

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS COM
HEMOGLOBINA S EM BOLSAS DE SANGUE**

John Pietro Nunes

Monografia apresentada à Coordenação do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia - MG
Dezembro/1999**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS COM
HEMOGLOBINA S EM BOLSAS DE SANGUE**

John Pietro Nunes

Prof^a Ms. Silma Maria Alves de Melo

(Orientadora)

Monografia apresentada à Coordenação do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia - MG
Dezembro /1999**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS COM
HEMOGLOBINA S EM BOLSAS DE SANGUE

John Pietro Nunes

Aprovada pela Banca Examinadora em 15/12/1999

Nota: 100,0

Ana Maria Coelho Carvalho
Universidade Federal de Uberlândia
Centro de Ciências Biomédicas
Prof.^a Ana Maria Coelho Carvalho
Laboradora do Curso de Ciências Biológicas

Silma Maria Alves de Melo
Prof.^a Ms. Silma Maria A. de Melo
Orientadora

Ângela Ferreira da Silva Rocha
Bióloga Ângela Ferreira S. Rocha
Conselheira

Maria Inês H. Brandeburgo
Prof.^a Dr.^a Maria Inês H. Brandeburgo
Conselheira

Uberlândia, 15 de dezembro de 1999

Aos meus pais Milton e M^a Geralda,
pela educação a mim conferido e
pelo exemplo de luta, pelo sacrifício,
pelo amor, carinho, incentivo e pela
minha existência. Amo muito vocês.

Obrigado por tudo !

*“Bem-aventurado o homem que põe no Senhor a sua confiança,
e que não atenta para os soberbos, nem para os que se desviam para a
mentira.” (Sl.40 v 4)*

agradecimentos

À Deus, pelo Dom da vida e por mais uma vitória , razão do meu viver.

Aos meus irmãos, Frank, Kelly Cristina, Karina pela possibilidade de ter vocês como parte de uma família.

À Marília, minha namorada, pelo incentivo, e por saber que na minha caminhada tenho você como companheira. Você é muito especial para mim.

À Silma, que não se limitou a ser somente orientadora, mas que através de seus próprios conhecimentos pode transmitir-me tantas lições. Obrigado pela amizade, incentivo e dedicação.

À Ângela, minha co-orientadora, pela sua amizade e incentivo, é bom saber que nesta vida, o amigo torna-se irmão.

Ao Dr. Sílvio, diretor geral do Hemocentro Regional de Uberlândia, que sempre demonstrou acreditar no desenvolvimento constante da pesquisa. Obrigado pelo apoio e por sua amizade.

À Prof^ª. Maria Inês, minha conselheira, pela disponibilidade e atenção. Sua profissão enriquece esta Universidade.

Aos funcionários e amigos do laboratório da Universidade Federal de Uberlândia na pessoa do Dr. Ademir, obrigado, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade de adquirir as ferramentas com as quais abrirei novos horizontes, rumo à satisfação dos meus ideais profissionais e humanos.

À minha equipe de trabalho no Hemoderivados, do Hemocentro Regional de Uberlândia, Rosana Paula, Ivone, Carla, Jane e Marli pelo apoio durante este trabalho. A vitória é nossa.

Aos funcionários e amigos do Hemocentro Regional de Uberlândia na pessoa do Dr. Adilson e Odelmo, pela amizade e apoio durante a realização deste trabalho. Obrigado.

À Prof^ª Cecília, pela disponibilidade e atenção, durante todo curso e neste trabalho.

Aos amigos do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia, que compartilharam comigo diversos momentos, Cristina, Helisângela, Ana Cláudia, Cecília, Sharon, Guilherme, Juliano, Grace, Selma, Ana Cristina e Maria Tereza.

