

Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto – SP

Wallace Fernando Rocha de Souza

**Avaliação laboratorial das lesões de armazenamento durante a
conservação de sangue total**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para a obtenção do título de
especialista em Imunologia Hematológica e Hemoterápica

São José do Rio Preto – SP

2014

Avaliação laboratorial das lesões de armazenamento durante a conservação de sangue total

Laboratory evaluation of storage lesions during storage of whole blood

Walace Fernando Rocha de Souza¹

¹*Biomédico, pós-graduando em Imunologia Hematológica e Hemoterápica – Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP.*

Resumo

O sangue armazenado em bolsas plásticas sofre alterações graduais ao longo do período de conservação, sendo conhecidas em conjunto como lesões de armazenamento. Tais alterações podem inviabilizar a utilização do sangue ou diminuir sua eficácia pós-transfusão. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo expor e mensurar as principais alterações ocorridas durante a conservação de sangue total. **Materiais e métodos:** bolsas de sangue total, excluídas por triagem subjetiva são armazenadas a $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, amostras são coletadas no seguinte período: 1°, 7°, 14°, 21° e 35° dia de armazenamento. Posteriormente, enviadas ao laboratório clínico para a dosagem do potássio, pH, hemoglobina plasmática livre e lactato desidrogenase (HDL). **Resultados:** a análise por média aritmética mostrou o nível de potássio no 1° dia: 4,5 mEq/L, 7° dia 11,9: mEq/L, 14° dia: 16,5 mEq/L 21° dia: 24,5 mEq/L e no 35° dia: 25,4 mEq/L; o nível de Lactato desidrogenase no 1° dia: 140 U/L, 7° dia: 202 U/L, 14° dia: 0368U/L, 21° dia: 495,5 U/L e no 35° dia: 501 U/L; o nível de hemoblogina plasmática livre no 1° dia: 0 g/dL, 7° dia: 0,1 g/dL, 14° dia: 0,1 g/dL, 21° dia: 0,1 g/dL e no 35° dia 0,2 g/dL; o pH no 1° dia: 6,9, 7° dia: 6,7, 14° dia:6,6 21° dia : 6,5 e no 35° dia: 6,5. **Conclusão:** após a coleta e posterior armazenamento, o sangue sofre alterações graduais, sendo assim, o tempo de armazenamento é diretamente proporcional às lesões celulares sofridas decorrentes da estocagem, o que pode diminuir a resposta transfusional ou inviabilizar a transfusão do hemocomponente.

Palavras-chave: armazenamento, bolsa de sangue, transfusão

Abstract

*Blood stored in plastic bags undergoes gradual changes throughout the storage period, and knew him together as storage lesions. Such changes may prevent the use of blood or decrease their post-transfusion efficacy. Thus, this study aims to expose and measure the major changes during storage of whole blood. **Materials and methods:** bags of whole blood, excluded subjective screening are stored at $4^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, samples are collected in the following period: 1st, 7th, 14th, 21st, and 35th day of storage. Then sent to the clinical laboratory for the estimation of potassium, pH, plasma free hemoglobin and lactate dehydrogenase (HDL). **Results: Conclusion:***

Keywords: storage, blood bag, transfusion

Introdução

A transfusão de componentes do sangue, especialmente na forma de unidades transfusionais eritrocitárias (UTE), é fundamental para a manutenção de muitas vidas em todo o mundo. A medicina transfusional preconiza a utilização de hemocomponentes, pois permite aumentar o tempo de estocagem e oferecer o produto mais específico. A importância da qualidade das UTE é inquestionável e amplamente discutida. O estudo da lesão de estoque dos eritrócitos se apresenta como etapa importante no controle de qualidade e tem mostrado correlação significativa com a eficácia do tratamento.¹

A partir de 1980 foram criadas as soluções aditivas que vieram para aumentar o tempo de prateleira das hemácias. Na década de 90, novos conhecimentos contribuíram para melhoria da qualidade das células armazenadas, como a leucorredução. Cada vez mais o empenho dos pesquisadores tem sido o aprimoramento de soluções preservativas, no intuito de se reduzir as lesões de armazenamento e promover maior tempo de conservação.²

O sangue total se caracteriza como o sangue coletado de um doador misturado com a solução preservativa e anticoagulante, na proporção de aproximadamente 450 mL de sangue para 63 mL de solução preservativa. O hematócrito dessa unidade varia de 36% a 44%. Deve ser estocado em refrigerador monitorizado entre 1° e 6° C. Seu prazo de validade depende do anticoagulante utilizado na bolsa de coleta: Citrato-Fosfato-Dextrose (CPD) é de 21 dias e Citrato - Fosfato-Dextrose- Adenina (CPDA - 1) é de 35 dias.³

A retirada do sangue da circulação para conservação in vitro, transfere os eritrócitos para um ambiente diferente do encontrado no organismo vivo, o que

promove uma série de alterações hematológicas, morfológicas, hemogasométricas e bioquímicas, que em conjunto são conhecidas como lesões de armazenamento, elas vão desde modificações microscópicas das células vermelhas que podem resultar em danos irreversíveis e redução da sobrevivência pós-transfusional, até o acúmulo de substâncias biorreativas que podem influenciar a qualidade do sangue transfundido e contribuir para reações pós-transfusionais. ⁴

Materiais e métodos

Foram selecionadas aleatoriamente 14 unidades de sangue total, obtidas de doadores voluntários que se apresentaram no Banco de Sangue da Associação Hospitalar Casa de Saúde de Santos (AHCSS), de maio a junho de 2014 e excluídas na triagem clínica e epidemiológica por subjetividade, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da AHCSS. Com esta amostragem foi possível obter médias representativas em relação aos parâmetros avaliados para o acompanhamento da qualidade dos eritrócitos durante a preservação.

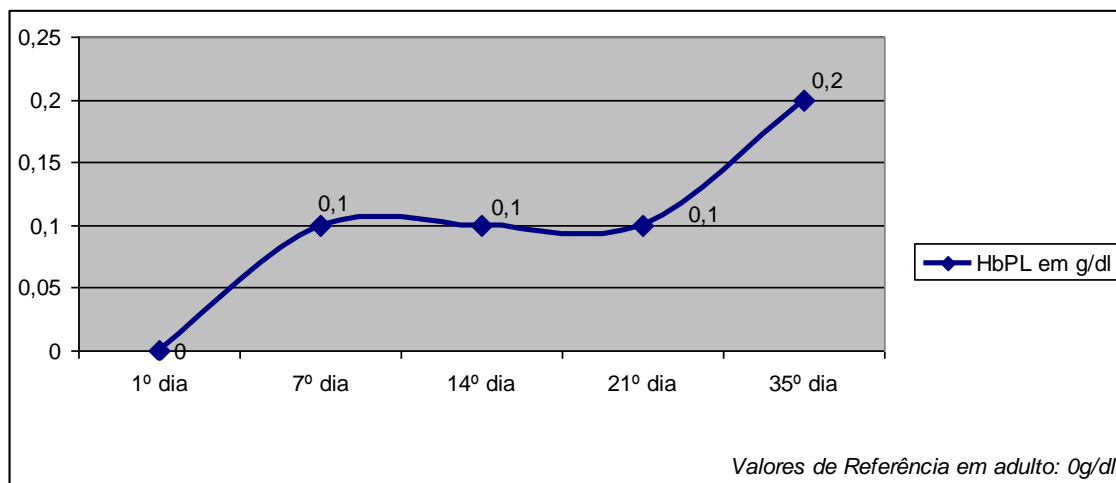
Seguindo o procedimento operacional padrão, o sangue total foi coletado em bolsa tripla *Fresenius Kabi*® contendo 63 mL de solução anticoagulante CPDA-1 (cada 100 mL de solução CPDA-1 contém: 2630mg de citrato de sódio diidratado, 327 mg de ácido cítrico monoidratado, 222mg de fosfato de sódio monobásico, 27,5 mL de adenina, água para injeção qsp. 100 mL), as bolsas satélites foram desprezadas e apenas a bolsa principal contendo o sangue total foi devidamente rotulada com a data de coleta e numeração particular criada para facilitar a identificação sendo armazenada em geladeira com temperatura controlada a cada 4 horas seguindo as diretrizes de armazenamento: $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$. As amostras foram obtidas do segmento após a homogeneização no seguinte período: 1°, 7°, 14°, 21° e 35° dia de armazenamento. Posterior à obtenção das amostras, as mesmas foram enviadas ao laboratório clínico de apoio que analisou o eletrólito potássio (K^+), a enzima lactato desidrogenase (LDH), o pH e a hemoglobina plasmática (hemoglobina livre). No 35° dia, foi realizada hemocultura para excluir a possível contaminação durante o processo de obtenção das amostras

Resultados e discussão

Alterações morfológicas

Apesar das soluções conservadoras possuírem fontes de energia para a manutenção do metabolismo eritrocitário, a sobrevivência dos eritrócitos é limitada tanto pela redução da fonte energética ao longo do armazenamento como pelo envelhecimento natural das hemácias. O período de armazenamento promove uma série de alterações na membrana plasmática dos eritrócitos como redução do tamanho e esferocitose progressiva, surgimento de microvesículas e aumento gradual da fragilidade osmótica, sendo que algumas sofrem lise, levando à diminuição no número de hemácias, diminuição do volume globular e aumento da hemoglobina plasmática.⁵ O aumento da hemoglobina plasmática (hemoglobina livre) é resultante da ruptura das hemácias ou liberação da hemoglobina presente nas microvesículas das membranas, o que pode ocasionar danos à função renal e ao sistema da coagulação quando o sangue é transfundido. Nos bancos de sangue humanos, a percentagem de hemólise durante o armazenamento não deve ser superior a 1%. Nos países da União Européia e no Brasil, este percentual é mais rígido não podendo ultrapassar 0,8%.⁶

GRÁFICO1. Variação dos níveis de hemoglobina plasmática livre nos 1º, 7º, 21º e 35º dias.

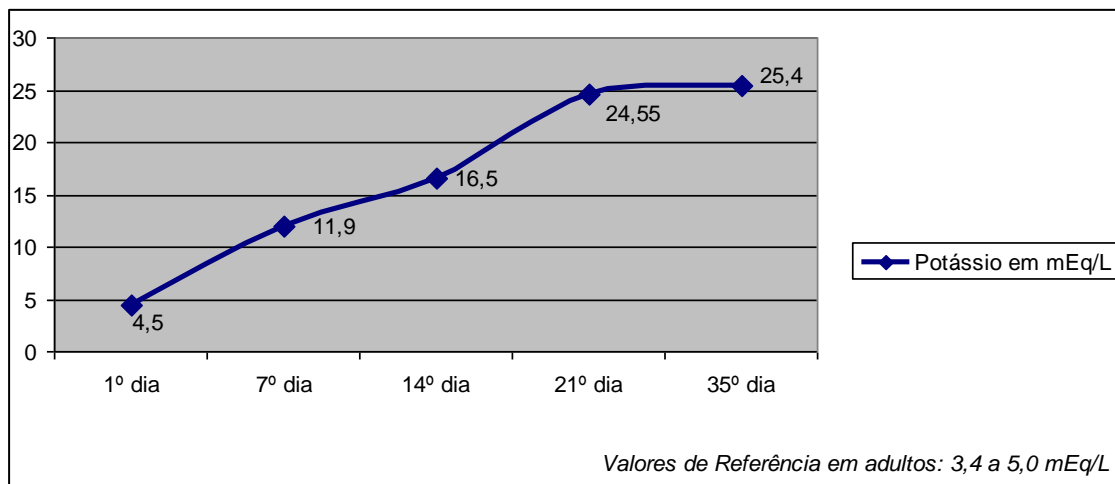


Alterações bioquímicas

O potássio é um íon predominantemente intracelular, sendo encontrado apenas cerca de 2% no meio extracelular, enquanto o sódio é um íon extracelular. A manutenção do equilíbrio desse gradiente de concentração nas hemácias é realizada pela bomba de sódio e potássio encontrada na membrana plasmática. A atividade dessa bomba de Na/K é dependente dos níveis de ATP, sendo também influenciada pela

diminuição do pH e da temperatura. Ao longo do período de armazenamento ocorre uma diminuição das concentrações de ATP, queda do pH e diminuição da atividade da bomba de Na/K, ocorrendo o aumento do potássio extracelular e diminuição do sódio extracelular. A inversão do gradiente de concentração promove aumento de soluções osmóticas e consequentemente o aumento da hipertonicidade do meio intracelular. Altos valores de K^+ no sangue armazenado estão na dependência da hemólise e das concentrações de K^+ intra-eritrocitários entre as espécies, sendo encontradas em grandes quantidades nas hemácias de humanos. ⁷

GRÁFICO 2. Variação dos níveis de potássio nos 1º, 7º, 21º e 35º dias.



Alterações hemogasométricas

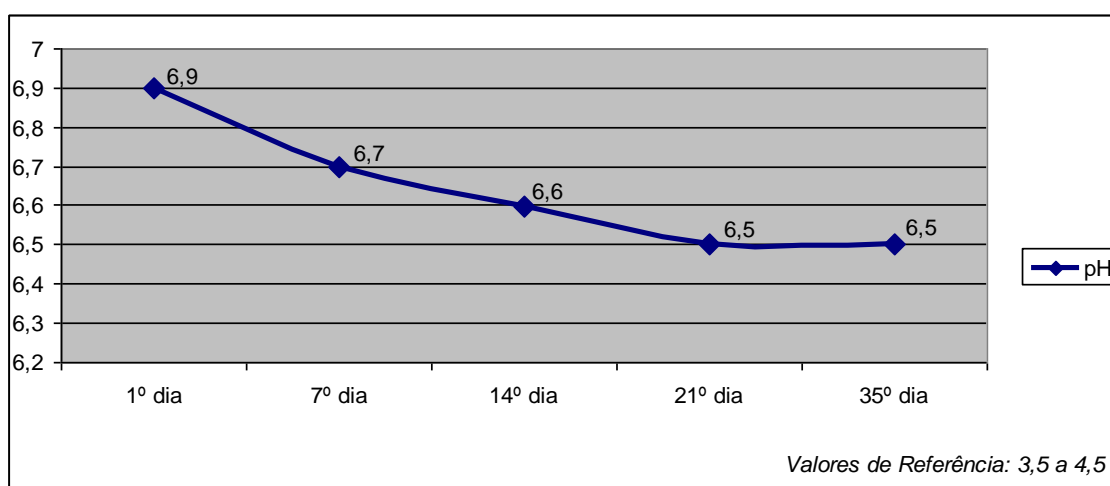
As hemácias são células anucleadas cujo metabolismo se mantém durante o período de estocagem, com manutenção da produção de lactato, reduzindo pH e consequentemente seu tempo de validade. Além de alterar a membrana eritrocitária, o pH reduzido dificulta a recomposição do 2,3 DPG, molécula responsável pelo controle de afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, resultando em redução da liberação de oxigênio para os tecidos pelas hemácias transfundidas. ⁸ O pH sanguíneo dos animais está próximo da neutralidade com leve tendência à alcalinidade (aproximadamente 7,4). Em condições fisiológicas, as reações metabólicas tendem a desviar continuamente este pH para ácido ou para básico. Quando o sangue coletado é armazenado em soluções conservadoras, umas das alterações que ocorre é a redução do pH, visto que as

células continuam seu metabolismo. Nas diferentes espécies, observa-se a redução do pH logo no primeiro dia de armazenamento decorrente da presença de ácido nítrico na solução conservadora, sendo que este pH tende a decrescer ainda mais ao longo do tempo, devido ao metabolismo anaeróbico das hemácias em que a glicose é metabolizada a lactato, levando ao acúmulo de íons de H^+ .⁹

Segundo Authement et al. observa-se a redução do pH logo no primeiro dia de armazenamento, decorrente da presença de ácido cítrico na solução conservadora, sendo que este pH tende a decrescer ainda mais ao longo do tempo, devido ao metabolismo anaeróbico das hemácias em que a glicose é metabolizada a lactato, levando ao acúmulo de íons H^+ . Essa alteração hemogasométrica pode ser observada no gráfico (? Confeccionar gráfico do pH) obtido por média aritmética.

Não é bem conhecido o pH onde as células sanguíneas podem ser submetidas e continuam a metabolizar, mas Hess e Greenwalt (2002) em trabalho com sangue humano sugeriram que o pH de 6,2 seja o máximo. Os níveis de pH do presente trabalho chegaram no máximo a 6,3 estando, portanto, nos padrões estabelecidos.

GRÁFICO 3. Variação dos níveis de pH nos 1º, 7º, 14º e 35º dias.



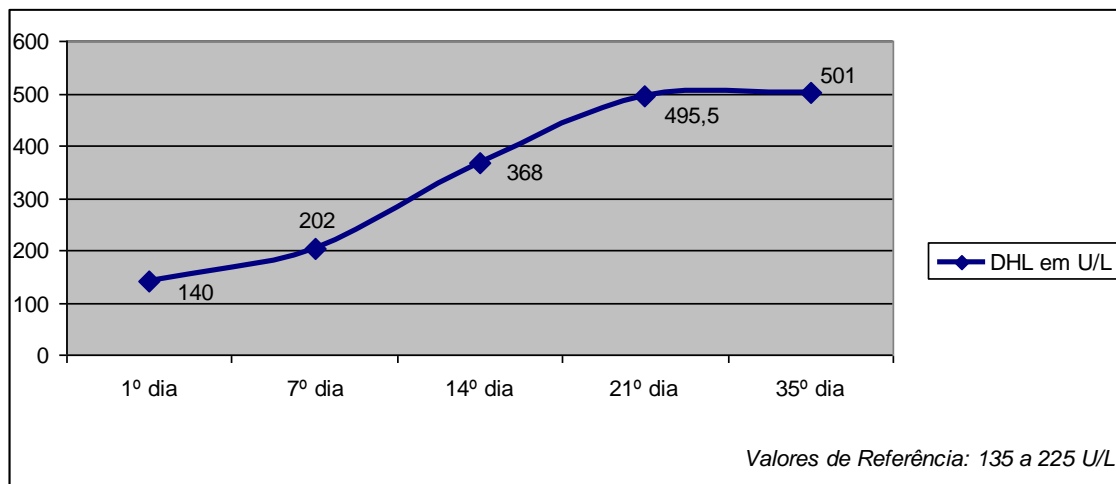
Lactato Desidrogenase (LDH)

Enzima tetramérica contendo apenas duas subunidades diferentes: H, para o coração e M, para o músculo esquelético. São identificadas cinco formas dessas isoenzimas: LDH1 (HHHH) e LDH2 (HHHM), encontradas no miocárdio e nos

eritrócitos; LDH3 (HHMM), no cérebro e rim; LDH4 (HMMM) e por fim LDH5 (MMMM), encontrada no fígado e músculo esquelético. ¹⁰

Todas as células de mamíferos possuem LDH e o lactato é o produto final da glicólise em condições anaeróbias. Em condições de aerobiose, as células de mamíferos utilizam o oxigênio molecular e as reações mitocondriais para oxidar NADH em NAD⁺ e o piruvato em CO₂ e H₂O de modo que não há formação de lactato. O principal objetivo da quantificação da enzima LDH é indicar a existência de uma severidade aguda ou danos teciduais crônicos e, algumas vezes, a monitoração de doenças progressivas. A LDH também pode ser usada em diagnósticos diferenciais para ajudar na detecção de órgãos afetados. ¹¹

GRÁFICO 4. Variação dos níveis de lactato desidrogenase nos 1º, 7º, 21º e 35º dias.



Conclusão

Após a coleta e posterior armazenamento, o sangue sofre alterações graduais, sendo assim, o tempo de armazenamento é diretamente proporcional às lesões celulares sofridas decorrentes da estocagem, o que pode diminuir a resposta transfusional ou inviabilizar a transfusão do hemocomponente.

Referências Bibliográficas

Giangrande PLF. *The history of blood transfusion*. Br J Haematol. 2000;110(4):758-67.

Tinmouth A, Fergusson D, Yee IC, Hébert PC; ABLE Investigators; Canadian Critical Care Trials Group. *Clinical consequences of red cell storage in the critically ill*. Transfusion. 2006;46(11):2014-27

Kennedy MS, Julius C. Transfusion therapy. In: Harmening, D. *Modern Blood Banking and Transfusion Practices*. 3th. ed. Philadelphia: FA Davis Company, p. 316-333, 1994.

Chin-Yee, I., Arya, N. & D'Almeida, M.S. 1997. *The red cell storage lesion and its implication for transfusion*. *Transfusion Science*, 18:447-458.

Wardrop, K.J., Owen, T.S. & Meyers, K.M. 1994b. *Evaluation of an additive solution for preservation of canine red blood cells*. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 8:253-257.

Wardrop, K.J., Tucker, R.L. & Mugnai, K. 1997. *Evaluation of Canine Red Blood Cells Stored in a Saline, Adenine, and Glucose Solution for 35 Days*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11: 5-8.

Meyer, DJ., Coles, EH & Rich, LJ. 1995. *Hemostasia e distúrbios eletrolíticos e ácidos-básicos*. In *Medicina de laboratório veterinário: interpretação e diagnóstico*. Roca. 83-90

(Acesso em 30/jun/2014 <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/47559/lesoes-de-armazenamento-e-concentracao-de-interleucinas-em-concentrado-de-hemacias-canino-coletados-/>).

Almosny, N. *Equilíbrio ácido-base em Medicina*. 2003. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. P5-16) Authement, JM, Wolfsheimer, KJ & Catchings, S. 1986. *Journal of American Animal Hospital Association*, 123:483-493

Acesso em 13/jun/2014 http://www.ufpe.br/dbioq/portallbq04/adendo_diagnostico.htm

Acesso em 15/abr/2014 http://www.fisfar.ufc.br/petmedicina/images/stories/lactato_desidrogenase.pdf