS, 1987).

7.4 Comparações dos parâmetros laboratoriais com as curvas padrão

Nesse estudo, realizamos uma análise diferente do que o encontrado na literatura, ao compararmos os valores médios dos grupos da segunda e terceira fases com os valores médios das curvas padrão desenvolvidas na primeira etapa do trabalho. Entretanto, esta comparação apresentou diversas inconsistências, como várias diferenças significativas no dia 14, quando ainda se tratavam de bolsas normais, antes do desvio de temperatura. De maneira similar, não esperávamos que o grupo E, controle normal da segunda etapa, ou o grupo C, controle normal da terceira etapa, apresentassem qualquer diferença em relação à curva padrão, mas em vários momentos encontramos diferenças significativas nestas comparações.

Acreditamos que a manipulação excessiva das unidades, na montagem do *pool* e alíquotagem tenham influenciado nestes resultados, ocasionando hemólise mecânica em níveis elevados, nas alíquotas que foram preparadas, com alterações nos testes laboratoriais (aumentos em hemoglobina plasmática, percentual de hemólise, LDH e lactato e redução de glicose). Outro ponto que corrobora esta suspeita é o fato de que vários *pools* de CH-CPDA1, tanto da segunda quanto terceira etapas do nosso trabalho, ultrapassaram o limite aceitável de percentual de hemólise (até 0,8% na data de vencimento). Esta interpretação é condizente com alguns relatos na literatura que discutem as vantagens e desvantagens do modelo de estudo em *pool* (RUDDELL et al., 1998; HANCOCK, CARDIGAN e THOMAS, 2011).

Na segunda etapa do nosso trabalho, a comparação com curva padrão, no caso dos CH-CPDA1, demonstrou diferenças significativas com resultados mais elevados nas amostras controle (grupo E) para lactato, LDH, hemoglobina livre e grau de hemólise. Nas bolsas CH-SAGM esta observação foi de menor importância, pois apenas encontramos inconsistência, com resultados maiores e significativamente diferentes da curva padrão de lactato nas alíquotas controle (grupo E). Percebe-se que o valor médio do hematócrito das amostras CPDA-1 ficaram mais elevados do que os valores médios da curva padrão e do que amostras SAGM, reforçando a hipótese de que a manipulação dos CH-CPDA1, que têm maior viscosidade, deve ter ocasionado maior lesão mecânica às

hemácias nos procedimentos de soldadura em conexão estéril, movimentos de homogeneização e transferências de conteúdo entre duas bolsas plásticas.

Também existiram algumas inconsistências, na terceira fase do nosso trabalho, pois a amostra controle (alíquota C) do CH-CPDA1 apresentou diferença significativa na comparação com a curva padrão, com resultados maiores em LDH, hemoglobina livre, grau de hemólise, além de resultados menores em lactato no D35. Já nas unidades CH-SAGM, a amostra controle (alíquota C) demonstrou resultados estatisticamente significativas e maiores em relação à curva padrão de lactato (D16), hemoglobina livre e percentual de hemólise e resultados menores em lactato no último dia de armazenamento (D42). Curiosamente, na data de vencimento do CH-SAGM (D42), os valores de lactato de todas as alíquotas passam a ser inferiores aos da curva padrão, com diferença estatisticamente significativa nas amostras A e C, semelhante aos achados de WAGNER et al., (2014). Além disso, todas as alíquotas de CH-SAGM no D14 apresentaram diferença significativa, com valores maiores do que a curva padrão nos parâmetros hemoglobina livre e percentual de hemólise. Estes achados corroboram a suspeita de ruptura de hemácias durante os procedimentos de montagem dos *pools*.

Apesar destes apontamentos, alguns parâmetros na terceira fase, como glicose e potássio, parecem refletir a realidade pois não apresentaram tais inconsistências e suas análises sugerem concordância com dados da literatura e, parcialmente, com a segunda etapa do nosso estudo. Assim, os resultados de glicose na alíquota B (temperatura de 25°C por 48 horas), tanto de CH-CPDA1 quanto CH-SAGM, são menores e estatisticamente significativas em relação à curva padrão nos dias 16 e 21, sugerindo uma queda mais acelerada de glicose após exposições a temperaturas mais elevadas, o que é corroborado por diversos autores (RUDDLELL et al., 1998; WAGNER et al., 2014). Já, para o parâmetro potássio, em CH-CPDA1 não houve nenhum valor com diferença estatisticamente significativa em relação à curva normal, condizente com a segunda etapa do nosso trabalho, mas parcialmente conflitante com a literatura. Por outro lado, em CH-SAGM, a alíquota B (temperatura de 25°C por 48 horas), demonstrou diferença significativa em potássio D21, com valor inferior à curva padrão, concordando com resultados encontrados por alguns autores, reforçando a suspeita que levantamos no decorrer desta discussão (THOMAS; HANCOCK; CARDIGAN, 2012; RUDDLELL et al., 1998).