RESUMO

As hemácias são células do sangue, que contém no seu interior uma proteína denominada hemoglobina, cuja função é o transporte de O₂ e CO₂. O presente trabalho foi realizado em 5 bolsas de concentrado de hemácias contendo HbAA (normal) e 31 com HbAS (traço falciforme), de doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia. A hemoglobina S é causada por uma mutação que provoca a falcização da hemácia na presença de fatores indutores. O principal objetivo desse trabalho, foi avaliar o comportamento das hemácias com HbAS durante 35 dias de armazenamento, buscando novos dados científicos para o descarte dessas bolsas. Foram analisadas a morfologia das hemácias, o pH, a metahemoglobina, a hemoglobina, o hematócrito os índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) e as dosagem das hemoglobinas A₁, S, A₂ e Fetal. Verificou-se que o índice de falcização aumentou gradativamente do 1º ao 35º dia de armazenamento em 25 (80,6%) dos concentrados contendo HbAS, sendo que nenhum desses fatores interferiu no processo de falcização. A utilização dessas hemácias em transfusões sanguíneas pode trazer complicações aos receptores, sugere-se que os Hemocentros realizem testes laboratoriais para detectar os doadores com hemoglobinas anormais, visando o descarte dessas bolsas para garantir uma melhor qualidade do sangue.

Palavras-chave: Concentrado de hemácias, Hemoglobina S, Falcização.

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO	01
2 - OBJETIVO.....	10
3 - MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 - Área de Estudo	11
3.2 - Material	11
3.3 - Metodologia	12
3.3.1 - Testes	13
3.3.1.1 - Eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose pH 8,6 - Dosagem de HbA ₂	13
3.3.1.2 - Eletroforese quantitativa em acetato de celulose pH 8,6 - Dosagem de HbS	15
3.3.1.3 - Dosagem de hemoglobina fetal	16
3.3.1.4 - Dosagem da metahemoglobina no sangue	17
3.3.1.5 - Análise da morfologia eritrocitária	20
3.3.1.6 - Análise do pH	21
3.3.1.7 - Análise pelo Contador Coulter T-890	21
3.3.1.8 - Controle bacteriológico	22
3.3.1.9 - Análise Estatística	22
4 - RESULTADOS	23
5 - DISCUSSÃO	33
6 - CONCLUSÃO	40
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
8 - APÊNDICES	46

1 - INTRODUÇÃO

As hemácias ou eritrócitos são células do sangue, formadas como células nucleadas na medula óssea, que normalmente perdem seu núcleo antes de serem liberadas na circulação. A eritropoiese inicia-se por meio de dois grandes grupos celulares conhecidos por células-tronco e células-mães, denominadas de unidades formadoras de blastos (UFB) e unidades formadoras de colônias (UFC). Esse processo depende da adequada obtenção de proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais e vitaminas. A célula hematopoiética mais primitiva é a célula-tronco pluripotente, que dá origem a dois tipos de células-tronco específicas e conhecidas por células-tronco linfóides e células-tronco mielóides multipotentes. Estas últimas diferenciam-se em vários tipos de células-mães mielóides que geram as hemácias e outras células sanguíneas. A hemácia ao entrar na circulação, ainda possui as seguintes organelas: ribossomos, mitocôndrias e aparelho de Golgi residuais, as quais são perdidas cerca de um dia, adquirindo a forma de disco bicôncavo, apresentando notável plasticidade, sendo capaz de esgueirar, repetidamente através de capilares com

somente metade do diâmetro da célula e, então voltar, sem deformações, a sua forma original. A hemácia madura, para sobreviver durante 120 dias, utiliza-se de duas vias metabólicas que são a via glicolítica e o ciclo das pentoses, que irão supri-la de todas as suas necessidades energéticas por todo o período de vida (WEST, 1989).

A maioria das moléculas de proteínas, associadas com a membrana de hemácias humanas, é constituída por proteínas periféricas da membrana, associadas com o lado citoplasmático da bicamada lipídica, atuando como receptores específicos. A espectrina é o principal componente do arcabouço protéico (o citoesqueleto) subjacente à membrana da hemácia, mantendo a integridade estrutural e a forma bicôncava dessa membrana, formando um “complexo juncional”, o qual resulta em uma malha deformável, em forma de rede, subjacente a toda superfície citoplasmática da membrana, capacitando a hemácia a suportar a tensão em sua membrana na medida em que ela é forçada através de capilares estreitos. A principal função dos eritrócitos é transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos e auxiliar no transporte de CO₂ (dióxido de carbono) dos tecidos para os pulmões, sendo a proteína banda 3 essencial para esta função. O CO₂ é pouco solúvel em água e, portanto, ele é transportado no plasma sanguíneo como bicarbonato (HCO₃⁻), o qual é formado e decomposto no interior das hemácias. A proteína banda 3 atua também como transportador de ânion, possibilitando ao CO₂ cruzar a membrana em processo de troca com o Cl⁻, por tornar a membrana da hemácia amplamente permeável ao CO₂, e esse transportador aumenta a quantidade de CO₂ que o sangue pode levar para os pulmões (ALBERTS *et al.*, 1997).

A hemácia contém uma proteína globular e oligomérica denominada hemoglobina, que é quimicamente composta pela conjugação de um pigmento, o heme, e de uma fração protéica denominada globina. O heme é um complexo formado por um átomo de ferro situado no interior de uma estrutura porfirínica que o mantém no estado ferroso e lhe dá a cor vermelha característica da hemoglobina. A fração protéica da molécula normal de hemoglobina é formada por 4 cadeias polipeptídicas num total de 574 aminoácidos. Duas delas são constituídas por 141 aminoácidos cada e são chamadas tipo alfa (alfa e zeta). As outras duas cadeias possuem 146 aminoácidos cada e são denominadas tipo beta (beta, delta, gama glicina, gama alanina e épsilon) (LEHMANN & HUNSTMAN, 1974).

As combinações entre as cadeias dos tipos alfa e beta resultam em moléculas de hemoglobinas distintas. Estas moléculas são sintetizadas em diferentes fases do desenvolvimento humano: embrionário, fetal e pós-nascimento, obedecendo a um rígido controle genético. As hemoglobinas diferenciam-se por possuírem características físico-químicas e mobilidades eletroforéticas distintas. As suas funções são marcantes desde os primeiros dias de gestação, adaptando-se ao constante desenvolvimento do embrião e do feto, até estabilizar-se por volta dos seis meses após o nascimento. Um indivíduo adulto e normal apresenta três tipos de hemoglobinas: Hb A₁, com concentração de 96-98%, HbA₂ e Hb Fetal com concentrações de 2,5 a 3,7% e de 0 a 2%, respectivamente (LEHMANN & HUNSTMAN, 1974; BROUSSIOUS & BERTLES, 1982).

A síntese das hemoglobinas humanas sofre constantes processos de diferenciação no sentido de adaptar-se a cada fase do desenvolvimento

humano, na busca biológica da molécula de hemoglobina em tornar-se mais eficiente na sua atividade transportadora de oxigênio. Esse processo está relacionado a um complicado sistema de interação que ocorre entre as globinas do tipo alfa com as do tipo beta, e entre cada uma delas. O transporte de oxigênio pela hemoglobina está baseado na capacidade dos seus átomos de ferro combinarem-se reversivelmente com o oxigênio molecular. Estruturalmente o grupo heme e o aminoácido (histidina), com o qual o ferro está ligado, são os mesmos em todos os tipos normais de hemoglobinas. O ferro do heme, normalmente, está no estado ferroso, quando este é oxidado do estado ferroso para o estado férrico, a metahemoglobina resultante não é capaz de reagir com o oxigênio, pois em soluções ácidas, o sítio de ligação com o oxigênio é ocupado por água e em soluções alcalinas, pelo radical OH⁻. Os produtos do metabolismo dos glóbulos vermelhos também interatuam com a hemoglobina, reduzindo o estado ferroso, de modo que pequena quantidade de metahemoglobina é constantemente produzidas em hemácias normais (WEST, 1989).

Embora a ligação do oxigênio com a hemoglobina seja o fator fisiológico mais significativo que afeta a sua estrutura quaternária, outras moléculas têm, também, expressivo impacto nas características que envolvem o processo de ligação do oxigênio e que permitem as trocas eficientes nos pulmões e tecidos periféricos. Em 1904, Bohr e colaboradores demonstraram que a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio estava significativamente reduzida na presença de concentrações elevadas de dióxido de carbono, este processo é denominado efeito Bohr. Estudos realizados posteriormente comprovaram que esse efeito era devido à diminuição do pH no interior das hemácias dos tecidos periféricos. Assim, nos pulmões, a expulsão do dióxido de carbono causa um efeito inverso, o efeito Borh alcalino, resultando no aumento da ligação entre a

hemoglobina e o oxigênio, com conseqüências favoráveis, pois à medida que o dióxido de carbono entra nas hemácias que circulam pelos capilares periféricos forma-se rapidamente o ácido carbônico, por meio da ação da anidrase carbônica. O ácido carbônico têm características de ácido fraco, sua contínua ionização resulta em queda do pH intra-eritrocitário, com conseqüente liberação de oxigênio. A deoxiemoglobina rapidamente liga-se a prótons livres e suplementa o tamponamento intracelular necessário para manter a neutralidade elétrica. Os íons cloretos substituem os íons bicarbonatos, que se difundiram para fora das hemácias, e apresentam um efeito adicional na redução da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (NAOUM, 1997).

Foi sugerido, também, que existiria um outro modulador da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (BARCROFT, 1928). Quase 40 anos mais tarde, esse modulador adicional foi identificado, como o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) (BENESCH & BENESCH, 1967). Atualmente, reconhece-se como os principais moduladores da afinidade por oxigênio a concentração de íons hidrogênio, temperatura e fosfatos orgânicos, particularmente o 2,3-DPG, cuja concentração diminui com o envelhecimento dos eritrócitos, *in vivo* e *in vitro*. O efeito temperatura sobre a afinidade por oxigênio parece fisiologicamente apropriado: o aumento da temperatura é inversamente proporcional à afinidade pelo oxigênio. O efeito da variação da temperatura é significativo, um aumento de 10^oC na temperatura quase dobra a P₅₀ da hemoglobina. A ligação direta do dióxido de carbono, como em um complexo de carbamina, também diminui a afinidade por oxigênio, mas esse efeito é pequeno na hemoglobina humana, em que 10% ou menos de CO₂ são transportados nessa forma. (WEST, 1989).

Quando as hemácias contêm baixa concentração de hemoglobina, o indivíduo apresenta anemia, sendo mais conhecidas as Carenciais (por falta de

ferro) e as Hereditárias. As hereditárias são causadas por alterações genéticas da hemoglobina, dentre elas estão incluídas as hemoglobinopatias que podem decorrer de alterações estruturais dos seus genes, originando as hemoglobinas variantes ou de um desequilíbrio quantitativo das cadeias, originando as talassemias.

As hemoglobinas variantes são decorrentes de falhas no gene estrutural, onde um aminoácido qualquer da cadeia polipeptídica, pode ser substituído por outro. As mais frequentes são a S (falciforme) e a C, as quais são de origem africana e foram trazidas às Américas pela imigração forçada dos escravos. No Brasil, essas hemoglobinas apresentam frequências de 2,0 a 5,0% e de 0,5 a 1,0%, respectivamente. As talassemias são decorrentes de falhas no gene regulador, onde em geral, essas mutações provocam um bloqueio de síntese de uma das globinas com intensidade variável, ou até mesmo total, ocorrendo desequilíbrio entre a globina produzida e a bloqueada, causando talassemias alfa ou beta, que são predominantes na região do Mar Mediterrâneo e entre alguns povos asiáticos. Em nosso país, a talassemia beta apresenta frequência entre 0,5 a 2,0% (SALZANO & FREIRE-MAIA, 1967).

A hemoglobina S é causada por uma mutação no gene beta, produzindo uma seqüência alterada de aminoácidos que formam a cadeia globínica beta, decorrente da substituição de uma adenina (A) por uma timina (T) no sexto códon do gene, que de GAG passa para GTG, provocando a substituição do ácido glutâmico pela valina na cadeia polipeptídica (INGRAM, 1958). Esta alteração causa a deformação das hemácias, tornando-as em forma de "foice" ou de "meia lua" na presença de fatores indutores (NAOUM, 1997).

A troca de aminoácidos que resulta na HbS abala estruturalmente a

molécula, pois se na HbA o ácido glutâmico da posição 6 da globina beta auxilia no afastamento das moléculas desoxigenadas de hemoglobinas, a entrada da valina nesta posição favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio. No estado oxigenado, a molécula de HbS está “relaxada”, e nesta conformação estrutural as globinas beta S estão mais separadas. No estado desoxigenado, a molécula de HbS torna-se esticada ou “tensa” e as globinas beta S ficam mais próximas. Essa mudança de conformação favorece o contato entre as regiões da desoxiemoglobina, o que não é possível no estado oxigenado. Por meio da união de vários tetrâmeros de HbS (nucleação), forma-se um número considerável de moléculas agregadas que gera longos polímeros alterando a morfologia da hemácia para a forma “afoiçada” (Figura 1). A polimerização da HbS e o processo de falcização estão na pendência da tensão de oxigênio, concentração intracelular da HbS, acidose, temperatura, desidratação e associação com a Hb Fetal (NAOUM, 1997).

A transfusão de hemácias deve ser capaz de reconstituir a capacidade respiratória celular do doente com a ajuda de células dotadas das melhores propriedades microcirculatórias, restabelecendo o volume circulante e a reposição eficaz da oxigenação. A solução anticoagulante preservadora, como o CPDA-1 (Citrato Fosfato Dextrose Adenina), é de grande importância, onde o papel da glicose na solução de preservação é primordial para a hemácia, pois sendo uma célula desprovida de núcleo, não há possibilidade de sintetizar enzimas, por isso o metabolismo é realizado na degradação deste açúcar pela via das pentoses (WEST, 1989).

A tendência da hemácia refrigerada, quando misturada com soluções anticoagulantes e preservativas (CPDA-1), é tornar a membrana mais permeável a água e aos sais, perdendo potássio e ganhando sódio. O fosfato transforma-se

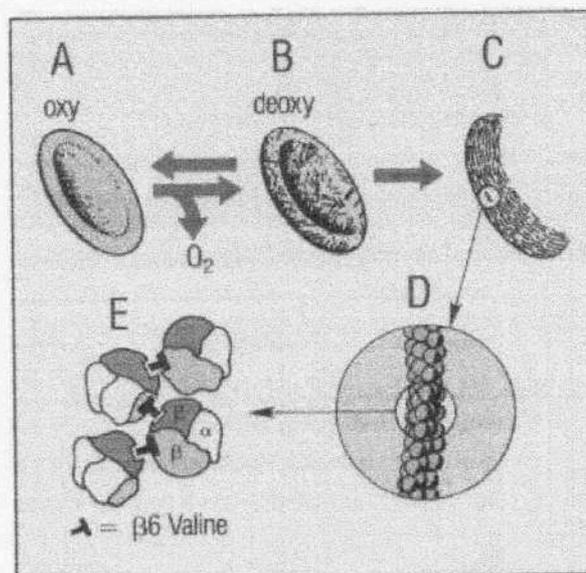


Figura 1: Polimerização da HbS.

A) Desoxigenação da hemácia; B) Formação da desoxiemoglobina S resultando em polímeros; C e D) Alongamento dos polímeros levando a hemácia à forma de foice e E) Contato entre as cadeias beta e pelas pontes de valinas na posição $\beta 6$ (Fonte: BUNN, 1989)

em fosfato inorgânico, a dextrose é consumida e o ácido láctico é produzido, ficando o plasma mais ácido. Todas estas alterações levam à perda de viabilidade das hemácias sem alterações de tamanho, forma, volume (KAHN *et al.*, 1976). A viabilização do uso de concentrados de hemácias com traço falciforme é muito questionável, tendo em vista que podem ocorrer alterações em sua forma modificando assim sua estrutura e o meio em que se encontra.

No Hemocentro Regional de Uberlândia, a partir de maio de 1995, foram incluídos testes na rotina laboratorial para detectar os doadores portadores de hemoglobinopatias, objetivando a melhoria da qualidade do sangue, com o descarte das bolsas de concentrado de hemácias com essas alterações, dentre as quais estão incluídas as com traço falciforme. No período de maio de 1995 a maio de 1997, foi realizado um estudo com 23.981 amostras de doadores de sangue desse Hemocentro, dos quais 2,5% eram portadores do traço falciforme (MELO *et al.*, 1998).

A triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue, nos Serviços de Hemoterapia, faz-se necessária nas regiões de alta prevalência. Devido à elevada frequência de hemoglobina S em nossa população, a triagem desta hemoglobina é uma exigência na rotina de um Moderno Serviço de Hemoterapia. A Portaria de Nº 1376 do Ministério da Saúde, de 19 de novembro de 1993, recomenda a triagem de Hemoglobina S (HbS) em doadores de sangue, visto que, existem restrições quanto ao uso de sangue com presença de HbS.

2 - OBJETIVO

Verificar nas bolsas de concentrado de hemácias contendo HbAS a morfologia eritrocitária, o pH, a metahemoglobina, a hemoglobina (Hb), o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM), a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o hematócrito, com o objetivo de avaliar novos dados científicos para o descarte ou não dessas bolsas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Hemocentro Regional de Uberlândia, Núcleo do Hemocentro Coordenador de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais - Fundação Hemominas - Belo Horizonte.

3.2 - MATERIAL

Nesse estudo foram avaliadas 36 bolsas de concentrado de hemácias, sendo 31 com HbAS (traço falciforme), sorologicamente negativas, as quais foram armazenadas em condições padronizadas de temperatura (2 - 6°C), em posição horizontal. Para controle utilizou-se 5 bolsas de concentrado de hemácias contendo HbAA (Normal), também, sorologicamente negativas e sob as mesmas condições. Essas bolsas foram utilizadas exclusivamente para essa finalidade. Após esse período as mesmas foram incineradas.

3.3 - METODOLOGIA

A coleta de sangue nessas bolsas foi realizada conforme normas da Fundação Hemominas estabelecidas pelo Ministério da Saúde. As bolsas utilizadas foram fabricadas pela ASEM e Baxter com CPDA-1, nas quais o concentrado de hemácias tem validade durante 35 dias, sendo coletados aproximadamente 446ml de sangue total. As bolsas foram centrifugadas e o sangue fracionado, resultando cerca de 346 ml de concentrado de hemácias.

Para a triagem de hemoglobinopatias as amostras de sangue dos doadores foram submetidas a testes seletivos e específicos. Os testes seletivos incluíram: 1) resistência globular osmótica em cloreto de sódio (NaCl) 0,36%, cujo resultado é positivo, principalmente quando as hemácias são microcíticas, como no caso das talassemias beta e anemias carenciais; 2) eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, pelo qual identificam-se as hemoglobinas normais e grande parte das variantes. Em pH 8,0-9,0 a hemoglobina é uma proteína carregada negativamente, migrando em direção ao pólo positivo. As diferentes mobilidades eletroforéticas verificadas entre as diversas hemoglobinas com defeitos estruturais devem-se às alterações de cargas elétricas, causadas por substituições de aminoácidos de diferentes pontos isoeletrônicos (pI) nas cadeias formadoras das moléculas. A eletroforese de hemoglobina em ágar-fosfato pH 6,2 foi o teste específico utilizado para diferenciar a HbS da HbD, que em eletroforese alcalina migram em posições semelhantes, enquanto que por esse método a HbS separa-se da HbA₁ e a HbD migra na mesma posição.

Assim que foram detectados os doadores portadores de traço falciforme com resultados sorológicos negativos, imediatamente as bolsas de concentrado de hemácias, referentes àqueles doadores, eram selecionadas e

realizadas as dosagens das HbA₁, HbS, HbA₂ e Hb Fetal nas suas respectivas amostras de sangue.

Após 24 horas da coleta do sangue, as bolsas selecionadas foram homogeneizadas e delas retirados 5 ml de concentrado de hemácias pelo “macarrão”, para a realização dos seguintes testes: a) análise da morfologia eritrocitária; b) análise do pH; c) dosagem da metahemoglobina; d) análises do VCM, do HCM, do CHCM, da hemoglobina e do hematócrito pelo Contador Coulter T-890. Esses procedimentos foram repetidos nos 5º, 10º, 15º, 20º, 25º, 30º e 35º dias de armazenamento das bolsas (Apêndice 1). Durante todo este período, as bolsas não sofreram qualquer tipo de agitação e só foram retiradas da geladeira o tempo necessário para a coleta do material.

A retirada de amostras de dentro das bolsas foi realizada com o máximo de assepsia, em Cabine de Fluxo Laminar Horizontal (classe I) e tomados os devidos cuidados de acordo com as Normas de Biossegurança. Após o 35º dia de armazenamento as bolsas foram submetidas a testes bacteriológicos em meio BHI.

A autorização do doador foi obtida, por meio de um termo de consentimento (Apêndice 2), onde constam detalhes da execução da pesquisa, no qual o doador teve livre escolha na sua decisão.

3.3.1 - TESTES

3.3.1.1 - Eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose pH 8,6 - dosagem de HbA₂ (Marengo e Rowe, 1965)

Por meio desse método quantificam-se a HbA₂ e a HbA₁ por eluição.

Materiais:

- Cuba e Fonte para eletroforese
- Placa cavada (Kline) para hemolisar as amostras de sangue
- Fitas de acetato de celulose
- Papel absorvente; papel de filtro
- Cuba para deixar as fitas imersas no tampão
- Pipetas de 10 microlitros; tubos de ensaio; tesoura

Reagentes:

Tampão TRIS EDTA-BORATO (TEB):

- | | |
|--|---------|
| - Tris hidroximetil aminometano | 10,2g |
| - Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) | 0,6g |
| - Ácido bórico | 3,2g |
| - Água destilada q.s.p. | 1000 ml |
| - Saponina 1% | |

Procedimentos:

- Preparar a solução de hemoglobina com 50 microlitros de sangue total, e 50 microlitros de saponina;
- Aplicar 20 microlitros da solução de hemoglobina, por meio de micropipeta, em duas fitas de acetato de celulose, depositando 10 microlitros em cada uma delas;
- Passar 200 ou 300 volts por 30 ou 20 minutos, respectivamente;
- Após o fracionamento, as hemoglobinas A₁ e A₂, sem prévia coloração, são recortadas com tesoura e eluídas em tubos contendo água destilada na quantidade de 3 ml para HbA₂ e 15 ml para HbA₁. Deixar a eluição se processar por 2 horas à temperatura ambiente, agitando os tubos a cada 15 minutos. Nas eluições superiores a 2 horas, conservar o material na geladeira. