

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA**  
**FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA**  
**DO AMAZONAS - HEMOAM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À**  
**HEMATOLOGIA**

**AVALIAÇÃO LABORATORIAL E MOLECULAR DE CONCENTRADO**  
**DE HEMÁCIAS DEVOLVIDAS À FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE**  
**HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**

**Discente**

**MARCELO REIS DO NASCIMENTO**

**Orientador**

**Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto**

**Manaus**  
**2017**

**MARCELO REIS DO NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO LABORATORIAL E MOLECULAR DE CONCENTRADO  
DE HEMÁCIAS DEVOLVIDAS À FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE  
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologias, em convênio com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas para obtenção do título de Mestre em ciências hematológicas .

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

**Manaus  
2017**

**AVALIAÇÃO LABORATORIAL E MOLECULAR DE CONCENTRADO DE  
HEMÁCIAS DEVOLVIDAS À FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE  
HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>o</sup>. PhD. José Pereira de Moura Neto (Presidente) - UFAM.**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr. Sérgio de Albuquerque (Membro) – HEMOAM**

---

**Prof<sup>o</sup>. Dr. Francisco Erivaldo Vidas Barros – UFAM**

**Manaus-Am, 09 de Outubro de 2017.**

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, o meu porto seguro, minha família.

*Aos meus pais, Antônio do Nascimento e Maria de Lourdes Ferreira  
Reis por todo o amor e dedicação na construção da minha  
educação.*

*A minha esposa Esther Araújo Reis, companheira incentivadora de  
todos os momentos.*

*“A dúvida é o princípio da sabedoria”*

*Aristóteles*

## AGRADECIMENTOS

Agradecer é um ato de reconhecimento e humildade perante aqueles que participaram da caminhada deste projeto, que não é apenas um projeto científico, mas também de vida, por todas as experiências adquiridas nesta jornada.

Primeiramente agradeço a Deus pela vida concedida, por ter colocado pessoas que tem me ajudado na intempérie desta caminhada chama vida.

À minha esposa Esther Araújo Reis, por toda paciência, compreensão e motivação para seguir em frente, sempre com a palavra certa nas horas difíceis e com o abraço amoroso nos momentos de felicidade.

Ao meu orientador, amigo por muitas vezes pai Dr. José Pereira de Moura Neto. Durante essa caminhada você me mostrou que com a ajuda certa somos capazes de construir grandes coisas, não tenho como agradecer pelos ensinamentos transmitidos o apoio nas horas difíceis, ter vivido esses dois anos como mestrando é uma experiência que levarei por toda vida, obrigado professor!

Ao Prof. Doutor Emerson Silva Lima, por ter sido uma das mentes pensantes para a formulação desta dissertação.

Ao Prof. Doutor Sérgio Albuquerque, que tem elucidados varias questões quando lhe foi solicitado.

A Universidade Estadual do Amazonas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia.

Sobre tudo à Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas pela concretização deste sonho.

**LISTA DE TABELA**

Tabela 1 Parâmetros para Controle de Qualidade no Concentrado de Hemácia .....	31
Tabela 2 Parâmetros bioquímicos testados nas bolsas de CH .....	39
Tabela 3 . Sondas utilizadas para determinação dos SNP .....	43

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Bolsa de sangue total após centrifugação mostrando a sedimentação das hemácias antes da extração do plasma.. .....	18
Figura 2 Extração do plasma em extrator semi-automatizado. ....	18
Figura 3 Bolsa com PRP e o CH respectivamente.....	20
Figura 4 Fases da produção dos componentes sanguíneos.....	20
Figura 5 Bolsa de concentrado de hemácia rotulada .....	22

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>AT's</b>	Agências Transfusionais
<b>CH</b>	Concentrado de Hemácias
<b>CPD</b>	Citrato fosfato dextrose
<b>CPDA</b>	Citrato Fosfato Dextrose Adenina
<b>COT</b>	Capacidade Oxidante Total
<b>CAT</b>	Capacidade Antioxidante Total
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>ST</b>	Sangue total
<b>Sag-M</b>	Solução de Manitol
<b>HT</b>	Hematócrito
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>VCM</b>	Volume Corpuscular Médio
<b>HCM</b>	Hemoglobina Corpuscular Média
<b>CHCM</b>	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
<b>RDW</b>	Amplitude de distribuição do Eritrócitos



## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM- coleta aproximadamente 60.000 bolsas de sangue por ano com as quais abastece todo o Estado do Amazonas. A bolsa de concentrados de hemácias (CH) é o componente sanguíneo mais utilizado no mundo. Dependendo do anticoagulante e solução aditiva, tem validade de até 42 dias quando armazenada  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Todavia, os eritrócitos continuam seu metabolismo de forma lenta, sofrendo neste ambiente adverso, danos em sua morfologia e produção de energia, podendo desencadear o processo de Lesão Celular. **OBJETIVO:** Analisar em dias alternados (7 a 7 dias), dados bioquímicos, hematológicos e moleculares na tentativa de verificar alterações indicativas para aumento do estresse oxidativo em Bolsas doadas e devolvidas para a FHMAOM. **RESULTADOS:** Do total de 60 bolsas analisadas, 48 (80%) foram do sexo masculino. A idade média dos voluntários para o sexo masculino foi de  $34\pm 11,35$  e  $32\pm 10,23$  anos para o feminino. O grupo sanguíneo mais frequente em ambos os gêneros foi o “O” RhD positivo, acima de 48%. Apesar de não encontramos diferenças significativas, as bolsas de sangue devolvidas ao hemocentro apresentam aumento dos níveis dos marcadores do estresse oxidativo e hemólise, além de outras variações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos em comparação com as bolsas que foram estocadas No hemocentro. Como era de se esperar, os dados hematológicos, apesar da leve diminuição nos valores, diferenças significativas não foram demonstradas nas análises do 1º até o 42º dia. Valores séricos para glicose e Sódio, apresentaram diminuição significativa ( $p<0,001$ ;  $P=0,023$ , respectivamente), enquanto para sódio, magnésio e LDH, aumento significativo ( $p<0,017$ ;  $p=0,029$ ;  $p<0,001$ , respectivamente). Todos os marcadores para o estresse oxidativo apresentaram diferenças significativas ao longo de cada análise, com aumento para capacidade oxidante (ROS), peroxidação lipídica/hemólise (TBARS), enquanto diminuição para capacidade antioxidante (ABTS) (todos com  $p<.001$ ). **CONCLUSÃO.** As diferenças encontradas nos parâmetros analisados entre as bolsas da que ficaram no hemocentro e as devolvidas de outras agências podem ser explicadas pelo transporte e/ou acondicionamento fora da temperatura ideal, o que resultou no aumento das lesões eritrocitárias. Poucas variações foram demonstradas com significância estatística entre os 14 primeiros dias, indicando talvez que os eritrócitos são capazes de atenuar o aumento do estresse oxidativo neste período. Além disso, verificamos a elevação do TBARS como resultado da peroxidação lipídica, sendo influenciado pela presença de heterozigose como maior força de associação para homozigotos nos SNPs rs1695 (Ile105Val) e rs1871042 (442-16C> T) para o gene GSTP1 e SOD rs4880 (Ala16Val). Acreditamos que a melhor compreensão dos fatores endógenos e exógenos que afetam o status oxidativo nas bolas de sangue, incluindo fatores genéticos são importantes para a compreensão da oxidação no armazenamento de sangue, a fim de melhorar os resultados clínicos nas transfusões de sangue.

Palavras chave: Estresse oxidativo, Superóxido dismutase; GSTP1 SNPs

## Sumário

1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
1.3.	DOAÇÃO DO SANGUE.....	14
1.4.	SELEÇÃO DO DOADOR .....	15
1.5	PRESERVAÇÃO DO SANGUE .....	16
1.6	SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS .....	17
1.7	ARMAZENAMENTO DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS .....	21
1.8	DISTRIBUIÇÃO DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS .....	22
1.9	DEVOLUÇÃO DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS .....	23
1.10	LESÕES DE ARMAZENAMENTO .....	23
1.11	ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
1.12	DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
1.13	MUTAÇÕES/POLIMORFISMOS DOS GENES RELACIONADOS COM O ESTRESSE OXIDATIVOS.....	26
<b>1.14</b>	<b>IMPACTO NA TRANSFUSÃO SANGUÍNEA .....</b>	<b>28</b>
1.15	CONTROLE DE QUALIDADE NOS CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS..	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>32</b>
3.	OBJETIVO GERAL.....	34
3.1	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	34
4.	METODOLOGIA.....	35
4.1	TIPO DE ESTUDO.....	35
4.2	POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA .....	35
4.4	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	36
4.5	INFORMAÇÕES ÉTICAS E FINANCIAMENTO .....	36
4.6	AMOSTRAS.....	37

	11
4.7 MÉTODOS LABORATORIAIS.....	37
4.7.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	37
4.7.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	38
4.7.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	38
4.7.4 DETERMINAÇÕES DA HEMOGLOBINA LIVRE.....	39
4.7.5 DETERMINAÇÕES DO PERCENTUAL DE HEMÓLISE.....	40
4.7.6 QUANTIFICAÇÃO DO TBARS.....	40
4.7.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT) .....	41
4.8 ENSAIOS MOLECULARES.....	42
4.8.1 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	42
4.8.2 GENOTIPAGEM.....	42
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5.1 DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	43
5.2 ANÁLISE DE VARIÁVEIS QUALITATIVAS OU CATEGÓRICAS.....	44
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
6.1 ARTIGO 01.....	45
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
7.1 ARTIGO 02.....	69
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	93

## INTRODUÇÃO

O concentrado de hemácias é um componente sanguíneo derivado da doação de uma bolsa de sangue, no Brasil o ato de doar sangue é regulamentado pela portaria 158 de fevereiro de 2016, dentre vários pré-requisitos estabelecidos pela portaria o Art. 30 determina que a doação deva ser voluntária, anônima e altruísta não devendo o doador ser remunerado por esta ação. Após a doação, o sangue total é submetido ao processo de centrifugação afim de que sejam separados os componentes sanguíneos: Concentrado de Hemácias (CH), Concentrado de Plaquetas (CP) e Plasma Fresco Congelado.

A transfusão de concentrado de hemácias é um dos procedimentos terapêuticos mais realizados em hospitais como objetivo de tratar ou prevenir a hipóxia tecidual em pacientes que apresentam condições de grande perda de sangue, assim como em alguns com a produção da medula óssea comprometida.

As bolsas de concentrados de hemácias podem ser armazenadas por até 42 dias em condições ideais, deste modo os hemocentros mantem maiores estoques dispondo sempre que necessário do produto. Entretanto, durante o armazenamento prolongado os eritrócitos sofre deformidade em sua estrutural prejudicando a realização de sua função *in vivo*. Este processo é chamado de lesão de estoque/armazenamento.

Estudos sugerem que a transfusão de concentrado de hemácias que permaneceram estocadas por muito tempo, podem comprometer a segurança e a eficácia da terapia transfusional devido a tais lesões.

Baseado no exposto, este trabalho teve como proposta descrever as lesões sofridas nas bolsas de concentrados de hemácias estocadas e distribuídas do HEMOAM (hemocentro Coordenador) na tentativa de contribuir com o uso racional do sangue.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2. O ERITRÓCITO

Os eritrócitos foram transformados pelas forças evolutivas em uma célula altamente especializada, tendo como missão o fornecimento de oxigênio dos pulmões aos tecidos do corpo, as hemácias são células anucleadas, contendo em sua membrana lipídeos e proteínas, apresentando no seu interior uma maquinaria especializada e direcionada a manutenção da função da hemoglobina; essas células são capazes realizar mudanças extremas em sua forma, devido à sua flexibilidade podem facilmente espreme-se através de capilares muito mais estreitos que o seu diâmetro e voltar rapidamente a sua forma original<sup>1</sup>.

Os eritrócitos maduros tem a forma de um disco bicôncavo com um diâmetro de 8 microns e uma espessura de 2 microns, podendo durar em média de 120 dias, devido à ausência do núcleo, mitocôndrias e outras organelas os eritrócitos perderam a capacidade de sintetizar aminoácidos e ácidos graxos desta forma a capacidade de metabolismo fica limitada, sendo continuamente removidos da circulação e para manter o número adequado, eles são regularmente formados a partir da medula óssea de acordo com a taxa de remoção pelo sistema reticulo-endoteliais<sup>1,2</sup>.

Os eritrócitos possuem um metabolismo relativamente simples, utilizando a glicose para gerar energia na forma de Adenosina Trifosfato (ATP) e potencial redutor na forma de NADH e NADPH, normalmente 90% da glicose é metabolizada ao longo da Via anaeróbica de Embden-Meyerhof e 10% metabolizada aerobicamente ao longo

da Via das pentoses, reduzindo o NADPH necessário às reações das várias vias biosintética, além de proporcionar a estabilidade da catalase e regeneração do glutathione redutase (GSH), a glicólise ocorre dez vezes mais lentamente a 3°C do que a 25°C o que acelera o consumo de nutrientes<sup>3,4,5</sup>.

Durante o armazenamento das bolsas de sangue os eritrócitos sofrem mudança na sua morfologia evoluindo de discos bicôncavos para esferas irregulares chamados equinócitos, este processo está associado com a diminuição do pH e da concentrações de ATP, apresentando aumento das concentrações de cálcio. No início do armazenamento estas mudanças são reversíveis, mas tornam-se irreversíveis após 42 dias de armazenamento<sup>4,5,6</sup>.

### 1.3. DOAÇÃO DO SANGUE

Mundialmente, a maioria dos países depende de doação voluntária de sangue para garantir um estoque suficiente. Os serviços de doação de sangue muitas vezes lutam para atender uma demanda flutuante, caracterizando a doação de sangue bem como a manutenção dos estoques um dos grandes desafios desse século<sup>7</sup>.

No Brasil a doação de sangue é regida pela Lei nº 10.205, de 21 de março de 2001. Que “Regulamenta o § 4º do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução adequada dessas atividades, e dá outras providências”<sup>8</sup>.

A portaria nº 158, de 04 de fevereiro de 2016. “Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos”<sup>9</sup>.

No entanto, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em média, para cada 1000 habitantes em países com alta renda ocorrem aproximadamente 36,8 doações, enquanto 11,7 em países de renda média e de 3,9 doações em de baixa renda <sup>7</sup>.

Apesar dos esforços para aumentar o recrutamento de doadores, no Brasil às taxas de doação estão abaixo do desejável, variando nos anos de 2006 a 2012, 2 a 7%, respectivamente <sup>10</sup>.

No Estado do Amazonas é coletado aproximadamente 60.000 (sessenta mil) bolsas de sangue por ano, caracterizando o percentual de 1,5% de bolsas coletadas se relacionadas com a população do Estado e 2,94% se considerado apenas a população da Capital.

As coletas são realizadas no hemocentro coordenador e na unidade fixa de coleta e campanhas utilizando a unidade móvel (ônibus).

#### 1.4. SELEÇÃO DO DOADOR

Os hemocentros realizam a captação dos candidatos à doação de sangue através de campanhas televisionadas, radio, nota em jornais, blog, envio de cartas, mensagem através de aplicativos e até mesmo campanhas em escolas e empresas <sup>7,10</sup>.

No entanto, após o candidato se sensibilizado com as campanhas e comparecer ao hemocentro ele é submetido a um rigoroso processo de triagem, a fim de selecionar apenas doadores saudáveis.

Os principais critérios de seleção para um candidato a doação de sangue são: ter documentos oficiais com foto, idade entre 16 e 69 anos, peso mínimo de 50 Kg, se do sexo masculino, ter hematócrito de no mínimo 39% e hemoglobina de 13,0 g/dl, enquanto no sexo feminino hematócrito mínimo de 38% e hemoglobina de 12,5 g/dl. O

volume admitido por doação é de 450 mL  $\pm$  45 mL, aos quais podem ser acrescidos até 30 mL para a realização de exames laboratoriais<sup>9</sup>.

Antes da coleta de sangue, é avaliada a história clínica e antecedente patológicos tais como: doenças infecciosas, virais, parasitárias, bacterianas, estilo de vida, situações de risco, histórico de cirurgias e procedimentos invasivos, história terapêutica recente em relação ao uso de medicamentos.

O candidato sendo aprovado nesses quesitos é encaminhado e atendido por profissionais treinados e supervisionado por um médico. A coleta de sangue será realizada em condições assépticas, em bolsas plásticas com sistema fechado e estéril contendo anticoagulante e o tempo de doação não deverá ser maior que 15 minutos. O produto final do processo da coleta é denominado sangue total (ST) que será imediatamente refrigerado a temperatura de  $22 \pm 2$  °C. Caso queira doar novamente, o intervalo mínimo entre doações deverá ser de três (03) meses para homens e quatro (04) meses para as mulheres. O doador que efetuou a sua primeira doação é definido como primo doador e o doador que já realiza mais que duas doações é definido como doador de retorno<sup>9</sup>.

## 1.5 PRESERVAÇÃO DO SANGUE

As primeiras transfusões sanguíneas eram necessárias que o doador estivesse ao lado do paciente para que o sangue doado fosse infundido o mais rapidamente possível através de seringas, funis ou anastomose<sup>10</sup>.

Rous & Turner (1915) desenvolveram a primeira solução para armazenamento de sangue com uma mistura de citrato e dextrose, com o citrato agindo na inativação da cascata da coagulação e a dextrose fornecendo energia aos eritrócitos. Somente na



década de 50 foi adicionado o ácido cítrico com o objetivo de baixar o pH da solução mantendo os eritrócitos viáveis por até 21 dias. Posteriormente foi desenvolvida a solução citrato fosfato dextrose (CPD), utilizando como tampão o fosfato inorgânico aumentando a produção de adenosina trifosfato (ATP), aumentando diretamente a viabilidade dos eritrócitos <sup>11</sup>.

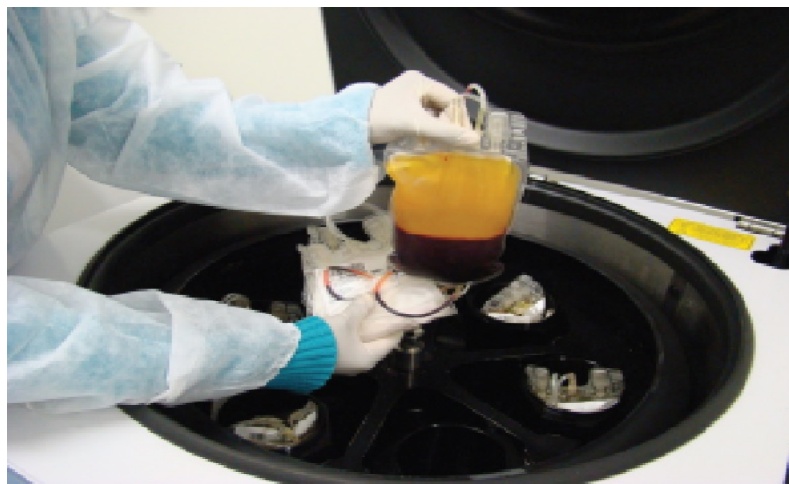
Em 1968 foi adicionada a adenina a solução de CPD passou a ser Citrato Fosfato Dextrose Adenina (CPDA<sup>1</sup>) elevando o período de armazenamento dos eritrócitos para até 35 dias. Em 1980, na tentativa de proporcionar um volume adicional e nutriente para um armazenamento mais longo aos concentrados de hemácias, foi adicionada Salina, Adenina, Glicose e Monitol (SAG-M) elevando o período de armazenamento dos eritrócitos para até 42 dias <sup>5,7,11,12</sup>.

## 1.6 SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS

Componentes sanguíneos e hemoderivados são produtos distintos. A separação dos Componentes sanguíneos é obtida por meio de centrifugação do sangue total. Através da densidade e tamanhos das células sanguíneas é possível realizar a separação do sangue total em concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas, plasma fresco, crioprecipitado e concentrado de granulócitos <sup>9</sup>.

O sangue total (ST), é armazenado em temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por um período de duas (02) horas a fim de promover a desagregação das plaquetas que ocasionalmente aderem ao plástico da bolsa. Após esse período, a bolsa de sangue total é centrifugada a 2750 RPM's por 4 minutos em temperatura de  $22^{\circ}\text{C}$  sedimentando as hemácias na parte inferior da bolsa (figura 01) <sup>9,13,14</sup>.