7.5 Indicação das melhores análises laboratoriais para detecção de anormalidades no CH decorrentes de desvios na temperatura

Em condições habituais de armazenamento de CH em refrigeração (2 a 6°C) o metabolismo eritrocitário é reduzido em torno de 40 vezes, limitando a glicólise e a consequente produção de lactato, permitindo sobrevivência das células por várias semanas. Entretanto, nestas temperaturas o funcionamento da bomba de sódio-potássio é prejudicado, e as células não conseguem manter o alta concentração intracelular de potássio, tendendo a liberar este íon para o meio plasmático (FLATT, BAWAZIR e BRUCE, 2014; HÖGMAN, 1998; CAMPBELL LEE et al., 2012).

Na primeira etapa do nosso estudo, o aumento de potássio da curva padrão foi muito mais acelerado na primeira semana do que nas demais semanas de armazenamento, corroborando esta explicação científica de paralisação da bomba de sódio-potássio secundária ao resfriamento do sangue.

Consequentemente, com o armazenamento ou transporte a temperaturas mais elevadas do que o preconizado para estoque (2 a 6°C), o consumo de glicose e, consequentemente, a produção de lactato, são acelerados em comparação ao armazenamento refrigerado (RUDELL et al., 1998; HÖGMAN, 1998; REID et al., 1999). Na terceira etapa do nosso estudo foram detectadas diferenças significativas, em relação ao grupo controle, em valores de glicose, com diminuição em amostras com temperaturas de 25°C, e aumento em amostras a -1°C (grupo com menor consumo de glicose). Esta diferença entre os grupos foi mais evidente nas unidades CH-CPDA1 do que CH-SAGM, provavelmente devido à menor concentração basal de glicose nas primeiras bolsas. Desta forma, os dados do nosso estudo e da literatura sugerem que o parâmetro glicose seja um bom marcador de lesões em CH-CPDA1 expostas a temperaturas elevadas. Além de ser detectado precocemente, trata-se de um teste laboratorial de execução simples e relativamente barato, sugerindo que seu acréscimo nestas avaliações tenha excelente relação custo-benefício.

Quanto ao lactato, tende a ser um teste dispensável em rotinas, pois sua resposta foi equivalente aos achados em glicose e consiste em uma metodologia

de maior custo e complexidade, dificultando sua adoção em serviços de hemoterapia.

De forma semelhante, o parâmetro LDH não demonstrou ser útil para rotinas, pois alguns resultados do nosso estudo foram contraditórios e sem respaldo na literatura científica, além de ser um teste de maior complexidade e custo.

Por outro lado, a exposição de CH a temperaturas mais elevadas também permite que a bomba de sódio-potássio volte a funcionar em níveis próximos ao fisiológico, restabelecendo o fluxo de potássio para o interior da célula. Isto explica os achados de alguns autores, já discutidos acima, onde os resultados de potássio das amostras submetidas a temperaturas altas foram inferiores aos controles (RUDDELL et al., 1998; THOMAS, HANCOCK e CARDIGAN, 2012; WAGNER et al., 2014). Em contrapartida, a hemólise progressiva que ocorre no decorrer do armazenamento de CH predispõe a liberação de potássio para o meio extracelular, podendo reduzir a diferença entre os grupos teste e controle com o passar dos dias. Estes dois efeitos contrários (tendência a diminuição por um mecanismo e ao aumento por outro) também podem explicar os perfis controversos do parâmetro potássio frente ao aumento de temperatura, nos variados trabalhos. Apesar de não termos encontrado diferenças significativas para o potássio entre as amostras teste e os controles do nosso estudo, achamos importante relatar que na terceira etapa os valores dos grupos submetidos a temperatura de 25°C por 48 horas foram ligeiramente inferiores ao grupo controle e grupo teste a -1°C, nos dias 16 e 21. Ainda ressaltamos que, em um dos pontos da análise (dia 21, em CH-SAGM), o valor p foi igual a 0,045 e a 0,050, quando em comparação, respectivamente, com a curva padrão e a alíquota controle. Entretanto, tanto os dados da literatura quanto do nosso estudo sugerem que dosagens de potássio não sejam bons marcadores para avaliar danos secundários a temperaturas inadequadas em CH. Por outro lado, são indispensáveis em casos específicos, como na suspeita de hipercalemia secundária a transfusão de CH, principalmente em pacientes pediátricos e hemocomponentes irradiados.

Conforme demonstrado em lesões de estocagem em CH, nas condições normais de resfriamento, a hemólise é um evento detectado tardiamente, ao final da validade, diferentemente das alterações bioquímicas, como glicose, lactato e potássio que ocorrem de forma mais acelerada nos primeiros 14 dias. Provavelmente este perfil de resposta contribuiu com um dos achados do nosso

estudo, onde os testes de hemólise (hemoglobina livre e percentual de hemólise) não detectaram diferenças logo após exposições de CH a temperaturas elevadas ou baixas, quando em comparação aos grupos controle. Como as exposições ocorreram no 14º dia de armazenamento, não deve ter havido tempo suficiente para um aumento hemoglobina livre e percentual de hemólise até o vencimento das bolsas. Os estudos já discutidos no **item 7.3** sugerem que os parâmetros hemoglobina livre e grau de hemólise tenham uma resposta tardia em CH submetidos a desvios de temperatura (WAGNER et al., 2014; THOMAS; HANCOCK; CARDIGAN, 2012).

Conforme relatado por WAGNER et al. (2014), CH em SAGM, quando submetidos a temperaturas elevadas continuamente, demonstraram diferenças em relação ao grupo controle em glicose e lactato mais precocemente (7º dia) do que em hemoglobina livre (14º dia naquelas unidades a 22°C e 28º dia nas bolsas a 13°C). Outra desvantagem descrita em testes de hemólise são os inúmeros interferentes da fase pré-analítica (conexão estéril e selagem, ordenha do tubo coletor, homogeneização do conteúdo da bolsa, coleta de amostra de CH, centrifugação, separação do plasma sobrenadante), que tendem a gerar resultados falsamente elevados. Entretanto, como transfusões de CH com altas concentrações de hemoglobina livre são nocivas para receptores, o teste de hemólise torna-se indispensável em avaliações de qualidade de CH. É importante ressaltar que podem existir outros efeitos que não foram medidos ou detectados em nosso estudo. Novas investigações devem ser realizadas para complementar nossas análises e estabelecer melhores condutas.

8 Recomendações

Este estudo não se destina a sugerir qualquer modificação nas diretrizes legais de transporte de unidades de CH. Entretanto, as evidências encontradas nesse trabalho podem ser usadas em avaliações de risco quando ocorrerem desvios não planejados na cadeia de frio, especialmente em situações de bolsas especiais como fenótipo raro. Porém, novas pesquisas ainda são necessárias para complementar os achados do nosso estudo e da literatura científica.

Algumas entidades internacionais autorizam transfusão de bolsas de CH que sofreram desvio de temperatura, quando o responsável técnico do serviço hemoterápico julgar seguro e imprescindível o aproveitamento destas unidades. Nestas situações, as bolsas ficam em quarentena até conclusão da avaliação laboratorial e parecer final do supervisor. São obrigatórios registros claros da justificativa e condutas tomadas nestes casos especiais (TRANSFUSION SCIENCE STANDING COMMITTEE; AUSTRALIAN & NEW ZEALAND SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION LTD, 2016).

Com base nos resultados do nosso estudo e revisão da literatura, apresentamos abaixo algumas recomendações para casos em que seja necessária uma avaliação laboratorial frente a exposição de unidades de CH a temperaturas diferentes do preconizado pelas diretrizes legais brasileiras. Estas recomendações também podem ser úteis para análises de risco em situações de falhas nos registros das temperaturas de transporte ou de equipamentos de armazenamento.

a) Perfil padrão de parâmetros laboratoriais:

- O perfil padrão dos parâmetros laboratoriais que forem adotados deve ser definido separadamente para cada metodologia de preparo de CH e tipo de solução preservativa.
- O perfil padrão também deve ser categorizado por período de armazenamento, contendo valores de referência específicos para intervalos no mínimo quinzenais.
- Os resultados laboratoriais encontrados devem ser comparados a valores de unidades de CH com mesma solução preservativa e mesma metodologia de preparação e dentro do mesmo período de armazenamento.

b) Testes de hemólise:

- Testes de hemólise sempre devem ser realizados para análise de qualidade de CH.
- A interpretação de resultados de teste de hemólise deve ser baseada em cuidadosa análise crítica frente a valores de referência estabelecidos pelo serviço e também aqueles exigidos pela legislação para último dia de validade do CH. Decisões fundamentadas apenas nas normas legais podem incorrer em risco para receptores.
- Como as alterações de hemólise são detectadas tardiamente, nas análises de desvios de temperatura, consideramos boa prática restringir a data de validade do CH para no máximo 14 dias, contados a partir da data do teste de hemólise. Caso ainda haja interesse em transfundir esta unidade de CH após este prazo, recomendamos a repetição do teste de hemólise nesta ocasião, com extensão da validade por mais 7 dias caso o resultado esteja se mantendo dentro da normalidade. Pelos achados do nosso estudo e da literatura, este prazo demonstrou ser seguro, já que é um teste com resposta tardia. Assim, esta prática garante que as alterações de hemólise sejam detectadas e evita transfusões com altas concentrações de hemoglobina livre.

c) Glicose:

- Análises de glicose são úteis como exames complementares nas avaliações de lesão frente a desvios de temperatura ocorridos. Propomos sua adoção pelos serviços de hemoterapia, especialmente para aqueles casos de CH-CPDA1 submetidas a temperaturas mais elevadas do que o preconizado. Cada laboratório deve elaborar seu próprio perfil padrão para estabelecer os valores de referência.
- Dosagens de glicose devem ser realizadas logo após o evento de elevação térmica, preferencialmente nas primeiras 24 horas, quando são mais evidentes seus efeitos sobre o metabolismo eritrocitário.

d) Potássio:

- Dosagens de potássio não são imprescindíveis em análises de unidades de CH não irradiadas que foram submetidos a desvios de temperaturas.
- Recomendamos a inclusão de análises de potássio plasmático para CH irradiados, especialmente se forem bolsas com volumes pediátricos, para avaliação de lesão após exposições a temperaturas inadequadas.
- Sugerimos também que os serviços estabeleçam padronização e estratégias para realizar dosagens de potássio em investigações de reações transfusionais com suspeita de hipercalemia.

e) Amostragem:

- Devido à variabilidade individual de respostas, análises laboratoriais de desvios de temperaturas devem ser realizadas em todas aquelas unidades de CH cujo aproveitamento é imprescindível. Ou seja, resultados laboratoriais em apenas uma amostragem de um lote de bolsas envolvidas em um evento não autoriza que as conclusões sejam assumidas como verdadeiras para todo o lote. Assim, recomendamos análises individuais de risco para cada unidade de CH.

9 Conclusão

Nesse trabalho foram elaborados os perfis padrão de parâmetros laboratoriais (hemoglobina plasmática, grau de hemólise, potássio, glicose, lactato e desidrogenase láctica) para dois tipos de CH não desleucocitados (CH em CPDA-1, preparado pela metodologia do PRP e CH em SAGM, produzido pelo BC). Estes perfis padrão constituirão uma ferramenta de grande utilidade para controle de qualidade e monitoramento das lesões de armazenamento em bolsas de CH produzidas na Fundação HEMOMINAS. Além disso, os resultados obtidos nesse trabalho reforçaram a meta institucional de substituição gradativa da solução preservativa CPDA1 por SAGM.

O conjunto dos resultados apresentados nas segunda e terceira etapas deste estudo demonstrou que bolsas de CH-CPDA1 e CH-SAGM submetidas a temperaturas de aproximadamente -1°C ou 14°C por períodos inferiores a 24 horas não apresentam alterações significativas em parâmetros laboratoriais *in vitro*. O monitoramento de temperatura e tempo é imprescindível para análise da qualidade das bolsas transportadas. Entretanto, ainda não existem evidências suficientes na literatura para modificar as normas de temperatura e tempo de transporte atualmente preconizadas.

Não foi possível definir um teste laboratorial específico para analisar a qualidade de CH submetidos a temperaturas inadequadas de transporte.

Referencias

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

AABB. **Technical manual**. 17th. ed. Bethesda: AABB, 2011.

AABB. **AABB Standards for Blood Banks and Transfusion Services**. 29th. ed. [s.l.] AABB, 2014b.

ACKER, J. P.; HANSEN, A. L.; KURACH, J. D. R.; 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.

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.

BEUTLER, E.; WEST, C. The Storage of Hard-Packed Red Blood Cells in Citrate-Phosphate-Dextrose (CPD) and CPD-Adenine (CPDA-1). **Blood**, v. 54, n. 1, p. 280–284, 1979. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/54/1/280.abstract>>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde. Portaria Conjunta Nº 370, de 7 de maio de 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília - DF, 08 mai. 2014. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2014/poc0370_07_05_2014.html. Acesso em: 16 abr. 2018.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria de Consolidação nº 5 de 28 de setembro de 2017. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília - DF, 03 out 2017. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html>. Acesso em: 16 abr. 2018.

BRUNSKILL, S.; et al. What Is the Maximum Time That a Unit of Red Blood Cells Can Be Safely Left Out of Controlled Temperature Storage? **Transfusion Medicine Reviews**, v. 26, n. 3, p. 209–223.e3, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2011.09.005>>.

CAMPBELL LEE, S.; et al. Red blood cell products: Consideration of the discrepant temperature ranges permitted for storage versus transport. **Transfusion**, v. 52, n. 1, p. 195–200, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2011.03242.x>>.

COUNCIL OF EUROPE. **Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components**. 19th. ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM), 2017.

CSA GROUP. **CAN/CSA-Z902-15 - Blood and blood components**. 3rd. ed. Canada: CSA, 2015.

DE BIASIO, L.; RYMER, T. Blood Administration. In: CLARK, G.; CHARGÉ, S. (Ed.). **Canadian Blood Services' Clinical Guide to Transfusion**. [s.l: s.n.]

DE GRANDMONT, M. J.; et al. Quality and safety of red blood cells stored in two additive solutions subjected to multiple room temperature exposures. **Vox Sanguinis**, v. 107, n. 3, p. 239–246, 2014.

DUMANI, D.; GOLDFINGER, D.; ZIMAN, A. Is the 30-minute rule still applicable in the 21st century? **Transfusion**, v. 53, n. 6, p. 1150–1152, 2013.

FLATT F., J. F.; BAWAZIR M., W. M.; BRUCE, L. J. The involvement of cation leaks in the storage lesion of red blood cells. **Frontiers in Physiology**, v. 5 JUN, p. 1–12, 2014.

GLYNN, S. A. Editorial: The red blood cell storage lesion: A method to the madness. **Transfusion**, v. 50, n. 6, p. 1164–1169, 2010.

HAN, V.; SERRANO, K.; DEVINE, D. V. A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates. **Vox Sanguinis**, v. 98, n. 2, p. 116–123, 2010.

HANCOCK, V.; CARDIGAN, R.; THOMAS, S. Red cell concentrate storage and transport temperature. **Transfusion Medicine**, v. 21, n. 5, p. 325–329, 2011.

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

HESS, J. R. Measures of stored red blood cell quality. **Vox Sanguinis**, v. 107, n. 1, p. 1–9, 2014.

HESS, J. R.; et al. Interlaboratory comparison of red-cell ATP, 2,3-diphosphoglycerate and haemolysis measurements. **Vox Sanguinis**, v. 89, n. 1, p. 44–48, 2005.

HÖGMAN, C. F. Preparation and preservation of red cells. **Vox sanguinis**, v. 74 Suppl 2, p. 177–87, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9704444>>

KLEIN, H. G. How safe is blood, really? **Biologicals**, v. 38, n. 1, p. 100–104, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.10.008>>.

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.

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

MOORE, G. L.; BATSAKIS, J. G. Additive Solutions for Better Blood Preservation. **CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 25, n. 3, p. 211–229, 27 jan. 1987. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408368709105883>>.

NATIONAL BLOOD SERVICE. **Guidelines for the Blood Services in the United Kingdom**. 7th. ed. London: The Stationery Office (TSO), 2005.

ORLOV, D.; KARKOUTI, K. The pathophysiology and consequences of red blood cell storage. **Anaesthesia**, v. 70, n. Suppl. 1, p. 29–37, 2015.

PICK, P.; FABIJANIC, J. Temperature Changes in Donor Blood under Different Storage Conditions. **Transfusion**, v. 11, n. 4, p. 213–215, 1971.

RAMIREZ-ARCOS, S.; et al. Evaluating the 4-hour and 30-minute rules: Effects of room temperature exposure on red blood cell quality and bacterial growth. **Transfusion**, v. 53, n. 4, p. 851–859, abr. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2012.03807.x>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

REDE DE SERVIÇOS TECNOLÓGICOS PARA SANGUE E HEMODERIVADOS. **Manual para Controle de Qualidade para sangue e Hemoderivados**. São Paulo, Redsang-SIBRATEC, 2011.

REID, T.; et al. The viability of autologous human red cells stored in additive solution 5 and exposed to 25°C for 24 hours. **Transfusion**, v. 39, n. September, p. 991–997, 1999.

RUDDELL, J.; et al. Effect of 24-hour storage at 25 degrees C on the in vitro storage characteristics of CPDA-1 packed red cells. **Transfusion**, v. 38, n. 5, p. 424–428, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9633553>>.

STRAUSS, R. G. Data-driven blood banking practices for neonatal RBC transfusions. **Transfusion**, v. 40, n. 12, p. 1528–1540, 2000.

THOMAS, S.; HANCOCK, V.; CARDIGAN, R. Repeated short-term warming of red blood cell concentrates has minimal effect on their quality. **Vox Sanguinis**, v. 103, n. 2, p. 113–121, 2012.

THOMAS, S.; HANCOCK, V.; CARDIGAN, R. The 30 minute rule for red blood cells: In vitro quality assessment after repeated exposure to 30°C. **Transfusion**, v. 53, n. 6, p. 1169–1177, 2013.

TRANSFUSION SCIENCE STANDING COMMITTEE; AUSTRALIAN & NEW ZEALAND SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION LTD. **Guidelines for Transfusion and immunohaematology laboratory practice**. Sydney: Australian & New Zealand Society of Blood Transfusion Ltd, 2016.

VAN DE WATERING, L. Red cell storage and prognosis. **Vox Sanguinis**, v. 100, n. 1, p. 36–45, 2011.

WAGNER, T.; et al. Impact of constant storage temperatures and multiple warming cycles on the quality of stored red blood cells. **Vox Sanguinis**, v. 106, n. 1, p. 45–54, 2014.

ANEXO

Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação *HEMOMINAS*

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da qualidade de concentrados de hemácias e do impacto de exposições a temperaturas entre 24 e 30°C no decorrer do período de armazenamento.

Pesquisador: Flavia Naves Givisiez

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 49443415.2.0000.5118

Instituição Proponente: FUND CENTRO HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: FUND CENTRO HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.268.729

Apresentação do Projeto:

A segurança transfusional dos concentrados de hemácias (CH) é determinada por diversos fatores como saúde do doador, condições clínicas do paciente, acurácia da triagem laboratorial e da prova de compatibilidade e qualidade do armazenamento e do transporte. Existe consenso na literatura científica de que o armazenamento, apesar de imprescindível para a hemoterapia, reduz a eficácia e segurança dos CH, mesmo em condições rigorosamente controladas (HESS, 2014) e (KLEIN, 2010). Durante armazenamento ex-vivo de unidades de CH, ocorrem modificações bioquímicas e morfológicas das células que são denominadas "lesões de estocagem". Estas alterações incluem modificações de morfologia celular e microvesiculações; aumento de potássio, hemoglobina livre, lactato e lisofosfolípidos; diminuição de pH, adenosina trifosfato (ATP) e 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e alterações da curva de dissociação de oxigênio. Apesar destas alterações estarem bem descritas, as evidências ainda são insuficientes para se concluir a correlação entre duração da estocagem e desfechos clínicos específicos (NESTER; JAIN; POISSON, 2014) e (GLYN, 2010). A qualidade dos concentrados de hemácias está intimamente relacionada às condições de armazenamento, de modo que diversos aspectos, como temperaturas do refrigerador, condições de transporte e frequência e período de tempo com que as bolsas são manipuladas em temperatura ambiente, são variáveis que podem intensificar e/ou acelerar as lesões de estocagem.

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.130-110
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3768-4587 **Fax:** (31)3768-4600 **E-mail:** cep@hemominas.mg.gov.br

Continuação do Parecer: 1.268.729

(HESS, 2014). Os diferentes métodos de preparo dos hemocomponentes, as diversas soluções preservativas e anticoagulantes e outros fatores como desleucocitação e irradiação também podem ter efeito no produto final, interferindo na qualidade dos concentrados de hemácias. A padronização dos produtos hemoterápicos e dos testes de controle de qualidade é um desafio de todo serviço de hemoterapia. A análise do controle de qualidade de CH, no decorrer do período de estocagem, comparando diferentes formas de preparo e de solução preservativa, é imprescindível para se conhecer o efeito habitual das lesões de armazenamento (ACKER; HANSEN; JENKING, 2014). Esta análise do controle de qualidade pode ser baseada nos testes laboratoriais da rotina de monitoramento e em testes especializados. Análises laboratoriais para avaliação das lesões de armazenamento variam quanto à facilidade de execução, robustez e utilidade do teste (HESS, 2014). Tentativas de se medir a qualidade da estocagem de concentrados de hemácias são centradas em requisitos regulamentares. Na legislação brasileira os parâmetros obrigatórios estão descritos na Portaria do Ministério da Saúde do Brasil, nº 2712, de 12/nov/2013, e consistem essencialmente em: hemoglobina, hematócrito e grau de hemólise. Na literatura científica são descritos diversos outros testes, de pequena aplicação prática na rotina diária do serviço de hemoterapia, mas que são muito úteis em pesquisas, quando se necessita obter painéis mais extensos de avaliação de qualidade dos concentrados de hemácias. Existem diversas regulamentações sobre condições de armazenamento e transporte de hemocomponentes, determinando que as bolsas de hemocomponentes sejam manipuladas sob controle rigoroso de temperaturas, para preservar a qualidade dos hemocomponentes. Um destes requisitos diz respeito ao tempo de exposição das bolsas de concentrados de hemácias à temperatura ambiente. A legislação brasileira e diversas regulamentações internacionais determinam que aqueles concentrados de hemácias que permanecerem à temperatura ambiente por mais do que trinta minutos sejam descartados. Transcrevemos, abaixo, trecho da Portaria do Ministério da Saúde do Brasil, nº 2712, de 12/novembro/2013, que trata deste assunto: Art. 193. Antes do início da transfusão, os componentes eritrocitários não permanecerão à temperatura ambiente por mais de 30 (trinta) minutos. § 1º Caso o tempo de que trata o "caput" seja atingido, o componente será recolocado, imediatamente, em temperatura adequada de armazenamento. § 2º O componente será descartado na hipótese de não cumprimento do procedimento de que trata o § 1º. Esta "regra dos 30 minutos", como tem sido denominada por diversos autores, parece ter se originado de um estudo conduzido por Pick e Fabijanic (1971), no qual demonstraram que unidades de sangue total, mantidas a temperatura ambiente, atingiram, no interior das bolsas, temperaturas superiores a 10°C, em aproximadamente 45 a 60 minutos. Curiosamente este trabalho não apresenta

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321 CEP: 30.130-110
 Bairro: Santa Efigênia
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3755-4587 Fax: (31)3755-4600 E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br

Continuação do Parecer: 1.260.729

nenhum dado referente à qualidade dos concentrados de hemácias (GRANDMONT; THIBAUT, 2014) e (DUMANI; GOLDFINGER; ZIMAN, 2013). Apesar de ser um padrão universal, a regra de 30 minutos nunca foi oficialmente validada, mesmo sabendo-se que ocasiona descarte de quantidade excessiva de bolsas. Devido a isto, trabalhos científicos têm sido conduzidos em diversas partes do mundo, analisando a segurança e qualidade in vitro de concentrados de hemácias expostos a temperatura ambiente por tempo superior a 30 minutos. Maior período de tempo, mesmo ocorrendo em múltiplas exposições com duração de 60 minutos, parece não afetar negativamente os concentrados de hemácias. Por isso os autores têm sugerido mudanças nas regulamentações, com expansão desta regra de 30 minutos, para o tempo limite de 60 minutos (GRANDMONT; THIBAUT, 2014), (DUMANI; GOLDFINGER; ZIMAN, 2013) e (THOMAS; HANCOCK; CARDIGAN, 2013).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Monitorar os parâmetros laboratoriais de controle de qualidade de concentrados de hemácias, preparados por duas metodologias distintas, no decorrer de diferentes condições de armazenamento.

Objetivo Secundário:

- Definir o perfil padrão em parâmetros laboratoriais (bioquímicos e morfológicos) para controle de qualidade e monitoramento das lesões de armazenamento de concentrado de hemácias em CPDA-1, preparados pela metodologia do plasma rico em plaquetas.
- Definir o perfil padrão em parâmetros laboratoriais (bioquímicos e morfológicos) para controle de qualidade e monitoramento das lesões de armazenamento de concentrado de hemácias em CPDSAG-Manitol, preparados pela metodologia da camada leucoplaquetária.
- Avaliar a influência da temperatura, do tempo e número de exposições nos parâmetros laboratoriais do perfil padrão de qualidade dos concentrados de hemácias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Perda de confidencialidade dos dados dos doadores. Na primeira etapa não existirá nenhum risco para receptores de sangue da FH, pois serão utilizadas bolsas de concentrados de hemácias reservadas mensalmente para monitoramento de rotina do Laboratório de Controle de Qualidade. Desta forma, o estoque de concentrados de hemácias do Hemocentro de Belo Horizonte (HBH) não será comprometido. Na segunda etapa deste estudo serão utilizadas, a cada mês, 5 bolsas de concentrados de hemácias (CH) de grupo sanguíneo A RhD positivo ou O RhD positivo, totalizando 30 amostras. Apesar de serem bolsas que seriam disponibilizadas para transfusão, será mínimo o

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321 CEP: 30.130-110
 Bairro: Santa Efigênia
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3758-4587 Fax: (31)3758-4600 E-mail: ocp@hemominas.mg.gov.br

Continuação do Parecer: 1.268.729

risco de falta de CH para pacientes, pelos motivos explicados a seguir. Primeiramente, serão excluídas deste estudo aquelas unidades que tenham fenótipo imunohematológico raro, evitando, desta forma, prejuízo a pacientes específicos para os quais o HBH tem dificuldades em encontrar doador compatível. Além disso, no HBH, os índices médios de descarte mensal por vencimento de CH são 6%, representando ao mês aproximadamente 180 bolsas do grupo sanguíneo A RhD positivo e 120 bolsas do grupo sanguíneo O RhD positivo. Ou seja, a quantidade de bolsas de CH descartadas mensalmente por vencimento é largamente superior às cinco unidades que serão selecionadas do estoque, e, por isso, não representará prejuízo algum ao quantitativo de bolsas disponibilizadas para pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Verificar campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Durante a análise do projeto de pesquisa não foram identificados óbices éticos. O Regimento de Constituição do Biorepositório foi anexado à Plataforma Brasil pela equipe do CEP-Hemominas no dia 07/10/2015.

Considerações Finais a critério do CEP:

A partir de Junho/2015, o CEP-Hemominas não mais enviará Parecer Consubstanciado Impresso e assinado aos pesquisadores. Caso seja necessário, o pesquisador deverá solicitar ao CEP-Hemominas a via impressa e assinada desse documento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio.pdf	07/10/2015 11:32:06	Daniel Gonçalves Chaves	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_544429.pdf	02/09/2015 23:49:16		Aceito

Endereço: Avenida Ezequiel Dias, 321
Bairro: Santa Efigênia CEP: 30.130-110
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3768-4567 Fax: (31)3768-4600 E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG

Continuação do Parecer: 1.268.729

Folha de Rosto	Folha_rosto_plataf_bras_Assinado.pdf	02/09/2015 17:29:57	Flavia Naves Givisiez	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Pesquisador_Flavia_Givisiez.doc	02/09/2015 07:37:54	Flavia Naves Givisiez	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 08 de Outubro de 2015

Assinado por:
Daniel Gonçalves Chaves
(Coordenador)

Daniel Gonçalves Chaves
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hemominas

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 321

CEP: 30.130-110

Bairro: Santa Efigênia

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3768-4587

Fax: (31)3766-4600

E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br