

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

**“PADRONIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE
HEMÁCIAS PARA AUXILIAR NA IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-
ERITROCITÁRIOS”**

Marta Aparecida Barbosa Chagas

- RIBEIRÃO PRETO, SP – 2015 –

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

Marta Aparecida Barbosa Chagas

**“PADRONIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE
HEMÁCIAS PARA AUXILIAR NA IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-
ERITROCITÁRIOS”**

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

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Orientadora: Simone Kashima Haddad

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”.

- RIBEIRÃO PRETO, SP – 2015 -

C433p

Chagas, Marta Aparecida Barbosa

Padronização e implementação de métodos de preservação de hemácias para auxiliar na identificação de anticorpos anti-eritrocitários./
Marta Aparecida Barbosa Chagas – Ribeirão Preto, 2015.

80f.; il. 30cm

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

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional

Orientador: Simone Kashima Haddad

MARTA APARECIDA BARBOSA CHAGAS

**“PADRONIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO
DE HEMÁCIAS PARA AUXILIAR NA IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-
ERITROCITÁRIOS”**

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

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina
Transfusional.

APROVADO: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me dado o dom da vida e proporcionado a maravilhosa oportunidade de participar deste mestrado, que é a realização de um sonho.

Ao **meu marido**, pelo grande incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

Aos **meus filhos amados**, porque mesmo sem entender direito o que acontecia, me apoiaram, colaboraram e me incentivaram nos momentos difíceis.

À **Dra. Maria Clara Fernandes da Silva Malta**, bióloga da Fundação Hemominas, meus profundos agradecimentos pela paciência, cooperação e pelas valiosas orientações.

À Professora **Dra. Simone Kashima Haddad**, orientadora desta dissertação, pela confiança, pelo carinho e pelo auxílio no trabalho desenvolvido.

À **Luciana Cayres**, Chefe da Central de imuno-hematologia, pela confiança e por tornar possível a concretização de grande parte dos procedimentos deste trabalho.

À **Dra. Marina Lobato** e **Dr. Daniel Chaves**, da Gerência do Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas, pela viabilização de grande parte deste projeto e pela confiança ao disponibilizar o laboratório de pesquisa para realização dos procedimentos.

À **Stela Brener**, bióloga do Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas, pelo carinho, atenção e por sua valiosa contribuição.

Às alunas de iniciação científica, **Ana Carolina Ferreira** e **Marcela Oliveira**, pela ajuda nos trabalhos técnicos para a conclusão desse projeto.

A **Dra Eugênia Maria Amorim Ubiali**, Coordenadora Médica do Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo apoio e disponibilidade em ajudar.

À **Ana Paula Rocha Diniz Zanelli** do Hemocentro de Ribeirão Preto, pelas orientações iniciais.

À colega de mestrado e amiga **Sônia Mara Nunes**, pelo companheirismo, paciência e, sobretudo, pela grande ajuda.

Ao colega de trabalho **Felipe Carlos Brito**, pelo grande auxílio.

Aos funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto, especialmente **Raquel Botelho**, **Elaine Terezinha** e **Adriana Maria Teles**, pelo carinho e disponibilidade em ajudar.

Aos **colegas da Central de Imuno-Hematologia** da Fundação Hemominas, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis ao longo deste trabalho.

À **Diretoria da Fundação Hemominas**, pelo apoio na realização deste mestrado.

Aos **meus pais** (*in memoria*), tenho certeza, estão muito felizes com a minha conquista.

Aos **meus irmãos**, pelo apoio sempre.

À **Elizabeth Aparecida Figueiredo**, pela grande colaboração nas minhas ausências, especialmente com relação aos meus filhos.

Aos **colegas de mestrado**, pelo apoio, pela convivência e pelas inúmeras experiências compartilhadas.

À empresa Expansão diagnósticos, na pessoa de **André Fraga Vieira**, pela valiosa colaboração com este projeto.

Ao **Marcelo Souza** da Bio-Rad Laboratories, pela disponibilidade em ajudar.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
GRÁFICOS.....	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT.....	VII
1 REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 OS ERITRÓCITOS.....	1
1.2 OS ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS	4
1.3 FENÓTIPOS RAROS	6
1.4 ANTICORPOS ANTI-ERITROCITÁRIOS	7
1.5 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ALOANTICORPOS E ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS.....	8
1.6 PRESERVAÇÃO DE HEMÁCIAS	10
1.7 ESTOQUE HIPOTÉRMICO DE HEMÁCIAS (4°C).....	10
1.8 MELHORIAS NA PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA DE ERITRÓCITOS	11
1.9 CRIOPRESERVAÇÃO (CONGELAMENTO).....	13
1.10 AGENTES CRIOPROTETORES (CPAS).....	14
1.11 UTILIZAÇÃO DE HEMÁCIAS PRESERVADAS NA REALIZAÇÃO DE TESTES LABORATORIAIS EM IMUNO - HEMATOLOGIA	15
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 AMOSTRAS	20
4.2 PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA.....	20
4.2.1 Preparo e estabilidade das soluções de preservação	21
4.2.2 Preparo e estabilidade das suspensões de hemácias	23
4.2.2.1 Testes de estabilidade: inspeção visual sem simular uso na rotina	24
4.2.2.2 Testes de estabilidade simulando uso na rotina.....	25
4.2.3 Avaliação de resultados falso-positivos nas suspensões de hemácias.....	25
4.2.4 Conservação dos antígenos nas suspensões de hemácias	26
4.2.4.1 Avaliação qualitativa da estabilidade antigênica: fenotipagem dos antígenos Fy ^b , Le ^b	26
4.2.4.2 Avaliação quantitativa da estabilidade antigênica: reatividade das suspensões contra anticorpos anti-C e anti-Fy ^b	27
4.3 PRESERVAÇÃO POR CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO.....	28
4.3.1 Preparo das soluções de congelamento e descongelamento.....	28
4.3.2 Preservação das hemácias por congelamento.....	29

4.3.3	Avaliação de resultados falso-positivos nas hemácias congeladas	32
4.3.4	Conservação dos antígenos nas hemácias criopreservadas	33
4.3.4.1	Avaliação qualitativa da estabilidade antigênica das hemácias criopreservadas: fenotipagem dos antígenos Fy ^b , Le ^b	33
4.3.4.2	Avaliação quantitativa da estabilidade antigênica nas hemácias criopreservadas: reatividade das hemácias contra anticorpos anti-C e anti-Fy ^b	33
4.3.5	Recuperação de hemácias.....	34
4.4	ESTATÍSTICA	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES	35
5.2	ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE HEMÁCIAS	35
5.2.1	Inspeção visual simulando uso na rotina	35
5.2.2	Inspeção visual sem simular uso na rotina	37
5.3	AVALIAÇÃO DE RESULTADOS FALSO-POSITIVOS NAS SUSPENSÕES DE HEMÁCIA	37
5.4	CONSERVAÇÃO DOS ANTÍGENOS NAS SUSPENSÕES DE HEMÁCIAS	38
5.4.1	Avaliação qualitativa da estabilidade antigênica: fenotipagem dos antígenos Fy ^b , Le ^b	38
5.4.2	Avaliação quantitativa da estabilidade antigênica: reatividade das suspensões contra anticorpos anti-C e anti-Fy ^b	39
5.5	PRESERVAÇÃO POR CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO	42
5.5.1	Avaliação de resultados falso-positivos nas alíquotas de hemácias congeladas	42
5.5.2	Conservação dos antígenos nas hemácias congeladas.....	42
5.5.2.1	Avaliação qualitativa da estabilidade antigênica: fenotipagem dos antígenos Fy ^b , Le ^b	42
5.5.2.2	Avaliação quantitativa da estabilidade antigênica: reatividade das hemácias criopreservadas contra anticorpos anti-C e anti-fy ^b	42
5.5.3	Recuperação de hemácias após descongelamento em nitrogênio líquido	47
5.6	REGISTROS	47
6	DISCUSSÃO.....	48
6.1	SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO	49
6.2	PRESERVAÇÃO DE HEMÁCIAS EM SUSPENSÕES	50
6.3	PRESERVAÇÃO POR CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO	52
7	CONCLUSÕES	55
8	REFERÊNCIAS	56
9	ANEXOS	60
9.1	ANEXO I- REAGENTES UTILIZADOS NA PESQUISA	60
9.2	ANEXO II- PROCEDIMENTOS DOS TESTES REALIZADOS	62
9.3	ANEXO III- AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA	77
9.4	ANEXO IV- COMPROVANTES DE TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3 DPG	2,3 difosfoglicerato
ACD	Solução de citrato, fosfato, dextrose
ADP	Difosfato de adenosina
ADSOL	Adenina – dextrose - manitol
AMP	Monofosfato de adenosina
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de adenosina
BFI-1	Baixa Força Iônica-1
BFI-2	Baixa Força Iônica-2
NaCl	Cloreto de sódio
CPAs	Agentes crioprotetores
CPD	Solução de citrato, fosfato, dextrose
CPDA	Solução de citrato, fosfato, dextrose e adenina
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
FL	Fentolitros
GP	Glicoforinas
GSH	Glutationa reduzida
HBc	<i>Antibody to the Hepatitis B Core</i> (Anticorpo do core do vírus da Hepatite B)
HBsAg	<i>Surface antigen of the Hepatitis-B-Virus</i> (Antígeno de Superfície do vírus da Hepatite B)
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> (Vírus da Hepatite C)

HEA	Hidroxietilamido
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da Imunodeficiência humana)
HTLV	<i>Human T lymphotropic virus</i> (Vírus da Leucemia de Células T de humanos)
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ISBT	Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue
ISGN	<i>International Society for Gene Nomenclature</i>
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
LISS	<i>Low Ionic Strength Solution</i>
Me₂SO	Dimetil - sulfóxido
mm	milímetros
Na₂HPO₄	Fosfato dibásico
Na₂HPO₄. H₂O	Fosfato monobásico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
PVP	Polivinil- pirrolidona
q.s.p	Quantidade suficiente para
S+D	Sacarose + dextrose
SAG-M	Salina, adenina, glicose e manitol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Amostras selecionadas, suspensões de hemácias produzidas e testes realizados.	24
Figura 2: Amostras selecionadas para criopreservação e testes realizados.	31
Figura 3: Container de nitrogênio líquido	32
Figura 4: Congelamento de hemácias em pequenas alíquotas	32
Figura 5: Suspensões de hemácias com 45 dias após preparo.....	36
Figura 6: Suspensões de hemácias com 60 dias após preparo.....	36
Figura 7: Teste indireto da antiglobulina utilizando suspensões de hemácias E negativo e plasma de doador contendo anticorpo de especificidade anti-E em cartela gel-teste (BIO-RAD).	38
Figura 8: Fenotipagem Fyb e Leb em cartela gel-teste (BIO-RAD) utilizando as suspensões de hemácias após 28 dias de preservação.....	39
Figura 9: Recuperação de hemácias após descongelamento.	47

GRÁFICOS

Gráfico 1- <i>Score</i> amostras frescas X amostras preservadas em BFI-1% para anti-C.....	41
Gráfico 2- <i>Score</i> amostras frescas X amostras preservadas em BFI-1% para anti-Fy ^b	41
Gráfico 3- <i>Score</i> amostras frescas X amostras congeladas com S+D em nitrogênio líquido para anti-C	44
Gráfico 4- <i>Score</i> amostras frescas X amostras congeladas com PVP em nitrogênio líquido para anti-C	44
Gráfico 5- <i>Score</i> amostras frescas X amostras congeladas com S+D em nitrogênio líquido para anti-Fy ^b	46
Gráfico 6- <i>Score</i> amostras frescas X amostras congeladas com PVP em nitrogênio líquido para anti-Fy ^b	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sistemas de grupos sanguíneos e possíveis funções dos antígenos associados	5
Tabela 2- Solução de Alsever modificada.	21
Tabela 3- Solução de baixa força iônica 1 (BFI-1).	22
Tabela 4- Solução de baixa força iônica 2 (BFI-2).	22
Tabela 5- Solução de congelamento Sacarose + Dextrose (S+D).	28
Tabela 6- Solução de congelamento com polivinilpirrolidona (PVP).	29
Tabela 7- Solução de descongelamento: tampão fosfato pH 7,3.	29
Tabela 8- pH das soluções	35
Tabela 9- Análises visuais realizadas em suspensões de hemácias por 45 dias, com simulação de uso na rotina.	36
Tabela 10- Análises visuais realizadas em suspensões de hemácias, sem simulação de uso na rotina.	37
Tabela 11- Fenotipagens dos antígenos Fy ^b , Le ^b no 1 ^o e no 28 ^o dia de estocagem das suspensões.	39
Tabela 12- Reatividade anti-C e anti- Fy ^b em amostras frescas e preservadas em BFI-1 a 1%	40
Tabela 13- Reatividade anti-C em amostras frescas e após congelamento em nitrogênio líquido.	43
Tabela 14- Reatividade anti- Fyb em amostras frescas e após congelamento em nitrogênio líquido.	45

RESUMO

Chagas, M. A. B. Padronização e implementação de métodos de preservação de hemácias para auxiliar na identificação de anticorpos anti-eritrocitários. 2015. 80f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Introdução e objetivo: A correta identificação de anticorpos anti-eritrocitários é de grande importância em hemoterapia, tanto para compatibilizar sangue adequado para pacientes, evitando reações transfusionais hemolíticas, quanto na prevenção da doença hemolítica perinatal e outras doenças imuno-hemolíticas. As hemácias dos painéis comerciais não possuem os antígenos necessários ou zigosidade adequada para a correta identificação de tais anticorpos. Sendo assim, faz-se necessário o uso de hemácias complementares para auxiliar na identificação dos anticorpos. Tais hemácias podem ser obtidas em banco de doadores fenotipados e preservadas em soluções de 2 a 6°C (hipotérmica) ou por congelamento em nitrogênio líquido, métodos capazes de preservar a integridade dos eritrócitos e os antígenos eritrocitários por meses ou até anos. Este estudo teve como objetivo padronizar métodos de preservação de eritrócitos, tanto na forma de suspensões quanto em pequenas alíquotas por congelamento em nitrogênio líquido. **Metodologia:** Para padronizar métodos de preservação hipotérmica e por congelamento foram utilizadas amostras de doadores de sangue, fenotipadas para os antígenos D, C, E, c, e, C^w, K, M, N, S, s, P₁, Le^a, Le^b, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, coletadas em tubo contendo EDTA. As amostras foram preservadas hipotermicamente nas soluções de Alsever modificada, BFI-1, BFI-2 e ID-CellStabTM e congeladas em nitrogênio líquido a -196°C nas soluções de S+D e PVP. Foram feitas análises quanto ao aparecimento hemólise, turvação do líquido sobrenadante, escurecimento das hemácias, presença de grumos e fungos para avaliar a estabilidade das suspensões mantidas em geladeira e simulação de uso na rotina laboratorial. Para avaliar a estabilidade dos antígenos em eritrócitos preservados em suspensões e por congelamento foram realizados testes qualitativos para os antígenos Fy^b, Le^b e testes quantitativos para os antígenos C e Fy^b, pela metodologia gel-teste. Com a finalidade de prevenir o aparecimento de resultados falso-positivos em cartela gel-teste, foram realizados testes de Coombs indireto das hemácias preservadas com plasma de doador contendo anti-E. **Resultados:** As suspensões de hemácias preparadas com as quatro soluções não apresentaram alterações importantes durante o período de 45 dias, mantidas em geladeira e com simulação de uso na rotina. Os antígenos eritrocitários foram preservados tanto nas hemácias em suspensões quanto nas hemácias congeladas, entretanto em uma amostra preservada em BFI-2 o antígeno Fy^b não foi detectado e nenhuma amostra apresentou resultado falso-positivo com plasma anti-E em cartela gel-teste, após utilização dos dois métodos de preservação. Os eritrócitos congelados com PVP apresentam recuperação superior aos congelados com S+D. **Conclusão:** Devido à viabilidade econômica, facilidade de uso na rotina laboratorial e ótima capacidade de preservar eritrócitos e antígenos de grupos sanguíneos, a solução BFI-1 pode ser utilizada para preservar eritrócitos de 2-6°C a 1% por até 30 dias e o método de preservação por congelamento em nitrogênio líquido em PVP pode ser utilizado para preservar eritrócitos com fenótipos raros por até 10 anos, devido maior capacidade de recuperação celular e ótima preservação dos antígenos.

Palavras-chave: preservação de eritrócitos, soluções de preservação, congelamento de hemácias, antígenos de grupo sanguíneo.

ABSTRACT

Chagas, M. A. B. Standardization and implementation methods of preserving red blood cells to help identify anti-red cell antibodies. 2015. 80f. Dissertation (Master). Faculdade de Medicina Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Introduction and objective: The correct identification of erythrocytes antibody is of great importance in hemotherapy, suitable to make compatible blood for patients, preventing hemolytic transfusion reactions, and in the prevention of hemolytic disease of the newborn and other immuno-hemolytic diseases. The erythrocytes of commercial panels do not have the necessary antigens or double-dose antigen expression for correct identification of such antibodies. Therefore, it is necessary to use additional red blood cells to help identify antibodies. These can be obtained from phenotyped donors bank and preserved in solutions 2-6 ° C (hypothermic) or by freezing in liquid nitrogen, methods that can preserve the integrity of erythrocytes and erythrocyte antigens for months or even years. This study aimed to standardize methods of preservation of erythrocytes, both in the form of suspensions and in droplets by freezing in liquid nitrogen. **Methodology:** To standardize methods for hypothermic preservation and by freezing were used samples from phenotyped blood donors for D, C, E, c, e, C^w, K, M, N, S, s, P1, Le^a, Le^b, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b antigens collected in tubes containing EDTA. Samples were preserved by cooling in modified Alsever solutions, BFI-1, BFI-2 and ID-CellStabTM and frozen in liquid nitrogen at -196 ° C in solutions of S + D and PVP. Analyzes were made of the onset hemolysis, turbidity of the supernatant liquid, darkening of red blood cells, the presence of lumps and fungi to assess the stability of the suspensions kept in the refrigerator and laboratory routine simulation. To evaluate the stability of antigens on erythrocytes in suspensions and preserved by freezing, qualitative tests for Fy^b and Le^b antigens, and quantitative tests for C and Fy^b antigens were carried out by gel technique. In order to prevent false-positive results in gel methodology, indirect Coombs tests were made using preserved red blood cells and donor plasma containing anti-E. **Results:** The erythrocyte suspensions prepared with the four solutions showed no important changes during the period of 45 days, kept in the refrigerator and routine use simulation. Blood group antigens in erythrocytes were preserved both in suspensions and by freezing, but in one sample preserved in BFI-2 was not detected Fy^b antigen and none showed false-positive results with plasma anti-E in gel methodology after the use of the two methods of preservation. Erythrocytes frozen with PVP exhibited better recovery than frozen Erythrocytes with S + D. **Conclusion:** Due to the economic viability, advantages of the use in the laboratory routine and great capacity to preserve erythrocytes and blood group antigens, the BFI-1 solution can be used to preserve erythrocytes of 2-6 ° C at 1% for up to 30 days and the method of preservation by freezing in liquid nitrogen in PVP can be used to preserve erythrocytes with rare phenotypes for up to 10 years due to higher capacity cell recovery and excellent erythrocyte antigens preservation.

Keywords: erythrocyte preservation, preservation solutions, freezing of erythrocytes, blood group antigens.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 OS ERITRÓCITOS

Os eritrócitos são os principais componentes do sangue. Estas células são produtos da diferenciação que começa na medula óssea, onde a célula-tronco hematopoiética se diferencia em célula nucleada. Após a expulsão do núcleo e degradação do retículo endoplasmático, os reticulócitos surgem na circulação e rapidamente se transformam em glóbulos vermelhos maduros, alcançando 120 dias de vida (OLIVEIRA e SALDANHA, 2010). A cada sucessivo estágio de desenvolvimento do eritrócito, há redução do volume celular, condensação da cromatina, perda do nucléolo, diminuição do núcleo e aumento da síntese de hemoglobina, resultando em uma célula sem núcleo e sem organelas. Apesar de ser uma célula altamente especializada, o eritrócito maduro é incapaz de produzir proteínas e realizar a fosforilação oxidativa (HÖGMAN e MERYMAN, 1999). Na fase madura, a célula possui forma de disco bicôncavo com aproximadamente 7,2 μm de diâmetro, 1,5 a 2,5 μm de espessura, com um volume médio de 90 fL (SCOTT, LECÁK e ACKER, 2005).

Membrana eritrocitária

Como a membrana de outras células, a membrana dos eritrócitos é um fluido estrutural composto de bicamada lipídica semipermeável, com mosaicos de proteínas organizadas assimetricamente. Aproximadamente 40% da membrana é constituída de lipídios e 52% de proteínas, que são classificadas em integrais e periféricas de acordo com suas localizações na bicamada lipídica (MOHANDAS e CHASIS, 1993; OLIVEIRA e SALDANHA, 2010). As proteínas integrais mais abundantes e mais bem estudadas da célula vermelha são a banda 3 e uma família das sialoglicoproteínas denominadas glicoforinas (GP). A banda 3 é a principal proteína integral, constituindo cerca de 15-20% das proteínas totais da membrana (MOHANDAS e EVANS, 1994). As proteínas integrais carregam antígenos de grupos sanguíneos e atuam como receptores e transportadores de moléculas na membrana (ANSTEE, 2011). As GP A, B, C, D possuem receptores de membrana e antígenos que participam do reconhecimento célula-célula na extremidade externa e auxiliam na estabilização do citoesqueleto através de ligações com a proteína 4.1 na face interna da membrana. A

concentração de GPA sobre as hemácias é responsável por 80% da carga negativa destas células em função da sua constituição bioquímica composta de ácido siálico e carboidratos terminais. Essa superfície negativa celular ajuda a minimizar a interação célula-célula e prevenir a aglutinação eritrocitária (MURADOR e DEFFUNE, 2007).

As proteínas periféricas formam o citoesqueleto eritrocitário localizado logo abaixo da camada lipídica que é constituído de espectrinas alfa e beta, anquirina (banda 2.1), filamentos curtos de actina (banda 5), tropomiosina (banda 7), aducinas e proteínas 4.1, 4.2 (ou palidina), 4.9 (ou dematina) e p55. Interações entre proteínas e lipídeos são responsáveis por sustentar cerca de 60% da dupla camada lipídica. O citoesqueleto é fundamental para a sobrevivência das hemácias na circulação, porque ele é responsável pela manutenção de sua forma bicôncava e pela sua flexibilidade (PERROTTA, GALLAGHER e MOHANDAS, 2008; SAAD, 2001).

Hemoglobina

A hemoglobina é a proteína globular presente no interior dos eritrócitos que tem como principal função o transporte de oxigênio por todo o organismo e excreção de gás carbônico. Sua estrutura é de uma proteína esferoide, globular, de conformação quaternária, formada por quatro subunidades, compostas de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas. Na hemoglobina A, a forma mais comum e abundante da hemoglobina no adulto, um par de cadeias é do tipo alfa e o outro do tipo beta. Ela é constituída por 4 grupos hemes, cada um contendo um grupo de protoporfirinas e uma molécula de ferro (NETO e PITOMBEIRA, 2003).

O grupo heme é uma molécula planar que contém no seu centro um átomo de ferro na forma Fe^{++} . Cada cadeia de globina possui uma bolsa onde se fixa o heme. Esta cavidade é forrada por aminoácidos hidrofóbicos, que impedem a entrada de água, protegendo o ferro contra a oxidação (ZAGO, 2001).

A hemoglobina constitui aproximadamente 95% do peso da hemácia e é a proteína tampão de maior importância no sangue devido à sua alta concentração e baixo peso molecular (SCOTT, LECAK e ACKER, 2005).

Vias metabólicas

A quebra da glicose é a única fonte de energia para as células vermelhas. Como não possui mitocôndrias para fazer a fosforilação oxidativa, o metabolismo energético do eritrócito utiliza, principalmente, a via glicolítica anaeróbica e o ciclo das pentoses (KLEIN e ANSTEE, 2005; HÖGMAN e MERYMAN, 1999).

Na via glicolítica (Embden-Meyerhof), a glicose é metabolizada em 2 moléculas de lactato, 2 de ATP (trifosfato de adenosina) e uma de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) (HESS e BEYER, 2007). A primeira parte desse processo envolve algum consumo de energia em que o ATP perde um radical fosfato inorgânico e é transformado em ADP (difosfato de adenosina). Mais tarde, na via metabólica, o ATP é regenerado com um ganho líquido de 2 moléculas de ATP por molécula de glicose. Nas células vermelhas circulantes, a maior parte do total do nucleotídeo adenina está presentes sob a forma de ATP. Os outros nucleotídeos, ADP e AMP (monofosfato de adenosina) estão em baixíssimas concentrações (KLEIN e ANSTEE, 2005). Esta via é a principal fonte de energia dos processos celulares e, em condições normais, 90% da glicose que penetra na célula é metabolizada por esta via (HESS e BEYER, 2007).

O ciclo das pentoses, que consome aproximadamente de 5 a 10% da glicose eritrocitária, promove a manutenção de níveis adequados de NADPH, que atua na produção da glutatona reduzida (GSH), que protege a membrana celular e a molécula de hemoglobina de oxidação (HESS e BEYER, 2007).

O metabolismo eritrocitário e conseqüentemente a produção de energia visa fundamentalmente manter a flexibilidade da membrana, a forma bicôncava da hemácia e a integridade da hemoglobina. Deste modo, o ATP produzido protege a membrana celular e a hemoglobina da oxidação, mantém a concentração intracelular alta de K^+ e baixa de Na^+ e Ca^{++} , sendo ainda fundamental para manutenção dos lipídeos de membrana. Assim, baixos níveis de ATP acarretam modificações danosas para a célula (HÖGMAN, 1998; HÖGMAN e MERYMAN, 1999).

1.2 OS ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS

Os antígenos de grupos sanguíneos são sistemas macromoleculares localizados na superfície extracelular da membrana eritrocitária, herdados geneticamente, que podem ser compostos por carboidratos, proteínas ou glicoproteínas (BONIFÁCIO e NOVARETTI, 2009). Os antígenos dos sistemas ABO, H, P1Pk, I e GLOB são formados por carboidratos enquanto os dos sistemas LE e CH/RG, que são provenientes do plasma e estão adsorvidos aos eritrócitos, são formados por carboidratos carregados por glicolipídios e por peptídeos do complemento, respectivamente. Os demais antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos são compostos por sequências proteicas na membrana do eritrócito (ANSTEE, 2011).

Atualmente foram definidos sorologicamente mais de 300 antígenos de grupos sanguíneos agrupados em 34 sistemas reconhecidos pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) e 1504 alelos de 34 genes de grupos sanguíneos foram identificados (BGMUT, 2013).

A frequência dos antígenos eritrocitários varia de acordo com algumas populações e grupos étnicos (AABB, 2011). Estes antígenos podem ser considerados de baixa frequência quando estão presentes em menos que 1% da população e, de alta frequência, quando presentes em mais de 90% da população (PEYRARD et al., 2008). Devido ao fato de vários antígenos de grupos sanguíneos apresentarem frequências populacionais distintas, é importante conhecer a frequência com que os principais antígenos aparecem na população de doadores de sangue, com finalidade de diminuir o risco de aloimunização eritrocitária provocada pela diferença entre fenótipos dos doadores e receptores (NOVARETTI, 2007).

A descoberta dos genes e alelos de grupos sanguíneos tem contribuído muito para desvendar aspectos sobre a funcionalidade e importância da expressão das proteínas que carregam antígenos na membrana dos eritrócitos (BONIFÁCIO e NOVARETTI, 2009). Os antígenos de grupos sanguíneos são carboidratos ligados a lipídeos ou proteínas, alguns são proteínas e outros necessitam de proteínas e carboidratos para se aderirem à membrana. Porém eles não desempenham funções específicas por si mesmas, as quais são desempenhadas por moléculas que os carregam (REID e WESTHOFF, 2007).

A ISBT classifica os antígenos de grupos sanguíneos em quatro categorias:

Sistemas: Antígenos com características sorológicas e bioquímicas bem definidas, constituindo característica herdada controlada por um único *locu* de um gene ou por dois ou mais genes homólogos próximos, com pouca ou nenhuma recombinação gênica.

Coleções: Antígenos que demonstram relações sorológica, bioquímica ou genética, mas não atendem aos critérios necessários para serem inseridos em um sistema.

Séries: Antígenos de baixa e alta frequência que ainda não podem ser incluídos em sistemas ou coleções. A série 700 contém antígenos de baixa incidência populacional e a série 901 contém antígenos de alta incidência populacional.

Os antígenos das séries e coleções não possuem localizações definidas nos cromossomos (REID e WESTHOFF, 2007).

A tabela 1 mostra o resumo dos principais sistemas de grupos sanguíneos, principais antígenos associados e possíveis funções.

Tabela 1- Sistemas de grupos sanguíneos e possíveis funções dos antígenos associados

Número ISBT	Sistema	Genes (ISBT/ ISGN)	Antígenos associados	Nome do componente	Possível função
001	ABO	<i>ABO/ABO</i>	A, B, AB, A ₁	Carboidrato	-
002	MNS	<i>MNS/GYPA, GYPB</i>	MNSs	GPA; GPB	Transporte de ácido siálico/ adesão
003	P	<i>PI/PI</i>	P1	Carboidrato	-
004	Rh	<i>RH/RHD; RHCE</i>	D, C E, c, e, f, C ^w	RhCE; RhD	Estrutural/ transporte
005	Lutheran	<i>LU/LU</i>	Lu ^a , Lu ^b , Lu ₃ , Lu ₄	Lutheran	Receptor/ adesão
006	Kell	<i>KEL/KEL</i>	K, k, Kp ^a , Kp ^b Ku, Js ^a	Glicoproteína Kell	Enzimática
007	Lewis	<i>LE/ FUT3</i>	Le ^a , Le ^b , Le ^{ab} , Le ^{bh}	Carboidrato	-
008	Duffy	<i>FY/ DARC</i>	Fy ^a , Fy ^b , Fy ₃ , Fy ₄	Glicoproteína Fy	Receptor/ adesão
009	Kidd	<i>JK/ SLC144A1</i>	Jk ^a , Jk ^b , Jk ₃	Kidd glicoproteína	Transporte de uréia
010	Diego	<i>DI/ SLC4A1</i>	Di ^a , Di ^b , Wr ^a , Wr ^b , Wd ^a	Banda 3	Transporte de ânions
011	Yt	<i>YT/ACHE</i>	Yt ^a , Yt ^b	Acetilcolinesterase	Enzimática
012	Xg	<i>XG/XG</i>	Xg ^a	Xg ^a glicoproteína	Adesão
013	Scianna	<i>SC SC</i>	Sc ₁ , Sc ₂ , Sc ₃	Scglycoproteína	-
014	Dombrock	<i>DO DO</i>	Do ^a , Do ^b , Gy ^a , Hy, Jo ^a	Do glicoproteína	Enzimática

Continuação da tabela 1

Número ISBT	Sistema	Genes (ISBT/ ISGN)	Antígenos associados	Nome do componente	Possível função
015	Colton	<i>CO AQP1</i>	Co ^a , Co ^b , Co3	Formação de canais	Transporte de água
016	Landsteiner-Wienwr	<i>LW LW</i>	LW ^a , LW ^{ab} , LW ^b	LW glicoproteína	Adesão
017	Chido-Rodgers	<i>CH/RG, C4A, C4B</i>	Ch1, Ch2, Rg1	C4A; C4B	Complemento
018	Hh	<i>H/ FUT1</i>	H	Carboidrato	-
019	Kichx	<i>XK/ XK</i>	Kx	Glicoproteína Kx	Transporte
020	Gerbich	<i>GE/ GYPC</i>	Ge2, Ge3, Ge4, Wb	GPC; GPD	Estrutural
021	Cromer	<i>CROM/ DAF</i>	Cr ^a , Tc ^a , Tc ^b , Tc ^c	CD55 (DAF)	Complemento
022	Knops	<i>KN/ CR1</i>	Kn ^a , Kn ^b , McC ^a , SI ^a , Yk ^a	CD35 (CR1)	Complemento
023	Indian	<i>IN/ CD44</i>	In ^a , In ^b	CD44	Adesão
024	Ok	<i>OK/ CD147</i>	OK ^a	CD147	Adesão
025	Ralph	<i>MER2/ MER2</i>	MER2	CD151	Adesão
026	JMH	<i>JMH/ CD108</i>	JMH	CD108	Adesão
027	I	<i>IGNT/ IGNT</i>	I	N-Acetilglicosaminiltransferase	Glicocálice
028	Globosídeo	<i>βGalN/ β3GALT</i>	P	N-Acetilglicosaminiltransferase	Glicocálice
029	Gil	<i>GIL/ AQP3</i>	Gil	AQP3	Transporte de ureia, água e glicerol

Legenda: ISGN (International Society for Gene Nomenclature.); ISBT (International Society of Blood Transfusion).

Fonte: adaptado de REID e WESTHOFF, 2007.

1.3 FENÓTIPOS RAROS

Fenótipo raro é geralmente definido como a ausência de um antígeno eritrocitário de elevada prevalência na população ou ausência de vários antígenos dentro de um mesmo sistema de grupo sanguíneo ou em diferentes sistemas, cujas frequências individuais encontram-se equilibradas nas populações. Não há consenso internacional para definição de um ponto de corte para fenótipo raro. Alguns valores de corte são propostos, sendo 4/1000 (França), 1/200 (Centro de Transfusão de Nova Iorque), 1/400 (Cruz Vermelha Americana), 1/1000 para fenótipos incomuns ou 1/5000 entre os muitos raros (AABB) (PIASSI, 2010).

A maioria dos indivíduos com sangue raro é identificada em testes pré- transfusionais de rotina ou durante pré-natal, caso ocorra coincidentemente identificação de anticorpo(s) correspondente(s) à(s) especificidade(s) rara(s). Um anticorpo contra antígeno raro pode ser de ocorrência natural ou imune. A confirmação da presença de um fenótipo raro ou identificação do anticorpo correspondente não é tarefa fácil e, às vezes, exige certo tempo e utilização de reagentes raros de origem humana, não comercializados (hemácias ou soros) ou técnicas especializadas de biologia molecular. A especificidade de um anticorpo dirigido contra um antígeno de elevada frequência pode permanecer indeterminada devido à dificuldade de obter hemácias ou soros raros para elucidação do caso (PEYRARD et al., 2008).

Quando uma unidade de hemácias com fenótipo raro é necessária, pode-se recorrer a um banco de sangue raro (usualmente unidades congeladas), caso seja acessível ou requisitar doadores cadastrados. Os membros da família são outra potencial fonte de doadores neste caso. Irmãos são, muitas vezes, as melhores fontes de sangue compatíveis. A ausência de antígeno de alta frequência populacional é geralmente associada com a herança do mesmo gene recessivo de cada um dos pais heterozigotos. Crianças dos mesmos pais têm uma chance em quatro de herdar os mesmos genes raros, tornando os irmãos muito mais prováveis do que a população em geral, de expressar o fenótipo raro (AABB, 2011).

1.4 ANTICORPOS ANTI-ERITROCITÁRIOS

As classes de imunoglobulinas (Ig) com maior significado para o banco de sangue são IgG e IgM. A IgM é uma molécula pentamérica, com capacidade de ativar o sistema do complemento, mas que não atravessa a barreira placentária. São geralmente “frios” e a fixação da imunoglobulina ao antígeno é máxima em baixas temperaturas como a 4°C, fraca a 25°C e frequentemente nula a 37°C. A IgG é uma molécula monomérica, que possui capacidade de atravessar a barreira placentária. (GIRELLO e KÜHN, 2011).

Os antígenos de grupo sanguíneo podem levar à produção de anticorpos quando o indivíduo é exposto a antígenos não próprios, ou seja, quando introduzidos em indivíduos que não possuem os antígenos correspondentes. Os anticorpos são considerados de ocorrência natural quando encontrados normalmente no soro ou plasma (anticorpos do sistema ABO), ou de ocorrência inesperada (imunes) quando o sistema imunológico é estimulado por

transfusões de sangue, gravidez, transplante de órgãos/tecidos ou enxertos. Há dois tipos de anticorpos inesperados: aloanticorpos e autoanticorpos. Quando um indivíduo produz um anticorpo contra um antígeno ausente em sua hemácia, é chamado de aloanticorpo. Quando o anticorpo é produzido contra antígenos existentes em sua própria hemácia, é chamado de autoanticorpo (AABB, 2011).

Os aloanticorpos podem ser clinicamente significantes quando são capazes de diminuir a sobrevivência das hemácias transfundidas ou provocar reação hemolítica perinatal. O significado clínico do aloanticorpo geralmente está associado à reatividade a 37°C e/ou em fase de antiglobulina (NOVARETTI, 2007). Os anticorpos do sistema ABO (anti-A, anti-B e anti-A,B) são os que possuem maior significado clínico, porque são de ocorrência natural, ou seja, não há necessidade de estímulos através de transfusão ou gravidez para que sejam produzidos. Além disso, são misturas de IgG e IgM capazes de ativar o sistema do complemento e provocar hemólise em caso de transfusão incompatível. Outros anticorpos clinicamente importantes mais comuns na prática transfusional na seguinte ordem, do mais comum para o menos comum são: anti-D, anti-K, anti-E, anti-c, anti-Fy^a, anti-C, anti-Jk^a, anti-S, anti-Jk^b. Todos os outros anticorpos clinicamente significantes ocorrem com uma incidência de menos de 1% em pacientes aloimunizados. Os anticorpos que são considerados clinicamente insignificantes, exceto no caso em que o anticorpo reage a 37°C, são: anti-P1, anti-M, anti-N, anti-Lu^a, anti-Le^a, anti-Le^b, e anti-Sd^a. (REID e WESTHOFF, 2007).

1.5 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ALOANTICORPOS E ANTÍGENOS ERITOCITÁRIOS

Para a identificação de anticorpos e/ou antígenos de glóbulos vermelhos a reação é normalmente realizada por um método baseado na aglutinação. No teste de aglutinação tradicional, glóbulos vermelhos suspensos em meio fluido são misturados com soro ou plasma e incubado à temperatura ótima para ligação antígeno/anticorpo. Após incubação por tempo determinado, ocorre centrifugação e leitura. A reação de aglutinação é influenciada por variáveis como tipo de imunoglobulina envolvida, temperatura da reação, tempo de incubação, pH da reação, relação antígeno/anticorpo, centrifugação, utilização de potencializadores e efeito de dose (KLEIN e ANSTEE, 2005).

A técnica de aglutinação pode ser realizada em tubo, microplaca, em gel ou aparelho automatizado.

Hoje em dia, os testes sorológicos em imuno-hematologia são frequentemente realizados em cartela de gel-teste. Neste caso, o soro contendo anticorpo é incubado com as células vermelhas em cartela contendo gel de dextrano e antiglobulina humana, que é centrifugada em seguida. Células vermelhas não aglutinadas passam através do gel enquanto células aglutinadas são mantidas na parte superior ou ao longo do gel (KLEIN e ANSTEE, 2005).

Os anticorpos clinicamente significantes são de grande importância em medicina transfusional e devem ser detectados e identificados no plasma do receptor que requer a transfusão, para que o serviço de transfusão encontre e administre eritrócitos sem o antígeno correspondente ao anticorpo identificado. Os anticorpos com maior importância clínica, além dos do sistema ABO, são aqueles dos sistemas de grupos sanguíneos Rh, Kell, Duffy e Kidd (CRUZ et al., 2010). Segundo a Portaria 2.712 de 2013, Art. 178, os métodos para pesquisa de anticorpos irregulares no soro ou plasma do receptor devem ser capazes de detectar anticorpos clinicamente significativos e devem incluir incubação a 37°C.

Para a detecção e identificação de anticorpos de grupo sanguíneo não-ABO, o soro ou plasma do paciente é testado contra um painel de hemácias do grupo O, geralmente comercial. Os principais antígenos contemplados no painel são D, C, E, c, e, C^w, K, M, N, S, s, P₁, Le^a, Le^b, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b. Para evitar resultados falso-negativos para os anticorpos que sofrem efeito de dose, hemácias do painel devem apresentar os antígenos dos sistemas Rh, MNS, Duffy e Kidd em dose dupla. Na prática, os painéis comerciais geralmente possuem validade de 2 a 4 semanas, cada lote possui hemácias de diferentes doadores e nem sempre contemplam todos os antígenos necessários para a detecção e identificação dos anticorpos ou não apresentam os antígenos em dose dupla para anticorpos correspondentes que sofrem efeito de dose (AABB, 2011).

Hemácias para realização dos testes sorológico complementares em imuno-hematologia, contendo os antígenos de interesse para inclusão ou exclusão de anticorpos correspondentes, geralmente não são comerciais. Na Central de Imuno-Hematologia da Fundação Hemominas são utilizadas hemácias de doadores de sangue, cujas fenotipagens foram previamente realizadas e os resultados armazenados no sistema informatizado de doadores. Portanto, só se consegue um fenótipo de interesse para realização de testes

complementares caso o doador, fenotipado previamente, retorne para novas doações. Além disso, quando o doador fenotipado retorna ao Serviço, após realização dos testes preconizados pela Portaria 2.712 de 2013, sua amostra é armazenada em geladeira, sem tratamento prévio, para ser utilizada em testes complementares dos pacientes. Assim, a estabilidade destas hemácias é comprometida, impossibilitando muitas vezes o seu uso.

Atualmente, o Hemominas realiza a fenotipagem de doadores rotineiramente para os antígenos D, C, E, c, e, C^w, K, M, N, S, s, P₁, Le^a, Le^b, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b. A genotipagem, por sua vez, é empregada para os casos sorológicos inconclusivos, bem como para a confirmação de fenótipos raros como U negativo.

1.6 PRESERVAÇÃO DE HEMÁCIAS

Para preservar hemácias utilizadas em testes laboratoriais, geralmente os laboratórios adotam técnicas de preservação hipotérmica e/ou criopreservação, utilizando técnicas de armazenamento a baixas temperaturas com uso de agentes preservantes.

Baixas temperaturas são utilizadas para suprimir ou abolir os processos metabólicos que acarretam as lesões celulares, aumentando o tempo de estoque sem ocorrência de hemólise (DE SANTIS e PRATA, 2009). Além dos processos metabólicos, a membrana e a hemoglobina devem ser mantidas durante estoque. Defeitos associados a algum desses elementos levam a diminuição do tempo de vida da hemácia (SCOTT, LECAK e ACKER, 2005).

1.7 ESTOQUE HIPOTÉRMICO DE HEMÁCIAS (4°C)

A preservação hipotérmica das hemácias é baseada no princípio de que eventos bioquímicos e moleculares podem ser suprimidos pela redução de temperatura. Como não são totalmente abolidos, há diminuição contínua do pH, acúmulo de ácido lático e aumento da lesão celular. O metabolismo da hemácia é reduzido em 40 vezes com armazenamento entre 2 a 6°C e o envelhecimento normal é abrandado. Entretanto, outros problemas como lesões do estoque hipotérmico irão surgir (HÖGMAN, 1988).

Durante estocagem, as hemácias perdem potássio, 2,3 DPG (2,3- difosfoglicerato), ATP (Trifosfato de Adenosina) e lipídios de membrana, enquanto tornam-se mais rígidas e reduzem a capacidade de carregar oxigênio. Após algum tempo de armazenamento, o sobrenadante das hemácias se torna mais ácido, com altas concentrações de hemoglobinas livres e lipídios biologicamente ativos (HESS, 2006).

A depleção do ATP tem sido associada à alteração da forma celular, aumento da viscosidade interna com diminuição do volume hemolítico crítico e perda da deformabilidade da membrana. Como consequência, há lesões da membrana da hemácia com perda de lipídios, microvesiculação, formação de micro agregados, esferocitose progressiva, endocitose anormal e redução da área de superfície em relação ao volume celular (MERYMAN et al., 1994; LEONART et al., 1997). Manutenção de uma concentração de ATP em pelo menos 50% é necessário para manter a viabilidade da célula, porque esta molécula está estreitamente relacionada com a recuperação celular. Como a sua concentração permanece estável ou aumenta nos primeiros dias de estocagem e, após certo tempo, há declínio, a adição de fosfato e adenina à solução de estocagem permite regularização das concentrações de ATP por certo tempo (HESS e GREENWALT, 2002).

A perda de 2,3-DPG, que também constitui uma lesão de estoque, está diretamente relacionada à diminuição do pH (HESS, 2006). Os glóbulos vermelhos perdem 2,3-DPG logo após a estocagem. Sua concentração cai para um décimo da concentração inicial entre 7 a 10 dias. Para a síntese de 2,3-DPG há consumo de ATP, portanto a tentativa de aumentar o tempo de estoque favorecendo o aumento da taxa de 2,3-DPG através do aumento do pH da solução estoque acima de 7,2 não é real, já que há consumo de uma molécula de ATP para cada molécula de 2,3-DPG produzida (HESS e GREENWALT, 2002).

Outra lesão de armazenamento é a perda de pequenas vesículas da membrana que conseqüentemente leva a maior perda da área do que do volume, formando esferócitos que sofrem hemólise durante armazenamento (LUTZ, LIU e PALEK, 1977).

1.8 MELHORIAS NA PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA DE ERITRÓCITOS

Na década de 40, com a inclusão do procedimento de **autoclavação** de frascos de vidro para estocagem de sangue total contendo citrato de sódio a 3,8%, dá-se o início dos avanços na preservação e estocagem do sangue (HESS, 2006).

No início da segunda guerra, os americanos Elmer DeGowin e John Alsever implementaram estudos com as soluções de **glicose** (nutriente essencial para retenção do metabolismo celular) e o **citrato** (anticoagulante estabilizador de membrana) (SCOTT, LECÁK e ACKER, 2005; HESS, 2006).

Ainda na década de 40, a solução de citrato, dextrose e ácido cítrico (ACD) foi fabricada em garrafas estéreis para coleta e armazenamento de sangue por 21 dias, constituindo um marco para construção dos sistemas de sangue britânico e americano durante e depois da segunda guerra. A **dextrose** funciona como suporte para a formação de ATP e o **ácido cítrico** como estabilizante da dextrose (MERYMAN et al, 1994; HESS, 2006).

Na década de 60, o **fosfato inorgânico**, adicionado à solução de armazenamento tanto para agir tamponando o meio quanto para ser utilizado como substrato para a síntese de 2,3 DPG, foi adicionado à solução de ACD dando origem à solução de CPD (citrato, fosfato, dextrose), com validade de 21 dias também (HESS, 2006).

Por volta de 1968, a **adenina** foi acrescentada à solução de CPD dando origem à CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrose e adenina). A adenina foi acrescentada à CPD com o objetivo de restaurar a forma celular, aumentar a síntese de adenilatos que são substratos para a produção ATP, preservar a viabilidade celular, melhorando e estendendo o armazenamento para 35 dias (MERYMAN et al., 1994).

As soluções aditivas contendo salina, adenina, glicose e **manitol** (SAG-M) foram desenvolvidas na década de 80 com o intuito de aumentar o tempo de estocagem das hemácias com redução de hemólise. O manitol é um conservante da membrana eritrocitária (antioxidante), que previne a hemólise celular. (SCOTT, LECÁK e ACKER, 2005; HESS, 2006).

A **leucorredução**, processo adotado pelos bancos de sangue na década de 90, também contribui para melhorar o armazenamento hipotérmico, já que a remoção dos leucócitos minimiza o consumo de glicose e diminui os danos causados pelas enzimas leucocitárias, resultando em uma significativa diminuição na hemólise durante armazenamento (HÖGMAN e MERYMAN, 1999).

As soluções e os métodos de armazenamento desenvolvidos na década de 40 continuam sendo a prática padrão até hoje e o progresso na manutenção da qualidade da estocagem hipotérmica tem sido lento e gradual. (SCOTT, LECÁK e ACKER, 2005).

1.9 CRIOPRESERVAÇÃO (CONGELAMENTO)

A criopreservação é um processo que visa preservar estruturas biológicas e/ou a funções dos sistemas vivos por congelamento e armazenamento a temperaturas extremamente baixas. Em contraste com o estoque hipotérmico, abaixo de -150°C a movimentação de moléculas é suspensa e a célula alcança um estado onde há poucas reações biológicas significantes ou alterações físico-químicas do sistema. A fisiologia da célula, incluindo a estrutura da hemoglobina, da membrana e metabolismo celular não é afetada pelo armazenamento prolongado por congelamento (SCOTT, LECÁK e ACKER, 2005).

Entretanto, o congelamento em si já implica em riscos para a célula, provocando lesões e morte celular por mecanismos ainda pouco estabelecidos. Para evitar tais lesões é necessário aplicar velocidade de congelamento ideal ao tipo de célula em questão e empregar agentes crioprotetores (CPAs) que minimizem a formação de cristais de gelo e diminuam a intensidade da desidratação celular (DE SANTIS e PRATA, 2009; MERYMAN, 1974).

Há basicamente dois tipos de lesões provocadas pela criopreservação que podem ser letais para a célula e devem ser evitadas: a desidratação e dano mecânico provocado pela formação de cristais de gelo no interior da célula. Estes dois tipos de lesões são decorrentes da velocidade com que a suspensão celular é congelada. Se a suspensão é congelada à baixa velocidade, ocorre desidratação celular e, em caso de alta velocidade, ocorre dano mecânico devido à formação de cristais de gelo no seu interior (MAZUR, 1963).

No congelamento lento das suspensões celulares, geralmente a nucleação de gelo ocorre primeiro no espaço extracelular. Os pontos iniciais de formação de cristais de gelo recrutam moléculas de água que expulsam o soluto para porções líquidas da solução, que têm o seu ponto de congelamento reduzido à medida que a concentração do soluto aumenta. Com este mecanismo há maior concentração e viscosidade da solução que se encontra próxima à célula que, quando exposta ao meio hipertônico, sofre desidratação (DE SANTIS e PRATA, 2009). No congelamento lento a célula tem tempo de responder através da exosmose que resulta na desidratação celular, redução do volume e aumento da concentração do soluto intracelular ao longo do tempo, que resulta em toxicidade celular (MERYMAN, 1974).

No congelamento em alta velocidade há formação de vários pontos de nucleação formados simultaneamente, gerando cristais de gelo relativamente menores do que os formados no congelamento à baixa velocidade, localizados tanto no espaço intracelular como

extracelular. Dependendo do tamanho do cristal intracelular formado, poderão ocorrer lesões mecânicas das organelas e da membrana celular (DE SANTIS e PRATA, 2009). Embora os mecanismos de formação intracelular de gelo e os meios pelos quais a célula é danificada não sejam elucidados até o momento, é sabido que a formação de gelo intracelular é letal para a célula em suspensão e deve ser evitado (MAZUR, 1963).

1.10 AGENTES CRIOPROTETORES (CPAS)

Os crioprotetores utilizados para congelamento de células vermelhas podem ser classificados em dois grupos, com base nos seus mecanismos de ação e permeabilidade através da membrana celular: os CPAs não penetrantes e os penetrantes. **Os CPAs não-penetrantes ou extracelulares** como açúcares, álcoois de açúcar, polímeros e amidos tais como hidroxietilamido (HEA), polivinil-pirrolidona (PVP) e óxido de polietileno são geralmente eficazes em concentrações milimolares e atuam por desidratação da célula à temperaturas de congelamento, reduzindo assim a incidência de formação de gelo intracelular e permitindo o resfriamento rápido antes que as concentrações do soluto intracelular alcance níveis críticos. Os CPAs extracelular também podem agir como estabilizantes da membrana, exercendo esta ação durante as mudanças do estado líquido para o estado sólido e, talvez até mais importante, na volta para o estado líquido, no descongelamento (SCHMID, 2011; MARYMAN, 1971).

Os CPAs penetrantes ou intracelulares são produtos químicos representados pelo glicerol e dimetil-sufóxido (Me_2SO), que são agentes que penetram nas células. Esses CPAs protegem as células dos danos causados por resfriamento lento, impedindo redução excessiva do volume celular e a concentração letal de eletrólitos, reduzindo, assim, a temperatura em que a concentração crítica de sais é alcançada. Os CPAs penetrantes abaixam o ponto de congelamento. Isto promove um maior tempo para a desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares (MCGANN, 1978). O glicerol funciona através da introdução nas hemácias, mudando seu equilíbrio osmótico e reduzindo o volume excessivo, devido à formação de gelo extracelular. Por deter a redução de volume, observa-se que os glóbulos vermelhos não atingem uma concentração eletrolítica crítica, além de diminuir o ponto de congelamento do sistema e auxiliar na redução da formação de gelo extracelular (SCHMID et al., 2011).

1.11 UTILIZAÇÃO DE HEMÁCIAS PRESERVADAS NA REALIZAÇÃO DE TESTES LABORATORIAIS EM IMUNO - HEMATOLOGIA

Hemácias para uso em testes de imuno-hematologia podem ser preservadas por congelamento ou de 2-6° (hipotermicamente). Para obtenção deste tipo de hemácias, muitos laboratórios de imuno- hematologia lançam mão de sangue de doadores com os fenótipos de interesse, que pode ser tratado, preservado através de técnicas de congelamento e/ou preservação de 2 a 6°C.

As soluções preservantes utilizadas no estoque hipotérmico de hemácias para uso em testes imuno-hematológicos, além de promover a preservação da membrana celular, não podem induzir à destruição de antígenos eritrocitários.

Os primeiros antígenos que perdem suas atividades durante o armazenamento são os do sistema Duffy, principalmente quando há contaminação por leucócitos, que promovem a liberação de proteases que degradam estes antígenos. Portanto, a remoção dos leucócitos antes da preparação de suspensões de hemácias para serem armazenadas é um procedimento crucial na preservação dos antígenos de grupo sanguíneo (ALLAN, BRUCE e MITCHELL, 1989).

Além destes, os antígenos do sistema Lewis, por serem adsorvidos aos eritrócitos, podem ser desprendidos na solução preservante durante o armazenamento e, conseqüentemente, podem não reagir com anticorpos correspondentes (MYHRES, DEMANIEW e NELSON, 1984).

Algumas soluções preservantes, como a solução de Alsever modificada, podem ser utilizadas para preservar eritrócitos utilizados em reações no laboratório de imuno-hematologia. Porém, as células devem ser lavadas e ressuspensas em solução salina ou de solução LISS (*Low Ionic Strength Solution*) antes da utilização.

O LISS é um potencializador que contém tampão fosfato, cloreto de sódio, dextrose, adenina, EDTA, aminoácidos e antibióticos, que permite redução segura no tempo de incubação e, portanto, torna-se uma solução de escolha para preparar suspensões de hemácias para detecção e identificação de anticorpos eritrocitários. O fornecimento de células vermelhas preservadas em LISS abole as etapas de lavagem e ressuspensão das células no laboratório, que são etapas que consomem tempo dos profissionais (ALLAN, BRUCE e MITCHELL, 1990).

Todos os componentes utilizados na fórmula do LISS induzem ao aumento da força iônica do meio, a qual é reduzida pela adição de aminoácidos como glicina. A redução da

força iônica permite menor número de resultados falso-positivos quando a técnica de aglutinação é realizada em cartela de gel-teste. Portanto, a adição de aminoácido aumenta a especificidade da reação, impedindo o aparecimento de hemácias não aglutinadas ao longo da coluna do gel (GRIFOLS, 2011).

Como a validade das hemácias refrigeradas é reduzida, os laboratórios de imunohematologia podem preservar hemácias por congelamento, o que possibilita validade de até 10 anos.

Desde que Meryman descreveu em 1956 o método de congelamento de hemácias em nitrogênio líquido, foram relatadas várias modificações no procedimento com o propósito de congelar hemácias para serem utilizadas na identificação de anticorpos anti-eritrocitários (REIDE e ELLISOR, 1974).

O congelamento de hemácias em pequenas gotas, em nitrogênio líquido, utilizando criopreservantes extracelulares como PVP ou S+D (Sacarose+Dextrose) constitui um ótimo método para preservação de hemácias para uso em testes sorológicos no laboratório de imunohematologia, porque além de ser um procedimento fácil e rápido, permite boa recuperação de hemácias. O uso de PVP permite recuperação em torno de 85%, enquanto o S+D recupera mais ou menos 56% das hemácias descongeladas. (SCHMID et al., 2011).

O importante na preservação de eritrócitos para uso em testes imuno-hematológicos é que a integridade da membrana seja mantida, a expressão dos antígenos de grupo sanguíneo seja preservada e que haja uma boa recuperação do volume celular no caso do congelamento. Além disso, o serviço que vai implementar os métodos de preservação deverá possuir cadastro de doadores com fenótipos de interesse e, para manter os estoques de hemácias preservadas, deve possuir meios de requisitar estes doadores, caso necessite. Ainda deverá possuir capacidade de realização dos testes de validação das hemácias a serem preservadas.

Na Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas as amostras de doadores com fenótipos conhecidos são mantidas em tubo primário, em geladeira de 2- 6°C, por mais ou menos 10 dias e são utilizadas para testes complementares dos pacientes e validações de reagentes. Atualmente, está sendo implementado o congelamento de hemácias em nitrogênio líquido com solução Sacarose + Dextrose (S+D) com várias hemácias raras congeladas com fenótipos negativos para os antígenos k, U, Di^b, Lu^b, Ge2 dentre outros. Entretanto, o método ainda não foi validado para uso sistemático na rotina.

Segundo a Portaria 2.712 de 2013, Art. 21, é permitido ao Serviço de Hemoterapia a produção e utilização de reagentes para testes imuno-hematológicos, desde que exista autorização da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), mas tal autorização não se aplica a reagentes para controles laboratoriais internos e soros raros. Portanto os reagentes de glóbulos vermelhos propostos neste estudo, para serem utilizados nos testes sorológicos complementares de imuno-hematologia, com fenótipos raros ou necessários para inclusão ou exclusão de aloanticorpos, podem ser legalmente produzidos.

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de técnicas eficazes de preservação de eritrócitos, para emprego em hemoterapia e nos testes laboratoriais de imuno-hematologia, constitui hoje uma grande necessidade dos bancos de sangue modernos.

As experiências com biopreservação de eritrócitos começaram por volta de 1915 com a utilização de citrato e glicose. As melhorias na estocagem do sangue foram alcançadas gradualmente a cada década, com introdução de novas tecnologias e procedimentos que proporcionaram avanços na qualidade e na segurança do uso do sangue (HESS, 2006).

A preservação de hemácias sob a forma de alíquotas, para uso em testes laboratoriais de imuno-hematologia com o propósito de detectar e identificar anticorpos irregulares constitui uma ótima ferramenta na medicina transfusional moderna (SCHMID et al., 2011).

Na rotina dos laboratórios de imuno-hematologia são utilizados painéis de hemácias comerciais para detecção e identificação de anticorpos eritrocitários. Entretanto, nem todos os fenótipos necessários para a realização dos testes são contemplados nestes painéis, os quais devem conter hemácias de indivíduos com expressão homozigota de tantos antígenos quanto forem possíveis. Muitos laboratórios utilizam hemácias fenotipadas de doadores, estocadas em geladeira em tubo primário contendo EDTA, com a finalidade de utilizar em testes complementares imuno-hematológicos.

Devido à dificuldade de encontrar hemácias com fenótipos adequados para inclusão/exclusão de anticorpos anti-eritrocitários na rotina laboratorial e também pela dificuldade em manter a estabilidade das hemácias de doadores fenotipados, em geladeira, livre de hemólise, há necessidade de utilizar métodos eficazes de preservação de hemácias com fenótipos raros e de interesse para utilização nos testes sorológicos complementares dos pacientes e doadores na rotina laboratorial de imuno-hematologia da Fundação Hemominas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Implementar métodos de preservação de alíquotas de hemácias na Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e validar métodos de preservação por resfriamento de 2 a 6°C, de hemácias para serem utilizadas em testes imuno-hematológicos complementares na Fundação Hemominas.
- Padronizar e validar métodos de preservação por congelamento, de alíquotas de hemácias de doadores com fenótipos raros, para serem utilizadas em testes imuno-hematológicos complementares na Fundação Hemominas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Para os testes de preservação hipotérmica e por congelamento foram selecionadas amostras dos grupos sanguíneos A ou O fenotipadas, no mínimo, para os sistemas Rh, Duffy e Lewis. Os antígenos Fy^b e Le^b foram selecionados por serem bons marcadores da integridade dos antígenos eritrocitários, pois são os primeiros a serem degradados durante estocagem de eritrócitos. O antígeno C do sistema Rh também foi utilizado como um marcador da estabilidade antigênica. Já o antígeno E do sistema Rh foi utilizado como um marcador de reações falso-positivas após a estocagem, por meio da avaliação de amostras E negativo contra anticorpos de especificidade anti-E.

Foram utilizadas amostras de doadores de sangue fenotipadas, coletadas em tubo primário contendo EDTA (ácido dietilenoaminoacético) no prazo máximo de 5 dias, com testes negativos para marcadores HIV-1 e 2, HTLV-1/2, HCV, HBc, HBsAg, doença de Chagas e sífilis.

Para cada amostra, a papa de hemácias foi separada em tubo 12 x 75 mm e lavada quatro vezes em solução de NaCl (cloreto de sódio) 0,9% com centrifugação a 1.000 x g por 5 minutos em centrífuga refrigerada de 2 a 6°C, fabricante HERMLE, modelo Z323K, sendo o *buffy coat* descartado. Em seguida, as amostras foram submetidas aos processos de preservação hipotérmica (suspensões de hemácias) ou por congelamento.

4.2 PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA

Os reagentes/ substâncias utilizados na preservação hipotérmica bem como os lotes, validades e fabricantes estão listados no ANEXO I.

Os procedimentos detalhados para realização dos testes estão descritos no ANEXO II.

Não houve mudança de lotes de reagentes durante a realização dos procedimentos e testes. Os plasmas humanos utilizados nos testes foram de um mesmo doador e, para manter a estabilidade, foram aliqüotados e armazenados em freezer a – 80°C. Após descongelamento e uso, as alíquotas foram descartadas.

Os testes realizados em cartela gel-teste, descritos abaixo, foram incubados, quando necessário, em incubadora DiaMed-ID *Micro Typing System*- ID 37 SI. Os cartões foram centrifugados em centrífuga DiaMed-ID *Micro Typing System*- ID 24 S.

4.2.1 Preparo e estabilidade das soluções de preservação

Foram preparados três tipos de soluções para preservação de hemácias: solução de Alsever modificada, solução de baixa força iônica – 1 (BFI-1) e solução de baixa força iônica – 2 (BFI-2) com as fórmulas descritas respectivamente nas tabelas 2, 3 e 4. Foram adotadas boas práticas no preparo de soluções, que consistiram em realização de todos os procedimentos em capela de fluxo laminar com luz germicida (fabricante VECO), utilização de vidrarias e água autoclavadas e, após preparo, as soluções foram autoclavadas ou filtradas utilizando membrana Millipore de 22 µm. Os antibióticos e aminoácidos só foram acrescentados após autoclavação das soluções.

Após preparo, as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e mantidas de 2 a 6°C em geladeira *Thermo Scientific Forma*, contendo painel de controle com sistema de alarme e visor de temperatura. Suas estabilidades foram avaliadas durante 9 meses através de medição mensal de pH e, conforme Portaria 2.712 de 2013, foram realizadas as avaliações quanto ao aparecimento de precipitados, gelatina, partículas, fungos e turvação. Os testes de estabilidade foram realizados, também, na solução comercial CellStab (BIO-RAD) para preservação de hemácias, nas mesmas condições das soluções preparadas no laboratório.

Tabela 2-Solução de Alsever modificada.

Citrato de sódio anidro	9,1 g
Dextrose anidra	20,5 g
Cloreto de sódio	4,2 g
Ácido cítrico H ₂ O	0,55 g (se anidro, usar 0,5 g)
Cloranfenicol	0,250 g
Neomicina	0,100 g
Gentamicina	0,050 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Estabilidade: 6 meses a 4°C.

Fonte: Adaptado de ROY; WYATT, 1964.

Tabela 3- Solução de baixa força iônica 1 (BFI-1).

Na ₂ HPO ₄ (Fosfato de sódio bi básico)	1,42 g
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de potássio monobásico)	1,36 g
Cloreto de sódio	1,0 g
Dextrose (D- glicose anidra)	3,5 g
Adenina	0,02 g
EDTA	2,80 g
Glicina	14,70 g
Cloranfenicol	0,17 g
Neomicina	0,10 g
H ₂ O destilada g.s.p.	1000 ml

Estabilidade: 6 meses a 4°C

Fonte: GRIFOLS, 2011

Tabela 4- Solução de baixa força iônica 2 (BFI-2).

Na ₂ HPO ₄ (Fosfato de sódio bi básico)	1,42 g
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de potássio monobásico)	1,36 g
Cloreto de sódio	1,0 g
Dextrose (D- glicose anidra)	3,5 g
Adenina	0,02 g
EDTA	2,80 g
Glicina	14,70 g
Cloranfenicol	0,17 g
Neomicina	0,10 g
L-valina	3,2g
L-metionina	2,52g
L-leucina	2,6g
L-isoleucina	6,48g
H ₂ O destilada g.s.p.	1000 ml

Estabilidade: 6 meses a 4°C

Fonte: GRIFOLS, 2011

4.2.2 Preparo e estabilidade das suspensões de hemácias

Para avaliar a estabilidade de hemácias após estocagem, as papas de hemácias lavadas de cada uma das amostras selecionadas foram utilizadas para a produção de suspensões a 1% e a 5% nas soluções BFI-1, BFI-2 e somente a 5% nas soluções de Alsever modificada e CellStab (Figura 1). As alíquotas de cada suspensão com volume de 5 ml, preparadas em frascos conta-gotas de 10 ml e mantidas em geladeira *Thermo Scientific Forma* entre 2 e 6°C, foram submetidas aos testes abaixo descritos.

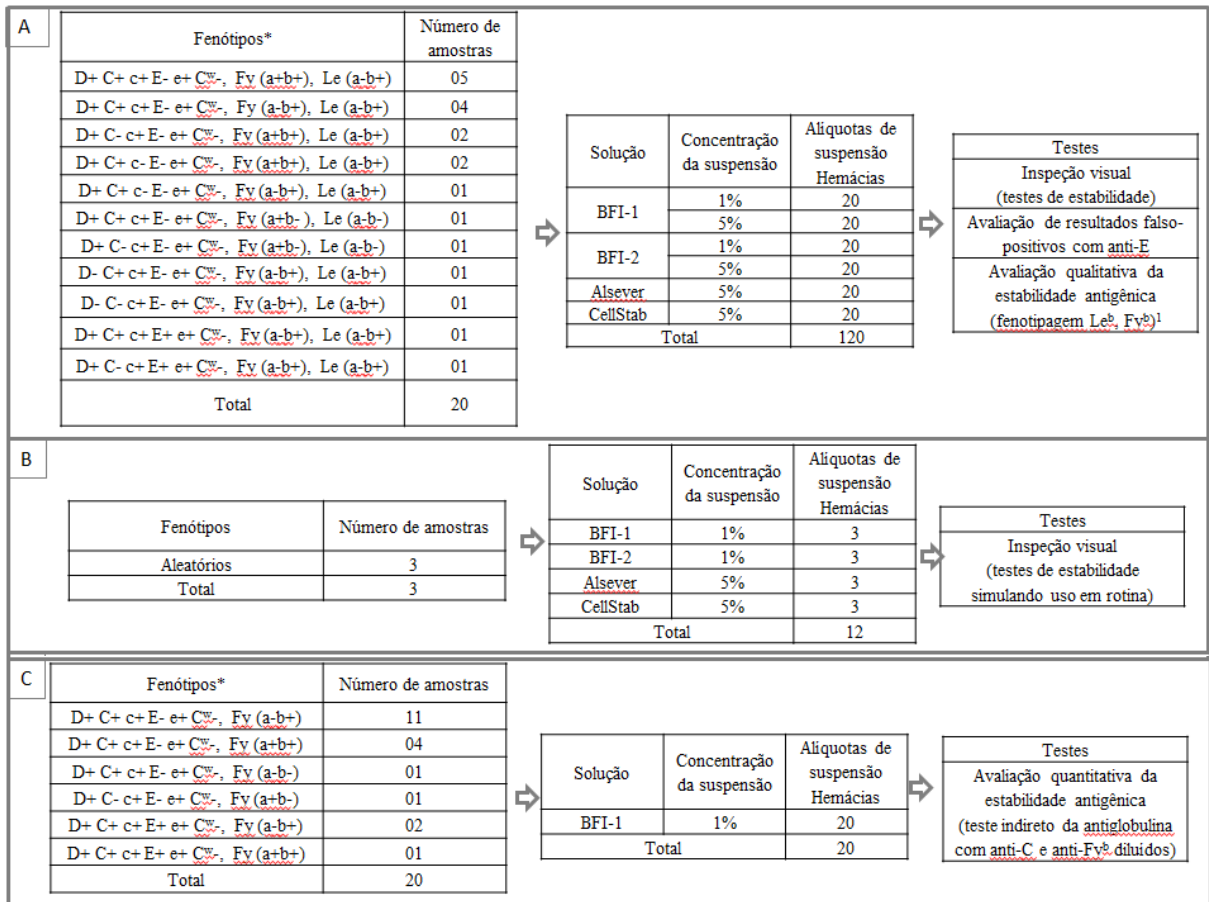
- Avaliação da estabilidade por meio da inspeção visual antes e após estocagem (teste de estabilidade em repouso sob- refrigeração e com simulação do uso na rotina).

- Avaliação da ocorrência de resultados falso-positivos antes e após estocagem.

- Avaliação qualitativa da estabilidade antigênica das suspensões de hemácias por meio da fenotipagem dos antígenos Fy^b e Le^b antes e após a estocagem.

- Avaliação quantitativa de reatividade antigênica das suspensões de hemácias contra anticorpos anti-C e anti-Fy^b em diferentes diluições.

Os procedimentos adotados para realização dos testes são detalhados a seguir.



¹ Para a fenotipagem Le^b foram utilizadas somente as suspensões a 5%.

Figura 1: Amostras selecionadas, suspensões de hemácias produzidas e testes realizados.

A: *Fenótipos das 20 amostras selecionadas: para o antígeno E (18 negativas e 02 positivas para o antígeno E em dose simples); Le^b (02 negativas e 18 positivas para o Le^b); Fy^b (02 negativas e 18 positivas para o Fy^b, sendo 09 em dose dupla e 09 em dose simples do antígeno).

B: * Fenótipos das 20 amostras selecionadas: para o antígeno C (01 amostra negativa e 19 positivas para o C em dose simples); Fy^b (02 amostras negativas e 18 positivas para o Fy^b, sendo 13 em dose dupla e 5 em dose simples do antígeno).

4.2.2.1 Testes de estabilidade: inspeção visual sem simular uso na rotina

Para avaliar a estabilidade das suspensões em geladeira, foi realizada a inspeção visual quanto ao aparecimento de hemólise, turvação do líquido sobrenadante e escurecimento das hemácias conforme Portaria 2.712 de 2013. Os testes foram realizados por até 60 dias após preparo e armazenamento de 120 alíquotas de suspensões em repouso de 2 a 6°C. Além dos

parâmetros acima, as suspensões foram avaliadas quanto à presença de grumos e fungos. A hemólise foi classificada de acordo com a intensidade em <1+, 1+, 2+ e 3+.

Nesses testes, foram utilizadas 120 alíquotas de suspensão de hemácias produzidas em diferentes soluções de preservação conforme apresentado na figura 1A.

4.2.2.2 Testes de estabilidade simulando uso na rotina

Para avaliar a estabilidade das suspensões na rotina, foi realizada a inspeção visual conforme parâmetros descritos no item anterior. A simulação de uso na rotina consistiu em manutenção das alíquotas de suspensões de hemácias na condição extrema de 4 horas a temperatura ambiente com homogeneizações esporádicas e retorno das alíquotas para a geladeira durante 45 dias. As amostras preservadas em CellStab foram submetidas às mesmas condições das amostras preservadas nas outras soluções, embora o fabricante não recomende conservação das suspensões por mais de quatro semanas nem manutenção em temperatura ambiente após o uso.

Nesses testes foram utilizadas 12 alíquotas de suspensão de hemácias produzidas em diferentes soluções de preservação conforme apresentado na figura 1B.

4.2.3 Avaliação de resultados falso-positivos nas suspensões de hemácias

Para avaliar a ocorrência de resultados falso-positivos nas amostras preservadas em suspensão, foram realizados testes indiretos da antiglobulina no 1º e no 28º dia de armazenamento.

Nesses testes foram utilizadas as 120 alíquotas de suspensão de hemácias produzidas em diferentes soluções de preservação conforme apresentado na figura 1A e plasma de doador do grupo sanguíneo A contendo anti-E.

Os testes foram realizados em cartão LISS/Coombs (BIO-RAD), utilizando 50 µl das suspensões de hemácias a 1% em solução de baixa força iônica e 25 µl de soro de doador contendo anti-E previamente identificado na Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas. Os cartões foram incubados por 15 minutos a 37° C e centrifugados por 10 minutos.

Para as amostras preservadas em BFI-1 e BFI-2, as próprias suspensões foram empregadas diretamente nos testes. Para as amostras preservadas em soluções de Alsever modificada e CellStab, as hemácias foram recuperadas por centrifugação e ressuspensas em LISS comercial (BIO-RAD) de modo se obter suspensões a 1%, necessárias para a realização dos testes.

4.2.4 Conservação dos antígenos nas suspensões de hemácias

4.2.4.1 Avaliação qualitativa da estabilidade antigênica: fenotipagem dos antígenos Fy^b, Le^b

Para avaliar qualitativamente a conservação dos antígenos eritrocitários nas amostras preservadas nas soluções de Alsever modificada, BFI-1, BFI-2 e CellStab, foram realizados testes de fenotipagem dos antígenos Fy^b, Le^b no 1º e no 28º dia de preservação.

O teste de fenotipagem do antígeno Fy^b foi realizado em Cartão LISS/Coombs (BIO-RAD), utilizando 50 µl das suspensões de hemácias a 1% em LISS comercial (BIO-RAD) e 25 µl de soro comercial anti-Fy^b (BIO-RAD). Os cartões foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugados por 10 minutos em centrífuga para cartão gel-teste.

Para as amostras preservadas em BFI-1 e BFI-2 a 1%, as suspensões foram empregadas diretamente nos testes. Para as amostras preservadas em soluções de Alsever modificada e CellStab, as hemácias foram recuperadas por centrifugação e ressuspensas em LISS comercial (BIO-RAD) de modo se obter suspensões a 1%, necessárias para a realização dos testes.

O teste de fenotipagem do antígeno Le^b foi realizado em cartão gel-teste DiaClon Anti-Le^b (BIO-RAD), utilizando 10 µl de suspensão de hemácia a 5% na solução de bromelina (BIO-RAD). Os cartões foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugados por 10 minutos em centrífuga para cartão gel-teste.

Nesses testes, as hemácias preservadas a 5% nas diferentes soluções foram recuperadas por centrifugação e ressuspensas em solução de Bromelina comercial de modo se obter suspensões a 5%, necessárias para a realização dos testes.

Para leitura da reação de aglutinação em cartela gel-teste, o grau de positividade foi graduado em 1+, 2+, 3+ e 4+.

Como controles dos testes foram utilizados uma amostra positiva e uma negativa correspondente aos antígenos pesquisados.

4.2.4.2 Avaliação quantitativa da estabilidade antigênica: reatividade das suspensões contra anticorpos anti-C e anti-Fy^b

Para avaliar quantitativamente a conservação dos antígenos nas amostras preservadas, foram realizados testes indiretos da antiglobulina utilizando as suspensões de hemácias produzidas, bem como antissoros contendo anticorpos anti-Fy^b e anti-C em diferentes diluições. Para cada amostra testada com os antissoros diluídos em série, foi calculado o *score*, que é um sistema de gradação numérica para hemaglutinação no qual são utilizados pontuações de 0 a 12 para as intensidades de aglutinação obtidas nas reações com soros diluídos. As pontuações para as intensidades de aglutinação são: 4+=12; 3+=10; 2+=08; 1+=05; (+)=02 e ausência de aglutinação=00.

O teste de reatividade foi realizado nas amostras frescas e nas amostras preservadas em suspensões, após 30 dias de armazenamento hipotérmico (de 2 a 6°C).

Nestes testes, foram utilizadas 20 amostras de doadores de sangue, sendo 18 positivas e 2 negativas para o antígeno Fy^b, 19 positivas e 1 negativa para o antígeno C, preservadas em suspensão a 1% em solução BFI-1 (Figura 1C). A solução BFI-1 foi selecionada para utilização nos testes de reatividade devido aos bons resultados obtidos com seu uso em testes prévios, tais como conservação qualitativa dos antígenos Fy^b, Le^b e ausência de resultados falso-positivos.

Para realização dos testes foram feitas diluições seriadas, na razão 2, do soro comercial anti-Fy^b (BIO-RAD) e do plasma de doador contendo anticorpo de especificidade anti-C e, em seguida, foram testados com as hemácias avaliadas. As diluições foram realizadas utilizando solução salina comercial.

Os testes de reatividade com relação ao antígeno Fy^b foram realizados em cartão LISS/Coombs (BIO-RAD), utilizando 50 µl de suspensão de hemácia a 1% e 25 µl do soro anti-Fy^b em diferentes diluições. O cartão foi incubado por 15 minutos a 37°C e centrifugado por 10 minutos em centrífuga para cartão gel-teste. Os testes de reatividade com relação ao antígeno C foram conduzidos da mesma forma.

Estes testes foram realizados com o objetivo de avaliar se existe perda da reatividade antigênica em decorrência do estoque em solução BFI-1, por meio da determinação da diluição máxima na qual um anticorpo previamente conhecido é detectado pelas suspensões de hemácias contendo os antígenos correspondentes.

4.3 PRESERVAÇÃO POR CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO

Os reagentes/ substâncias utilizados na preservação por congelamento bem como os lotes, validades e fabricantes estão listados no ANEXO I.

Os procedimentos detalhados para realização dos testes estão descritos no ANEXO II.

Não houve mudança de lotes de reagentes durante a realização dos procedimentos e testes. Os plasmas humanos utilizados nos testes foram de um mesmo doador e, para manter a estabilidade, foram alíquotados e armazenados em freezer a -80°C . Após descongelamento e uso, as alíquotas foram descartadas.

Os testes realizados em cartela gel-teste, descritos abaixo, foram incubados, quando necessário, em incubadora DiaMed-ID *Micro Typing System*- ID 37 SI. Os cartões foram centrifugados em centrífuga DiaMed-ID *Micro Typing System*- ID 24 S.

4.3.1 Preparo das soluções de congelamento e descongelamento

Para preservação de hemácias por congelamento, inicialmente foram preparadas as soluções de preservação Sacarose + Dextrose (S+D) e polivinilpirrolidona (PVP) conforme abaixo descrito (tabelas 5 e 6).

A fórmula da solução para descongelamento está descrita na tabela 7.

Tabela 5-Solução de congelamento Sacarose + Dextrose (S+D).

Sacarose	15,4 g
Dextrose	5,9 g
NaCl	0,29 g
Água destilada q.s.p	100 ml

Estabilidade da solução: 7 dias a 4°C ou 1 ano a -20°C .

Fonte: SCHMID et al., 2011

Tabela 6- Solução de congelamento com polivinilpirrolidona (PVP).

Albumina bovina a 22% (BIORAD)	27 ml
PVP (SIGMA) a 30% em água deionizada	23 ml

Estabilidade da solução: 3 meses a 4°C

Fonte: SCHMID et al., 2011

Tabela 7- Solução de descongelamento: tampão fosfato pH 7,3.

Solução de Na ₂ HPO ₄ . H ₂ O 0,16M	1,6 ml
Solução de Na ₂ HPO ₄ 0,16M	8,4 ml
Solução de Salina a 0,9%	90 ml

Estabilidade: 6 meses a 4°C

Fonte: AABB, 2011

- Preparar a solução estoque de Na₂HPO₄. H₂O 0,16M dissolvendo 22,16g de Na₂HPO₄. H₂O em 1000 ml de H₂O destilada.

-Preparar a solução estoque de Na₂HPO₄ 0,16M dissolvendo 22,7g de Na₂HPO₄ em 1000 ml de H₂O destilada.

-Preparar solução salina a 0,9%.

-Misturar os volumes das soluções acima em um proveta graduada para obter 100 ml de tampão no pH 7,3.

4.3.2 Preservação das hemácias por congelamento

Para avaliar a estabilidade de hemácias após preservação por congelamento, as papas de hemácias lavadas de cada uma das amostras selecionadas (Figura 2) foram congeladas a -196° em *container* de nitrogênio líquido da *Custom BioGenic Systems - XC SERIES*, com capacidade para 47,4 litros de nitrogênio líquido, altura de 673mm, abertura de 127mm, comportando 6 *racks* e 6 *canisters*. O congelamento foi realizado como descrito abaixo:

-Identificar o tubo com o número da amostra a ser congelada.

-Transferir 2 ml de hemácias para o tubo identificado.

-Lavar as hemácias 4 vezes com solução salina, centrifugando a 1000 x g por 5 minutos e descartar o sobrenadante e o *buffy coat*.

- Adicionar às hemácias lavadas o mesmo volume de solução de congelamento.
- Homogeneizar por inversão e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos com a solução de congelamento de S+D e, por 1 hora a temperatura ambiente, com a solução de PVP.
- Colocar em uma pequena caixa de isopor aproximadamente $\frac{3}{4}$ do seu volume de nitrogênio líquido.
- Colocar dispositivo inoxidável, contendo divisórias para separação das gotas de suspensão de hemácias congeladas, dentro da caixa de isopor contendo nitrogênio líquido.
- Aspirar 1 ml da suspensão de hemácias com o auxílio de uma pipeta Pasteur.
- Dispensar a suspensão de hemácias gota a gota nas divisórias do dispositivo inoxidável, a uma distância de mais ou menos 20 cm para evitar o congelamento da suspensão de hemácias na pipeta.
- Transferir, com pinça de metal, as gotas de hemácias congeladas para tubos de criopreservação identificados, que devem ser mantidos em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido.
- Armazenar os tubos, contendo as alíquotas de hemácias, dentro do *container* de nitrogênio líquido, em pequenas caixas de metal (*canisters*) identificadas.
- Retornar o restante do nitrogênio líquido utilizado para o *container*.

Após o período de criopreservação, as amostras foram descongeladas em 3 ml de tampão fosfato pH 7,3 a 37°C e, em seguida, lavadas 3 vezes com tampão fosfato pH 7,3 a temperatura ambiente e submetidas aos testes descritos:

- Avaliação da ocorrência de resultados falso-positivos após estocagem.
- Avaliação qualitativa da estabilidade antigênica das hemácias congeladas por meio da fenotipagem dos antígenos Fy^b e Le^b.
- Avaliação quantitativa de reatividade antigênica das hemácias congeladas contra anticorpos anti-C e anti-Fy^b em diferentes diluições.
- Recuperação de hemácias após descongelamento.

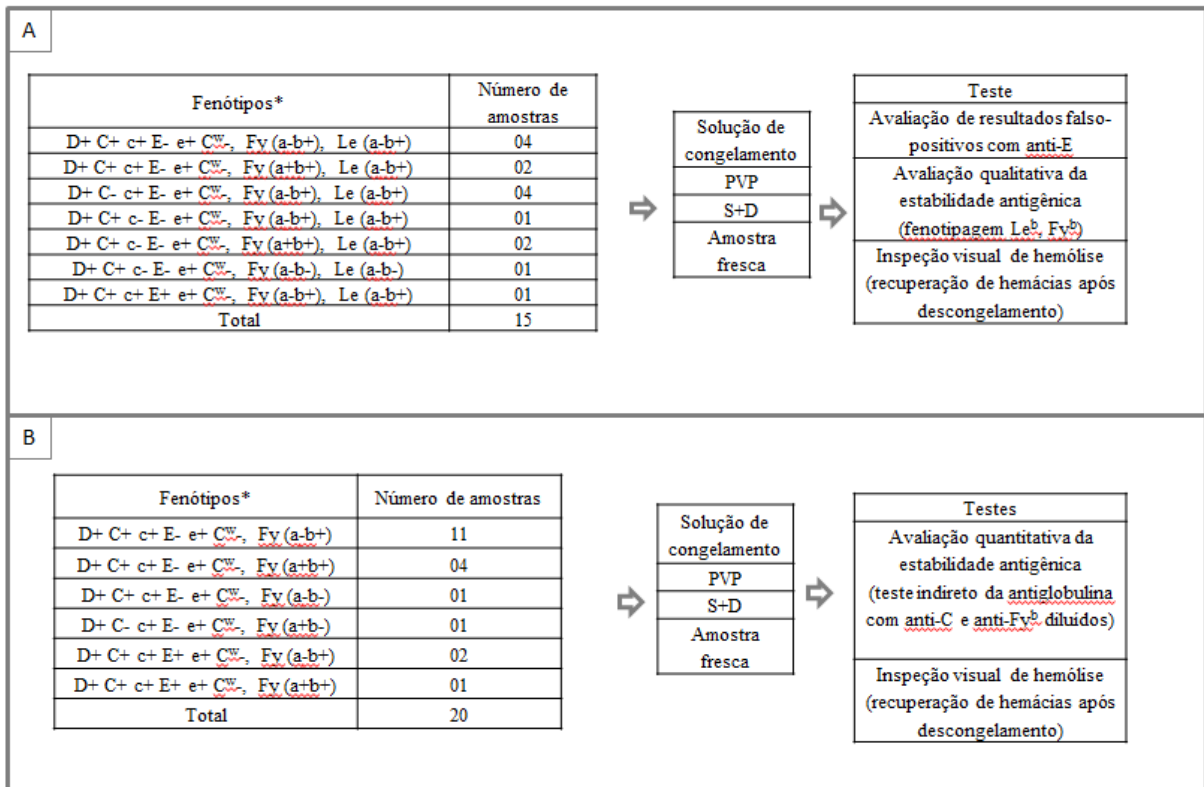


Figura 2: Amostras selecionadas para criopreservação e testes realizados.

A: *Fenótipos das 15 amostras selecionadas: para o antígeno E (14 negativas e 01 positiva para o antígeno E em dose simples); Le^b (01 negativa e 14 positivas para o Le^b); Fy^b (01 negativa e 14 positivas para o Fy^b, sendo 10 em dose dupla e 04 em dose simples do antígeno).

B: *Fenótipos das 20 amostras selecionadas: para o antígeno C (01 amostra negativa e 19 positivas para o C em dose simples); Fy^b (02 amostras negativa e 18 positivas para o Fy^b, sendo 13 em dose dupla e 5 em dose simples do antígeno).

As figuras 3 e 4 ilustram o congelamento de hemácias em pequenas alíquotas em nitrogênio líquido.



Figura 3: Container de nitrogênio líquido
Fonte: autora

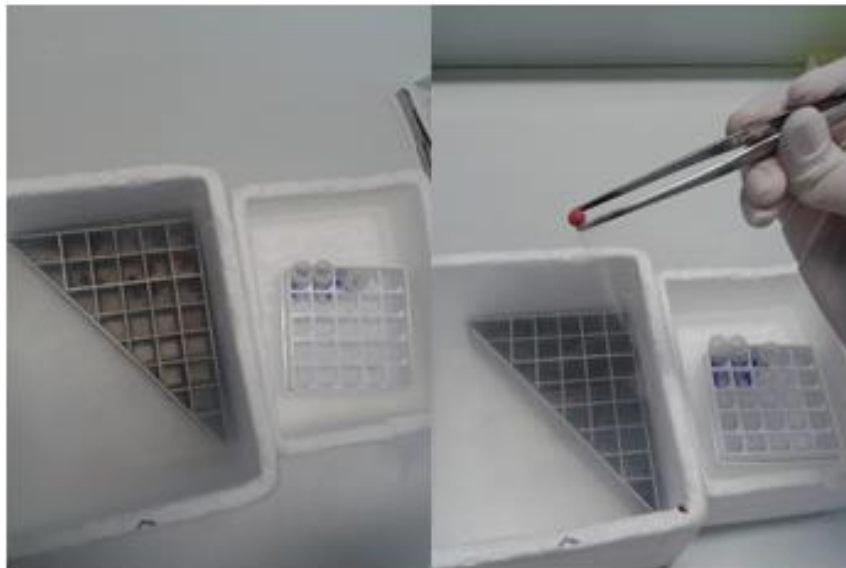


Figura 4: Congelamento de hemácias em pequenas alíquotas
Fonte: autora

4.3.3 Avaliação de resultados falso-positivos nas hemácias congeladas

Para avaliar a ocorrência de resultados falso-positivos nas amostras preservadas por congelamento, foram realizados testes indiretos da antiglobulina nas amostras frescas bem como, no mínimo, após 120 dias de congelamento em solução S+D e PVP.

Os testes foram realizados em Cartão LISS/Coombs (BIO-RAD), utilizando 50 µl de suspensão de hemácia a 1% em LISS comercial (BIO-RAD) e 25 µl de soro de doador do grupo sanguíneo A contendo anticorpo de especificidade anti-E previamente identificado na Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas. Os cartões foram incubados por 15 minutos a 37°C e centrifugados por 10 minutos em centrífuga para cartão gel-teste.

Nestes testes, foram utilizadas 14 amostras negativas e uma positiva para o antígeno E (Figura 2A). Como controles dos testes, foram utilizadas 1 amostra negativa e outra positiva para o antígeno E.

4.3.4 Conservação dos antígenos nas hemácias criopreservadas

4.3.4.1 Avaliação qualitativa da estabilidade antigênica das hemácias criopreservadas: fenotipagem dos antígenos Fy^b, Le^b

Para avaliar qualitativamente a conservação dos antígenos eritrocitários nas amostras congeladas em S+D e PVP, foram realizados testes de fenotipagem dos antígenos Fy^b, Le^b nas amostras frescas bem como após 120 de congelamento.

Os testes de fenotipagem foram realizados conforme descritos no item 4.2.4.1 acima. Nestes testes foram utilizadas 14 amostras positivas e uma negativa para os antígenos Fy^b, Le^b (Figura 2A).

4.3.4.2 Avaliação quantitativa da estabilidade antigênica nas hemácias criopreservadas: reatividade das hemácias contra anticorpos anti-C e anti-Fy^b

Para avaliar quantitativamente a conservação dos antígenos nas amostras preservadas, foram realizados testes indiretos da antiglobulina utilizando as hemácias criopreservadas, bem como anti-soros contendo anticorpos anti-Fy^b e anti-C em diferentes diluições. O teste de reatividade foi realizado nas amostras frescas e após 30 dias de congelamento.

Os testes foram realizados conforme descrito no item 4.2.4.2 acima. Nestes testes foram utilizadas 20 amostras, sendo uma amostra negativa e 19 positivas para o C, duas amostras negativas e 18 positivas para o Fy^b (Figura 2B).

4.3.5 Recuperação de hemácias

O teste de recuperação, após descongelamento das hemácias congeladas nas soluções S+D e PVP (figura 2), foi realizado apenas através de graduação da hemólise em 1+, 2+, 3+ e 4+, sem utilizar método quantitativo. As hemácias foram descongeladas e foi feita a comparação do grau de hemólise entre as 35 hemácias congeladas nas duas soluções.

4.4 ESTATÍSTICA

Os dados obtidos com os testes de avaliação quantitativa da atividade antigênica foram analisados através do programa *GraphPad Prism* versão 4.0 e apresentados como média \pm desvio padrão. A normalidade dos dados foi avaliada através do teste *Kolmogorov-Smirnov*. Como os valores não apresentaram distribuição normal foi utilizada estatística não paramétrica e uma vez que, a reatividade de uma determinada amostra foi avaliada inicialmente e após um período de conservação pelos diferentes métodos avaliados, foi utilizado teste de medidas repetidas. Assim os dados foram tratados pelo teste de amostras pareadas de Wilcoxon para a comparação dos grupos. Para avaliar se houve diferença significativa, foi considerado o nível de significância de $p < 0,5$.

5 RESULTADOS

5.1 ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES

O pH das soluções de Alsever modificada, BFI-1, BFI-2 e CellStab manteve-se estável durante 6 meses, com pequeno aumento a partir do sexto mês de armazenamento em geladeira entre 2 e 6°C, como descrito na tabela 8.

Tabela 8- pH das soluções

Solução	pH até 6 meses de armazenamento	pH após 6 meses de armazenamento
Alsever modificada	5,96	6,08 a 6,15
BFI-1	6,25 a 6,27	6,28 a 6,40
BFI-2	6,25 a 6,27	6,27 a 6,40
CellStab	6,82	6,85 a 6,88

Quanto às análises visuais das soluções, não houve aparecimento de precipitados, gelatina partículas, fungos e turvação durante o período de 9 meses.

5.2 ESTABILIDADE DAS SUSPENSÕES DE HEMÁCIAS

5.2.1 Inspeção visual simulando uso na rotina

As suspensões de hemácias mantidas em geladeira entre 2 e 6°C por 45 dias, com simulação de uso na rotina, não apresentaram alterações importantes durante período avaliado. Porém, houve aparecimento de hemólise de 1+ nas suspensões preparadas em Alsever modificada e CellStab com 45 dias após preparo (tabela 9 e figura 5). Após 45 dias as suspensões a 5% apresentaram hemólise acentuada (figura 6).

Tabela 9- Análises visuais realizadas em suspensões de hemácias por 45 dias, com simulação de uso na rotina

Suspensões	Turvação do líquido sobrenadante	Escurecimento das hemácias	Formação de grumos	Presença de fungos	Presença de hemólise
Alsever modificada (5%)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	1+
CellStab (5%)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	1+
BFI-1 (1%)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
BFI-2 (1%)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente



Figura 5: Suspensões de hemácias com 45 dias após preparo
Fonte: autora



Figura 6: Suspensões de hemácias com 60 dias após preparo
Fonte: autora

5.2.2 Inspeção visual sem simular uso na rotina

As suspensões de hemácias mantidas em geladeira entre 2 e 6°C por 45 dias, em repouso, não apresentaram alterações importantes durante período de armazenamento (tabela 10).

Entre 45 e 60 dias de armazenamento, as suspensões em Alsever modificada, BFI-1 e CellStab a 5% apresentaram hemólise de 1 a 3+, enquanto as suspensões em BFI-2 a 5% apresentaram hemólise de 1 a 2+.

Já as suspensões a 1% preparadas com BFI-1 apresentaram hemólise < 1+ a 1+ entre 45 dias e 60 dias após preparo, enquanto as suspensões a 1% preparadas em BFI-2 ainda apresentaram hemólise < 1+ após 60 dias de preparo.

Houve perda de uma alíquota de suspensão de hemácias em BFI-1 a 1% após uma semana de preparo devido a forte hemólise.

Tabela 10- Análises visuais realizadas em suspensões de hemácias, sem simulação de uso na rotina.

Suspensões	Turvação do líquido sobrenadante	Escurecimento das hemácias	Formação de grumos	Presença de fungos	Presença de hemólise	
					Até o 45º dia	Até o 60º dia
Alsever modificada (5%)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	1+	1 a 3+
CellStab (5%)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	1+	1 a 3+
BFI-1 (5%)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	1+	1 a 3+
BFI-2 (5%)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	1+	1 a 2+
BFI-1 (1%)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<1+	<1 a 1+
BFI-2 (1%)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	<1+

5.3 AVALIAÇÃO DE RESULTADOS FALSO-POSITIVOS NAS SUSPENSÕES DE HEMÁCIA

Nenhuma alíquota preparada com as soluções de Alsever modificada 5% (n= 20), BFI-1 a 1 e 5% (n= 40), BFI-2 a 1 e 5% (n= 40) e CellStab a 5% (n= 20) apresentou resultado

falso-positivo em cartão gel-teste no 1° e no 28° dia de estoque, conforme ilustrado pela figura 7.

Os controles positivos e negativos apresentaram resultados concordantes.

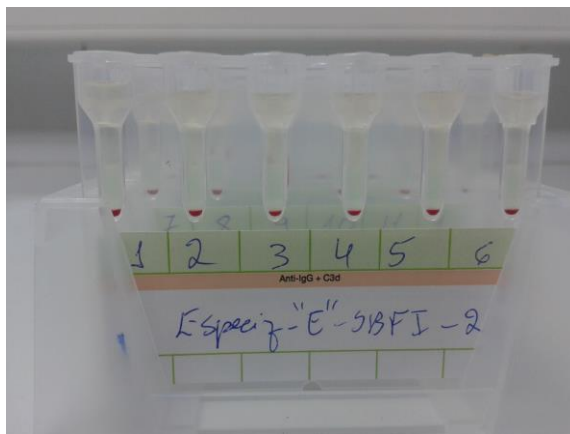


Figura 7: Teste indireto da antiglobulina utilizando suspensões de hemácias E negativo e plasma de doador contendo anticorpo de especificidade anti-E em cartela gel-teste (BIO-RAD).

Fonte: autora

5.4 CONSERVAÇÃO DOS ANTÍGENOS NAS SUSPENSÕES DE HEMÁCIAS

5.4.1 Avaliação qualitativa da estabilidade antigênica: fenotipagem dos antígenos Fy^b , Le^b

Todas as amostras avaliadas apresentaram resultados de fenotipagem Fy^b , Le^b concordantes em comparação aos resultados armazenados no banco de dados de doadores fenotipados da Fundação Hemominas, considerando os testes realizados no primeiro dia de preparo das suspensões. Testes ilustrados na figura 8.

Entretanto, no 28° de armazenamento, uma alíquota de suspensão de hemácias em BFI-2 a 1% apresentou resultado negativo na fenotipagem Fy^b . O teste de fenotipagem Fy^b desta amostra foi repetido na suspensão BFI-2 a 1% e o resultado foi confirmado na suspensão BFI-2 a 5%. As outras alíquotas apresentaram resultados concordantes no 28° dia de armazenamento (tabela 11).

Os controles positivos e negativos apresentaram resultados concordantes nas fenotipagens Fy^b , Le^b .

Tabela 11- Fenotipagens dos antígenos Fy^b, Le^b no 1° e no 28° dia de estocagem das suspensões.

Suspensões de hemácias	n	Fy ^b		Le ^b	
		1° dia/28° dia		1° dia/28° dia	
Alsever 5%	20	Fenotipagens concordantes (mesmas reatividades)		Fenotipagens concordantes (mesmas reatividades)	
CellStab 5%	20	Fenotipagens concordantes (mesmas reatividades)		Fenotipagens concordantes (mesmas reatividades)	
BFI-1 1%	20	Fenotipagens concordantes (mesmas reatividades)*		**	
BFI-1 5%	20	**		Fenotipagens concordantes (mesmas reatividades)	
SBFI-2 1%	20	19 foram concordantes (mesmas reatividades) Resultado discordante em 1 amostra no 28° dia		**	
BFI-2 5%	20	Antígeno não detectado em 1 suspensão no 28° dia		Fenotipagens concordantes (mesmas reatividades)	

*hemólise em 1 frasco

**teste não realizado



Figura 8: Fenotipagem Fyb e Leb em cartela gel-teste (BIO-RAD) utilizando as suspensões de hemácias após 28 dias de preservação

Fonte: autora

5.4.2 Avaliação quantitativa da estabilidade antigênica: reatividade das suspensões contra anticorpos anti-C e anti-Fy^b

A tabela 12 mostra a reatividade anti-C e anti-Fy^b em 20 amostras de doadores antes e após preservação utilizando suspensão a 1% em BFI-1 com o cálculo dos *scores*. Nos gráficos

1 e 2 foram feitas comparações entre *scores* obtidos nas amostras frescas e preservadas em BFI-1 a 1%.

Tabela 12- Reatividade anti-C e anti- Fy^b em amostras frescas e preservadas em BFI-1 a 1%

Amostras†	Reatividade anti-C**				Reatividade anti- Fy ^b **			
	Amostras frescas		No 30° dia de preservação (BFI-1 a 1%)		Amostras frescas		No 30° dia de preservação (BFI-1 a 1%)	
	Reat.**	Score*	Reat. **	Score	Reat. **	Score	Reat. **	Score
<u>01</u>	1:8	29	1:4	21	1: 16	40	1: 32	48
<u>02</u>	1:2	13	SD	8	1: 32	45	1: 32	48
<u>03</u>	1:4	24	1:2	16	1: 16	40	1: 16	40
<u>04</u>	1:4	21	1:2	16	1: 16	40	1: 16	40
<u>05</u>	1:8	26	1:4	21	1: 16	40	1: 32	48
06	1:2	16	1:2	13	0	-	0	-
<u>07</u>	1:2	16	SD	8	1: 16	40	1: 32	48
08	1:2	16	SD	8	1: 16	40	1: 32	48
<u>09</u>	1:2	16	1:2	13	1: 16	40	1: 32	48
<u>10</u>	1:2	16	SD	8	1: 32	45	1: 32	48
11	1:2	16	1:2	13	1: 16	40	1: 32	48
12	0	-	0	-	0	-	0	-
<u>13</u>	1:2	16	SD	8	1: 32	45	1: 32	48
<u>14</u>	1:4	21	SD	8	1: 16	40	1: 32	48
15	1:4	24	1:2	16	1: 16	40	1: 16	40
16	1:4	24	1:4	21	1: 16	40	1: 16	40
<u>17</u>	1:4	24	1:4	21	1: 16	40	1: 16	40
<u>18</u>	SD	8	SD	8	1: 32	45	1: 32	48
19	1:2	16	SD	8	1: 16	40	1: 16	40
<u>20</u>	1:2	13	SD	8	1: 16	40	1: 32	48

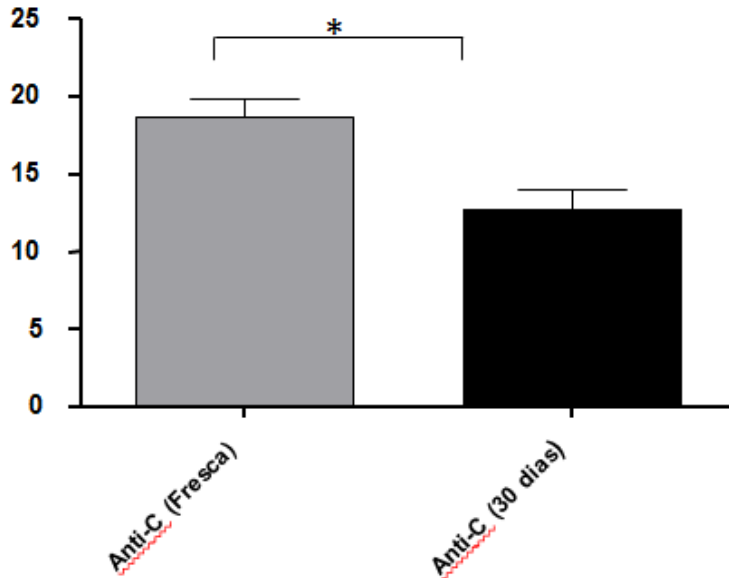
Legenda: SD: sem diluir, 0: negativo

****Reat. = Reatividade.** A reatividade refere-se à maior diluição na qual foram observados resultados positivos com intensidade mínima de 1+ em teste indireto da antiglobulina.

* Score refere-se a um sistema de gradação numérico para hemaglutinação.

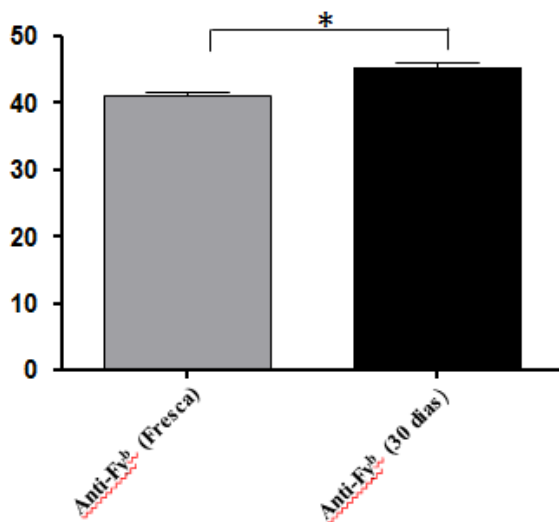
† Das 20 amostras testadas, 19 são positivas para o antígeno C em dose simples e uma é negativa. Para o antígeno Fy^b, 13 amostras possuem o antígeno em dose dupla (amostras sublinhadas), duas são negativas e 5 possuem o antígeno em dose simples.

Gráfico 1- *Score* amostras frescas X amostras preservadas em BFI-1% para anti-C



* *Scores* do anti-C obtidos com amostras frescas e preservadas em BFI-1 a 1%. Os dados são expressos como a média ± erro padrão de vinte amostras independentes. O teste de comparação não paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon revelou diferença significativa entre os grupos, sendo $P < 0,01$.

Gráfico 2- *Score* amostras frescas X amostras preservadas em BFI-1% para anti-Fy^b



* *Scores* do Fyb obtidos com amostras frescas e preservadas em BFI-1 a 1%. Os dados são expressos como a média ± erro padrão de vinte amostras independentes. O teste de comparação não paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon revelou diferença significativa entre os grupos, sendo $P < 0,01$.

5.5 PRESERVAÇÃO POR CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO

Nas 15 amostras de doadores congeladas em nitrogênio líquido (Figura 2 A), utilizando soluções S+D e PVP, foram realizados testes de avaliação da conservação de antígenos eritrocitários, avaliação da ocorrência de resultados falso-positivos, realizados antes e após congelamento por mais de 120 dias. Também foram realizados os testes de recuperação de hemácias após descongelamento.

5.5.1 Avaliação de resultados falso-positivos nas alíquotas de hemácias congeladas

Nenhuma amostra congelada em S+D e PVP (n=15) apresentou resultado falso-positivo em cartão gel-teste, antes ou após congelamento por mais de 120 dias.

Os controles positivos e negativos apresentaram resultados concordantes.

5.5.2 Conservação dos antígenos nas hemácias congeladas

5.5.2.1 Avaliação qualitativa da estabilidade antigênica: fenotipagem dos antígenos Fy^b, Le^b

As 15 amostras de doadores, congeladas em nitrogênio líquido, utilizando soluções S+D e PVP (Figura 2A), apresentaram resultados de fenotipagens para os antígenos Fy^b, Le^b, realizadas antes e após congelamento por mais de 120 dias, concordantes com os resultados armazenados no banco de dados do sistema de doadores fenotipados.

Os controles positivos e negativos apresentaram resultados concordantes.

5.5.2.2 Avaliação quantitativa da estabilidade antigênica: reatividade das hemácias criopreservadas contra anticorpos anti-C e anti-fy^b

As reatividades para os anticorpos anti-C e anti-Fy^b em amostras frescas e congeladas em PVP e S+D são apresentados nas tabelas 13 e 14 com o cálculo dos *scores*. Nos gráficos 3,

4, 5 e 6 foram feitas comparações entre *scores* obtidos com amostras frescas e congeladas em nitrogênio líquido em PVP e S+D.

Tabela 13- Reatividade anti-C em amostras frescas e após congelamento em nitrogênio líquido

Amostras†	Reatividade anti-C**					
	Amostras frescas		No 30° dia de congelamento em S+D		No 30° dia de congelamento em PVP	
	Reat.**	Score*	Reat. **	Score	Reat. **	Score
01	1:8	29	1:4	24	1:4	24
02	1:2	13	1:2	13	SD	8
03	1:4	24	1:4	24	1:4	21
04	1:4	21	1:2	16	1:2	16
05	1:8	26	1:4	24	1:4	24
06	1:2	16	1:4	24	1:4	24
07	1:2	16	1:2	16	1:2	16
08	1:2	16	1:4	21	1:2	16
09	1:2	16	1:4	24	1:4	24
10	1:2	16	1:2	16	1:2	16
11	1:2	16	1:2	16	1:2	16
12	0	-	0	-	0	-
13	1:2	16	1:2	16	1:2	16
14	1:4	21	1:4	24	1:4	24
15	1:4	24	1:2	16	1:2	16
16	1:4	24	1:4	24	1:2	16
17	1:4	24	1:4	24	1:4	24
18	1:2	16	1:2	16	1:2	16
19	1:2	16	1:2	16	1:2	16
20	1:2	13	SD	8	1:2	13

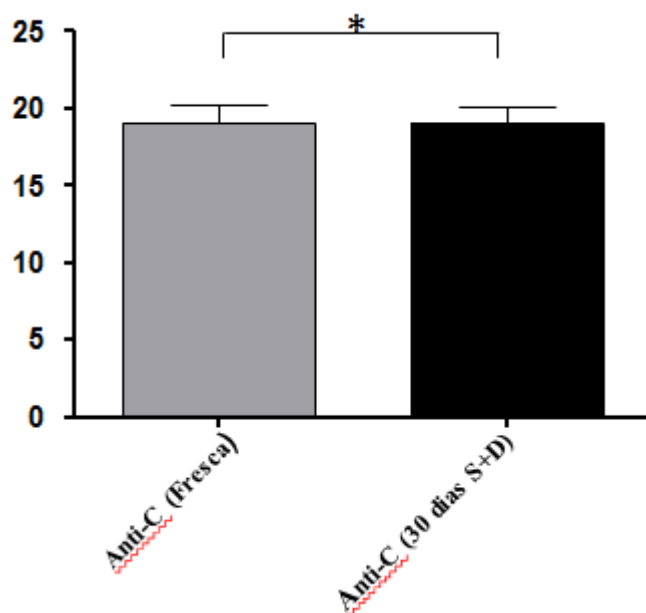
Legenda: SD: sem diluir, 0: negativo

****Reat.=Reatividade.** A reatividade refere-se à maior diluição na qual foram observados resultados positivos com intensidade mínima de 1+ em teste indireto da antiglobulina.

*Score refere-se a um sistema de gradação numérico para hemaglutinação.

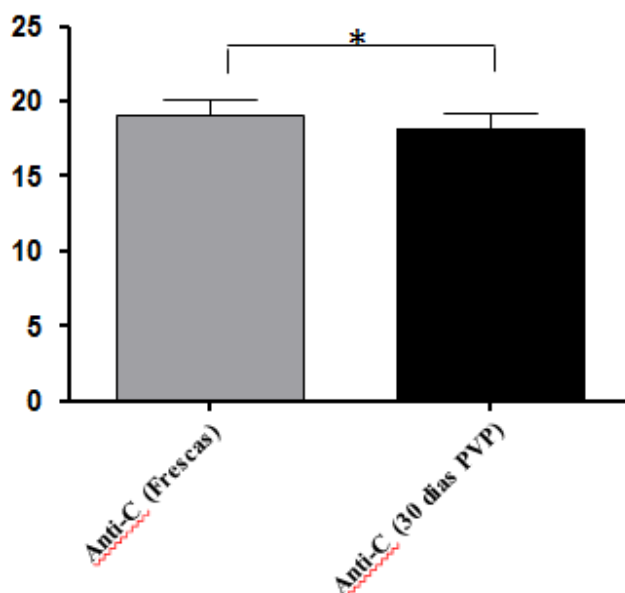
† Das 20 amostras testadas, 19 são positivas para o antígeno C em dose simples e uma é negativa.

Gráfico 3- *Score* amostras frescas X amostras congeladas com S+D em nitrogênio líquido para anti-C



**Scores* anti-C obtidos em amostras frescas e após congelamento em nitrogênio líquido em S+D. Os dados são expressos como a média \pm erro padrão referente a vinte amostras independentes. O teste de comparação não paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon não revelou diferença significativa entre os grupos, sendo $P=1$.

Gráfico 4- *Score* amostras frescas X amostras congeladas com PVP em nitrogênio líquido para anti-C



**Scores* anti-C obtidos em amostras frescas e após congelamento em nitrogênio líquido em PVP. Os dados são expressos como a média \pm erro padrão referente a vinte amostras independentes. O teste de comparação não paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon não revelou diferença significativa entre os grupos, sendo $P=0,44$.

Tabela 1414- Reatividade anti- Fyb em amostras frescas e após congelamento em nitrogênio líquido

Reatividade anti- Fy ^b **						
Amostras†	Amostras frescas	Score*	No 30° dia de congelamento em S+D	Score	No 30° dia de congelamento em PVP	Score
	Reat. **	Score*	Reat. **	Score	Reat. **	Score
<u>01</u>	1: 16	40	1: 16	40	1: 64	53
<u>02</u>	1: 32	45	1: 8	32	1: 16	40
<u>03</u>	1: 16	40	1: 16	35	1: 16	40
<u>04</u>	1: 16	40	1: 16	40	1: 16	40
<u>05</u>	1: 16	40	1: 16	40	1: 16	40
06	0	-	0	-	0	-
<u>07</u>	1: 16	40	1: 32	48	1: 64	53
08	1: 16	40	1: 16	40	1: 64	53
<u>09</u>	1: 16	40	1: 32	48	1: 64	53
<u>10</u>	1: 32	45	1: 32	48	1: 64	53
11	1: 16	40	1: 16	40	1: 64	53
12	0	-	0	-	0	-
<u>13</u>	1: 32	45	1: 32	48	1: 64	53
<u>14</u>	1: 16	40	1: 8	32	1: 64	53
15	1: 16	40	1: 8	32	1: 16	40
16	1: 16	40	1: 16	40	1: 16	40
<u>17</u>	1: 16	40	1: 8	32	1: 16	40
<u>18</u>	1: 32	45	1: 32	48	1: 64	53
19	1: 16	40	1: 16	40	1: 16	40
<u>20</u>	1: 16	40	1: 16	40	1: 16	40

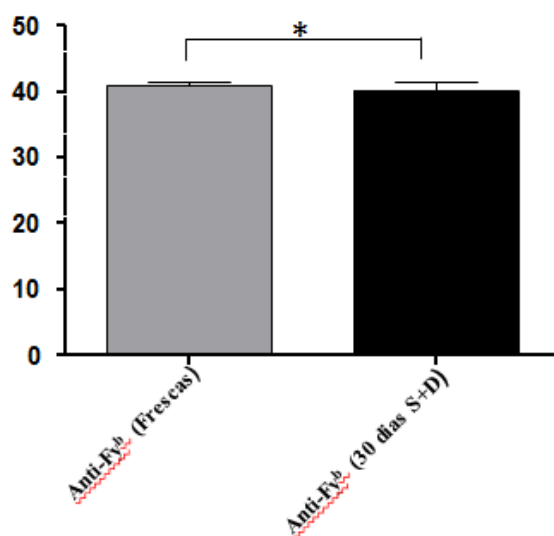
Legenda: SD: sem diluir, 0: negativo

****Reat.=Reatividade.** refere-se à maior diluição na qual foram observados resultados positivos com intensidade mínima de 1+ em teste indireto da antiglobulina.

*Score refere-se a um sistema de gradação numérico para hemaglutinação.

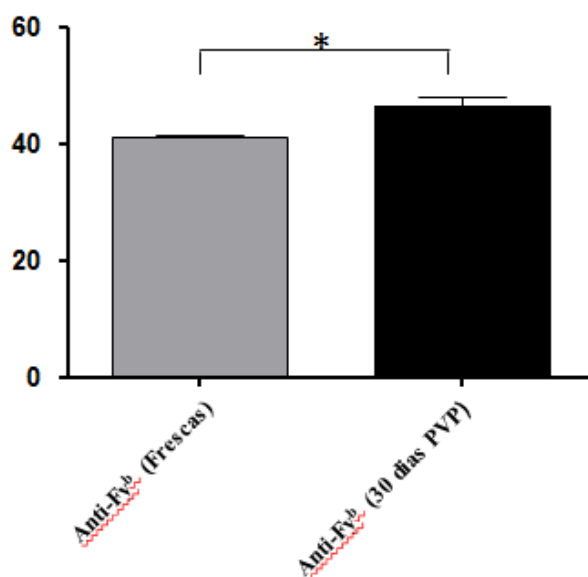
† Das 20 amostras testadas para Fy^b, 13 amostras possuem o antígeno em dose dupla (amostras sublinhadas), 5 possuem o antígeno em dose simples e duas são negativas.

Gráfico 5- *Score* amostras frescas X amostras congeladas com S+D em nitrogênio líquido para anti-Fy^b



**Scores* anti-Fy^b obtidos em amostras frescas e após congelamento em nitrogênio líquido em S+D. Os dados são expressos como a média ± erro padrão referente a vinte amostras independentes. O teste de comparação não paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon não revelou diferença significativa entre os grupos, sendo P=0,47.

Gráfico 6- *Score* amostras frescas X amostras congeladas com PVP em nitrogênio líquido para anti-Fy^b



**Scores* anti-Fy^b obtidos em amostras frescas e após congelamento em nitrogênio líquido em PVP. Os dados são expressos como a média ± erro padrão referente a vinte amostras independentes. O teste de comparação não paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon revelou diferença significativa entre os grupos, sendo P<0,01.

5.5.3 Recuperação de hemácias após descongelamento em nitrogênio líquido

As hemácias congeladas com a solução PVP apresentaram hemólise <1+ após descongelamento, enquanto as preservadas em S+D apresentaram hemólise entre 2 e 3+ (Figura 9).

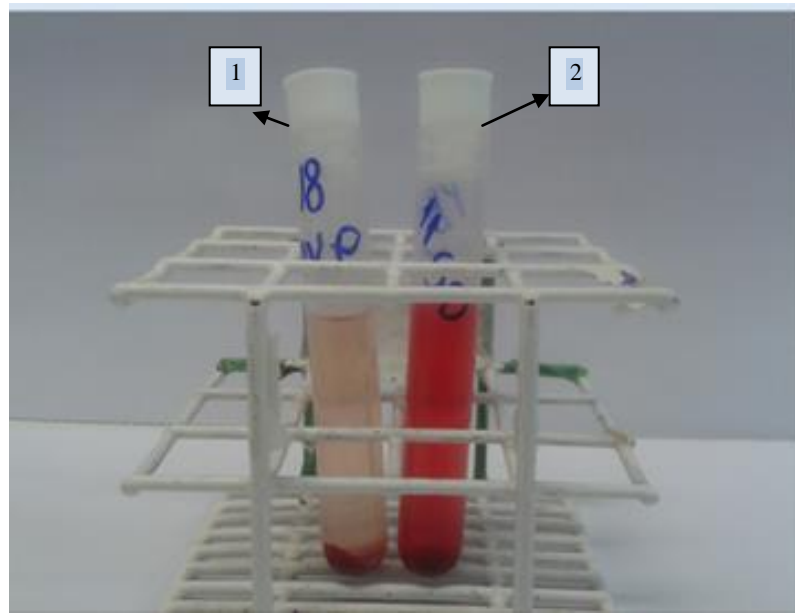


Figura 9: Recuperação de hemácias após descongelamento.

1: PVP; **2:** S+D

Fonte: autora

5.6 REGISTROS

Foram criados e validados formulários para validação das hemácias preservadas em suspensões e por congelamento em nitrogênio líquido. Os formulários estão armazenados em pastas.

6 DISCUSSÃO

A garantia da qualidade em hemoterapia só pode ser alcançada através da padronização cuidadosa do trabalho realizado em todas as suas etapas, abrangendo da seleção de doadores até os cuidados com os receptores.

Desde o século XVIII, nas primeiras transfusões sanguíneas, pesquisadores e hemoterapeutas têm buscado tratamento através de células que mantenham a sua essência, mas que não provoquem efeitos deletérios ao receptor. A partir das dificuldades enfrentadas durante reações adversas inesperadas e, muitas vezes, letais devido a transfusões diretas entre doador e receptor, aprofundaram-se estudos no sentido de garantir a qualidade do sangue a ser transfundido (LEONART, 2009).

Dentro do contexto da medicina transfusional, que tem como objetivo garantir a qualidade e quantidade do sangue e componentes oferecidos à comunidade, a análise e padronização de reagentes imuno-hematológicos são críticas para a realização dos testes pré-transfusional e, conseqüentemente, uma transfusão segura (NOVARETTI, 2009). A hemoterapia tem buscado incessantemente o aumento da segurança transfusional e isso envolve a busca por resultados adequados em todos os níveis do serviço. Há muito se sabe que a qualidade dos reagentes utilizados nos testes imuno-hematológicos, a padronização e precisão dos métodos aplicados, o uso de controles, a realização de manutenções preventivas e corretivas de equipamentos e treinamento contínuo de funcionários desempenham papel importante para assegurar a qualidade das transfusões (NOVARETTI et al., 2002).

A fim de possibilitar a realização de exames laboratoriais de detecção e identificação de anticorpos anti-eritrocitários de maneira segura, fornecendo subsídios para diagnóstico, prevenção e conduta em casos de sensibilização associada à transfusão, gestação e transplante de órgãos, a preservação de hemácias constitui uma ferramenta auxiliar de grande importância no dia a dia do laboratório de imuno-hematologia.

Para determinar especificidades de anticorpos é necessário o uso de painéis de hemácias comerciais e utilização de painéis de diferentes procedências ou mesmo de hemácias selecionadas e preservadas de uma hemateca (GIRELLO e KUHN, 2011).

Dentro deste contexto, a maior dificuldade na identificação de anticorpos anti-eritrocitários em imuno-hematologia reside no fato de painéis comerciais não serem suficientes para determinar as especificidades. Assim, o desenvolvimento de técnicas efetivas

de preservação de eritrócitos que mantém *in vitro* a integridade da célula e seus antígenos representa uma necessidade nas áreas da hemoterapia e da imuno-hematologia.

As técnicas de preservação de hemácias desenvolvidas no presente trabalho levaram em conta a viabilidade de implantação do método de preservação através da disponibilidade de matéria prima e tecnologia existente na Central de Imuno-hematologia da Fundação Hemominas, facilidade de utilização das hemácias preservadas e possibilidade de recursos financeiros para manter a utilização sistemática na rotina laboratorial.

O desenvolvimento de metodologias alternativas, simples e acessíveis economicamente, para preservar eritrócitos com fenótipos raros ou menos comuns, que poderão ser utilizados na rotina de imuno-hematologia com o propósito de auxiliar na pesquisa e identificação de anticorpos anti-eritrocitários, podem contribuir para liberação mais rápida e com maior qualidade de laudos imuno-hematológicos, contribuindo, portanto, para a melhoria dos serviços de hemoterapia prestados à comunidade.

6.1 SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO

Para inspeção de reagentes de imuno-hematologia, é recomendada a verificação periódica de possíveis alterações durante sua manipulação ou armazenamento, como a ausência de precipitados, gelatina, partículas, fungos e turvação (Portaria 2.712 de 2013).

No presente estudo, as soluções de Alsever modificada, BFI-1 e BFI-2, produzidas para preservar hemácias de 2-6°C, não apresentaram alterações significativas durante os meses avaliados, embora tenha sido observado ligeiro aumento de pH a partir do 6º mês. Como não há descrição em literatura de valores de pH aceitáveis para as 3 soluções produzidas neste trabalho, os valores encontrados no 1º dia de preparo foram considerados adequados, tendo sido utilizados como parâmetro para comparação com os valores de pH observados ao longo do período de armazenamento.

Além disso, como todas as soluções avaliadas, de maneira geral, demonstraram eficácia na preservação da membrana e dos antígenos eritrocitários durante armazenamento, consideramos ideais os valores de pH obtidos inicialmente, sendo de 5,9 para a solução de Alsever modificada e 6,25 para as soluções BFI-1 e BFI-2.

Considerando os resultados obtidos, a validade das soluções foi estabelecida em 6 meses após preparo e armazenamento, a fim de assegurar a qualidade das suspensões de hemácias preparadas.

6.2 PRESERVAÇÃO DE HEMÁCIAS EM SUSPENSÕES

Ao preservar eritrócitos em soluções, é preciso estar atento às alterações morfológicas e metabólicas que podem ocorrer durante o armazenamento, como diminuição nos níveis de ATP acompanhada da redução dos níveis de 2,3-DPG, diminuição do pH, acúmulo de ácido láctico e, conseqüentemente, alterações da membrana que levam a formação de esferócitos e finalmente hemólise (HÖGMAN, 1998; LEONART, 1997). A taxa de hemólise espontânea é considerada um marcador essencial na preservação de eritrócitos, desde os primeiros experimentos realizados sobre armazenamento até os dias de hoje (HÖGMAN e MERYMAN, 2006).

Para preservação de eritrócitos em suspensão, as variações da solução de Alsever são habitualmente utilizadas em imuno-hematologia. Entretanto, as suspensões preparadas com esta solução poderão induzir a resultados falso-positivos em cartela de gel-teste, uma vez que algumas células não aglutinadas são retidas ao longo do gel. Uma solução utilizada na preparação de suspensão de eritrócitos para reação em cartela de gel-teste deve manter as características funcionais da célula, assim como a sua capacidade de atravessar através do gel da coluna quando não ocorre a aglutinação. A força iônica, o pH e a osmolaridade da solução devem permanecer estáveis. A adição de glicose e adenina é necessária para manter a viabilidade das células. Porém, estas substâncias provocam aumento da força iônica do meio, a qual é reduzida através da adição de aminoácidos (GRIFOLS, 2011).

Os testes de estabilidade das suspensões de hemácias preparadas com as soluções BFI-1 e BFI-2 a 1%, com ou sem simulação de uso na rotina, apresentaram melhores resultados quando comparados com as suspensões preparadas a 5% com soluções de Alsever modificada, CellStab e BFI-1 e BFI-2. Os resultados foram semelhantes aos obtidos com as soluções 1 e 2 descritas em GRIFOLS (2011).

Após 45 de preparo e armazenamento, a suspensão de hemácias produzida com BFI-1 a 1% ainda permanecia com hemólise <1+, sendo que o mesmo era observado na suspensão com BFI-2 a 1% após 60 dias. As duas suspensões a 1%, prontas para uso na metodologia

gel-teste, poderão ser utilizadas com facilidade na rotina imuno-hematológica, sem passar por processo de lavagem e diluição, o que gera comodidade e facilidade na execução dos testes complementares para identificação e exclusão de anticorpos anti-eritrocitários. Apesar da suspensão em BFI-2 praticamente não apresentar degradação com 60 dias de armazenamento, a suspensão produzida com BFI-1, por conter reagentes de preços mais acessíveis em sua fórmula, poderá ser utilizada sistematicamente no preparo de suspensões prontas para uso.

A análise dos resultados de estabilidade das suspensões de hemácias preparadas em solução de Alsever modificada e CellStab a 5% indica que após 45 dias de preparo ocorreu presença de hemólise com intensidade de 1+. Tal fato não inviabiliza o uso destas suspensões na rotina laboratorial, já que nos outros testes realizados, as referidas suspensões apresentam boas performances. Quanto à facilidade de uso, as duas suspensões não agregam facilidade e agilidade à rotina, porque devem passar pelas etapas de centrifugação e diluição para realização dos testes, já que não podem ser utilizadas diretamente nos testes imuno-hematológicos de rotina.

Os testes para avaliação da ocorrência de resultados falso-positivos, utilizando plasma de doador contendo anticorpo de especificidade anti-E e hemácias E negativas, não apresentaram resultados falso-positivos com os 4 tipos de suspensões no 1º e no 28º dia após preparo e armazenamento. A adição do aminoácido glicina na BFI-1 e outros 4 aminoácidos na BFI-2, além da glicina, não resultou em ganho adicional quando comparados aos resultados obtidos com as suspensões em Alsever modificada e CellStab.

Os testes de fenotipagem dos antígenos Fy^b e Le^b (avaliação qualitativa da estabilidade antigênica) realizados no 1º e no 28º dia após preparo e armazenamento das suspensões, para avaliar a conservação dos antígenos eritrocitários nas suspensões de hemácias produzidas com os quatro tipos de soluções preservadoras demonstraram concordância com os resultados armazenados no banco de dados do sistema de doadores fenotipados da Fundação Hemominas, exceto para 1 alíquota da suspensão em BFI-2. Nesta alíquota o antígeno Fy^b não foi detectado no 28º de armazenamento, podendo indicar perda da estabilidade da amostra utilizada na preparação da suspensão.

Os resultados obtidos no presente estudo com as suspensões de hemácias preparadas em soluções de Alsever modificada, CellStab e BFI-1 podem ser comparados com os obtidos por SNYDER et. al. (1983), nos quais foi observada a preservação dos antígenos de grupo sanguíneo após preservação de concentrados de hemácias em CPD e ADSOL (adenina-

dextrose-manitol) por até 8 semanas sem comprometimento da reatividade dos antígenos Fy^a e Le^a.

Já o estudo publicado por MALYSKA et al. (1983) relata a perda parcial ou total da reatividade dos antígenos M, N, s, Fy^a e Xg^a em hemácias conservadas em solução de LISS contendo neomicina, atribuindo tal perda a alterações dos polipeptídios de membrana devido ao tipo de solução utilizada na preservação dos eritrócitos. A perda antigênica relatada neste estudo é comparada às perdas obtidas quando os eritrócitos são tratados com proteases. Esses resultados podem, de certa maneira, serem correlacionados com os obtidos com a utilização da solução preservadora BFI-2.

Os resultados dos testes de reatividade (avaliação quantitativa da estabilidade antigênica) utilizando antissoros anti-C e anti-Fy^b, em diferentes diluições, demonstraram discreta variações da reatividade em amostras preservadas por 30 dias em BFI-1 em relação às amostras frescas. O teste de comparação não paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon apresentou diferença significativa entre os *scores* do grupo de amostras frescas e preservadas em BFI-1 testadas com os dois antissoros (anti-C e anti-Fy^b). Não houve concordância das alterações de reatividade com a zigozidade das hemácias para os dois antígenos. As alterações detectadas pelo teste de Wilcoxon não inviabiliza o uso da solução BFI-1 para preservar hemácias para uso em testes imuno-hematológicos, já que em relação aos outros parâmetros avaliados a solução apresentou bom desempenho e nenhuma das amostras testadas com o antissoro anti-C ou anti-Fy^b apresentou grande alteração ou perda da reatividade após preservação.

6.3 PRESERVAÇÃO POR CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO

Na preservação de eritrócitos por congelamento, o metabolismo celular é mantido em estado de quiescência, tornando possível a conservação das células por longos períodos. Para que não ocorram danos celulares durante congelamento e descongelamento, que resultam em perda de grande parte das células, um crioprotetor e velocidade de congelamento adequada devem ser utilizados (DE SANTIS e PRATA, 2009; AABB, 2011).

Com o propósito de identificar anticorpos anti-eritrocitários, o método de congelamento mais efetivo, bem estabelecido e acessível economicamente é o de congelamento de pequenas alíquotas de hemácias em nitrogênio líquido (REIDE e ELLISOR,

1974). Laboratórios de referência podem solucionar casos imuno-hematológicos complexos com uso de hemácias raras congeladas (SIRIANE et al., 2012).

Para avaliar a eficácia do congelamento de hemácias em nitrogênio líquido, uma série de testes foi realizada em hemácias congeladas em S+D e PVP.

Os testes de avaliação da ocorrência de resultados falso-positivos utilizando plasma de doador contendo anticorpo de especificidade anti-E e hemácias criopreservadas por mais de 120 dias, negativas para o antígeno correspondente, não apresentaram resultados falso-positivos para nenhum dos dois métodos avaliados.

Os testes de fenotipagens eritrocitárias para os antígenos Fy^b e Le^b para avaliar a conservação dos antígenos eritrocitários (testes qualitativos) após 120 dias de congelamento com as soluções S+D e PVP, demonstraram concordância com os resultados obtidos em hemácias frescas e com os registros do banco de dados do sistema de doadores fenotipados da Fundação Hemominas. Portanto, podemos considerar que o congelamento em nitrogênio líquido utilizando as soluções S+D e PVP não induz alteração da reatividade dos antígenos quando comparado com resultados obtidos em amostras frescas, ou seja, antes do congelamento.

Os resultados dos testes de reatividade (quantitativos) utilizando antissoro anti-C em diferentes diluições com hemácias criopreservadas em S+D e PVP apresentaram discreta variações de reatividade quando comparados com os resultados obtidos com hemácias frescas. O teste de comparação não paramétrico para amostras pareadas de Wilcoxon, não apresentou diferença significativa entre os *scores* do grupo de amostras criopreservadas e frescas.

Os testes de reatividade (quantitativos) com soro comercial anti-Fy^b em diferentes diluições e hemácias contendo o antígeno correspondente preservadas em S+D, apresentaram, também, discretas variações de reatividade quando comparadas às obtidas com amostras frescas, não demonstrando relação com zigozidade das hemácias para o antígeno em questão. O teste estatístico de Wilcoxon não apresentou diferença significativa entre o grupo de amostras frescas e preservadas. Já os testes realizados com hemácias preservadas em PVP e anti-Fy^b demonstram aumento da reatividade em oito amostras, sendo que sete apresentaram reatividade duas diluições acima das diluições obtidas com hemácias frescas. Esse aumento de reatividade em relação às amostras frescas não demonstrou nenhuma relação com a zigosidade das hemácias. O teste de Wilcoxon realizado comparando os *scores* destas amostras com os das amostras frescas apresentou diferença significativa.

As alterações detectadas pelo teste de Wilcoxon não impedem o uso de PVP para preservar hemácias, já que em relação aos outros parâmetros avaliados o crioprotetor apresentou bom desempenho e nenhuma das amostras testadas com o antissoro anti-C ou anti-Fy^b apresentou grande alteração ou perda da reatividade após preservação. Tanto PVP como S+D podem ser utilizados alternativamente como agentes crioprotetores no laboratório de imuno-hematologia.

Os resultados da reatividade para anti-C obtidos neste trabalho são, em alguns aspectos, similares aos encontrados por SIRIANNI et al.(2012), no qual foi realizado estudo comparativo entre dois métodos de congelamento em nitrogênio líquido de hemácias na forma de alíquotas: um utilizando o crioprotetor S+D e o outro, PVP. Assim como no presente estudo, SIRIANE e colaboradores observaram uma boa preservação antigênica após descongelamento, sendo esta preservação avaliada com o uso do anticorpo anti-C.

Apesar de no presente trabalho não ter sido realizado nenhum teste quantitativo para avaliação da recuperação celular dos dois métodos de congelamento, foi observado, por meio da inspeção visual, um grau de hemólise muito mais acentuado após o descongelamento de amostras congeladas em S+D.

Como foi constatado por SCHIMID et al. (2011) e SIRIANNI et al.(2012), o congelamento com o crioprotetor PVP apresenta excelente recuperação quando comparado com o congelamento com S+D, principalmente quando se utiliza hemácias velhas e fragilizadas.

7 CONCLUSÕES

Após análises realizadas em hemácias preservadas de 2 a 6° C em diferentes soluções e por congelamento em nitrogênio líquido, pode-se concluir que:

- As soluções de Alsever modificada, BFI-1 e BFI-2 possuem boa estabilidade quando armazenadas em geladeira, sem aparecimento de alterações importantes detectadas por inspeções visuais e análise do pH.
- As suspensões de hemácias preparadas com as soluções de Alsever modificada, BFI-1 e BFI-2 são capazes de preservar hemácias em geladeira por até quatro semanas sem aparecimento de hemólise ou outra alteração importante detectada através de inspeção visual.
- As suspensões de hemácias preparadas com as soluções de Alsever modificada e BFI-1 foram capazes de preservar os antígenos de grupo sanguíneo no período avaliado. Entretanto, não foi possível detectar o antígeno Fy^b em uma amostra preservada em BFI-2 no 28° dia de preservação, podendo indicar perda da estabilidade da amostra utilizada na preparação da suspensão.
- Foi demonstrado que o congelamento em nitrogênio líquido, utilizando os crioprotetores S+D e PVP, foi capaz de preservar os antígenos de grupo sanguíneo no período avaliado.
- Tanto as hemácias preservadas de 2 a 6° C nas diferentes soluções quanto às preservadas por congelamento não apresentaram resultados falso-positivos em cartão gel-teste.
- Devido à viabilidade econômica, facilidade de uso na rotina laboratorial e boa capacidade de preservar eritrócitos e antígenos de grupos sanguíneos, a solução BFI-1 pode ser utilizada para preservar eritrócitos de 2-6° a 1% por até quatro semanas, com objetivo de auxiliar na identificação de anticorpos anti-eritrocitários menos comuns.
- Os protocolos de preservação por congelamento em nitrogênio líquido, utilizando S+D e PVP, podem ser utilizados para preservar eritrócitos com fenótipos raros por até 10 anos devido à capacidade de conservar os antígenos de grupo sanguíneo. Entretanto, o uso do crioprotetor PVP é mais indicado devido maior capacidade de recuperação celular, como corrobora a literatura.
- Para obter bons resultados ao preservar eritrócitos, as boas práticas no preparo das soluções e suspensões são essenciais.

8 REFERÊNCIAS

ALLAN, J. C.; BRUCE, M.; MITCHEL, R. The preservation of red cell antigens at low ionic strength. **Transfusion**, Philadelphia, v. 30, p 423-426, 1990.

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS (AABB). Technical manual. 17^a ed. Bethesda: AABB, 2011. P. 361-498.

ANSTEE, D. J. The functional importance of blood group-active molecules in human red blood cells. **Vox Sanguinis**, Basel, Vol. 100, p.140–149, 2011.

BGMUT – Blood Group Antigen Gene Mutation Database: banco de dados. Disponível em: <[HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV](http://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV), 2013L>. Acesso em 25/03/2014.

BONIFÁCIO, S.L.; NOVARETTI, M.C.Z. Funções Biológicas dos Antígenos Eritrocitários. **Rev. Brasileira de Hemat. Hemoter.** São Paulo, Vol. 31(2), p. 104-111, 2009.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 1.353 de 13 de junho de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília - DF, 14 jun 2011. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 de set. 2012.

CRUZ, R.O., MOTA, M.A., CONTI, F.M., PEREIRA, R.A.D., KUTNER, J.M., ARAVECHIA, M.G., CASTILHO, L.. Incidência de aloimunização eritrocitária em pacientes poli transfundidos. **Einstein**. SP, vol. 9(2pt 1), p. 173-8, 2010.

DE SANTIS, G.C.; PRATA, K. L.. Criopreservação de células progenitoras hematopoiéticas. **Medicina**, Ribeirão Preto, SP, vol.42(1), p. 36-47, 2009.

GIRELLO, A. L.; KÜHN, T. I. B. B. **Fundamentos da imuno- hematologia eritrocitária**. São Paulo. Editora SENAC, 2011.

GRIFOLS. **Suspension Medium for Red Blood Cells**. Patente US 2011/0045455 A1. 24 de fevereiro de 2011.

HESS, J. R. An update on solutions for red cell storage. **Vox Sanguinis**, Basel, vol. 91, p.13-19, 2006.

HESS, J. R.; BEYER, G. M. Red Blood Cell Metabolism During Storage: Basic Principal and Practical Aspects. In HILLYER, C. D. et al. **Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic Principles & Practice**. 2a edição, Philadelphia. Churchill Livingstone Elsevier, 2007. P. 205-210.

HESS, J. R.; GREENWALT, T. G. Storage of Red Blood Cells: New Approaches. **Trasnfusion Medicine Reviews**, Orlando, v. 16, P. 283-295, 2002.

HOGMAN, C.F. Preparation and Preservation of Red Cells. **VoxSanguinis**, Basel, vol 74, p.177-187, 1998.

HÖGMAN, C. F.; MERYMAN, H. T. Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion. **Transfus Med Rev.**, Orlando, vol 13, p275-96, 1999.

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

KLEIN, H. G.; ANSTEE D. J. **Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine**. 11^a edição. Malden: Blackwell Publishing Ltda, 2005.

LEONART, M. S. S. Controle de Qualidade na Preservação de Eritrócitos para Transfusão. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, vol.32(3), p.192-193, 2010.

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

LINENFELTER, B.; GIBBS, F.G.; SOSLER S.D. Detecção e Identificação de anticorpos. In: HARMENING, D.M. **Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão**. 4^a edição. Rio de Janeiro. Revinter, 2006. P. 253-276.

LUTZ, H.U.; LIU, H. C.; PALEK, J.; Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP depletion. **J Cell Biol**, vol. 73, p.548-560, 1977.

MALYSKA, H. Effects on Blood Group Antigens from Storage at Low Ionic Strength in the Presence of Neomycin. **Vox Sanguinis**, Basel, vol. 44, p.375-384, 1983.

MAZUR, P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing, **The Journal of General Physiology**, vol. 47, p. 347-369, 1963.

MCGANN, L. E. Differing Actions of Penetrating and Nonpenetrating Cryoprotective Agents. **Cryobiology**, vol.15, p. 382 - 390, 1978.

MERYMAN, H.T. et al. Extending the storage of red cells at 4° C. **Transfusion**, Philadelphia, vol. 15, p. 105-115, 1994.

MERYMAN, H. T. Freezing Injury and its Prevention in Living Cells. **Annu Rev Biophys Bioeng.**, vol 3, p 341-63, 1974.

MERYMAN, H. T. Cryoprotective Agents. **Cryobiology**, vol 8, p 173- 183, 1971.

MOHANDAS, N.; EVANS, E. Mechanical Properties of the Red Cell Membrane in Relation to Molecular Structure and Genetic Defects. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, vol. 23, p 787-818, 1994.

MOHANDAS, N.; CHASIS, J. A. Red blood Cell Deformability, Membrane Material Properties and Shape: Regulation by Transmembrane, Skeletal and Cytosolic Proteins and Lipids. **Semin. Hematol.**, vol 30, p 171 - 192, 1993

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Rev. bras. hematol. hemoter.** São Paulo, vol. 29(2), p. 168-178, 2007.

MYHRES, B. A.; DEMANIEW, S.; NELSON, E. J. Preservation of red cell antigens during storage of blood with different anticoagulants. **Transfusion**, Philadelphia, v. 24, p. 499-501, 1984.

NETO, G. C. G, PITOMBEIRA, M. S. **Aspectos moleculares da anemia falciforme. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** Rio de Janeiro, vol. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

NOVARETTI, M. C. Z.; BUENO, V. J.; DORLHIAC-LLACER, P. E.; CHAMONE, D. A. F. Controle de qualidade interno de reagentes em imuno-hematologia - Aspectos Práticos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, vol 24, n. 04, p 270-85, 2002

NOVARETTI, M.C. Z. et al. Dez anos de experiência em controle de qualidade em imuno-hematologia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, vol.31(3), p.160-165, 2009.

NOVARETTI, M.C.Z. Investigação Laboratorial em Pacientes com Anticorpos Eritrocitários. In: COVAS, D.T.; LANGHI, D.M.J.; BORDIM, J.O. **Hemoterapia: fundamentos e prática.** São Paulo: Atheneu, 2007. P. 185-192.

OLIVEIRA, S.; SALDANHA, C. An overview about erythrocyte membrane. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, Amsterdam, Vol. 44, p.63–74, 2010.

PERROTTA S.; GALLAGHER P. G.; MOHANDAS, N. Hereditary spherocytosis. **Lancet**, vol. 372, p. 1411– 1426, 2008.

PEYRARD, T. et al. Les phenotypes érythrocytaires rares: un enjeu de santé publique. The rare blood groups: A public health challenge. **Transfus Clin Biol**, Paris, vol. 15, p.109–119, Jun 2008.

PIASSI, F. C. C. **Análise genotípica do sistema de grupo sanguíneo Dombrock em doadores de sangue do Estado de Minas Gerais.** 2010. 70 folhas. Dissertação- Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

REID, M.E.; WESTHOFF, C. M. Membrane Blood Group Antigens and Antibodies. In HILLYER, C. D. et al. **Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic Principles & Practice.** 2ª edição. Philadelphia. Churchill Livingstone Elsevier, 2007. P. 53-68.

REID, M. E.; ELLISOR, S. S. A Rapid and Simple Method for Freezing Small Volumes of Erythrocytes in Liquid Nitrogen. **Transfusion**, Philadelphia, vol. 4, p 75-76, 1974.

ROY, R. B.; WYATT, L. The Preservation and Storage of Red Cells for Subsequent Use in Antibody Detection Procedures. **Transfusion**, Philadelphia, vol. 04, p. 293-298, 1964.

SAAD, S. T. O. Anemias por Defeito de Membrana. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUIM, R. **Hematologia. Fundamentos e Práticas**. São Paulo. Atheneu, 2001. P. 250.

SCHMID, P. et al. Red blood cell preservation by droplet freezing with polyvinylpyrrolidone or sucrose-dextrose and by bulk freezing with glycerol. **Transfusion**, Philadelphia, Vol. 51, p. 2703-2708, 2011.

SCOTT, K. L.; LECAK, J.; ACKER, J. P. Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future. **Transfusion Medicine Reviews**, Orlando, vol. 19, No 2, p. 127-142, abril de 2005.

SIRIANNI, M.M. et al. Preservação de alíquotas de hemácias em nitrogênio líquido: comparação entre dois métodos. In Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2012, Rio de Janeiro. **Resumo**. Rev Bras. Hematol. Hemoter, São Paulo, vol. 34 (2), p. 400.

SNYDER, E.L et al. Stability of red cell antigens during prolonged storage in citrate-phosphate-dextrose and a new preservative solution. **Transfusion**, Philadelphia, Vol. 23, p. 165-166, 1983.

ZAGO, M. A. Estrutura, Síntese e Genética das Hemoglobinas. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUIM, R. **Hematologia. Fundamentos e Práticas**. São Paulo. Atheneu, 2001. P. 270-272.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I- REAGENTES UTILIZADOS NA PESQUISA

Reagentes/ substâncias com validades e lotes

Reagentes/ substâncias	Fabricante	Lote	Validade
Ácido cítrico anidro PA	Vetec	1108402	10/2015
Adenina	SIGMA-ALDRICH	060M0157V	27/03/2016
Albumina bovina 22%	BIO-RAD	11950.84.50	12/2014
Antissoro anti-Fy ^a	BIO-RAD	08660.92.20	06/2014
Cartão LISS/coombs	BIO-RAD	50531.7632	07/2014
CellStab	BIO-RAD	05740.30.10	10/2014
Cloranfenicol	Genix	DY090280	11/2014
Cloreto de sódio PA	Vetec	1006225	08/2014
Dextrose anidra PA (Glicose anidra)	Vetec	DCBB0903	12/2018
EDTA PA	Vetec	1004608	07/2015
Gentamicina	Pharma Nostra	12062220	05/2016
Glicina	Vetec	1101331	02/2015
ID-Card DiaClon anti-Le ^b	BIO-RAD	50250.68.01	08/2013
ID-Card DiaClon anti-Le ^b	BIO-RAD	50250.73.01	03/2014
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	Synth -Reagente analítico	143430	02/02/2015
KH ₂ PO ₄	Synth -Reagente analítico	143590	06/06/2015
L-isoleucina	SIGMA-ALDRICH	090MOO842	30/10/2016
L-leucina	SIGMA-ALDRICH	BCBG3857V	30/06/2022
L-metionina	SIGMA-ALDRICH	SLBC7548	25/06/2020
L-valina	SIGMA-ALDRICH	021MO1121V	28/02/2015
Na ₂ HPO ₄	Synth -Reagente analítico	143457	02/06/2015
Neomicina	Pharma Nostra	201212043	12/2016
Polivinilpirrolidona	SIGMA-ALDRICH	BCBH3938V	12/01/2016

Reagentes/ substâncias com validades e lotes

Reagentes/ substâncias	Fabricante	Lote	Validade
Sacarose	Vetec	1206718	08/2017
Solução de bromelina	BIO-RAD	05751.67.40	06/2014
Solução de LISS	BIO-RAD	05761.41.30	01/2015

9.2 ANEXO II- PROCEDIMENTOS DOS TESTES REALIZADOS

PRESERVAÇÃO DE ALÍQUOTAS DE HEMÁCIAS POR RESFRIAMENTO A 4°C:

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Materiais, equipamentos e reagentes

- Balão volumétrico de 1000 ml
- Béquer de 1000 ml
- Frasco de vidro âmbar de 1000 ml
- Membrana Millipore de 22 µm
- Bastão de vidro
- Capela de fluxo laminar
- Balança analítica
- Reagentes descritos nas fórmulas abaixo

Atividades

- Pesar todos os reagentes descritos nas fórmulas abaixo, exceto os antibióticos.
- Transferir para um Béquer com capacidade para 1000 ml.
- Acrescentar água destilada e autoclavada aos poucos, homogeneizando com bastão de vidro até completa dissolução, sem atingir o volume de 1000 ml.
- Transferir a solução para frasco âmbar.
- Autoclavar por 30 minutos.
- Transferir a solução, após resfriada, para balão volumétrico de 1000 ml e completar com água destilada e autoclavada até a marca.
- Filtrar a solução utilizando membrana Millipore de 22 µm.
- Acrescentar os antibióticos, deixando o cloranfenicol por último.
- Armazenar a solução em frasco âmbar, de 2-6°C, em geladeira científica.

Atividades essenciais

- Realizar todos os procedimentos em capela de fluxo laminar

SOLUÇÃO DE ALSEVER :

Citrato de sódio anidro	8,0 g
Dextrose anidra	20,5 g
Cloreto de sódio	4.2 g
Ácido cítrico H ₂ O	0,55 g (se anidro, usar 0,5 g)
Cloranfenicol	0,250 g
Neomicina	0,100 g
Gentamicina	0,050 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

SOLUÇÃO DE BAIXA FORÇA IÔNICA-1 (BFI-1):

Na ₂ HPO ₄ (Fosfato de sódio bibásico)	1,42 g
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de potássio monobásico)	1,36 g
Cloreto de sódio	1,0 g
Dextrose (D- glicose anidra)	3,5 g
Adenina	0,02 g
EDTA	2,80 g
Glicina	14,70 g
Cloranfenicol	0,17 g
Neomicina	0,10 g
H ₂ O destilada g.s.p.	1000 ml

SOLUÇÃO DE BAIXA FORÇA IÔNICA- 2 (BFI-2):

Na ₂ HPO ₄ (Fosfato de sódio bibásico)	1,42 g
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de potássio monobásico)	1,36 g
Cloreto de sódio	1,0 g
Dextrose (D- glicose anidra)	3,5 g
Adenina	0,02 g
EDTA	2,80 g
Glicina	14,70 g
Cloranfenicol	0,17 g
Neomicina	0,10 g
L-valina	3,2g
L-metionina	2,52g
L-leucina	2,6g
L-isoleucina	6,48g
H ₂ O destilada g.s.p.	1000 ml

TESTES DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES PREPARADAS:

Materiais e/ou equipamentos

- pHmetro

Atividades

- Manter as soluções em geladeira científica de 4 a 6°C e verificar quanto à presença de precipitados, gelatina, partículas, fungos e turvação durante 9 meses de armazenamento.
- Fazer leitura de pH das soluções uma vez por mês, durante o período de armazenamento.

PREPARO DAS SUSPENSÕES DE HEMÁCIAS FENOTIPADAS:

PREPARO DAS SUSPENSÕES DE HEMÁCIAS

Materiais, equipamentos e reagentes

- Frascos conta-gotas de 10 ml autoclavados.
- Pipetas de vidro de cinco ml autoclavadas
- Hemácias previamente lavadas
- Capela de luxo laminar
- Soluções de Alsever modificada, BFI-1, BFI-2 e CellStabb (BIO-RAD)
- Solução salina
- Pipetas de Pasteur
- Centrífuga refrigerada de 2-6°C
- Tubos de Kahn 12 x 75 mm

Atividades

- Selecionar as hemácias de doadores de sangue, previamente fenotipadas, com os fenótipos de interesse.
- Centrifugar as hemácias a 1000 x g por 5 minutos e descartar o plasma e *buffy coat* utilizando pipetas de Pasteur.
- Transferir 1000 µl de papa de hemácias para um tubo de Kahn 12 x 75 mm, devidamente identificado.
- Lavar as hemácias quatro vezes com solução salina, obedecendo à proporção de uma parte de papa de hemácias e duas partes de salina, utilizando centrífuga refrigerada de 2-6°C com centrifugação a 1.000 x g por 5 minutos.
- Rotular os frascos conta-gotas com etiquetas contendo: nome da suspensão, número da amostra utilizada, data de preparo, lote, nome do responsável.
- Utilizar as hemácias lavadas para preparo das suspensões descritas abaixo, com as devidas concentrações.
- Utilizar a capela de fluxo laminar para realizar todos os procedimentos.
- Manter as suspensões preparadas em geladeira científica de 2-6°C.

Preparo da suspensão em Alsever a 5%

Solução de Alsever.....4,75 ml

Hemácias lavadas.....0,25 ml

Preparo da suspensão em Cell Stab a 5%

Solução Cell Stab.....4,75 ml

Hemácias lavadas0,25 ml

Preparo da suspensão em solução de BFI-1 a 5%

Solução de baixa força iônica-1.....4,75 ml

Hemácias lavadas 0,25 ml

Preparo da suspensão em solução de BFI-2 a 5%

Solução de baixa força iônica-2.....4,75 ml

Hemácias lavadas 0,25 ml

Preparo da suspensão em solução de BFI-1 a 1%

Solução de baixa força iônica.....4,95 ml

Hemácias lavadas.....0,05 ml

Preparo da suspensão em solução de BFI-2 a 1%

Solução de baixa força iônica.....4,95 ml

Hemácias lavadas.....0,05 ml

VALIDAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE HEMÁCIAS

Materiais, equipamentos e reagentes

- Suspensões de hemácias a 5% (soluções de Alsever, CellStab, solução BFI-1 e BFI-2) e a 1% (solução BFI-1 e BFI-2).
- Cartão LISS/coombs (BIO- RAD)
- Cartões para fenotipagem DiaClon Anti-Le^b (BIO-RAD)
- Solução de bromelina (BIO-RAD)
- Solução de LISS (BIO-RAD)
- Antissoros anti- Fy^b (BIO-RAD)
- Soro humano congelado contendo anti-C
- Pipetas automáticas de 5-50 µl
- Tubos de Kahn 12x75 mm
- Centrífuga para cartões DiaMed-ID *Micro Typing System*- ID 24 S.
- Incubadora DiaMed-ID *Micro Typing System*- ID 37 SI.

Atividades:

Testes de estabilidade das suspensões através de análises visuais sem simular uso na rotina

- Manter as suspensões preparadas em repouso na geladeira científica de 2-6°C.
- Fazer inspeções diárias das suspensões quanto à presença de hemólise, turvação do líquido sobrenadante, escurecimento das hemácias, formação de grumos e fungos, por um período mínimo de quatro semanas.

Testes de estabilidade das suspensões através de análises visuais simulando uso na rotina

- Manter as suspensões preparadas na geladeira científica de 2-6°C e por 4 horas por dia à temperatura ambiente, com homogeneizações esporádicas.
- Fazer inspeções diárias das suspensões quanto à presença de hemólise, turvação do líquido sobrenadante, escurecimento das hemácias, formação de grumos e fungos, por um período mínimo de quatro semanas.

Fenotipagem eritrocitária do antígeno Fy^b:

- Transferir 1 ml de hemácias preservadas a 5% (Alsever e Cell Stab) para tubo 12x75, centrifugar por 2 minutos a 1000X g e desprezar o sobrenadante utilizando pipeta de Pasteur.
- Preparar suspensão a 1%, em solução de LISS com hemácias preservadas (500 µl de LISS + 5 µl de hemácias preservadas em soluções de Alsever e Cell Stab a 5%).
- Para hemácias que são preservadas nas BFI-1 e BFI-2 a 1%, utilizar a própria suspensão.
- Pipetar 50 µl das suspensões de hemácias a 1% no cartão LISS/Coombs previamente centrifugado.
- Pipetar 25 µl de antissoros comerciais anti- Fy^b em cada microtubo.
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Centrifugar por 10 em centrífuga para cartões.
- Fazer leitura da positividade em cruces (+).

Fenotipagem eritrocitária para os antígenos Le^b

- Transferir 1 ml de hemácias preservadas a 5% (Alsever, Cell Stab, SBFI-1 e SBFI-2) para tubo 12x75, centrifugar 2 minutos a 1000 g e desprezar o sobrenadante utilizando pipeta de Pasteur.
- Pipetar, em tubo de Kahn 12 X 75 mm, 10 µl da hemácia preservada e 200 µl de solução de bromelina.
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos
- Pipetar 10 µl da suspensão preparada no cartão DiaClon Anti-Le^b (BIO-RAD) previamente centrifugado.
- Centrifugar em centrífuga para cartões.
- Fazer leitura de acordo com padronização em cruces (+).

Coombs indireto para avaliação de resultados falso-positivos

- Transferir 1 ml de hemácias preservadas a 5% (Alsever e Cell Stab) para tubo 12x75, centrifugar por 2 minutos a 1000X g e desprezar o sobrenadante utilizando pipeta de Pasteur.
- Preparar suspensão a 1%, em solução de LISS, com hemácias preservadas (500 µl de LISS + 5 µl de hemácias preservadas em soluções de Alsever e Cell Stab a 5%).
- Para hemácias que são preservadas nas BFI-1 e BFI-2 a 1%, utilizar a própria suspensão.

- Pipetar 50 µl das suspensões de hemácias a 1% no cartão LISS/Coombs previamente centrifugado.
- Pipetar 25 µl de soro de paciente contendo anti- E.
- Incubar a 37°C por 15 minutos.
- Centrifugar por 10 minutos em centrífuga para cartões.
- Fazer leituras de acordo com a padronização em cruces (+).

Teste de reatividade das suspensões contra anticorpos anti-C e anti-Fy^b

- Separar as alíquotas de suspensões em solução BFI-1 a 1%.
- Diluir o soro comercial anti-Fy^b (BIO-RAD) e o plasma de doador contendo anticorpo de especificidade anti-C com solução salina comercial em diluições seriadas, sendo o anti-Fy^b até 1:128 e o anti-C até 1:16.
- Pipetar 50 µl das suspensões de hemácias a 1% no cartão LISS/Coombs previamente centrifugado, testando cada alíquota de suspensão com as diluições seriadas dos antissoros anti-Fy^b e anti-C.
- Pipetar 25 µl dos antissoros previamente diluídos.
- Incubar a 37°C por 15 minutos.
- Centrifugar por 10 minutos em centrífuga para cartões.
- Fazer leituras de acordo com a padronização em cruces (+).

PRESERVAÇÃO DE ALÍQUOTAS DE HEMÁCIAS POR CONGELAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO:

PREPARO DOS REAGENTES

Materiais, equipamentos e reagentes necessários:

- Na_2HPO_4
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Dextrose
- Sacarose
- Solução de NaCl a 0,9%
- Albumina bovina a 22%
- Polivinilpirrolidona
- Becker de 100, 250, 500 e 1000 ml
- Balão volumétrico de 50, 100 e 1000 ml
- Bastão de vidro
- Pipetas de vidro de 5 e 10 ml
- Solução salina
- Pipetas de Pasteur
- Centrífuga refrigerada de 2-6°C
- Tubos de Kahn 12 x 75 mm

Atividades

Salina tamponada

- Preparar a solução estoque de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,16M dissolvendo 22,16g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 1000 ml de H_2O destilada.
- Preparar a solução estoque de Na_2HPO_4 0,16M dissolvendo 22,7g de Na_2HPO_4 em 1000 ml de H_2O destilada.
- Preparar solução salina a 0,9%.
- Misturar os volumes das soluções abaixo indicados em um proveta graduada para obter 100 ml de tampão no pH 7,3

Solução de Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O 0,16M	1,6 ml
Solução de Na ₂ HPO ₄ 0,16M	8,4 ml
Solução de Salina a 0,9%	90 ml

Solução de congelamento sacarose/dextrose (S+D):

Fórmula:

Sacarose..... 15,4 g

Dextrose..... 5,9 g

NaCl..... 0,29 g

Água destilada..... 100 ml

Preparo da solução

- Dissolver em um Becker de 250 ml a sacarose, dextrose e NaCl em 70 ml de água destilada estéril.
- Homogeneizar utilizando um bastão de vidro.
- Transferir a solução para um balão volumétrico (100 ml) e completar o volume com água destilada estéril até a marca indicada.
- Tampar e homogeneizar por inversão.
- Armazenar a 4°C durante sete dias ou a -20°C por um ano.

Solução de congelamento com polivinilpirrolidona (PVP):

Fórmula:

Albumina bovina a 22% 27 ml

PVP a 30% em água deionizada..... 23 ml

Preparo da solução

- Pesar 15 grs. de PVP e dissolver com aproximadamente com 30 ml de água deionizada.
- Transferir para um balão volumétrico de 50 ml e completar até a marca com água deionizada.
- Preparar uma solução com 27 ml de albumina bovina a 22% com 23 ml da solução de PVP preparada acima.
- Armazenar a solução por até três meses a 4°C.
- Homogeneizar adequadamente antes do uso.

CONGELAMENTO EM SOLUÇÃO DE S+D E PVP

Materiais, equipamentos e reagentes necessários:

- Solução salina
- Pipetas de Pasteur
- Centrífuga comum
- Tubos de Kahn 12 x 75 mm
- Pipetas de vidro de cinco ml
- Pipetas automáticas de 1000 µl
- Caixas de isopor pequenas
- Pinça de metal
- Tubos de criopreservação
- Dispositivo inox (colmeia) contendo divisórias para separar as gotas de hemácias congeladas
- Container* de nitrogênio líquido

Atividades

- Selecionar as hemácias de doadores de sangue, previamente fenotipadas, com os fenótipos de interesse.
- Centrifugar as hemácias a 1000 x g por 5 minutos e descartar o plasma e *buffy coat* utilizando pipetas de Pasteur.

- Transferir dois ml de papa de hemácias para um tubo de Kahn 12 x 75 mm, devidamente identificado.
- Lavar as hemácias quatro vezes com solução salina, obedecendo à proporção de uma parte de papa de hemácias e duas partes de salina, utilizando centrífuga comum com centrifugação a 1.000 x g por 5 minutos.
- Adicionar às hemácias lavadas o mesmo volume de solução de congelamento (1000 µl de hemácias e 1000 µl de solução de congelamento)
- Homogeneizar por inversão e incubar a temperatura ambiente durante **15 minutos** com a **solução de congelamento S+D** ou, por **1 hora** a temperatura ambiente, com a **solução de PVP**.
- Colocar em uma pequena caixa de isopor aproximadamente $\frac{3}{4}$ do seu volume de nitrogênio líquido.
- Colar dispositivo inoxidável (colmeia), contendo divisórias para separação das gotas de suspensão de hemácias congeladas, dentro da caixa de isopor.
- Aspirar 1 ml da suspensão de hemácias com o auxílio de uma pipeta Pasteur.
- Dispensar a suspensão de hemácias gota a gota nas divisórias do dispositivo inoxidável, a uma distância de 20 cm para evitar o congelamento da suspensão de hemácias na pipeta.
- Transferir, com pinça de metal, as gotas de hemácias congeladas para tubos de criopreservação identificados, que devem ser mantidos em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido.
- Armazenar os tubos, contendo as alíquotas de hemácias, dentro do *container* de nitrogênio líquido, em pequenas caixas de metal (*canisters*) identificadas.
- Retornar o restante do nitrogênio líquido utilizado para o container

DESCONGELAMENTO DAS ALÍQUOTAS DE HEMÁCIAS

Materiais, equipamentos e reagentes necessários:

- Centrífuga comum
- Tubos de Kahn 12 x 75 mm
- Pinça de metal
- Solução PBS pH 7,3

Atividades

- Identificar o tubo com o número da amostra a ser descongelada.
- Colocar três ml de Solução salina tamponada pH 7.3 (PBS) em um tubo previamente identificado, mantendo o mesmo em banho- maria a 37°C por aproximadamente 30 minutos.
- Retirar rapidamente o tubo de criopreservação do container e transferir as alíquotas (máximo de três bolinhas) para o tubo Kahn 12 x 75 mm com o PBS pré-aquecido;
- Homogeneizar e colocar o tubo à temperatura ambiente até o completo descongelamento das hemácias.
- Centrifugar a 1000 x g por 2 minutos.
- Lavar as hemácias com PBS até que não haja nenhum sinal de hemólise
- Ressuspender as hemácias em solução salina ou outra solução, na concentração a ser utilizada.

VALIDAÇÃO DO CONGELAMENTO DAS HEMÁCIAS:

Materiais, equipamentos e reagentes necessários:

- Hemácias descongeladas e lavadas
- Cartão LISS/coombs (BIO- RAD)
- Cartões para fenotipagem DiaClon Anti-Le^b (BIO-RAD)
- Solução de bromelina (BIO-RAD)
- Solução de LISS (BIO-RAD)
- Antissoros anti- Fy^b (BIO-RAD)
- Soro humano congelado contendo anti-C
- Pipetas automáticas de 5-50 µl
- Tubos de Kahn 12x75 mm
- Centrífuga para cartões DiaMed-ID *Micro Typing System*- ID 24 S.
- Incubadora DiaMed-ID *Micro Typing System*- ID 37 SI.

Atividades:

Fenotipagem eritrocitária do antígeno Fy^b:

- Preparar suspensões a 1% em solução de LISS com as hemácias descongeladas e lavadas (500 µl de solução de LISS + 5 µl de hemácias).
- Pipetar 50 µl das suspensões de hemácias a 1% no cartão LISS/Coombs previamente centrifugado.
- Pipetar 25 µl de antissoros comerciais anti- Fy^b em cada microtubo.
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Centrifugar por 10 em centrífuga para cartões.
- Fazer leitura da positividade em cruces (+).

Fenotipagem eritrocitária do antígenos Le^b :

- Pipetar 200 µl de bromelina e 10 µl de hemácia descongelada e lavada, em tubo 12x75 mm, produzindo assim uma suspensão de hemácias.
- Pipetar, em tubo de Kahn 12 X 75 mm, 10 µl da suspensão de hemácia preservada e 200 µl de bromelina.
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos
- Pipetar 10 µl da suspensão preparada no cartão DiaClon Anti-Le^b (BIO-RAD) previamente centrifugado.
- Centrifugar em centrífuga para cartões.
- Fazer leitura de acordo com padronização em cruces (+).

Coombs indireto para avaliação de resultados falso-positivos

- Preparar suspensões a 1% em solução de LISS com as hemácias descongeladas e lavadas (500 µl de solução de LISS + 5 µl de hemácias).
- Pipetar 50 µl das suspensões de hemácias a 1% no cartão LISS/Coombs previamente centrifugado.
- Pipetar 25 µl de soro de paciente contendo anti- E.
- Incubar a 37°C por 15 minutos.

- Centrifugar por 10 minutos em centrífuga para cartões.
- Fazer leituras de acordo com a padronização em cruces (+).

Teste de reatividade das suspensões contra anticorpos anti-C e anti-Fy^b

- Preparar suspensões a 1% em solução de LISS com as hemácias descongeladas e lavadas (500 µl de solução de LISS + 5 µl de hemácias).
- Diluir o soro comercial anti-Fy^b (BIO-RAD) com salina comercial nas diluições 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128 e o plasma de doador contendo anticorpo de especificidade anti-C nas diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16.
- Pipetar 50 µl das suspensões de hemácias a 1% no cartão LISS/Coombs previamente centrifugado, sendo cinco micropoços para realizar reatividade com soro anti-Fyb e quatro micropoços para reatividade com soro humano com anti-C.
- Pipetar 25 µl dos antissoros previamente diluídos.
- Incubar a 37°C por 15 minutos.
- Centrifugar por 10 minutos em centrífuga para cartões.
- Fazer leituras de acordo com a padronização em cruces (+).

9.3 ANEXO III- AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA

 FUNDAÇÃO HEMOMINAS	Autorização prévia do Serviço de Pesquisa	CCB:
--	--	------

I.1. Título da pesquisa

Padronização e implementação de métodos de preservação de aliquotas de hemácias com antígenos raros e/ou de interesse para auxiliar na identificação de anticorpos anti-eritrocitários na Fundação Hemominas.

I.2. Pesquisador responsável

Nome: Marta Aparecida Barbosa Chagas	
Endereço: Rua Bueno Brandão, 94, Belo Horizonte - MG	
Telefone: (31) 9201-4670	E-mail: martaab.chagas@gmail.com
Instituição à qual pertence: Fundação Hemominas	
Unidade/setor: Central de Imunohematologia	

I.3. Local e cronograma de execução

Unidades/setores da Hemominas onde a pesquisa será realizada:	
Serviço de Pesquisa	
Data apresentada para o início da pesquisa: Janeiro/2013	Data apresentada para a conclusão: Maio/2014

I.4. Análise prévia

Pesquisa autorizada Data: 19 / 03 / 2013

OBSERVAÇÕES:

Projeto aprovado pelo Serviço de Pesquisa da Fundação Hemominas. Não há necessidade de avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.



Daniel Gonçalves Chaves
WASP: 120172-7 (085) 04202-6
Chefe do Serviço de Pesquisa
Fundação Hemominas

Serviço de Pesquisa - Fundação HEMOMINAS
Avenida Fregateiro Dias, 321 - Belo Horizonte/MG - CEP: 30130-110
Fone: (31) 3248-6192 - e-mail: daniel.chaves@hemominas.mg.gov.br

9.4 ANEXO IV- COMPROVANTES DE TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS



CERTIFICADO

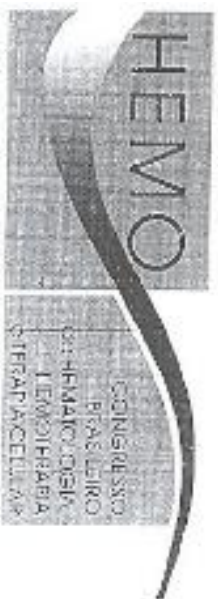
Certificamos que o trabalho intitulado "CRIOPRESERVAÇÃO DE ALÍQUOTAS DE HEMÁCIAS RARAS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO PARA UTILIZAÇÃO EM TESTES IMUNOHEMATOLOGICOS NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS" de autoria de Maria Aparecida Barbosa Chagas|Maria Clara Fernandes da Silva-Malta|Luciana Cayres Schmidt|Ana Paula Rocha Diniz Zanelli|Eugênia M Amorim Ubieli|Simone Kachima, foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2014, realizado no período de 6 a 9 de novembro de 2014, na categoria painel com vista guiada [Painel 56].

Florianópolis, 09 de Novembro de 2014.

ABHH
Associação Brasileira
de Hematologia, Hemoterapia
e Terapia Celular


DIMAS TADEU COVAS
PRESIDENTE DA ABHH


FERNANDO FERREIRA COSTA
PRESIDENTE DO HEMO 2014



6 a 8 de novembro de 2014 - Florianópolis/SC/Brasil

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado: **"PRESERVAÇÃO HIPOTÉRMICA DE ALÍQUOTAS DE HEMÁCIAS EM SUSPENSÃO UTILIZANDO SOLUÇÕES PRESERVADORAS: COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS"** de autoria de **Marta Aparecida Barbosa Chagas| Maria Clara Ferrandes da Silva Matta| Luciana Cayres Schmidt| Ana Paula Rocco Diniz Zanelli| Eugênia M Amorim Lbiali| Simone Kashima**, foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2014, realizado no período de 6 a 9 de novembro de 2014, na categoria painel com vista guiada (Painel 57).

Florianópolis, 09 de Novembro de 2014.

ABHH
Associação Brasileira
de Hematologia, Hemoterapia
e Terapia Celular


DIMAS TADEU COVAS
PRESIDENTE DA ABHH


FERNANDO FERREIRA COSTA
PRESIDENTE DO HEMO 2014

Certificamos que o resumo USO DE SOLUÇÕES PRESERVADORAS NO ESTOQUE HIPOTÉRMICO DE ALÍQUOTAS DE HEMÁCIAS EM SUSPENSÃO PARA USO EM TESTES IMUNO-HEMATOLÓGICOS da autoria de CHAGAS, Marta Aparecida Barbosa; SILVA-MALTA, Maria Clara Fernandes; SCHMIDT, Luciana Cayres; ZANELLI, Ana Paula R. Diniz; UBIALI, Eugênia M. Amorim; KASHIMA, Simone foi apresentado no Congresso do Grupo Cooperativo Ibero-Americano de Medicina Transfusional, realizado em Belo Horizonte, Minas Gerais, nos dias 15 a 17 de abril 2015.


Belo Horizonte, 17 de abril de 2015


Júlia Guimarães Mourão Cioffi
Presidente da Fundação Hemominas


Esther Graciela León de González
Presidente do GCIAMT

Certificamos que o resumo COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE ALÍQUOTAS DE HEMÁCIAS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO PARA UTILIZAÇÃO EM TESTES IMUNO-HEMATOLÓGICOS NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS da autoria de CHAGAS, Marta Aparecida Barbosa; SILVA-MALTA, Maria Clara Fernandes; SCHMIDT, Luciana Cayres; ZANELLI, Ana Paula R. Diniz; UBIALI, Eugênia M. Amorim; KASHIMA, Simone foi apresentado no Congresso do Grupo Cooperativo Ibero-Americano de Medicina Transfusional, realizado em Belo Horizonte, Minas Gerais, nos dias 15 a 17 de abril 2015.

Belo Horizonte, 17 de abril de 2015


Júlia Guimarães Mourão Cioffi
Presidente da Fundação Hemominas


Esther Graciela León de González
Presidente do GCIAMT