**Figura 1 – Bolsa de sangue total após centrifugação mostrando a sedimentação das hemácias antes da extração do plasma.**



Fonte: Manual para controle de qualidade do sangue total e hemocomponentes

O plasma sobrenadante é extraído através de extratores semi-automatizados (figura 02).

**Figura 2 Extração do plasma em extrator semi-automatizado.**



Fonte: Acervo pessoal

Após a extração do plasma é obtido dois produtos; o concentrado de hemácias (CH) constituído fundamentalmente por eritrócitos e em uma bolsa-satélite o plasma rico em plaquetas (PRP) (figura 03).

Para obter as plaquetas é necessário que o PRP seja centrifugado a 3530 RPM durante 12 minutos em temperatura de 22°C. Após o processo de centrifugação é realizado uma nova extração do plasma sobrenadante para uma outra bolsa deixando as plaquetas sedimentadas na bolsa primaria. Com este processo é obtido o concentrado de plaquetas (CP) e o Plasma Fresco que será congelado dando origem ao plasma fresco congelado (PFC) <sup>13,14,15</sup>.

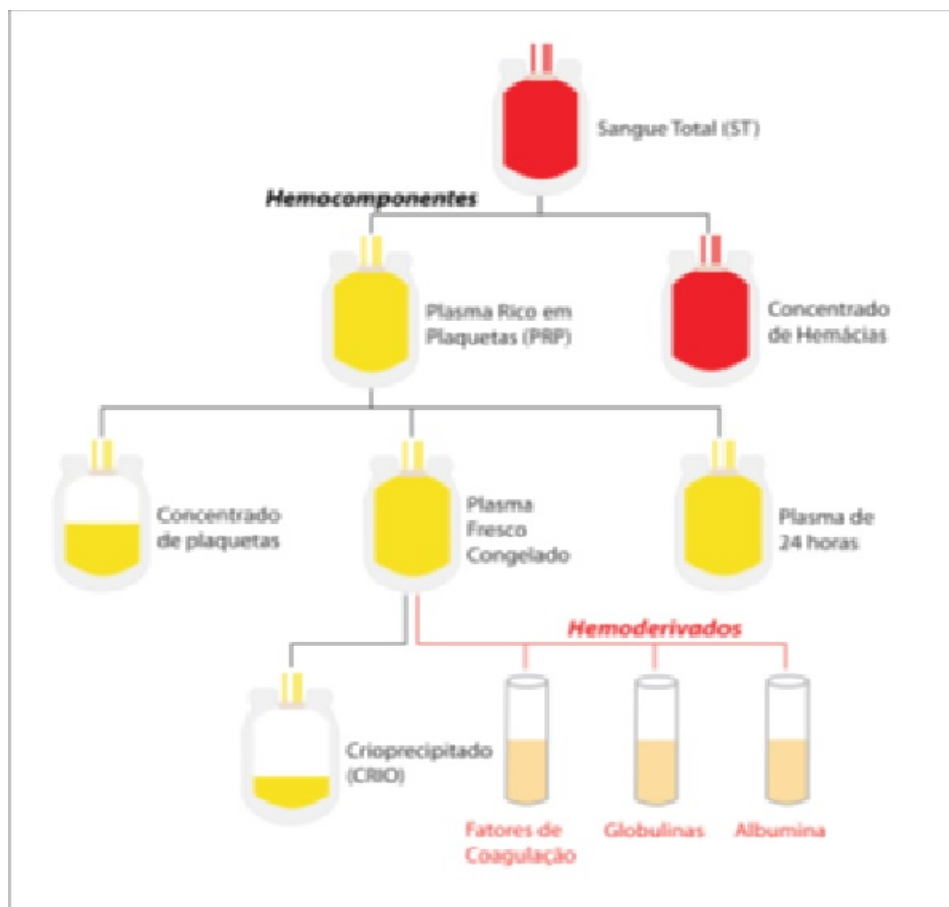
A figura 04 demonstra resumidamente as fases da produção dos hemocomponentes e alguns hemoderivados.

Figura 3 Bolsa com PRP e o CH respectivamente



Fonte: Manual para controle de qualidade do sangue total e hemocomponentes

Figura 4 Fases da produção dos componentes sanguíneos



Fonte: Manual para controle de qualidade do sangue total e hemocomponentes

## 1.7 ARMAZENAMENTO DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS

Após o processo de separação dos componentes sanguíneos eles são colocados em quarentena à espera da liberação dos resultados dos testes de sorologia, ácidos nucleicos (NAT) e tipagem sanguínea.

O concentrado de hemácias deve ser armazenado em temperatura de  $4\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>10</sup>.

O concentrado de plaqueta devem ficar a temperatura ambiente  $22\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  sob agitação constante.

O plasma fresco congelado deve ser armazenado a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nessa temperatura tem validade de dois anos<sup>9</sup>.

O armazenamento é realizado em duas câmaras frigoríficas. Uma para armazenar o concentrado de hemácias ( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e outra para o plasma fresco congelado ( $-30^{\circ}\text{C}$ ). As câmaras são monitoradas a cada 15 minutos via sistema informatizado e manualmente através de planilhas de quatro em quatro horas.

Os resultados dos testes sorológicos, NAT, Imuno-hematologia são lançados no sistema informatizado **HEMOSYS**, essas informações capacitam o setor de rotulagem para realizar a liberação dos componentes sanguíneos, as bolsas são checadas individualmente no sistema e estando com todos os testes aptos é impresso um rótulo para cada bolsa constando o nome e código do produto, número da bolsa, tipagem sanguínea, fator Rh, fenotipagem, data da coleta, validade e exames sorológicos realizados, conforme figura 05.

A bolsa rotulada está apta para ser enviada à agência transfusional e se necessária transfundida.

**Figura 5 Bolsa de concentrado de hemácia rotulada**



Fonte: Acervo pessoal

## 1.8 DISTRIBUIÇÃO DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS

O hemocentro coordenador abastece 27 agências transfusionais na Capital e 52 nos Municípios.

As agências da capital diariamente entram em contato (via telefone) diretamente com o setor de distribuição informando a quantidade de concentrados de hemácias em seu mini-estoque e sua necessidade, havendo disponibilidade de CH à agência envia documento solicitando o componente sanguíneo. O setor de distribuição libera as bolsas de CH requisitadas previamente acondicionadas em caixas térmicas a temperatura de 1 a 10°C, o transporte da caixa é realizado por automóvel (ambulância, moto, carro de passeio).

As agências dos Municípios quando necessitam de CH entram em contato com o setor de Interiorização este disponibiliza as bolsas em caixas térmicas a temperatura de 1 a 10°C, o transporte dessas caixas é realizado via rodoviária (ônibus), via fluvial (barco/lanchas) ou por avião.

## 1.9 DEVOLUÇÃO DOS COMPONENTES SANGUÍNEOS

Eventualmente algumas bolsas de sangue que estão dentro do prazo de validade e não foram utilizadas pelas agências transfusionais são devolvidas.

Em 2015, segundo dados do HEMOSYS 5.000 (cinco mil) bolsas de CH foram devolvidas, representando 8,3% do total de bolsas coletas.

As bolsas que chegam ao hemocentro são reintegradas ao estoque se atenderem os critérios de aceitação definidos pela portaria 158 no artigo Art. 189 “Os componentes liberados para transfusão, mas não utilizados, podem ser reintegrados ao estoque se as condições de transporte e armazenamento forem conhecidas e adequadas, sendo que tais componentes devem ser submetidos à inspeção visual antes da reintegração”<sup>10</sup>. Desta forma as bolsas reintegradas ao estoque são novamente enviadas para outras agências transfusionais.

## 1.10 LESÕES DE ARMAZENAMENTO

A coleta e armazenamento do sangue são necessários para fornecer produtos sanguíneos a pronto emprego. A regulamentação atual permite o armazenamento das hemácias por até 42 dias, o que é considerado seguro<sup>15</sup>. Apesar das estritas diretrizes internacionais para a coleta e conservação de sangue, existe um consenso geral de que uma das consequências adversas é que, em média, aproximadamente 25% dos glóbulos vermelhos transfundidos sejam eliminadas da circulação sanguínea após 1 a 2 horas da transfusão. Além disso, estipula-se que um percentual ainda maior dessas hemácias

transfundidas seja eliminado da circulação devido à ativação dos macrófagos esplênicos<sup>15,16</sup>.

Embora este tema tenha sido largamente discutido, nenhuma evidência definitiva até agora tem sido comprovado mediante aos dados de ensaios clínicos prospectivos. Por outro lado, estudos *in vitro* sustentam a hipótese de que o sangue não deve ser usado após os 14 dias, devido aos progressivos danos sofridos pelas hemácias, investigações laboratoriais vem documentando varias alterações ocasionadas durante o armazenamento, as alterações visíveis incluem a perda da morfologia e maleabilidade, formação de espículas eritrocíticas, fragilidade osmótica, As alterações químicas já descritas incluem o consumo de glicose, acúmulo de ácido láctico, perda de potássio, ganho de cálcio, perda de óxido nítrico (NO) e decréscimos nas concentrações de adenosina 5'-trifosfato (ATP) e 2,3-difosfoglicerato (DPG). Além destas, lesões oxidativas a proteínas membranares e aos lipídios e carboidratos, diminuem sua habilidade para fornecer oxigênio e sua flexibilidade<sup>16,17,18</sup>.

Apesar de possuírmos uma compreensão mais profunda dos mecanismos moleculares que conduzem envelhecimento dos concentrados de hemácias, novas estratégias de armazenamento para prolongar a vida útil das hemácias são necessárias, Infelizmente mecanismos envolvendo o estresse oxidativo têm sido apenas parcialmente descritos<sup>16,17</sup>.

### 1.11 ESTRESSE OXIDATIVO

O radical livre é um átomo, molécula ou composto que é altamente instável devido à sua estrutura atômica ou molecular. Como resultado, os radicais livres são muito reativos à medida que tentam emparelhar-se com outras moléculas para criar um



composto estável. Para alcançar um estado mais estável, os radicais livres podem "roubar" um átomo de hidrogênio de outra molécula, também podem se ligar a outra molécula ou interagir de várias maneiras com outros radicais livres, um elemento químico frequentemente envolvido na formação de radicais livres é o oxigênio<sup>18,19</sup>.

Por tanto, o estresse oxidativo é o resultado da produção exacerbada de radicais livres durante a redução do oxigênio, produzindo assim as espécies reativas de oxigênio (ROS) superóxido (O<sub>2</sub>•), hidroxila (OH•), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dentre outros<sup>19</sup>.

A oxidação é uma constante da via aeróbica e do metabolismo celular, desta forma os radicais livres são gerados espontaneamente ou devido há alguma falha biológica ocasionando o desemparelhamento de elétrons, porém o excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA<sup>20</sup>.

Os eritrócitos armazenados nas bolsas de concentrados de hemácias são mais suscetíveis a danos oxidativo, pois eles contêm altas concentrações de oxigênio intracelular e comumente produz espécies reativas de oxigênio, e a eficácia dos seus mecanismos antioxidantes tentem a diminuir à medida que as reservas de energia da célula durante o armazenamento diminuem<sup>20,21</sup>.

Os ROS podem danificar as hemácias prejudicando sua função. Para minimizar o efeito dessas ROS e o stress oxidativo resultante, os eritrócitos contam com um amplo sistema antioxidante<sup>21</sup>.

A superóxido-dismutase (SOD) é uma enzima que catalisa a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> tendo como iniciador o radical superóxido:  $2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ .

A glutathione peroxidase exerce o papel principal no sistema que controla os níveis de peroxidase celular, usando como catalisando o agente redutor glutathione (GSH), reduzindo o peróxido de hidrogênio em água<sup>22</sup>.

A catalase contém heme e emprega o peróxido de hidrogênio para oxidar substâncias sendo esta a primeira linha de defesa do eritrócito.

A glutathione reduzida (GSH) é uma molécula anti-oxidante importante no entanto a quantidade de GSH presente nos eritrócitos diminui após 14 dias de armazenagem, enquanto que a glutathione oxidada (GSSG) aumenta e conseqüentemente o dano oxidativo é maior<sup>23,24</sup>.

Uma das conseqüências de um processo de estresse oxidativo é o aumento da peroxidação lipídica causada por um ataque de radicais livres sobre os lipídios das membranas celulares. Uma das substâncias geralmente medidas como um marcador para o estresse oxidativo é o malondialdeído (MDA). A medição do MDA, o produto mais abundante decorrente da peroxidação lipídica, tem sido amplamente utilizada como índice de estresse oxidativo<sup>25,26</sup>.

### 1.13 MUTAÇÕES/POLIMORFISMOS DOS GENES RELACIONADOS COM O ESTRESSE OXIDATIVOS.

A pesquisa genética fornece uma nova visão quando aplicado à fisiopatologia de doenças complexas. Genes que possam determinar a susceptibilidade de doenças podem ser identificados por estudos genéticos, fornecendo novos *insights* sobre a patogênese de doenças<sup>27</sup>.

Polimorfismo de nucleotídeo único ou polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) são substituição/troca, de uma única base nitrogenada, ocorrendo variação na

sequência de DNA somente em uma base adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G) na sequência do genoma. Ocorrem geralmente de erros da DNA polimerase durante a duplicação/replicação do DNA durante a divisão celular<sup>28</sup>.

Os SNPs podem constituir em até 90% de todas as variações genômicas humanas, ocorrendo em média, entre uma vez a cada 300 bases, o que significa que existam cerca de 10 milhões de SNPs no genoma humano. Além de poder acarretar mudanças morfológicas, essas variações na sequência do DNA podem influenciar a resposta dos organismos a doenças, bactérias, vírus, produtos químicos, e fármacos<sup>29,30</sup>.

Além disso, os SNPs podem atuar como marcadores biológicos, ajudando a localizar genes que estão associados a determinadas doenças. Quando um SNP ocorre dentro de um gene ou em sua região promotora, este pode desempenhar papel direto na doença por afetar a função do gene<sup>31,32</sup>

O gene da Catalase (CAT) está localizado no cromossomo 11p13 e muitos estudos têm como objetivo relacionar a substituição na posição C-262T. Este SNP é encontrado dentro da região promotora e a mutação reside na sequência do 5' não traduzida, o que aumenta sua expressão, e se correlaciona com níveis de catalase no sangue. CAT está presente em todas as células aeróbicas. No entanto, os níveis mais elevados da enzima são encontrados no fígado, nos rins e eritrócitos<sup>33</sup>. A ausência desta enzima torna os eritrócitos mais susceptíveis à lesão celular.

O polimorfismo da GSTP1 foi descrito pela primeira vez no cromossomo 11q13, e constataram uma transição do nucleotídeo 313 (A → G) no éxon 5 e outra no nucleotídeo 341 (G → T) no éxon 6, envolvendo a substituição de dois aminoácidos no sítio 28 de atividade da enzima (Ile → Val). Essa variação alélica parece reduzir a atividade de GSTP1 em muitos tecidos, assim como a capacidade de inativar compostos

mutagênicos, indicando o envolvimento dessa enzima na suscetibilidade para cânceres<sup>34</sup>.

A superóxido dismutase (SOD) compõe o sistema primário de defesa enzimática contra estresse oxidativo. A superóxido dismutase mitocondrial (SOD2) protege o organismo do estresse oxidativo convertendo o ânion superóxido  $O_2^-$  para o menos tóxico  $H_2O_2$ <sup>35</sup>. O SNP Ala16Val no gene da SOD2 é uma mutação que reduz a expressão da proteína e produz mRNA instável, o que afeta a entrada da proteína na mitocôndria, reduzindo sua atividade<sup>35</sup>. Levando em consideração que as hemácias realiza sua produção de energia a partir da glicólise sendo necessário verificar se o SNP Ala16Val irar impactar nas hemácias estocadas.

#### **1.14 IMPACTO NA TRANSFUSÃO SANGUÍNEA**

Nos últimos anos, tem havido debates calorosos em relação à questão fundamental da medicina transfusional: até que ponto os eritrócitos armazenados mantem a sua função<sup>36</sup>. Será que estas células desformes prejudicam o fluxo sanguíneo e a oxigenação dos tecidos durante ou após a transfusão de sangue? Segundo Raat e colaboradores é difícil de responder e dependerá da deformabilidade do eritrócito ser reversível ou a capacidade do corpo para remover essas células<sup>37</sup>.

Os efeitos fisiológicos da exposição e as mudanças bioquímicas que ocorrem em um concentrado de hemácia armazenado podem ser muito diferentes e dependendo da patologia do receptor da transfusão podem causar prejuízos ao paciente. (por exemplo, pacientes atendidos em urgência, pacientes com doença falciforme, pacientes internados na unidade de terapia intensiva, os pacientes submetidos à cirurgia cardíaca)<sup>38</sup>.

No entanto, as implicações médicas caudas aos pacientes que por ventura receberem transfusões de sangue mais antigas são bastante controversas, esse tema polemico vem dividindo opiniões de especialistas em todo o mundo. Em estudos retrospectivos foram analisados que a taxa de mortalidade é maior em pacientes que receberam sangue com mais tempo de estocagem (sangue velho)<sup>39</sup>. No entanto, há discordância nos resultados desses estudos<sup>40</sup>, porém, medidas vêm sendo adotadas por alguns países afins de melhor gerenciar o tempo de estocagem das bolsas de eritrócitos, por exemplo: o Japão desde 1995 adotou o tempo máximo de permanência das bolsas em estoque de 21 dias precavendo-se de contaminação bacteriana<sup>40</sup>. O Reino Unido e a Holanda restringiram para 35 dias o tempo máximo de estoque do concentrado de hemácias, apesar de serem conservados em soluções aditivas que garantam sua viabilidade por até 42 dias<sup>41</sup>.

J. D. Roback e colaboradores<sup>42</sup>, realizaram uma pesquisa com os participantes da reunião anual da Associação Americana de Banco de Sangue (AABB). A pesquisa compreendeu perguntas destinadas a reunir informações sobre as opiniões máximas duração do armazenamento do concentrado de hemácias (dentre outras perguntas). Quase todos os participantes (96,9%) concordaram que há necessidade de minimizar ou reverter às mudanças que ocorrem ao longo do tempo em bolsas de sangue armazenadas (lesão de estoque), No entanto, 79,7% também concordaram que a pesquisa não demonstra consistentemente que as transfusões de sangue com maior tempo de armazenamento conduzam a piores resultados quando comparados com o sangue mais novo. Embora 65,1% dos entrevistados concordaram que a duração do armazenamento de sangue antes do uso é uma preocupação maior entre os profissionais médicos especialistas da medicina de transfusão, 81,3 % concordaram que a maioria das

instituições não está buscando medidas para reduzir a idade do sangue armazenado no momento da transfusão.

Klein e colaboradores<sup>43</sup>, realizaram um estudo em dois grupos de cães com pneumonia induzida, em um grupo administraram transfusão de sangue com até cinco dias de coleta (sangue novo) e em outro grupo sangue com 42 dias de armazenamento (sangue velho), observou-se que nos animais que receberam transfusão com sangue velho a taxa de mortalidade foi maior que no outro grupo, esses dados corroboram com estudos de meta análises realizados em pacientes humanos, no entanto, por força de ética não é possível realizar estudos desse porte com paciente sem expor a vida humana. Toda via, é de fundamental importância compreender e prevenir possíveis danos aos pacientes que utilizam de terapêutica transfusional.

### **1.15 CONTROLE DE QUALIDADE NOS CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS**

Como já foi debatida anteriormente, a coleta das bolsas de sangue em todo o mundo é padronizada a fim de manter a qualidade, porém ao contrário de um produto químico farmacêutico, no qual todas as matérias-primas e formulações são definidas com precisão, na coleta do sangue não é possível alcançar esse mesmo nível de acurácia. Considerando que a variação de lote a lote do produto químico é mínima, cada doador de sangue é biologicamente único. Além disso, ao contrário da indústria farmacêutica, em que cada lote de fármaco é testado antes da liberação, isso não ocorre com os componentes sanguíneos. Mesmo assim, com a tranquilidade proporcionada pelo rigoroso controle regulatório da produção de componentes sanguíneos, houve uma tendência para ignorar o possível impacto da variabilidade dos componentes gerados da doação de sangue e nos resultados de transfusão.

O processamento e armazenamento das bolsas de sangue são regulados para garantir a qualidade do produto, assim como à segurança do paciente. As especificações dos produtos são definidas por agências governamentais<sup>9,13</sup>. No Brasil a agência regulamentadora é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Definindo as normas através da portaria 158 que determina que os serviços de hemoterapia realizem o controle de qualidade sistematicamente em 1% ou dez unidades (o que for maior) mensalmente nos concentrados de hemácias que produzem, cujo índice de conformidade mínimo aceitável de 75% das amostras testadas<sup>10</sup>. Os testes e valores esperados para o controle de qualidade do concentrado de hemácias são mostrados na tabela 01.

**Tabela 1 Parâmetros para Controle de Qualidade no Concentrado de Hemácia**

Análises	Valores esperados
Teor de hemoglobina	maior que 45g/unidade
Hematócrito	50 a 80% *
Grau de hemólise	menor que 0,8% da massa eritrocitária (no último dia de armazenamento)
Microbiológica	Negativa

\* O hematócrito esperado depende do tipo de solução preservativa utilizada na bolsa, sendo de 50 a 70% para os concentrados de hemácias com soluções aditivas e de 65 a 80% para com CPDA-1.

OBS.: deve ser realizado controle de qualidade em, pelo menos, 1% da produção ou 10 unidades por mês (o que for maior).

Fonte: Portaria 158, de 04 de Fevereiro de 2016.

O laboratório de controle de qualidade de hemocomponentes realiza diariamente testes nos concentrados de hemácias totalizando 40 unidades mensalmente. Os testes são realizados apenas nas bolsas que ainda não foram distribuídas.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Devido à portaria solicitar apenas a realização de inspeção visual nas bolsas devolvidas é no ano de 2015 8,3% das bolsas coletadas foram devolvidas. Observamos a necessidade de analisar o impacto causado aos eritrócitos das bolsas de CH, pois em sua grande maioria são reintegradas ao estoque e reenviadas para outras agências transfusionais, considerando que as hemácias já sofrem lesão permanecendo em ambiente controlado, levantamos a hipótese de que nas bolsas devolvidas devido ao seu constante deslocamento a lesão deve ser maior. Embora já esteja bem descrita na literatura às lesões causada as hemácias estocadas, ainda não foi realizado trabalhos nesta Fundação que corroborem com o descrito. Para tanto, avaliaremos a morfologia celular uma vez que as hemácias saudáveis apresentam-se na forma de disco bicôncavo e quando armazenadas adquirem forma de espiculas prejudicando sua maleabilidade limitando o fornecimento de oxigênio aos tecidos. Dosaremos o potássio, pois quanto mais tempo às hemácias permanecem a baixas temperaturas acontece o extravasamento deste íon para o meio externo podendo prejudicar o paciente que porventura receberá esta transfusão, da mesma forma é necessário dosar o cálcio, pois o excesso deste íon na célula torna sua membrana mais rígida. As enzimas envolvidas no estresse oxidativo catalase, Glutathionas S-transferase, superóxido dismutase, devido à redução de sua atividade pode potencializar a lesão celular nas hemácias em condições de



armazenamento e levando em consideração que não sabemos o perfil genético dos nossos doadores de sangue no que se refere a essas enzimas optamos por realizar testes de biologia molecular desta forma poderemos observar se há polimorfismos e consequentemente verificar se nestes doadores há um percentual maior de lesão em suas hemácias. Com o resultado deste trabalho poderemos contribuir com a segurança transfusional validando a reintegração das bolsas e sua eventual disponibilidade para outra agência ou declarando essas bolsas inaptas para a reintegração baseada nas lesões verificadas nas bolsas evitando assim maiores consequências para os pacientes e eventuais custos com sua permanência hospitalizados.

### 3. OBJETIVO GERAL

Identificar as alterações bioquímicas, hematológicas e morfológicas e interpretar o perfil molecular de marcadores indicativos de estresse oxidativos importantes em Bolsas de Concentrado de Hemácias doadas e devolvidas para Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

#### 3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Descrever as alterações nos valores e índices hematológicos e bioquímicos nas Bolsas de Concentrados de hemácias;
- Verificar o perfil antioxidante/oxidante plasmático e correlacionar com marcadores para estresse oxidativo.
- Determinar a frequência dos polimorfismos nos genes P1 rs1695 (Ile105Val) e rs1871042 (442-16C>T), CAT rs1001179 (C-262T) and SOD rs4880 (Ala16Val);

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 TIPO DE ESTUDO**

Esta pesquisa é um estudo de natureza descritiva com grupos comparativos. As mostras foram coletas no período de janeiro a junho de 2017 no laboratório de controle de qualidade do hemocentro do Amazonas e realizados os testes hematológicos, as técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas no Laboratório de Análises Especializadas em hematologia e Biologia Molecular (LAEBM), os testes bioquímicos foram realizados no laboratório de atividade biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UFAM.

### **4.2 POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA**

Foram selecionadas bolsas de concentrado de hemácias doadas e estocadas no HEMOAM, assim como bolsas devolvidas das agências transfusionais e um grupo de sangue total de doadores.

A população de estudo foi dividida em três grupos da seguinte forma: Grupo 1 de bolsas estocadas por 42 dias no HEMOAM, grupo 2 bolsas que foram enviadas as agências transfusionais e monitoradas, grupo 3 (SAG-M) e 4 (CPDA<sup>1</sup>) bolsas devolvidas das agências,.

#### 4.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

##### 4.4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram consideradas aptas à inclusão as bolsas de concentrados de hemácias coletadas de doadores que passaram na entrevista clínica, e cujo tempo de coleta não excedeu 12 minutos sendo o volume coletado de  $450 \pm 50$  mL, as bolsas foram processadas no mesmo dias, e apresentaram resultados sorológicos negativos, assim como para hemoglobina S, as bolsas devolvidas estavam dentro do prazo de validade.

##### 4.4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas bolsas violadas, hemolisadas, irradiadas, lavadas e com resultado de microbiologia positivo e bolsas RhD – negativos.

#### 4.5 INFORMAÇÕES ÉTICAS E FINANCIAMENTO

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, conforme protocolo CAAE n° 67130417.0.0000.0009.

Este projeto recebeu recursos da Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), assim como recursos próprios e dos projetos ao qual este Programa de Pós-Graduação se inclui.

## 4.6 AMOSTRAS

As bolsas do grupo 1 foram selecionadas aleatoriamente no setor de processamento do sangue e posteriormente armazenadas em temperatura de 2 a 4 °C durante 42 dias, no decorrer dos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 foi retirada uma alíquota de 30 mL através do aparelho de conexão estéril.

Grupo 2 as bolsas foram selecionadas aleatoriamente no setor de rotulagem (bolsas com testes imuno-hematológicos, sorologia liberados) foi realizada a coleta de 30 mL, as mesmas foram distribuídas (enviadas) para três agências transfusionais sendo cinco bolsas para Manaus outras cinco para Manacapuru e cinco enviadas a São Gabriel da Cachoeira. As bolsas permaneceram nessas agências por 20 dias e retornaram para o HEMOAM, ao chegar, realizamos novamente a coleta de 30 mL de amostras.

As bolsas devolvidas para o HEMOAM ficaram distribuídas em dois grupos: grupo 3 (bolsas com SAG-M), grupo 4 (bolsas com CPDA<sup>1</sup>), o processo de coleta foi efetuado até 24 horas após a devolução através do aparelho de conexão estéril.

## 4.7 MÉTODOS LABORATORIAIS

### 4.7.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Foi realizado através do Sistema de Detecção Microbiana BacT/ALERT® 3D, sistema capaz de incubar, agitar e monitorar de forma contínua os meios, cujos frascos de cultura são descartáveis e contém um sensor que detecta dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como um indicador do crescimento de micro-organismos. Nas bolsas que permaneceram no HEMOAM foi coletada amostra no dia 0 e 42, nos CH devolvidos a

coleta foi realizada no dia da devolução. Nas bolsas do grupo 3, a coleta foi realizada antes do envio e após a devolução. A retirada 8 mL de amostra da bolsa de transferência foi efetuada em capela de fluxo e inoculadas no frasco de cultura, permanecendo no aparelho por sete (07) dias afim de detectar se positivo ou negativo, em caso positivo, o frasco foi encaminhado ao setor de microbiologia do HEMOAM para identificação do microrganismo.

#### 4.7.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Para análise do hemograma foi retirado 2 ml de amostra da bolsa de transferência e processado no aparelho eletrônico (ABX MICROS 60) que conta com a tecnologia de impedância e fotometria para quantificar e diferenciar as classes celulares no sangue total. Esse forneceu os valores de Hematócrito (HT), Hemoglobina (HB), Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Amplitude de distribuição dos Eritrócitos (RDW) assim como a contagem de plaquetas e leucócitos.

#### 4.7.3 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Foi retirado no tubo *Falcon* 15 ml de sangue da bolsa de transferência e centrifugado a 3500 rpm's por 10 minutos, após a centrifugação o sobrenadante foi devidamente separado (através de pipetas semiautomáticas) para um tudo de hemólise previamente identificado com o número da bolsa, e encaminhado para o setor de bioquímica do HEMOAM que através do aparelho *BIOCLIN 300*, cujo princípio das

análises é por colorimetria, Turbidez, método ISE. Realizou os testes listados abaixo conforme quadro 01.

**Tabela 2 Parâmetros bioquímicos testados nas bolsas de CH**

<b>Análises Bioquímicas</b>	
Glicose	Sódio
Lactato Desidrogenase	Potássio
Fósforo	Cálcio
Albumina	Magnésio
Fosfatase Alcalina	Proteínas Totais
Ureia	Creatinina
Amilase	pH

#### 4.7.4 DETERMINAÇÕES DA HEMOGLOBINA LIVRE

De posse do sobrenadante do tubo *Falcon* (14.7.3). Foi realizado à leitura no espectrofotômetro tendo como branco água destilada e a primeira absorbância (abs) a ser verificada foi a de 415 nm quando a leitura era menor que 1,5 realizamos as leituras nas absorbâncias de 370, 510 nm. Quando a leitura da abs 415 nm era maior que 1,5 utilizamos as abs de 510, 577 e 600 nm.

Em pregamos a fórmula de número 1 para a leitura em que a absorbância de 415 nm foi < 1,5. A fórmula de número 2 para os casos em que a absorbância de 415 nm foi maior que 1,5. <sup>14</sup>.

Fórmula 1:

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

$$Y = \text{abs}_{510} - X$$

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

Fórmula 2:

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

$$Y = \text{abs}_{577} - X$$

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

#### 4.7.5 DETERMINAÇÕES DO PERCENTUAL DE HEMÓLISE

A determinação do percentual de hemólise, dos CH foi realizada através da seguinte fórmula matemática: <sup>13</sup>.

$$\% \text{ hemólise} = \frac{(100 - \text{Ht}) \times \text{Hbl}}{\text{Hb}}$$

Onde:

Ht = hematócrito (%)

Hbl = hemoglobina livre (g/dl)

Hb = hemoglobina total (g/dl)

#### 4.7.6 QUANTIFICAÇÃO DO TBARS

A lipoperoxidação foi determinada pelo método de TBARS criado por ohkawa *et al.*, (1979), modificado por Draper & Hadley, (1990). O MDA é um produto final da lipoperoxidação, que em contato com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma um cromóforo de coloração rosado, sendo determinado através de espectrofotômetro. Adicionou-se 100 µL da amostra (Plasma) a 1 ml de solução contendo 400 µL de tampão ácido acético 1,3 M em HCl a 0,27 M, pH 3,4; 400µl TBA 0,8% e 200 µl de SDS 8,1%. A mistura foi em cubada em banho Maria a 95 °C por 60 minutos. Após a incubação, medimos a absorbância em 535 nm. A concentração de MDA total das amostras do



tecido foi determinada mediante utilização de uma equação da curva do padrão de MDA com 5 diluições (0,25; 0,5; 1; 2; 4  $\mu\text{mol/L}$ ).

#### 4.7.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)

Para esses testes seguimos o protocolo de Erel (2005) preparando uma solução de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico]) em água deionizada, seguida da adição de Persulfato de potássio 5mM que permaneceu em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 12-16 h antes da utilização. Em microplacas de 96 poços de fundo chato, serão adicionados 300  $\mu\text{L}$  do ABTS diluído e 10  $\mu\text{L}$  de soro para se calcular a concentração de CAT usando como padrão solução de 1mmol/L de Trolox® (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromano).

#### 4.7.8 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE OXIDANTE TOTAL (COT)

Esta determinação será realizada conforme o protocolo descrito por Erel (2005) e realizado em microplacas. Serão adicionados 35  $\mu\text{L}$  de soro cuja presença dessas moléculas oxidaram o ferro presente em 11  $\mu\text{L}$  de solução reagente de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25mM contendo: o-dianisidina dicloridrato 10mM + sulfato ferroso 5 mM, na presença de 225  $\mu\text{L}$  solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25mM contendo: xilenol laranja 150  $\mu\text{M}$ , NaCl 140 mM + glicerol 1,35M, pH 1,75. Após 4 minutos de incubação a 39°C, a leitura da absorbância ocorrerá no comprimento de onda de 560 nm em leitor de Elisa (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Couter). A concentração será calculada com base na curva padrão traçada com solução padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e os resultados do ensaio serão expressos em termos de  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equivalente/L.

## 4.8 ENSAIOS MOLECULARES

### 4.8.1 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCICOS

O DNA genômico foi extraído a partir de 300µL de sangue, utilizando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit, conforme instruções do fabricante.

Após a extração, o DNA foi armazenado a -70 °C para as posteriores análises moleculares.

### 4.8.2 GENOTIPAGEM

A determinação dos SNPs pela técnica qPCR foi realizada com o sistema TaqMan® e analisados através da plataforma StepOnePlus™ v. 2.0 (Applied Biosystems).

. A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 10uL/reação, contendo 5uL de 2x TaqMan Universal Master Mix, 0,200uL de 20x SNP Genotyping Assay, 2,800uL de água esterilizada, com 2 uL de DNA da amostra.

A tecnologia se baseia na medição da fluorescência durante as ciclagens, emitidas através de sondas específicas para cada genótipo. A quantidade de fluorescência emitida é proporcional à quantidade do produto da PCR e permite a monitorização da reação. A curva de PCR resultante é usada para definir a fase exponencial da reação, que é condição prévia para o cálculo do número de cópias produzidas (KLEIN, 2002).

**Tabela 3 . Sondas utilizadas para determinação dos SNP**

<b>Gene (polimorfismo)</b>	<b>Ref. SNP ID</b>
<b>GSTP1 (Ile105Val)</b>	<b>rs1695</b>
<b>GSTP1 (442-16C&gt; T)</b>	<b>rs1871042</b>
<b>CAT (C-262T)</b>	<b>rs1001179</b>
<b>SOD (Ala16Val)</b>	<b>rs4880</b>

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os softwares utilizados para as análises estatísticas foram: IBM SPSS *Statistics* para *Windows*, Versão 22.0.; *GraphPad Prism* versão 5.00 para *Windows* e Epi Info™ 7.1.5.2.

### 5.1 DISTRIBUIÇÃO DAS VARIÁVEIS

A análise de normalidade da distribuição das variáveis foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir desta informação foram utilizados os testes paramétricos ANOVA ou não-paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de categorias. Além disso, foi verificado a diferença entre as médias dos valores e foram observadas diferenças significativas conduzidas de múltiplas comparações de médias através do teste de Bonferroni (ou post-hoc). O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para as distribuições fora do normal.

## 5.2 ANÁLISE DE VARIÁVEIS QUALITATIVAS OU CATEGÓRICAS

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Nas análises de valores inferiores a 4, estas foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Foram calculadas os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência dessas variáveis.

Os testes de Mann-Whitney e o teste T independente foram utilizados para a análise de duas variáveis numéricas, na comparação de dois grupos de valores dentro de uma mesma variável, levando-se em consideração a distribuição de cada variável.

A estatística descritiva foi aplicada para analisar as principais características clínicas e demográficas das amostras avaliadas.

A partir dos resultados de genotipagem dos SNP investigados, as frequências alélicas e genótípicas dos SNPs observados foram calculadas por contagem direta e analisados pelo Teste  $\chi^2$  para análise de associação das variáveis (pacientes com LES x controles). A razão de chances (*OR*) foi calculada para estimar o risco, e o intervalo de confiança adotado foi de 95%. Valores de *OR*<1 determinam proteção, enquanto que valores *OR*>1 determinaram risco associado. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 ARTIGO 01**

**GSTP1 rs1695 and rs1871042, and SOD rs4880 (Ala16Val).**

**MOLECULAR MARKERS TO LIPID PEROXIDATION IN BLOOD  
STORAGE**

1 – Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

2 - Universidade Federal da Bahia - UFBA

Correspondence: José Pereira de Moura Neto, Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil, Rua Comendador Alexandre Amorim, 330. CEP – 69010-300. Aparecida – Manaus-AM-Brasil.

E-mail: [jp-mn@hotmail.com](mailto:jp-mn@hotmail.com).

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Red blood cells (RBC) are subject to oxidative stress by reactive oxygen species during refrigerated storage. Molecular characterizations of oxidative stress have few data in red blood cells (RBCs) stored. In many blood transfusions can occur by for a longer duration after your collect. The purpose of this preliminary study was to compare in during 42 days of the oxidative stress levels by SNPs genotyping.

### STUDY DESIGN AND METHODS:

We conduzide a study in forty five blood storage of healthy volunteers recruited from Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, AM. Oxidative stress markers were measured in plasma from blood storage for 42 days. Hemogram, biochemical data and oxidative stress markers were measured every seven days until complete 42 days of storage. GSTM1 and GSTT1 were determined by multiplex-PCR, while P1 rs1695 and rs1871042, CAT rs1001179 and SOD rs4880 by real Time PCR.

**RESULTS:** A directly proportional relationship was found in all seven days to ROS, TIOIS e TBARS ( $p < .001$ ). As expected, all level was indirectly proportional to ABTS ( $p < .001$ ). Plasma blood concentration of TBARS was associated with GSTP1 rs1695 (Ile105Val) and rs1871042 (442-16C>T), and SOD rs4880 (Ala16Val) genotypes. SNPs in the gene CAT rs1001179 (C-262T) was not associated with TBARS. Oxidative markers ROS and ABTS were not associated with none SNPs examined (GSTP1, SOD, CAT).

**CONCLUSION:** Prolonged storage may result in the onset of erythrocyte deterioration. This clearly indicates that the erythrocytes are capable of attenuating ROS with 2 weeks of storage. In conclusion, we found that oxidative stress may be associated by elevation of TBARS as a result of lipid peroxidation, being influenced by the presence of heterozygosis as highest association strength for homozygotes in the SNPs rs1695 (Ile105Val) and rs1871042 (442-16C> T) for the gene GSTP1 and SOD rs4880 (Ala16Val). Understanding of the factors both endogenous and exogenous which impact oxidative status, as well as genetics factores can be important to understanding oxidation in blood storage in order to improve the clinical results in blood transfusions.

Key Words: GSTP1 rs1695; GSTP1 rs1871042; SOD rs4880; Lipid Peroxidation; Blood Storage.

## INTRODUCTION

Availability of storage in blood bank have a problem about how long blood products can and be stored, and how long they are safe and effective. Stored in optimum conditions must be occur without compromising the efficacy of red blood cells [1].

Currently, several surveys renewed interest in studies of red blood cells during refrigerated storage to improve stability and their transfusion efficacy and safety after long storage (i.e. up to 42 days) [2].

In fact, many studies, principally the retrospective have demonstrated multiple complications associated transfusion of “old” red blood cells (e.g. greater than 28 days of storage) as compared with the transfusion of “fresh” red blood cells (e.g. less than 14 days of storage). Among the symptoms, include pneumonia, sepsis, multi-organ failure, heart syntomes acute renal failure, thrombosis, and mortality [3].

Some of these studies failed to explain plausible pathophysiological mechanism, and their conclusions are subject to much controversies and discussions. In addition, the some findings have often low association. In the most widely discussed study, demonstrated that patients receiving transfusions of “old” red blood cells, this statistically-significant increase is only from 1.7 to 2.8% [4].

Any researches about any mechanism(s) have to explain these relatively subtle variance in the incidence of these types of complications. Finally, several aleatory trials are now underway to address this issue (e.g. the Red Cell Storage Duration Study [RECESS], the Age of Blood Evaluation [ABLE] study, and the Age of Red Blood Cells in Premature Infants [ARIPI] study) [5–7]. However, these are not to describe especial or particular pathophysiological mechanisms, will only help to provide very useful information.

Several researchers agree that if negative consequences happen, these are derived from the transfusion of older, then these result from a series of biochemical changes within the stored red blood cells, defined as storage lesion [8].

Tinmouth et al (2006) [9] evidenced various changes to erythrocytes during storage, including changes in their shape, mainly decreased membrane deformability and increased aggregability and intracellular viscosity. membrane loss, lysis, reduced glutathione and nitric oxide, and increased oxidation of cellular lipids and proteins, increases in extracellular hemoglobin, potassium and lactate dehydrogenase and decreases in extracellular pH. The red cell storage lesion and time limit over which the red cells can be stored are not fully defined. These lesions improve in reduced survival after transfusion and lowered efficacy in terms of reduced O<sub>2</sub> delivery capacity immediately after transfusion [10].

Several inquiries turned their attention to oxidative stress damages as a factor of the storage lesion, since the red cell is fully susceptible to oxidative stress. Some of the storage lesions, as the loss of membrane, are attributed at least in part to lipid peroxidation to membrane lipids and cytoskeletal proteins [11,12].

Previous studies to reduce oxidative damage have included storage under carbon monoxide to stabilize haemoglobin and prevention of oxygen diffusion into the bag during storage, however, this one did not result in acceptable red cell recovery on reinfusion [13,14].

Plasma antioxidant levels and RBCs' antioxidant enzymes deplete gradually depending on the days of storage, inducing RBC membrane proteins suffer progressive pathological alterations during storage [15].

Glutathione S-transferase (GST) are a superfamily of phase II enzymes that act catalyzing the detoxification of hydrophobic and electrophilic compounds with reduced



glutathione [16]. The GSTP1 has several polymorphic sites, however, functionally, the single nucleotide polymorphism (SNP) caused by the transition A> G in exon 5 leads to change of isoleucine aminoacid (Ile) for valine (Val) (Ile105Val), which expresses a protein with altered thermal instability and catalytic activity [17].

SOD along with CAT comprise the primary enzyme system defense against reactive oxygen species (ROS) [18]. Whereas mitochondrial superoxide dismutase (SOD<sub>2</sub>) acts in the conversion of O<sub>2</sub><sup>-</sup> anion to the less toxic hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and then catalase catalyzes the conversion of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into water and oxygen [19]. The SOD2 Ala16Val SNP alters the structure of the enzyme, decreasing the efficiency of entry into the mitochondrial matrix and consequently decreases the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and dismutation. Catalase is expressed in all tissue types, predominantly in the liver, kidney and erythrocytes [20]. The CAT C-262T SNP is found in the promoter region of the gene and is associated with low enzyme activity [21].

The hemoglobin content and oxidative status of the erythrocyte as a function of the storage period remain unclear. Therefore this study is towards identifying oxidative changes that may compromise physiological functions of the erythrocytes in stored blood and their antioxidant defenses.

Studies have demonstrated the involvement of polymorphisms in several genes that contribute to improve or decrease oxidative status. The aim of our study was to investigate if polymorphisms of glutathione s-transferases (P1 Ile105Val and P1 442-16C>T), superoxide dismutase (Ala16Val), catalase (C-262T) can modify the levels of oxidative stress markers correlating with antioxidant status in erythrocytes of stored blood.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental design**

The analyses were conducted in forty five blood bag back of healthy volunteers recruited from Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, AM (age:  $35.4 \pm 15.11$  years; 36 males and 09 females).

### **Blood Sampling**

We studied a total of 40 RBC units over the course of 07 different days. Every 07 days, plasma aliquots were removed for analysis of oxidative stress.

### **ABTS Antioxidant Assay**

ABTS was determined by the method of Erel, O (2004) [22]. Briefly, this method each assay was performed in 96-well test plates. Each well was charged plasma sample and ABTS Solution. After addition, the plate was allowed to stand at room temperature and ambient light for 15 min, then a final reading (Abs<sub>2</sub>) was performed at 714 nm on a test plate reader (TP-Reader, Thermoplate, Italy).

### **Lipid Peroxidation Assay (TBARS)**

A product of TBARS was determined according to the method of Ohkawa et al., (1979) [26] adapted by Draper & Hadley, (1990) [27]. In brief, the sample was added to 8.1% SDS, vortexed and incubated at room temperature. This was followed by the addition of 20% acetic acid and 0.6% thiobarbituric acid, and placed in boiling water bath. The samples were allowed to cool and butanol-pyridine was added and centrifuged. Absorbance of the colored layer was measured at 532 nm.

**SNPs genotyping**

The DNA was extracted from leukocytes using Brazol® technique according to the manufacturer's instructions. SNPs Genotyping was conducted using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) on a StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The probes used were: P1 rs1695 (Ile105Val) and rs1871042 (442-16C>T), CAT rs1001179 (C-262T) and SOD rs4880 (Ala16Val). The genotypic frequencies for polymorphisms were analyzed according to the expected by Hardy-Weinberg equilibrium.

**Statistical analysis**

Statistical analysis softwares used were: IBM SPSS Statistics, Version 19.0. and GraphPad Prism version 5.0. Analysis of the distribution of variables was performed using the Kolmogorov-Smirnov test. The ANOVA parametric test was used to analyze the distribution of the means of quantitative variables with normal distribution within categories. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used for the off-normal distributions.

## RESULTS AND DISCUSSION

Demographic characteristics of the participants are presented in Table 1. Male volunteers was most frequent gender (80%) and O most frequent blood group.

No one women were in postmenopausal, never used of hormone replacement therapy, no smokers, current drinkers and non-users of aspirin.

Table 2 shows the averages and standard deviation of the haematological and biochemical data of the volunteer's on day 1 of the collection. Hematological, biochemical and oxidative stress analyzes were performed after the blood bags were centrifuged, including the first day analysis. The correlation of the data did not demonstrate significant correlation. In this way, all posterior analyzes were performed without distinction of gender.

An overview of world blood donors shows that the distribution of women and men donors is identical around the world, with a average frequency of women donors less than 35% [28,29].

As expected, an increase in TBARS levels, a lipid peroxidation indicator was directly proportional the days of blood storage observed in Day-1 compared to Day-42 thus confirming the increased exposure to oxidative stress. The higher the number of days stored, the greater the lipid peroxidation (Pearson correlation:  $r=.739$ ;  $p\text{-value} < .001$ ) (Figure 1).

Additionally, in this study, a relationship has been observed between decreased levels of ABTS (Figure 2) and the increased oxidative stress (ROS) (Figure 3). This relationship show an decrease antioxidant capacity. Thus, the decrease in ABTS also reflects a greater susceptibility to the oxidation and lipidic peroxidation.

Blood storage induce a hemolysis, releasing free alpha chains and a release of intra-erythrocytic heme which triggers a hemoglobin oxidation pathway, thus causing

damage to the RBC. This auto-oxidation reflects the formation of superoxide radicals ( $O_2^-$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) resulting in oxidative stress [30].

There are limited studies about assessment of plasma total antioxidant capacity in blood storage. Some authors showed the depletion of antioxidants in hemolytic diseases as alpha and beta thalassemia, with a significant decrease of Total Antioxidant Capacity in thalassemic patients was reported compared to controls [31-33].

The genotypic frequencies of polymorphisms of the genotypes 41.7% to GSTP1Ile/Val and 18.3% to GSTP1Val/Val; 26.7% to GSTP1C/T and 5.0% to GSTP1T/T; 48.3% to SODAla/Val and 30.0% to SODVal/Val; 21.7% to CAT C/T and 5.0% to CAT T/T.

The polymorphisms of GST are distributed heterogeneously in different populations around the world [35,35]. The distribution of Ile105Val variants of GSTP1 shows similar data to a study conducted among indigenous populations of Amazonas, wild type, heterozygous and homozygous frequency were 40, 41 and 18%, respectively [36,37]. The genotypic frequencies of SOD and CAT are also in accordance with data found in different Brazilian populations [38]. Taufer et al. (2005) demonstrated an approximated frequency to our study of the Ala/Val and Val/Val genotypes of SOD2, 60,6% and 24,4% respectively and it was a mixed ethnicity population, like our study [39].

Plasma blood concentration of TBARS was associated with GSTP1 rs1695 (Ile105Val) and rs1871042 (442-16C>T), and SOD rs4880 (Ala16Val) genotypes (Figures 4-7). SNPs in the genes CAT rs1001179 (C-262T) was not associated with TBARS. Oxidative markers ROS and ABTS were not associated with none SNPs examined (GSTP1, SOD, CAT).

For the first time, we describe the GSTP1 variant associated with increased TBARS levels, videlicet, increased lipid peroxidation in Blood Storage (Figures 4-6).

We noticed a increase of TBARS with the increase of time "days" stored. We we found the highest levels of TBARS in Heterozygous (Ile/Val) ( $P=.032$ ) and principally in the Homozygous (Val/Val) genotypes ( $p<.001$ ) (Figure 4-6).

The GSTP regulat the activity of glutathione peroxidase VI (Prdx6) by initial heterodimerization and subsequent S-glutathionylation. Prdx6 is a dual-functioning antioxidant enzyme that acts to protect biological membranes against damage caused by lipid peroxidation [40,41].

We believed que GSTP1 mediate activation of Prdx6 peroxidase providing power to imply that contingent upon their GSTP genotype. Individuals mutants to GSTP1 will have significant differences an antioxidant response, particularly impacting protection of cell membranes against lipid peroxidation.

Moreover, previous studies have suggested that GSTP1 polymorphisms are associated with cancer risk. Such differences will be of importance in the analysis of epidemiological data studying differences in population sensitivities to oxidant-stress involving long blood storage [42,43].

Our study found that genetic variation in SOD Val is associated with increase lipid peroxidation and can be a molecular marker of oxidative stress in blood storage (figure 7).

MnSOD is located in the mitochondria, converting the superoxide anion radical resulting from the electron transport chain into oxygen and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [44]. It has been hypothesized that the Val SNP variant does not propitiate easier transport of the MnSOD precursor into the mitochondria [45], resulting in lower basal activity of the

enzyme. This Val SNP might become partially arrested within the inner mitochondria membrane impairing its function [46].

However, Bastaki et al (2006) showed that homozygous Ala/Ala have lower enzyme activity compared to those with ALa/Val or Val/Val genotypes [12]. Our results suggest that heterozygous Ala/Val individuals have the greatest ability to cope with oxidative stress; those with the Val/Val genotype the lowest [47].

We found two SNPs (GSTP1 and SOD) associated to high level with on lipid peroxidation. We believe that could be that other genetic variants in the same genes or other related genes are causally associated increase of oxigens reactivates species or the TBARS. We know there are a big complexity in the processes to maintain oxidative balance, and our study just address few part of that process.

Our project included a large blood storage sample size (n = 45) which allowed us to examine subgroups defined by outhrs variables as gender, age, anemia, leukocytosis and other factors. Next exploration of these variables will can to associate in other samples would be important in determining the cause/efect consistency of the association. We consider our study does have any important strengths.

In conclusion, we found that oxidative stress may be associated by elevation of TBARS as a result of lipid peroxidation, being influenced by the presence of heterozygosis as highest association strength for homozygotes in the SNPs rs1695 (Ile105Val) and rs1871042 (442-16C> T) for the gene GSTP1 and SOD rs4880 (Ala16Val).

Understanding of the factors both endogenous and exogenous which impact oxidative status, as well as genetics factores can be important to understanding oxidation in blood storage in order to improve the clinical results in blood transfusions.

## **REFERENCE**

- [1] Hess JR, Greenwalt TG. Storage of red blood cells: new approaches. *Transfus Med Rev* 2002;16:283–95.
- [2] Wang D, Sun J, Solomon SB, Klein HG, Natanson C. Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. *Transfusion* 2011 [doi:10.1111/j.1537-2995.2011.03466.x].
- [3] Dzik W. Fresh blood for everyone? Balancing availability and quality of stored RBCs. *Transfus Med* 2008;18:260–5.
- [4] Koch CG, Li L, Sessler DI, Figueroa P, Hoeltge GA, Mihaljevic T, et al. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *New Engl J Med* 2008;358:1229–39.
- [5] Steiner ME, Assmann SF, Levy JH, Marshall J, Pulkrabek S, Sloan SR, et al. Addressing the question of the effect of RBC storage on clinical outcomes: the Red Cell Storage Duration Study (RECESS) (Section 7). *Transfus Apher Sci* 2010;43:107–16.
- [6] Lacroix J, Hebert P, Fergusson D, Tinmouth A, Blajchman MA, Callum J, et al. The Age of Blood Evaluation (ABLE) randomized controlled trial: study design. *Transfus Med Rev* 2011;25:197–205.
- [7] Fergusson D, Hutton B, Hogan DL, LeBel L, Blajchman MA, Ford JC, et al. The age of red blood cells in premature infants (ARIP) randomized controlled trial: study design. *Transfus Med Rev* 2009;23:55–61.
- [8] Kato GJ. Understanding the Erythrocyte Storage Lesion. *Anesthesiology* 2012; 117(6):1159-61.
- [9] Tinmouth A, Fergusson D, Yee IC, Hebert PC. Clinical consequences of red cell storage in the critically ill. *Transfusion* 2006;46: 2014–27.
- [10] Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, Telen MJ, Ortel TL, Reid TS, et al. Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17063–8.
- [11] Wolfe LC: Oxidative injuries to the red cell membrane during conventional blood preservation. *Semin Hematol* 1989; 26:307–312.
- [12] Wolfe LC, Byrne AM, Lux SE: Molecular defect in the membrane skeleton of blood bank-stored red cells. Abnormal spectrin-protein 4.1-actin complex formation. *J Clin Invest* 1986; 78:1681–1686.
- [13] Wolfe L, Byrne A, Chiu D: 1987 *Blood* 70: sup 335a. The storage lesion of liquid preserved erythrocytes is blocked in vivo by treatment with carbon monoxide.
- [14] Hogman CF, de Verdier CH, Ericson A, Hedlund K, Sandhagen B: Effects of oxygen on red cells during liquid storage at +4 degrees C. *Vox Sang* 1986; 51:27–34.



- [15] Ogunro PS, Ogungbamigbe TO, Muhibi MA. The influence of storage period on the antioxidants level of red blood cells and the plasma before transfusion. *Afr J Med Med Sci* 2010;39:99–104.
- [16] Ye Z, Song H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2005;41:980–9.
- [17] Spurdle AB, Webb PM, Purdie DM, Chen X, Green A, Chenevix-Trench G. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Carcinogenesis* 2001;22:67–72.
- [18] Crawford A, Fassett RG, Coombes JS, Kunde D a, Ahuja KDK, Robertson IK, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase genotypes and activities and the progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transpl* 2011;26:2806–13.
- [19] Xu Z, Zhu H, Luk JM, Wu D, Gu D, Gong W, et al. Clinical significance of SOD2 and GSTP1 gene polymorphisms in Chinese patients with gastric cancer. *Cancer* 2012;118:5489–96.
- [20] Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP, Kunde DA, Ball MJ, Robertson IK, et al. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene* 2012;501:89–103. doi:10.1016/j.gene.2012.04.011.
- [21] dos Santos KG, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KEP, Roisenberg I. The catalase -262C/T promoter polymorphism and diabetic complications in Caucasians with type 2 diabetes. *Dis Markers* 2006;22:355–9.
- [22] Erel, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004 37(4):277-85.
- [23] Ellman GL 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.
- [24] HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 1994; 233, p. 380-5.
- [25] Costa CM, Santos RCC, Lima ES 2006: A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J Bras Patol Med Lab* 42: 339-344.
- [26] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry.* 1979;95:351–358.
- [27] Drapper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology.* 1990;186:421–431.

- [28] Goldman M, Steele WR, Di Angelantonio E, et al. Comparison of donor and general population demographics over time: a BEST Collaborative group study. *Transfusion*. 2017.
- [29] Veldhuizen IJ, Doggen CJ, Atsma F, De Kort WL (2009) Donor profiles: demographic factors and their influence on the donor career. *Vox Sang* 97: 129-138.
- [30] Scott MD. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury in beta thalassemic erythrocytes: protective role of catalase and the prooxidant effects of GSH. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(7):1264–1272.
- [31] Ghone RA, Kumbar KM, Suryakar AN, et al. Oxidative stress and disturbance in antioxidant balance in beta thalassemia major. *Ind J Clini Biochem*. 2008;23:337–40.
- [32] Hamed EA, ElMelegy NT. Renal functions in pediatric patients with beta-thalassemia major: relation to chelation therapy: original prospective study. *Italian J Pediatr*. 2010;36:39.
- [33] Cakmak A, Soker M, Koc A, Aksoy N. Prolidase activity and oxidative status in patients with thalassemia major. *J Clin Lab Analysis*. 2010;24:6–11.
- [34] Zhong S, Huang M, Yang X, Liang L, Wang Y, Romkes M, et al. Relationship of glutathione S-transferase genotypes with side-effects of pulsed cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62:457–72.
- [35] Karaca S, Karaca M, Cesuroglu T, Erge S, Polimanti R. GSTM1, GSTP1, and GSTT1 genetic variability in Turkish and worldwide populations. *Am J Hum Biol* 2015;27:310–6.
- [36] Oliveira C De, Oliveira SF De, Hatagima A, Ferreira LB, Grisolia CK, Klautau-MDN. Glutathione S-Transferase M1 and T1 Polymorphisms in Brazilian African Descendants 2007.
- [37] Klautau-guimarães MDN, Hiragi CDO, Ascensão RFD, Oliveira SF, Grisolia CK, Hatagima A, et al. Distribution of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null phenotypes in Brazilian Amerindians 2005;35:32–5.
- [38] Hiragi C de O, Miranda-Vilela AL, Rocha DMS, de Oliveira SF, Hatagima A, de Klautau-Guimarães MN. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione s-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three brazilian population groups. *Genet Mol Biol* 2011;34:11–8.
- [39] Taufer M, Peres A, Andrade VM De, Oliveira G De, Sa G, Canto MEP do, et al. Is the Val16Ala Manganese Superoxide Dismutase Polymorphism Associated With the Aging Process? *J Gerontol* 2005;60A:1–7.
- [40] Manevich Y, et al. 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation-mediated membrane damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99(18):11599–604.

- [41] Manevich Y, Fisher AB. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free radical biology & medicine*. 2005; 38(11):1422–32.
- [42] Harris MJ, et al. Polymorphism of the Pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. *Pharmacogenetics*. 1998; 8(1):27–31.
- [43] Townsend DM, et al. A glutathione S-transferase pi-activated prodrug causes kinase activation concurrent with S-glutathionylation of proteins. *Mol Pharmacol*. 2006; 69(2):501–8.
- [44] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007. xxxvi, 851 p. p.
- [45] Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. 2003; 13(3):145–57.
- [46] Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999; 261(2):332–9.
- [47] Bastaki M, Huen K, Manzanillo P, Chande N, Chen C, Balmes JR, et al. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenet Genomics*. 2006; 16(4):279–86.

Table 1: Demographic characteristics of the volunteers.

<b>GENDER (N)</b>	<b>AGE (%)</b>		<b>ABO BLOOD GROUP (%)</b>	
<b>MALE (36)</b>	16 a 19	04 (11.12)	A	10 (27.78)
	20 a 29	10 (27.77)	B	07 (19.44)
	30 a 39	17 (47.23)	AB	01 (2.78)
	40 a 49	03 (8.33)	O	18 (50.0)
	50 e 52	02 (5.55)		
<b>FEMALE (09)</b>				
	20 a 29	03 (33,33)	A	03 (33.33)
	30 a 39	05 (55,56)	B	01 (11.11)
	42	01 (11.11)	O	05 (55.56)

Table 2. Hematological and Biochemistry data from blood storage of volunteers.

Hematological and Biochemistry Variables	Male	Female	p-value
	Mean $\pm$ SD		
RBC, X10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	6.28 $\pm$ 0.73	6.09 $\pm$ 0.72	.402
Hemoglobin, g/dL	17.2 $\pm$ 2.10	17.09 $\pm$ 2.2	.301
Hematocrit, %	53.89 $\pm$ 2.24	53.84 $\pm$ 2.4	.956
Mean Cell Volume, fL	88.03 $\pm$ 2.58	85.72 $\pm$ 2.12	.126
Mean Cell Hemoglobin, pg	29.21 $\pm$ 0.63	28.27 $\pm$ 0.65	.445
Red Cell Distribution Width	13.01 $\pm$ 0.57	13.57 $\pm$ 0.55	.117
Leukocyte Count X 10 <sup>6</sup> /L	3.75 $\pm$ 0.57	3.45 $\pm$ 0.63	.356
Platelet Count, X 10 <sup>9</sup> /L	56.57 $\pm$ 18.34	26.65 $\pm$ 11.94	.511
Lactate dehydrogenase, U/L	155.04 $\pm$ 48.21	163.45 $\pm$ 49.48	.465
Total protein, g/dL	2.29 $\pm$ 0.18	2.37 $\pm$ 0.42	.593
Albumin, g/dL	1.37 $\pm$ 0.11	1.35 $\pm$ 0.31	.826
Globulin, g/dL	0.91 $\pm$ 0.11	1.02 $\pm$ 0.15	.268
Urea nitrogen, mg/dL	17.30 $\pm$ 4.88	15.68 $\pm$ 3.19	.436
Creatinine, mg/dL	0.63 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.04	.110
Amylase (units/L)	24.3 $\pm$ 4.41	24.1 $\pm$ 3.56	.940
Phosphorus (mg/dL)	29.21 $\pm$ 5.89	22.72 $\pm$ 4.31	.447
Calcium, total (mg/dL)	2.12 $\pm$ 2.25	2.29 $\pm$ 0.41	.326
Magnesium (mg/dL)	0.81 $\pm$ 0.16	0.91 $\pm$ 0.29	.409
Sodium (mEq/L)	146.11 $\pm$ 0.89	145.95 $\pm$ 0.93	.755
pH (venous)	7.33 $\pm$ 0.112	7.40 $\pm$ 0.068	.263
Chloride (mEq/L)	105.90 $\pm$ 1.24	104.90 $\pm$ 4.54	.492

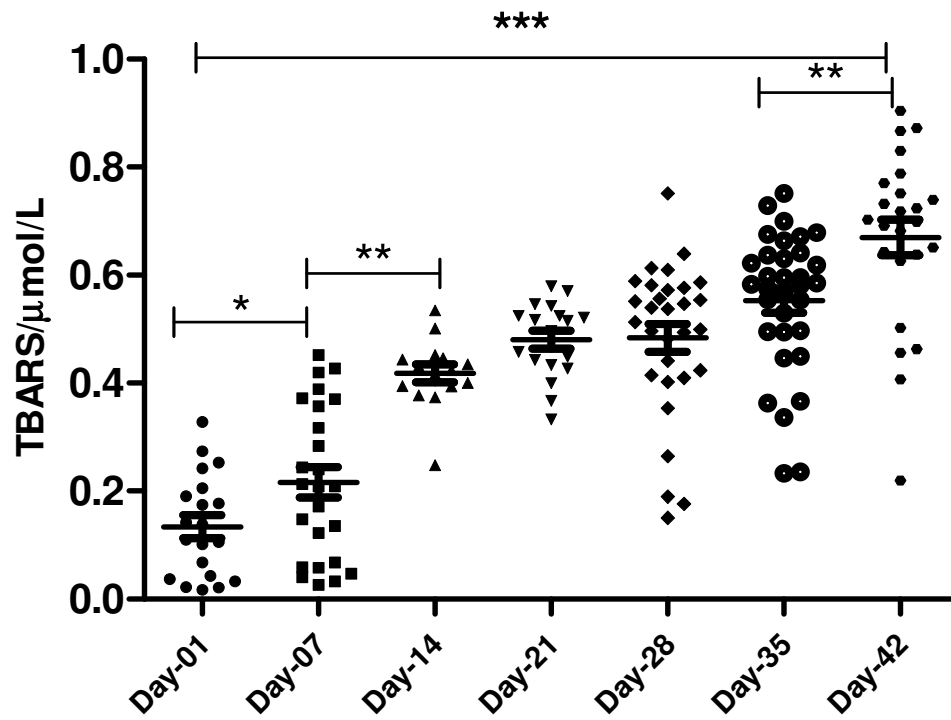


Figure 1: Evolution of TBARS levels from RBC Plasma 1-to 42-days stored. Positive correlations between days analysed are demonstrated. \*Statistically significant difference (\*  $P < .05$ ; \*\*  $P < .01$ ; \*\*\*  $P < .001$ )

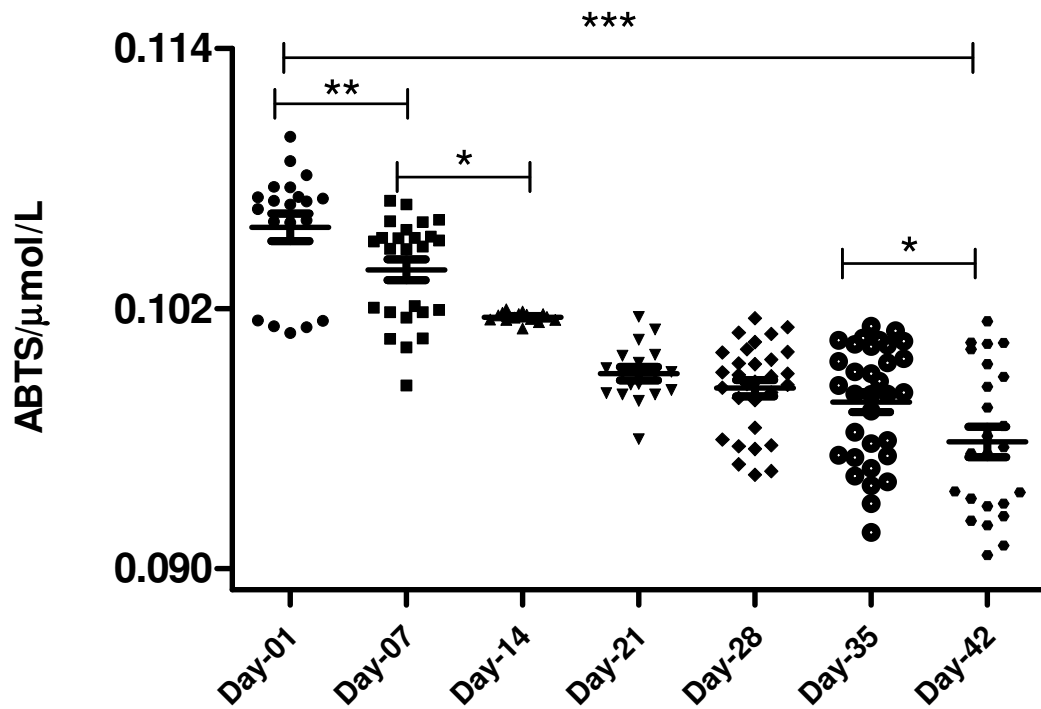


Figure 2: Evaluation of ABTS levels from RBC Plasma 1-to 42-days stored. Positive correlations between days analysed are demonstrated. \*Statistically significant difference (\*  $P < .05$ ; \*\*  $P < .01$ ; \*\*\*  $P < .001$ )

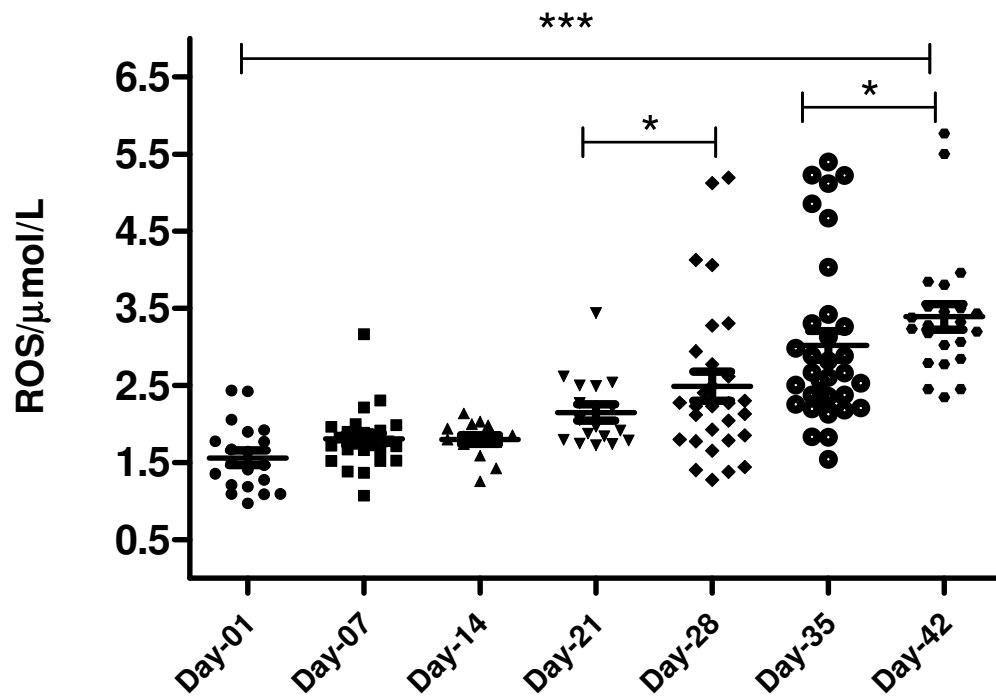


Figure 3: Evolution of ROS levels from RBC Plasma 1-to 42-days stored. Positive correlations between days analysed are demonstrated. \*Statistically significant difference (\*  $P < .05$ ; \*\*  $P < .01$ ; \*\*\*  $P < .001$ )



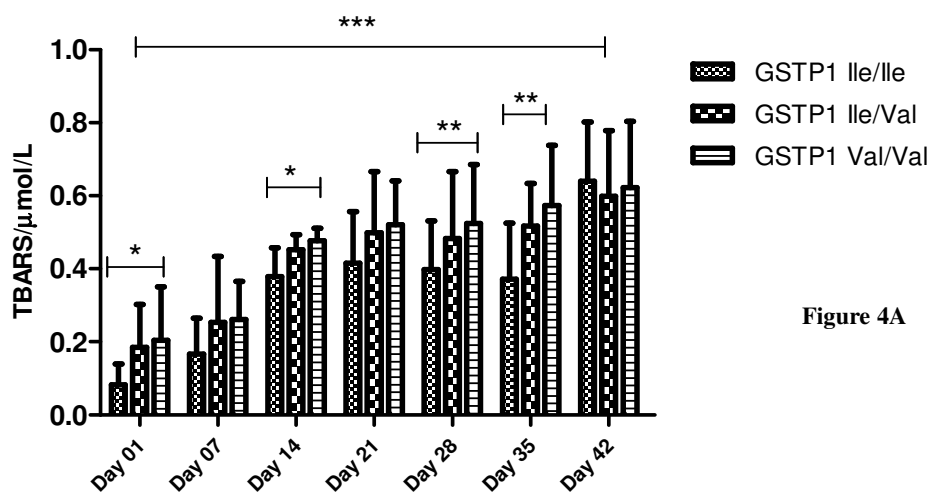


Figure 4A

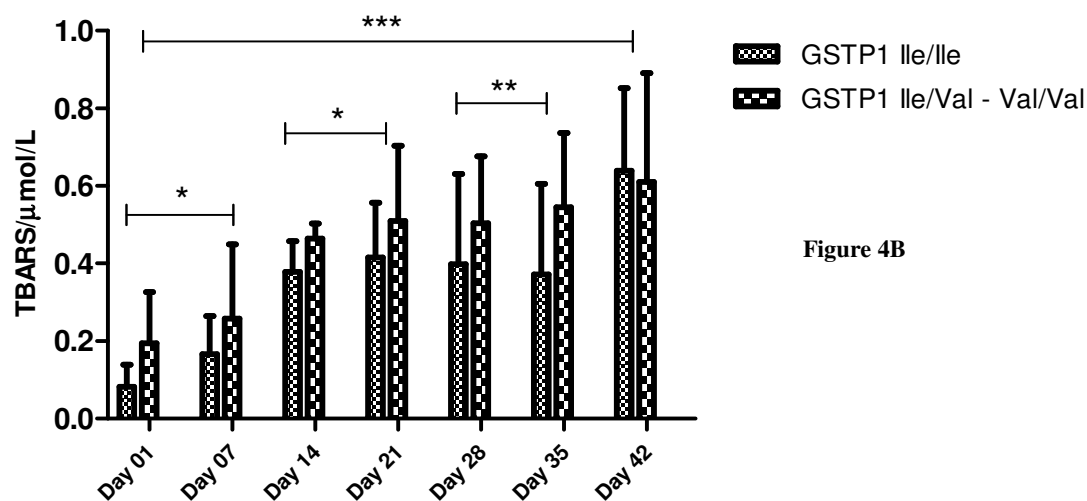


Figure 4B

Figure 4. Evolution of TBARS levels by GSTP1 Ile105Val polymorphism. Genotypes modify of TBARS concentration between different days stored. Figure 4A shows of TBARS levels by wild Type (Ile/Ile), Heterozygous (Ile/Val) and Homozygous (Val/Val) genotypes. Figure 4B shows of TBARS levels by wild Type (Ile/Ile) vs mutants genotypes (Heterozygous (Ile/Val) plus Homozygous (Val/Val)).

Positive correlations between days analysed vs genotypes are demonstrated.

\*Statistically significant difference (\* P < .05; \*\* P < .01; \*\*\* P < .001)

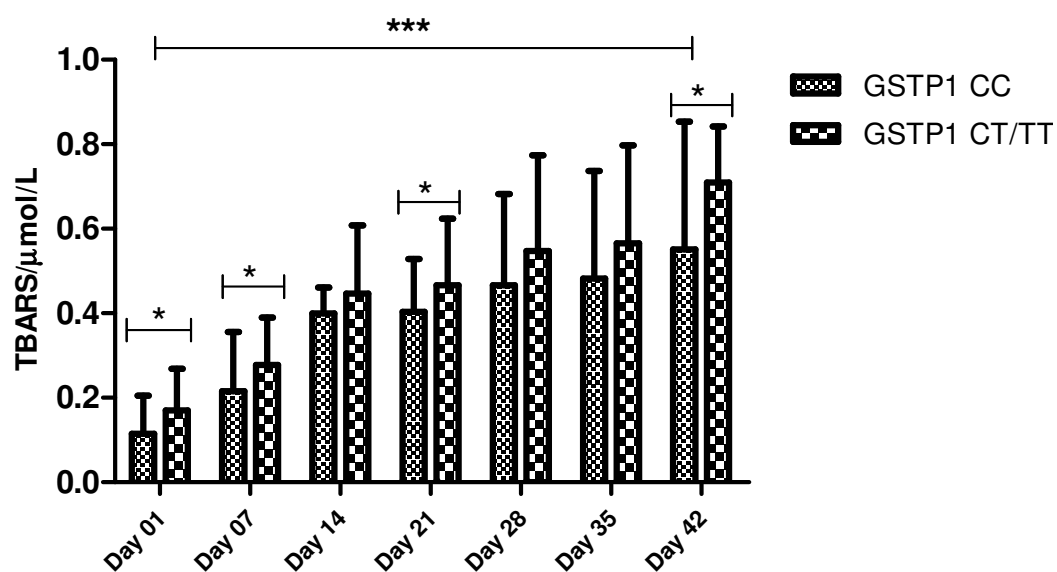


Figure 5. Evolution of TBARS levels by GSTP1 442-16C>T polymorphisms. Genotypes modify of TBARS concentration between different days stored. Lower levels of TBARS are present in wild type (CC) genotypes. Positive correlations between days analysed vs genotypes are demonstrated. \*Statistically significant difference (\* P < .05; \*\* P < .01; \*\*\* P < .001)

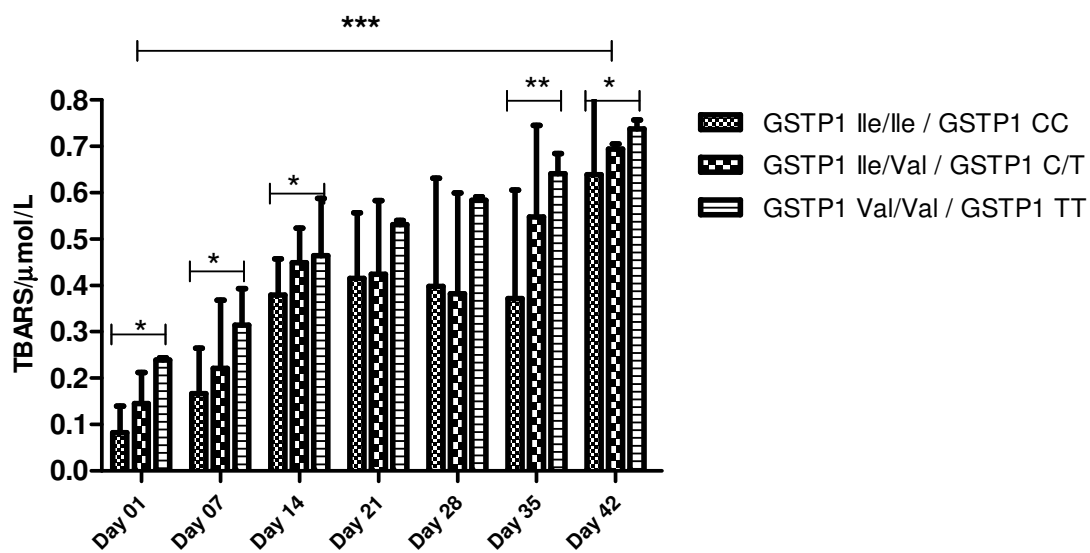


Figure 6. Synergism among GSTP1 polymorphisms Ile105Val and 442-16 C/T in the modulation the concentration of TBARS levels between different stored days. Lower levels of TBARS are present in wild type genotypes (Ile / C).

Positive correlations between days analysed vs genotypes are demonstrated.

\*Statistically significant difference (\*  $P < .05$ ; \*\*  $P < .01$ ; \*\*\*  $P < .001$ )

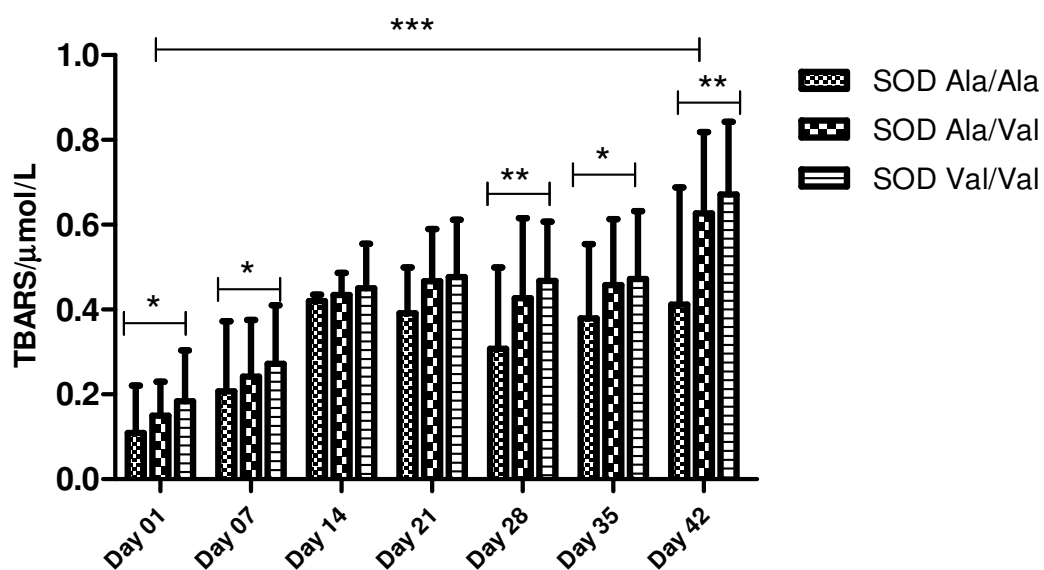


Figure 7. Evolution of TBARS levels by SOD Ala16Val polymorphism. Genotypes modify of TBARS concentration between different days stored. It is demonstrated TBARS lower levels in wild Type (Ala/Ala) in comparison Heterozygous (Ala/Val) and Homozygous (Val/Val) genotypes.

Positive correlations between days analysed vs genotypes are demonstrated.

\*Statistically significant difference (\*  $P < .05$ ; \*\*  $P < .01$ ; \*\*\*  $P < .001$ )

## **7 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **7.1 ARTIGO 02**

# **ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM BOLSAS DE SANGUE REINTEGRADAS AO ESTOQUE**

**Marcelo Reis do Nascimento<sup>1</sup>; José Pereira de Moura Neto<sup>1,2</sup>**

1 – Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

2 - Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Correspondence: José Pereira de Moura Neto, Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/UFAM), Manaus, Amazonas, Brasil, Rua Comendador Alexandre Amorim, 330. CEP – 69010-300. Aparecida – Manaus-AM-Brasil.

E-mail: [jp-mn@hotmail.com](mailto:jp-mn@hotmail.com).

## Resumo

**INTRODUÇÃO:** A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM- coleta aproximadamente 60.000 bolsas de sangue por ano com as quais abastece todo o Estado do Amazonas. A bolsa de concentrados de hemácias (CH) é o componente sanguíneo mais utilizado no mundo. Dependendo do anticoagulante e solução aditiva, tem validade de até 42 dias quando armazenada  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Todavia, os eritrócitos continuam seu metabolismo de forma lenta, sofrendo neste ambiente adverso, danos em sua morfologia e produção de energia, podendo desencadear o processo de Lesão Celular. **OBJETIVO.** O objetivo do estudo foi descrever as alterações hematológicas e bioquímicas ocorridas nas bolsas de sangue de voluntários sadios armazenadas entre 1 e 42 dias no hemocentro do Amazonas e das bolsas devolvidas das agências transfusionais. **RESULTADOS:** Do total de 60 bolsas analisadas, 48 (80%) foram do sexo masculino. A idade média dos voluntários para o sexo masculino foi de  $34\pm 11,35$  e  $32\pm 10,23$  anos para o feminino. O grupo sanguíneo mais frequente em ambos os gêneros foi o “O” RhD positivo, acima de 48%. Apesar de não encontramos diferenças significativas, as bolsas de sangue devolvidas ao hemocentro apresentam aumento dos níveis dos marcadores do estresse oxidativo e hemólise, além de outras variações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos em comparação com as bolsas que foram estocadas na FHEMOAM. Como era de se esperar, os dados hematológicos, apesar da leve diminuição nos valores, diferenças significativas não foram demonstradas nas análises do 1o até o 42o dia. Valores séricos para glicose e Sódio, apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,001$ ;  $P = 0,023$ , respectivamente), enquanto para sódio, magnésio e LDH, aumento significativo ( $p < 0,017$ ;  $p = 0,029$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente). Todos os marcadores para o estresse oxidativo apresentaram diferenças significativas ao longo de cada análise, com aumento para capacidade oxidante (ROS), peroxidação lipídica/hemólise (TBARS), enquanto diminuição para capacidade antioxidante (ABTS) (todos com  $p < .001$ ). **CONCLUSÃO.** As diferenças encontradas nos parâmetros analisados entre as bolsas da FHEMOAM e as devolvidas de outros centros podem ser explicadas pelo transporte e/ou acondicionamento fora da temperatura ideal, o que resultou no aumento das lesões eritrocitárias. Poucas variações foram demonstradas com significância estatística entre os 14 primeiros dias, indicando talvez que os eritrócitos são capazes de atenuar o aumento do estresse oxidativo neste período.

Palavra chave: Estresse oxidativo; Bolsa de Sangue, Dados Hematológicos; Níveis Bioquímicos

## Introdução

O estado do Amazonas possui 1.559.146,876km<sup>2</sup>, sendo o maior estado do Brasil, além de ter uma rica fauna e flora com área territorial ocupada principalmente por rios e florestas. A diversidade no desenvolvimento industrial, associada ao baixo desenvolvimento econômico da região, dificulta a logística de abastecimento de sangue a todos os municípios do Estado. Neste, há apenas um único hemocentro localizado na cidade de Manaus-AM, que coleta anualmente cerca de 60.000 bolsas de sangue e é responsável por abastecer toda a rede de saúde da região.

No Brasil os procedimentos técnicos de hemoterapia são definidos pela Portaria 158 de fevereiro de 2016, que determina o tempo máximo de estoque das bolsas de concentrados de hemácias (CH) em 42 dias se coletados com solução preservantes devendo ser acondicionadas à temperatura de 2 a 6°C o que é considerado seguro<sup>1,2</sup>. No entanto, o armazenamento por longos períodos que as bolsas são sujeitas e as condições extremas têm sido associadas a alterações no metabolismo, morfologia das hemácias tornando-as disformes comprometendo a distribuição de oxigênio para os tecidos, fragilizadas podem sofrer processo de hemólise<sup>3,4,5</sup>.

Os concentrados de hemácias em condições de armazenamento são mais suscetíveis a danos oxidativo, pois eles contêm altas concentrações de oxigênio intracelular e comumente produzem espécies reativas de oxigênio, e a eficácia dos seus mecanismos antioxidantes diminui à medida que as reservas de energia da célula diminuem durante o armazenamento<sup>6,7</sup>. Os ROS podem danificar as hemácias prejudicando sua função. Para minimizar o efeito dessas ROS e o stress oxidativo resultante, essas células contam com um amplo sistema antioxidante<sup>8,9</sup>. Esses efeitos sofridos pelos eritrócitos são chamados de “Lesão de Estoque”<sup>10,11</sup>.

Todos esses fenômenos têm levado a perguntas na comunidade médica/acadêmica relacionada à viabilidade dos eritrócitos armazenados, será que estas células desformes prejudicam o fluxo sanguíneo e a oxigenação dos tecidos durante ou após a transfusão de sangue<sup>12,13</sup>.

Os efeitos fisiológicos da exposição e as mudanças bioquímicas que ocorrem em um concentrado de hemácia armazenado podem ser muito diferentes e dependendo da patologia do receptor da transfusão podem causar prejuízos ao paciente. (por exemplo, pacientes atendidos em urgência, pacientes com doença falciforme, pacientes internados na unidade de terapia intensiva, os pacientes submetidos à cirurgia cardíaca)<sup>14</sup>.

Klein e colaboradores realizaram um estudo em dois grupos de cães com pneumonia induzida, em um grupo administraram transfusão de sangue com até cinco dias de coleta (sangue novo) e em outro grupo sangue com 42 dias de armazenamento (sangue velho), observou-se que nos animais que receberam transfusão com sangue velho a taxa de mortalidade foi maior que no outro grupo, esses dados corroboram com estudos de meta-análises realizados em pacientes humanos, no entanto, por força de ética não é possível realizar estudos desse porte com paciente sem expor a vida humana<sup>15</sup>.

Toda via, o hemocentro realiza a distribuição dos concentrados de hemácias para as agências transfusionais que podem utiliza-lo ou não ficando estocados na própria agência transfusional (AT's), porém, quando o CH esta próximo da data de vencimento as agências devolvem-nas para o hemocentro que os reintegra ao estoque se esta atender os critérios de aceitação definidos pela portaria 158 Art. 189 “Os componentes liberados para transfusão, mas não utilizados, podem ser reintegrados ao estoque se as condições de transporte e armazenamento forem conhecidas e adequadas, sendo que tais componentes devem ser submetidos à inspeção visual antes da reintegração” [2]. Essas bolsas reintegradas são encaminhadas geralmente para grandes centros expondo os pacientes poli traumatizados a transfusão de sangue mais velho.

Diante do exposto nosso trabalho tem como objetivo comparar os concentrados de hemácias que permaneceram estocados no hemocentro com os CH devolvidos para reintegração do estoque mediante as análise hematologias e bioquímicas.

## **Material e método**

### **População de estudo**

Foram selecionadas aleatoriamente 60 bolsas de concentrados e hemácias, obtidas através de doação voluntaria no HEMOAM no período de outubro de 2016 a fevereiro de 2017, conforme aprovado pelo comitê de Ética da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas n° 67130417.0.0000.0009, essas bolsas foram divididas em quatro grupos contendo 15 unidades em cada.



*Divisão dos grupos:* o grupo 1 as bolsas permaneceram estocadas no Hemoam, o segundo as bolsas foram testadas no dia 7 e enviadas cinco bolsas à três agências (Capital, Região metropolitana, Interior) permanecendo por 20 dias, após esse período as bolsas foram encaminhadas ao hemocentro para novas análises. O grupo 3 (SAG-M) e grupo 4 (CPDA<sup>1</sup>), foram de bolsa oriundas (devolvidas) das agências transfusional da capital. .

*Análises hematológicas - E, Hct, Hb, VCM, HCM, CHCM, RDW* – Foram realizada nos CH, em contador automatizado (ABX Micros 60®).

*Determinações bioquímicas* - glicose, LDH, Fósforo, Albumina, Fosfatase Alcalina Ureia, Creatinina, Sódio, Potássio, Cálcio, Magnésio, Proteínas Totais foram realizados através do aparelho *BIOCLIN 300*, cujo princípio das análises é por colorimetria, Turbidez, método ISE.

*Quantificação do TBARS* - A lipoperoxidação foi determinada pelo método de TBARS criado por ohkawa *et al.*, (1979), modificado por Draper & Hadley, (1990). Adicionou-se 100 µL da amostra (Plasma) a 1 ml de solução contendo 400 µL de tampão ácido acético 1,3 M em HCl a 0,27 M, pH 3,4; 400µl TBA 0,8% e 200 µl de SDS 8,1%. A mistura foi em cubada em banho Maria a 95 °C por 60 minutos. Após a incubação, medimos a absorbância em 535 nm. A concentração de MDA total das amostras foi determinado mediante utilização de uma equação da curva do padrão de MDA com 5 diluições (0,25; 0,5; 1; 2; 4 µmol/L)

*Determinação da capacidade antioxidante total (CAT)* - Para esse testes seguimos o protocolo de Erel (2004) preparando uma solução de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico]) em água deionizada, seguida da adição de Persulfato de potássio 5mM que permaneceu em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 12-16 h antes da utilização. Em microplacas de 96 poços de fundo chato, sendo adicionados 300 µL do ABTS diluído e 10 µL de soro para se calcular a concentração de CAT usando como padrão solução de 1mmol/L de Trolox® (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano).

*Determinação da capacidade oxidante total (COT)* - determinamos conforme o protocolo descrito por Erel (2005) em microplacas. Foi adicionados 35  $\mu\text{L}$  de soro cuja presença dessas moléculas oxidaram o ferro presente em 11  $\mu\text{L}$  de solução reagente de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25mM contendo: o-dianisidina dicloridrato 10mM + sulfato ferroso 5 mM, na presença de 225  $\mu\text{L}$  solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25mM contendo: xilenol laranja 150  $\mu\text{M}$ , NaCl 140 mM + glicerol 1,35M, pH 1,75. Após 4 minutos de incubação a  $39^\circ\text{C}$ , a leitura da absorbância no comprimento de onda de 560 nm em leitor de Elisa (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Couter). A concentração será calculada com base na curva padrão traçada com solução padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e os resultados do ensaio serão expressos em termos de  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equivalente/L.

### **Análise estatística**

O software de análise estatística utilizado foi: IBM SPSS Statistics, Versão 22.0 .;

A análise da distribuição das variáveis foi realizada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para analisar a distribuição dos meios de variáveis quantitativas com distribuição normal em categorias. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para distribuições fora de normalidade.

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo qui-quadrado não paramétrico ( $\chi^2$ ), corrigido pelo teste Mantel-Haenszel e Yates. Os valores de análise inferiores a 4, estes foram realizados pelo teste exato de Fisher. As frequências de alelos e genótipos dos SNP observados foram calculadas por contagem direta e analisadas pelo teste  $\chi^2$  para análise de associação das variáveis (controles SLE x). O odds ratio (OR) foi calculado para estimar o risco e o intervalo de confiança adotado foi de 95%.

## Resultados

Nosso estudo analisou quatro (04) grupos de bolsas de sangue. O primeiro grupo as bolsas permaneceram estocadas por 42 dias e foram testadas nos dias 0, 7, 14, 21, 28, e 42. O segundo realizamos testes no dia sete (07) e enviamos as bolsas para agências transfusionais do interior do Estado recomendando a não manipulação das mesmas durante o estoque, após 20 dias foram devolvidas ao hemocentro e realizado novas análises. O terceiro (SAG-M) e quarto (CPDA<sup>1</sup>) foram de bolsas devolvidas espontaneamente das agências transfusionais de Manaus.

O total de 60 bolsas de concentrados de hemácias foi analisado, sendo 48 (80%) do sexo masculino com idade média de  $34 \pm 11,35$  e do sexo feminino  $32 \pm 10,23$  anos. O grupo sanguínea mais frequente em ambos os gêneros foi O RhD positivo 47,9% e 41,7%, respectivamente.

A figura 1. Contagem de global de hemácias demonstra não haver diferença significativa entre os grupos.

A figura 2. Determinação do hematócrito não apresenta diferença entre os grupos testados

Figura 3. Determinação da hemoglobina acompanhou os mesmos resultados que os demais testes não apresentando diferença estatisticamente significativa.

Da mesma forma o VCM na figura 4. Não apresenta alterações entre os grupos.

A figura 5. Apresentou nos dias 21 e 28 a diminuição dos níveis de glicose ( $p < ,000$ ) nos grupos 3 e 2 respectivamente.

A figura 6. Apresenta a diminuição significativa ( $p < ,000$ ) do potássio no dia 35 no grupo 3.

Figura 7. O pH não apresentou alteração durante o período de análise.

Figura 8. A dosagem de Lactato desidrogenase apresentou diminuição significativa ( $p < ,000$ ) no dia 35 para o grupo 3.

Figura 9. Apresentou aumento ( $p < ,000$ ) no dia 21 para o grupo 3 e 4.

Figura 10. O grupo 3 apresentou níveis baixos de TBARS (MDA) nos dias 21, 28 e 35 ( $p < ,000$ ).

Figura 11. A dosagem de COT apresentou alterações no grupo 3 no dia 21.

Figura 12. O CAT (ABTS) não apresentou alteração significativa entre os grupos.

## Discussão

O processo de lesão das hemácias estocadas em bancos de sangue já esta bem descrita<sup>1, 2,3</sup>. Nosso trabalho primou em descrever as alterações hematológicas e bioquímicas encontradas nas bolsas que ficaram estocadas no hemocentro (grupo 1) e as bolsas que foram devolvidas de varias agências transfusionais durante o estudo (grupos 3, 4), salientamos que o armazenamento e transportes dos concentrados de hemácias são de responsabilidade das AT's devendo seguir todas as normas e resoluções referentes aos componentes sanguíneos.

Durante os ensaios observamos os grupos apresentaram alterações hematológicas e bioquímicas. Ao comparamos o hematócrito observamos que todos os grupos firmam com médias próximas durante todo o período de estoque, diferentes de outros estudos<sup>16</sup> que demonstraram aumento significativo do Hct, enquanto<sup>15</sup> corroborou com os nossos resultados, o aumento Hct foi atribuído a mudança morfológica dos eritrócitos durante o armazenamento.

A dosagem da hemoglobina corrobora com estudos<sup>16,17</sup> não apresentando aumento significativo. O volume corpuscular médio (VCM) segundo estudos<sup>18</sup> apresentou aumento durante o armazenamento sendo diferente de nossos dados que apresentaram o VCM sem alteração<sup>16</sup>.

O nível de potássio medido em nosso trabalho apresentou aumento gradual durante o armazenamento (17,07 mmol/L - D 7 e no dia 35 30,39 mmol/L), corroborando com os relatos<sup>19,20</sup>.

Entre nossos grupos os valores medidos de potássio foram diferentes. O dia 28 (todos foram dosados) há aumento nos grupos 2 e 3 comparados com o grupo 1 e o grupo 4 apresentou queda. O aumento do nível de potássio no sobrenadante das bolsas de sangue pode contribuir para o risco de hipercalemia, após a transfusão, uma carga adicional de potássio pode ser administrada à circulação do paciente devido à lise de das hemácias transfundidas (particularmente as mais velhas), a hipercalemia pode ocasionar complicações cardíacas principalmente em neonatos ou pacientes que necessitam de transfusões maciças<sup>1,9,19,20</sup>.

O consumo de glicose durante o armazenamento ficou evidente corroborando com vários trabalho<sup>1,9,,20</sup>.

Novamente utilizando a dosagem do dia 28 como comparativo o grupo 1 a apresentou a média (292,88 SD 13) os demais ficaram abaixo dessa média, possivelmente ficarem expostas a temperaturas mais elevadas<sup>14</sup> do que as que permaneceram em no hemocentro promovendo o consumo exacerbado de glicose, sugerindo que podemos ter problemas no transporte ou no acondicionamento das bolsas nas agências transfusionais da Capital.

O Lactato desidrogenase é um marcador de dano celular<sup>15</sup>. O grupo 1 apresentou aumento do LDH no decorrer do estoque, esses achados já foram descritos anteriormente em outros trabalhos<sup>1,9,18</sup>, no entanto bolsas do grupo 1 foram as que exibiram maior concentração de LDH em comparação com os demais grupos embora tenham sido submetidos ao estoques controlado.

A análises do pH no grupo 1 apresentou queda de 7,2 a 7,0 conforme a literatura.<sup>21,22</sup>. Os demais grupos não apresentaram resultados fora da média do primeiro.

A Capacidade Oxidante Total (COT) dosada no grupo 1 apresentou aumento gradual no decorrer do armazenamento<sup>1,17</sup>, porém, comparando o grupo 1 com os demais observou-se o COT aumentado nas bolsas devolvidas caracterizando o aumento de oxidantes nessas bolsas.

A dosagem do CAT no grupo 1 apresentou decaimento<sup>18</sup> em quanto os demais não apresentaram o mesmo perfil sugerindo a diminuição de proteção contra os oxidantes existentes no plasma.

A dosagem de MDA no grupo 1 apresentou crescimento durante o armazenamento<sup>21,22</sup> os demais grupos ficaram com a média abaixo, o MDA é um marcador de peroxidação lipídica seu aumento nas bolsas de sangue pode contribuir para hemólise no decorrer da transfusão acarretando em danos ao paciente.

## **Conclusão**

Nosso estudo demonstrou que as bolsas de sangue devolvidas quando comparadas com bolsas de sangue que permaneceram estocadas (sem manipulação/transporte ou mudança do ambiente de estocagem) apresentaram maior variação nos resultados das análises hematológicas e bioquímicas. Levantando questões sobre o armazenamento das AT's o transporte e manuseio. Portanto, é necessário mais estudos para elucidação desta questão, contudo, é sensato a não reintegração dessas bolsas ao estoque prezando a qualidade transfusional.

## REFERÊNCIAS

1. BRASIL. ANVISA - agência nacional de vigilância sanitária. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. Resolução RDC nº 158, de 04 de Fevereiro de 2016.
2. Al, D. A. E. T. (2015). An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies, 55(January), 205–219. <http://doi.org/10.1111/trf.12804>
3. Kumar, D., & Rizvi, S. I. (2014). Markers of Oxidative Stress in Senescent Erythrocytes Obtained from Young and Old Age Rats. *Rejuvenation Research*, 17(5), 446–452. <http://doi.org/10.1089/rej.2014.1573>
4. Vandromme, M. J., McGwin, G., & Weinberg, J. A. (2009). Blood transfusion in the critically ill: does storage age matter? *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 17, 35. <http://doi.org/10.1186/1757-7241-17-35>
5. Orlov, D., & Karkouti, K. (2015). The pathophysiology and consequences of red blood cell storage. *Anaesthesia*, 70 Suppl 1, 29–37, e9–12. <http://doi.org/10.1111/anae.12891>
6. Hess, J. R. (2010). Red cell changes during storage. *Transfusion and Apheresis Science*, 43(1), 51–59. <http://doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.009>
7. Hess, J. R. (2012). Scientific problems in the regulation of red blood cell products. *Transfusion*, 52(8), 1827–1835. <http://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03511.x>
8. Hess, J. R. (2006). An update on solutions for red cell storage. *Vox Sanguinis*, 91(1), 13–19. <http://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2006.00778.x>
9. Roback, J. D., Josephson, C. D., Waller, E. K., Newman, J. L., Karatela, S., Uppal, K., ... Dumont, L. J. (2014). Metabolomics of ADSOL (AS-1) red blood cell storage. *Transfus Med Rev*, 28(2), 41–55. <http://doi.org/10.1016/j.tmr.2014.01.003>
10. van de Watering, L. M. G., & Brand, A. (2008). Effects of storage of red cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy : Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Für Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 35(5), 359–67. <http://doi.org/10.1159/000155221>
11. Tinmouth, A., Cook, D. J., Marshall, J. C., Clayton, L., Sc, M., McIntyre, L. Eng, B. (2015). Age of Transfused Blood in Critically Ill Adults. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1500704>

12. Flegel, W. A., Natanson, C., & Klein, H. G. (2014). Does prolonged storage of red blood cells cause harm? *British Journal of Haematology*, 165(1), 3–16. <http://doi.org/10.1111/bjh.12747>
13. Gevi, F., Alessandro, A. D., Rinalducci, S., & Zolla, L. (2012). Alterations of red blood cell metabolome during cold liquid storage of erythrocyte concentrates in CPD – SAGM ☆. *Journal of Proteomics*, 76, 168–180. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.012>
14. Vandromme, M. J., McGwin, G., & Weinberg, J. A. (2009). Blood transfusion in the critically ill: does storage age matter? *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 17, 35. <http://doi.org/10.1186/1757-7241-17-35>
15. Mustafa, I., Marwani, A. Al, Nasr, K. M., Kano, N. A., & Hadwan, T. (2016). Time Dependent Assessment of Morphological Changes : Leukodepleted Packed Red Blood Cells Stored in SAGM, 2016. <http://doi.org/10.1155/2016/4529434>
16. OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358. 1979.
17. Draper, H. H.; Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology** v.186, p. 421–431. 1990.
18. EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n.1, p 1103–1111. 2005
19. Tomczak, A. C. T. Q., Grilo, K. T. M., & Leonart, M. S. S. (n.d.). Estudo de métodos laboratoriais para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná ( Hemeepar ), Brasil. <http://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000076>
20. Antonelou, M. H., Tzounakas, V. L., Velentzas, A. D., Stamoulis, K. E., Kriebardis, A. G., & Papassideri, I. S. (2012). Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: A time-course evaluation from shape to proteome. *Journal of Proteomics*, 76, 220–238. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.06.032>
21. Bardyn, M., Rappaz, B., Jaferzadeh, K., Crettaz, D., Tissot, J. D., Moon, I., ... Prudent, M. (2017). Red blood cells ageing markers: A multi-parametric analysis. *Blood Transfusion*, 15(3), 239–248. <http://doi.org/10.2450/2017.0318-16>
22. Serrano, K., Chen, D., Hansen, A. L., Levin, E., Turner, T. R., Kurach, J. D. R., ... Devine, D. V. (2014). The effect of timing of gamma-irradiation on hemolysis and potassium release in leukoreduced red cell concentrates stored in SAGM. *Vox Sanguinis*, 106(4), 379–381. <http://doi.org/10.1111/vox.12112>



23. Vraets, A., Lin, Y., & Callum, J. L. (2011). Transfusion-associated hyperkalemia. *Transfusion Medicine Reviews*, 25(3), 184–196. <http://doi.org/10.1016/j.tmr.2011.01.006>
  
24. Antosik, A., Czubak, K., Gajek, A., Marczak, A., Glowacki, R., Borowczyk, K., & Zbikowska, H. M. (2015). Influence of Pre-Storage Irradiation on the Oxidative Stress Markers, Membrane Integrity, Size and Shape of the Cold Stored Red Blood Cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Für Transfusionsmedizin Und Immunhämatologie*, 42(3), 140–8. <http://doi.org/10.1159/000371596>
  
25. Collard, K., White, D., & Copplestone, A. (2014). The influence of storage age on iron status, oxidative stress and antioxidant protection in paediatric packed cell units. *Blood Transfusion*, 12(2), 210–219. <http://doi.org/10.2450/2013.0142-13>

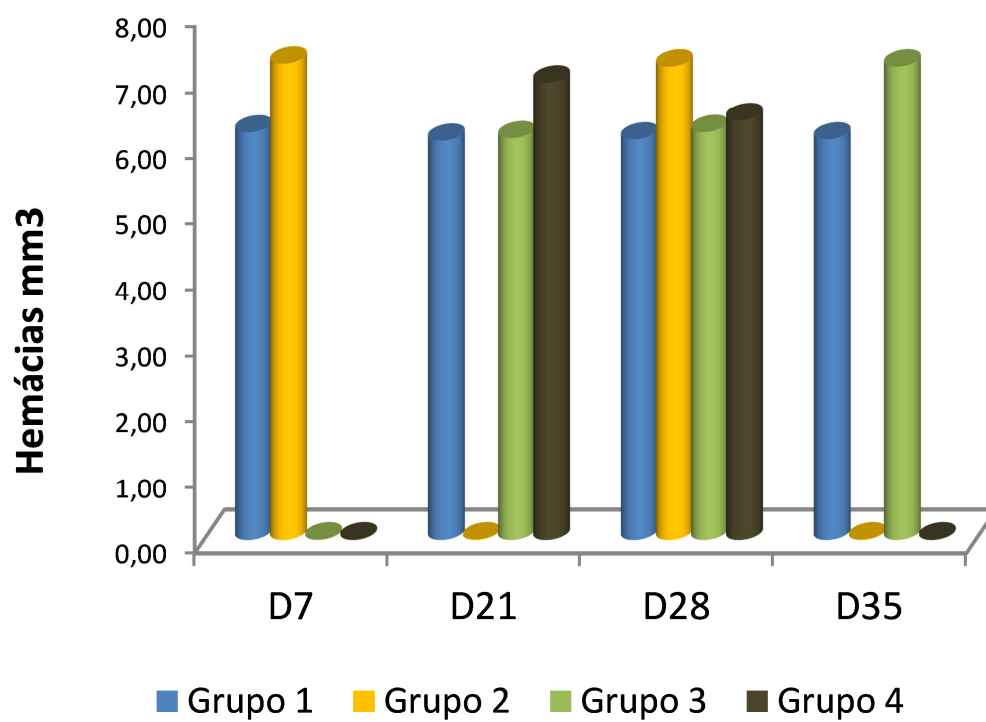


Figura 1. Contagem global do número de hemácias por grupos analisados durante os dias 7 ao 35 de estocagem.

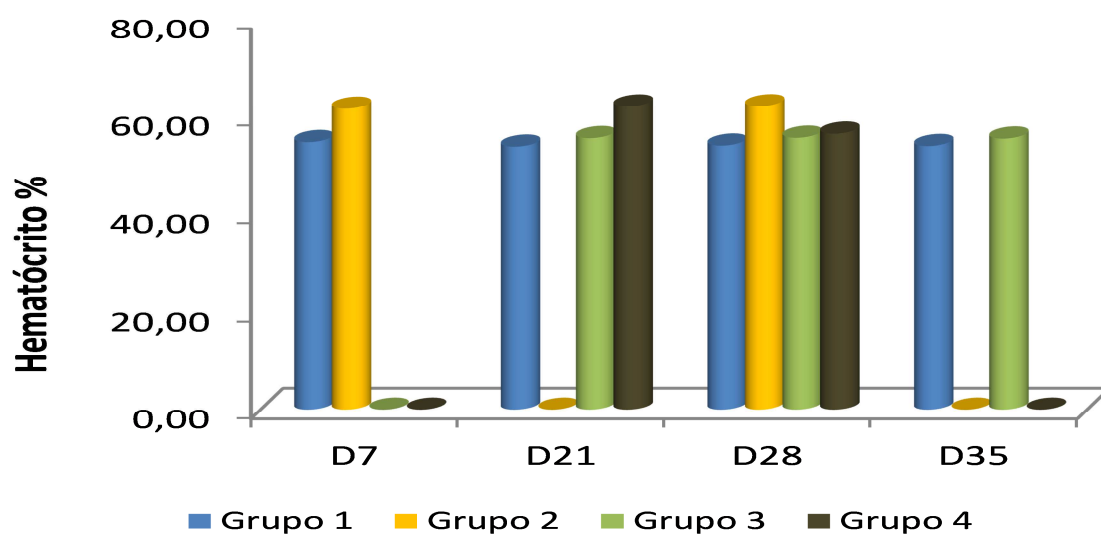


Figura 2. Valores do hematócrito mensurados nas bolsas estocadas e devolvidas ao hemocentro.

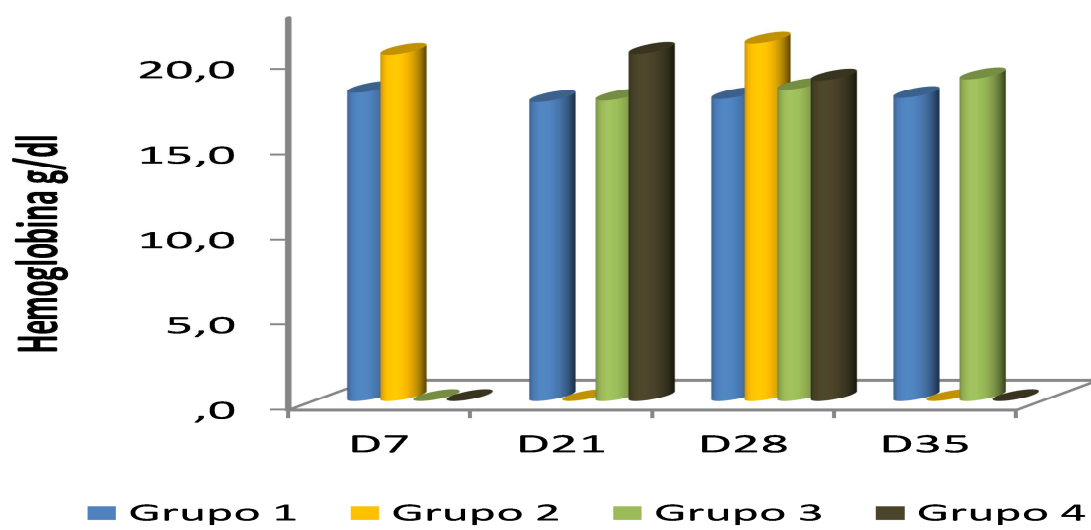


Figura 3. Dosagem da hemoglobina durante o período de estudo.

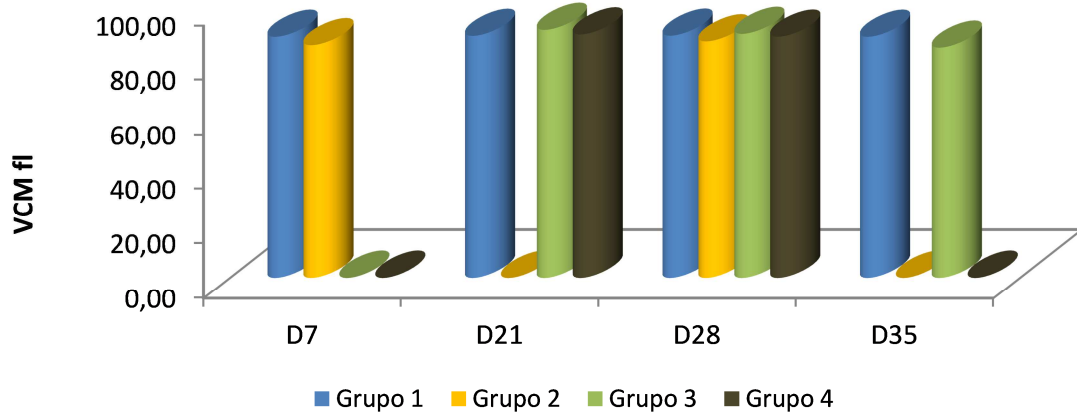


Figura 4. Volume Corpuscular Médio para os grupos analisados durante os dias 7 e 35.

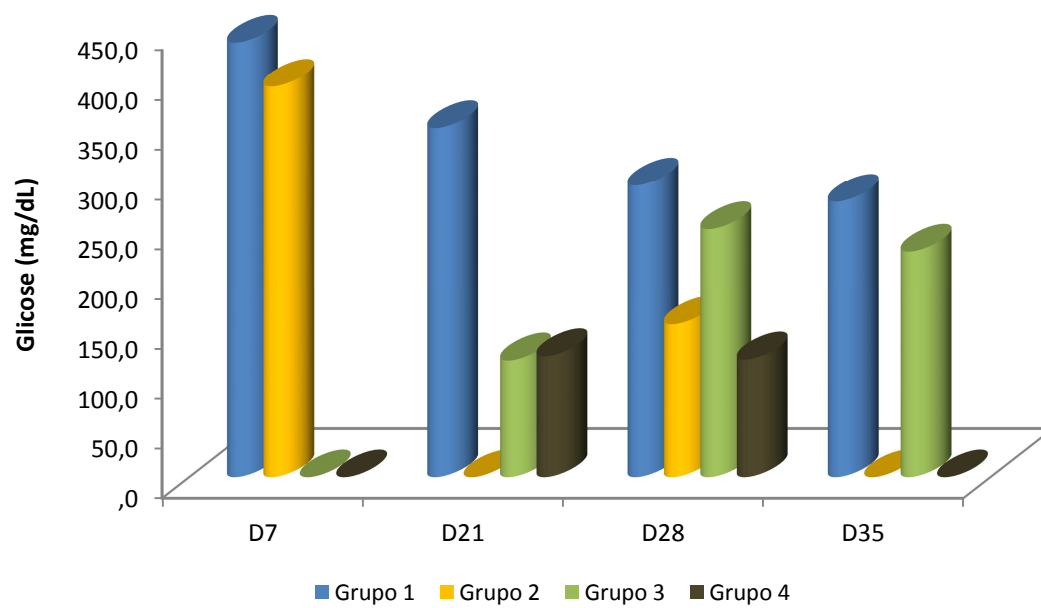


Figura 5. Dosagem de glicose no plasma das bolsas de sangue durante o decorrer de 35 dias.

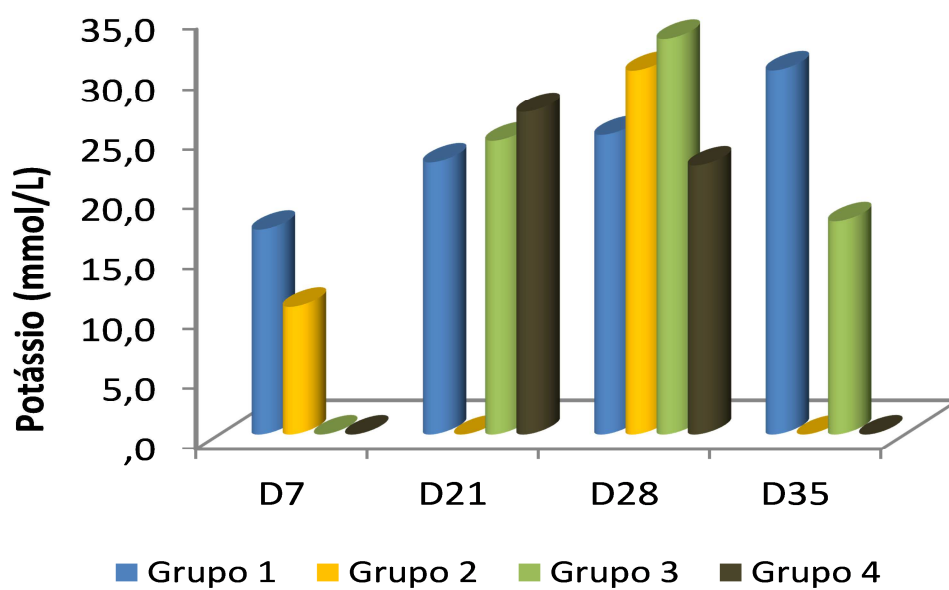


Figura 6. Medida de potássio no plasma das bolsas de sangue.

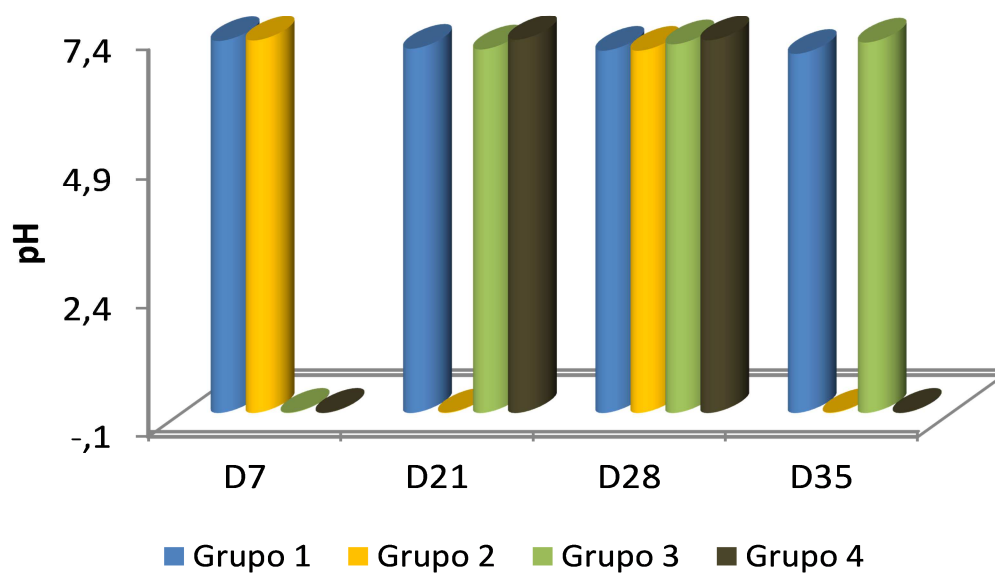


Figura 7. Médias do pH medidos nas bolsas de sangue estocadas e devolvidas de 7 a 35 dias.



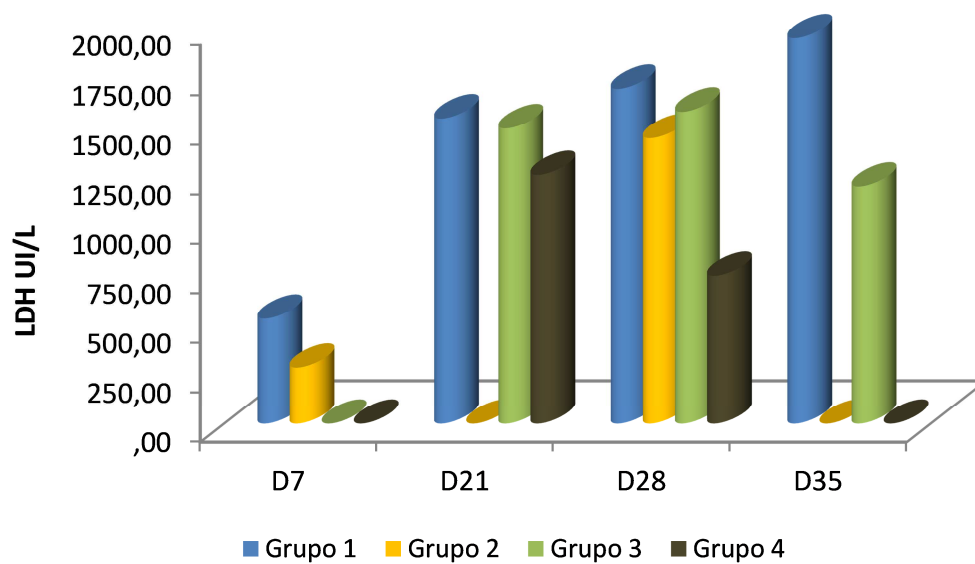


Figura 8. Dosagem de Lactato Desidrogenase no plasma das bolsas de sangue estocadas e devolvidas.

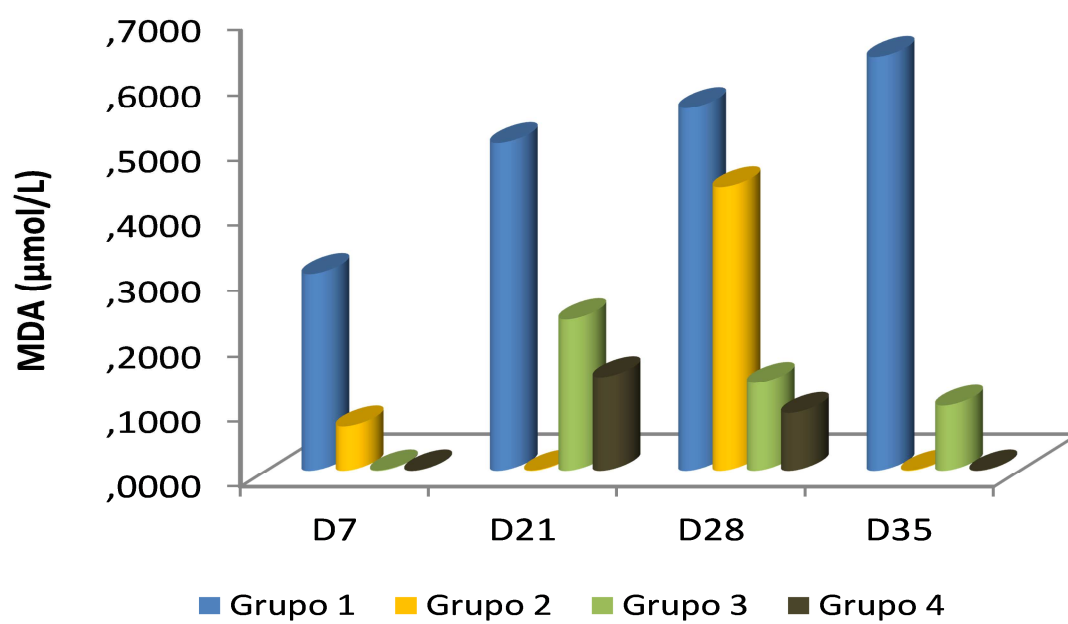


Figura 9. Medida de MDA (TBARS) no plasma das bolsas de sangue.

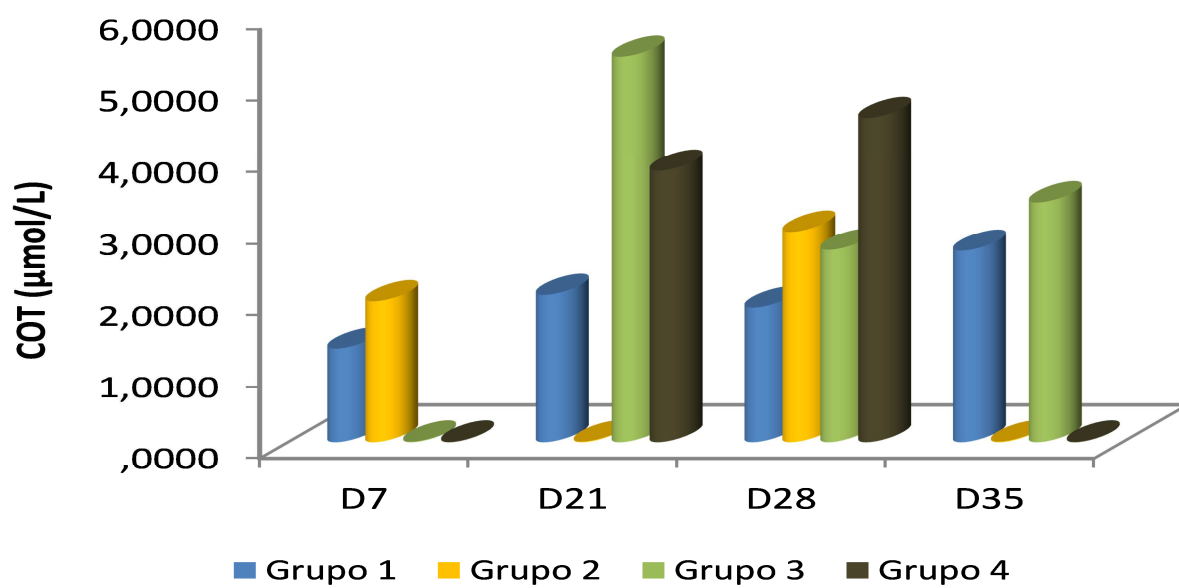


Figura 10. Capacidade Oxidante Total medida no plasma das bolsas de sangue.

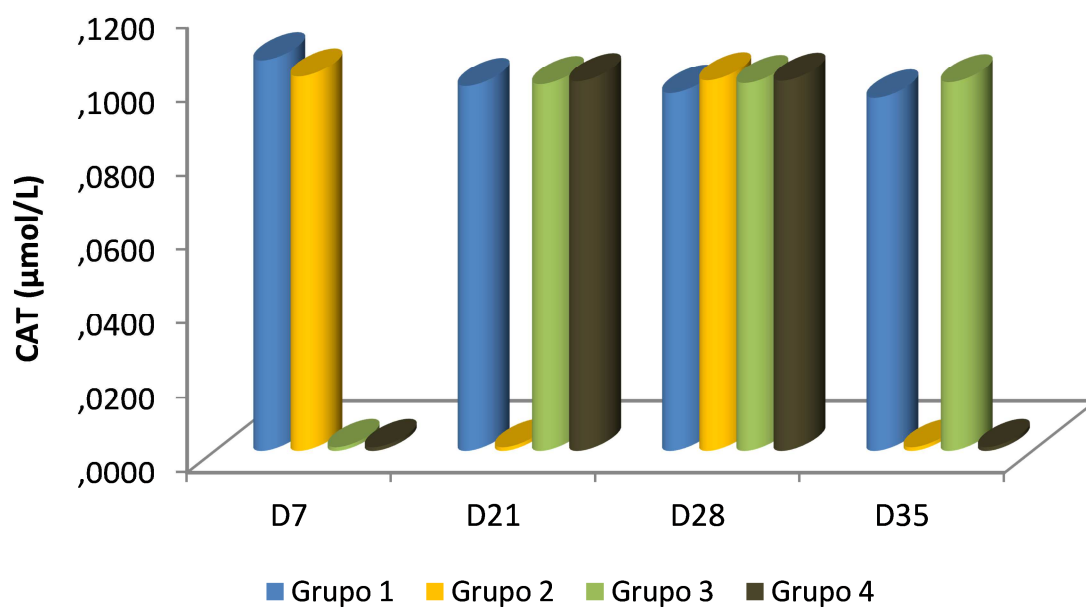


Figura 11. Capacidade Antioxidante Total medida no plasma das bolsas de sangue.

## 8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Sivilotti, M. L. A. (2004). Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. *Toxicological Reviews*, 23(3), 169–188. <http://doi.org/10.2165/00139709-200423030-00004>
2. Kumar, D., & Rizvi, S. I. (2014). Markers of Oxidative Stress in Senescent Erythrocytes Obtained from Young and Old Age Rats. *Rejuvenation Research*, 17(5), 446–452. <http://doi.org/10.1089/rej.2014.1573>
3. Vandromme, M. J., McGwin, G., & Weinberg, J. A. (2009). Blood transfusion in the critically ill: does storage age matter? *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 17, 35. <http://doi.org/10.1186/1757-7241-17-35>
4. Orlov, D., & Karkouti, K. (2015). The pathophysiology and consequences of red blood cell storage. *Anaesthesia*, 70 Suppl 1, 29–37, e9–12. <http://doi.org/10.1111/anae.12891>
5. Hess, J. R. (2010). Red cell changes during storage. *Transfusion and Apheresis Science*, 43(1), 51–59. <http://doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.009>
6. Hess, J. R. (2012). Scientific problems in the regulation of red blood cell products. *Transfusion*, 52(8), 1827–1835. <http://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03511.x>
7. Bruhin, A., Goette, L., Roethlisberger, A., Markovic, A., Buchli, R., & Frey, B. M. (2015). Call of duty: The effects of phone calls on blood donor motivation. *Transfusion*, 55(11), 2645–2652. <http://doi.org/10.1111/trf.13236>
8. BRASIL. Lei nº 10205, de 21 de março de 2001, Regulamenta o § 4º do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução adequada dessas atividades, e dá outras providências D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 22 de março de 2001, Brasília, 21 de março de 2001
9. BRASIL. ANVISA - agência nacional de vigilância sanitária. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. Resolução RDC nº 158, de 04 de Fevereiro de 2016.
10. Hess, J. R. (2006). An update on solutions for red cell storage. *Vox Sanguinis*, 91(1), 13–19. <http://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2006.00778.x>

11. Rous, P., & Turner, J. R. (1916). the Preservation of Living Red Blood Cells in Vitro : I. Methods of Preservation. *The Journal of Experimental Medicine*, 23(2), 219–237.
12. Roback, J. D., Josephson, C. D., Waller, E. K., Newman, J. L., Karatela, S., Uppal, K., ... Dumont, L. J. (2014). Metabolomics of ADSOL (AS-1) red blood cell storage. *Transfus Med Rev*, 28(2), 41–55. <http://doi.org/10.1016/j.tmr.2014.01.003>
13. Sakuma, A., Ottoboni, M., & Sierra, P. (2011). Manual para controle da qualidade do sangue total e hemocomponentes, 120p. Retrieved from [http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs leis/pd/pd1\\_manual\\_sangue.pdf](http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs leis/pd/pd1_manual_sangue.pdf)
14. van de Watering, L. M. G., & Brand, A. (2008). Effects of storage of red cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy : Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Für Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 35(5), 359–67. <http://doi.org/10.1159/000155221>
15. Tinmouth, A., Cook, D. J., Marshall, J. C., Clayton, L., Sc, M., McIntyre, L. Eng, B. (2015). Age of Transfused Blood in Critically Ill Adults. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1500704>
16. Flegel, W. A., Natanson, C., & Klein, H. G. (2014). Does prolonged storage of red blood cells cause harm? *British Journal of Haematology*, 165(1), 3–16. <http://doi.org/10.1111/bjh.12747>
17. Tinmouth, A., Cook, D. J., Marshall, J. C., Clayton, L., Sc, M., McIntyre, L. Eng, B. (2015). Age of Transfused Blood in Critically Ill Adults. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1500704>
18. Tinmouth, A., Cook, D. J., Marshall, J. C., Clayton, L., Sc, M., McIntyre, L. Eng, B. (2015). Age of Transfused Blood in Critically Ill Adults. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1500704>
19. Mohanty, J. G., Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2014). Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in Physiology*, 5 FEB(February), 1–6. <http://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>
20. Flegel, W. A., Natanson, C., & Klein, H. G. (2014). Does prolonged storage of red blood cells cause harm? *British Journal of Haematology*, 165(1), 3–16. <http://doi.org/10.1111/bjh.12747>
21. Gevi, F., Alessandro, A. D., Rinalducci, S., & Zolla, L. (2012). Alterations of red blood cell metabolome during cold liquid storage of erythrocyte concentrates in CPD – SAGM ☆. *Journal of Proteomics*, 76, 168–180. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.012>
22. Rifkind, J. M., Mohanty, J. G., & Nagababu, E. (2015). The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Frontiers in*

*Physiology*, 6(JAN), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fphys.2014.00500>

23. Vandromme, M. J., McGwin, G., & Weinberg, J. A. (2009). Blood transfusion in the critically ill: does storage age matter? *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*, 17, 35. <http://doi.org/10.1186/1757-7241-17-35>
24. Orlov, D., & Karkouti, K. (2015). The pathophysiology and consequences of red blood cell storage. *Anaesthesia*, 70 Suppl 1, 29–37, e9–12. <http://doi.org/10.1111/anae.12891>
25. OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358. 1979.
26. Draper, H. H.; Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology** v.186, p. 421–431. 1990.
27. EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n.1, p 1103–1111. 2005
28. Taniguchi, I., McCloskey, A., & Ohno, M. (2014). *Analysis of RNA transport in Xenopus oocytes and mammalian cells. Methods in Cell Biology* (1st ed., Vol. 122). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-417160-2.00018-7>
29. Collins, F. S., & Ph, D. (2010). R 2001. *Genome*, 2001–2011. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0907175>
30. SACHIDANANDAM, R. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 928–933, 15 fev. 2001.
31. FAREED, M.; AFZAL, M. Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 14, n. 2, p. 123–134, abr. 2013.
32. GRIFFIN, T. J.; SMITH, L. M. Genetic identification by mass spectrometric analysis of single-nucleotide polymorphisms: ternary encoding of genotypes. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 14, p. 3298–3302, 15 jul. 2000.
33. DEN DUNNEN, J. T.; ANTONARAKIS, S. E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Human mutation**, v. 15, n. 1, p. 7–12, jan. 2000.
34. Crawford, F., Beck, S., Mclean, J., & Walsh, D. (2012). Migration and health in Glasgow and its relevance to GoWell February 2012, (February).
35. Spurdle, A. B., Hopper, J. L., Chen, X., Dite, G. S., McCredie, M. R., Giles, G. G. Chenevix-Trench, G. (2001). The steroid 5alpha-reductase type II TA repeat polymorphism is not associated with risk of breast or ovarian cancer in Australian women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10(12), 1287–1293. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11751447](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11751447)

36. Petrovi, D., & Peterlin, B. (2014). GSTM1-null and GSTT1-null genotypes are associated with essential arterial hypertension in patients with type 2 diabetes. *Clinical Biochemistry*, 47(7-8), 574–577. <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.03.012>
37. Hess, J. R. (2010). Red cell changes during storage. *Transfusion and Apheresis Science*, 43(1), 51–59. <http://doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.009>
38. Hess, J. R. (2012). Scientific problems in the regulation of red blood cell products. *Transfusion*, 52(8), 1827–1835. <http://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03511.x>
39. Lion, N., Crettaz, D., Rubin, O., & Tissot, J.-D. (2010). Stored red blood cells: A changing universe waiting for its map(s). *Journal of Proteomics*, 73(3), 374–385. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.11.001>
40. Hod, E. A., & Spitalnik, S. L. (2012). Stored red blood cell transfusions: Iron, inflammation, immunity, and infection. *Transfusion Clinique et Biologique : Journal de La Société Française de Transfusion Sanguine*, 19(3), 84–9. <http://doi.org/10.1016/j.tracli.2012.04.001>
41. Raat, N. J. H., & Ince, C. (2007). Oxygenating the microcirculation: the perspective from blood transfusion and blood storage. *Vox Sanguinis*, 93(1), 12–8. <http://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.00909.x>
42. Collins, F. S., & Ph, D. (2010). R 2001. *Genome*, 2001–2011. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0907175>
43. Roback, J. D. (2016). Perspectives on the impact of storage duration on blood quality and transfusion outcomes. *Vox Sanguinis*, 111(4), 357–364. <http://doi.org/10.1111/vox.12441>
44. Klein, H. G. (2017). The red cell storage lesion(s): Of dogs and men. *Blood Transfusion*, 15(2), 107–111. <http://doi.org/10.2450/2017.0306-16>
45. Mohanty, J. G., Nagababu, E., & Rifkind, J. M. (2014). Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. *Frontiers in Physiology*, 5 FEB(February), 1–6. <http://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>
46. Rifkind, J. M., Mohanty, J. G., & Nagababu, E. (2015). The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Frontiers in Physiology*, 6(JAN), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fphys.2014.00500>
47. Taniguchi, I., McCloskey, A., & Ohno, M. (2014). *Analysis of RNA transport in Xenopus oocytes and mammalian cells. Methods in Cell Biology* (1st ed., Vol. 122). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-417160-2.00018-7>
48. KIM, Y. et al. Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Nature**, v. 376, n. 6541, p. 612–616, 17 ago. 1995.



49. YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, p. 337–348, 2004.

## ANEXO 01

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMACIONAL  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

## Você está sendo convidado para participar da pesquisa “AVALIAÇÃO LABORATORIAL, ENZIMÁTICA E MOLECULAR DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS DEVOLVIDAS À FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS”

Estamos realizando uma pesquisa para conhecermos melhor as causas das lesões celulares ocorridas nas bolsas de concentrados de hemácias estocadas e distribuídas pelo HEMOAM, bem como baseados nestas informações poder melhorar o gerenciamento de distribuição e aceitação de devolução das bolsas.

Hoje é possível identificar várias lesões que ocorrem nas hemácias estocadas em condições de resfriamento, como alteração na morfologia eritrocitária, diminuição do 2,3DPG, aumento do potássio extracelular e diminuição da atividade antioxidante. Todos os testes que realizaremos no projeto são ligados à lesão celular e poderão colaborar com o médico solicitante da transfusão de concentrado de hemácias, de forma que o mesmo possa solicitar uma bolsa com maior ou menor tempo de estoque. Nosso projeto analisará a parte morfológica, bioquímica e molecular dos concentrados de hemácias do HEMOAM.

É de grande importância que você entenda os princípios gerais que se seguem e que serão aplicados a todos os participantes do nosso estudo:

- A) Sua participação é totalmente voluntária;
- B) Você poderá interromper sua participação antes ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa em participar não envolverá qualquer prejuízo para seu atendimento no serviço caso não queira participar da pesquisa;
- C) Depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária ao seu entendimento.

## EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

Se você quiser participar, será colhida uma amostra de sangue da veia do braço (mais ou menos uma colher de chá) com seringa e agulha. Durante a coleta de sangue você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal treinado.

Todas as amostras de sangue que forem utilizadas neste projeto, você terá acesso total aos resultados, sendo estes enviados para o seu endereço pelos correios ou entregues pessoalmente pelo pesquisador deste projeto.

Também serão anexados ao projeto sem necessidade de nova entrevista, dados da sua clínica obtidos do seu cadastro quando realizou a entrevista, bem como dados hematológicos e bioquímicos de possíveis coletas de sangue que realizará.

## BENEFÍCIOS

Um benefício de sua participação neste estudo é a contribuição para o conhecimento científico na área da saúde.

Além disso, você poderá se beneficiar do diagnóstico, do aconselhamento e orientação sobre a doença genéticas.

Tenha certeza sua participação e das demais pessoas serão de muita importância para um melhor acompanhamento e entendimento de possíveis distúrbios genéticos com a lesão celular.

#### COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto.

#### ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos somente se o Sr(a) autorizar. Sua amostra poderá ser utilizado em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores.

Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.

Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores. Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:

Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituído por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

- ( ) Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados  
( ) Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

O pesquisador responsável por este estudo, Prof. Dr. JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO, está à sua disposição e com ele você pode esclarecer qualquer dúvida que surja sobre o referido estudo. Você receberá uma via deste TCLE, que será assinada pela pesquisador e pelo Sr(a) em todas as páginas.

Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas localizado no HMOAM - Bloco A - Sala - Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada – Manaus – AM- Fone: (92) 3655-0100 Ramal 0123. O Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - é um colegiado independente existe nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil. Ele foi criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde). As atribuições do CEP são de papel consultivo e educativo, visando contribuir para a qualidade das pesquisas, bem como a valorização do pesquisador, que recebe o reconhecimento de que sua proposta é eticamente adequada.

O CEP/HEMOAM é uma comissão constituída por treze membros das várias áreas do conhecimento, e um representante dos usuários, que tem por finalidade a avaliação da pesquisa com seres humanos em nossa Instituição, em conformidade com a legislação brasileira regulamentada pela CONEP.

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos.

Dr. José Pereira de Mouro Neto - Coordenador do projeto - Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular – Rua Alexandre Amorim N: 330 - Bairro Aparecida - Manaus/AM - Contato: (92) 3305-000 – (92) 98187-0920.

Marcelo Reis do Nascimento - Biomédico do HEMOAM – Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - Endereço: R. Cananoré, N°110 – Chapada – Manaus/AM - Contato: (92) 3655-0111 - (92) 99155-3788.

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa “AVALIAÇÃO LABORATORIAL, ENZIMÁTICA E MOLECULAR DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS DEVOLVIDAS À FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS”. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Li este termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa Assinei duas vias, uma que vai ficar comigo e outra que será guardada pelo pesquisador.

\_\_\_\_\_  
Local, Data (dia/mês/ano)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante do Estudo

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador(a)

Impressão Datiloscópica:

Nome do Coordenador da pesquisa: José Pereira de Moura Neto

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Coordenador da pesquisa: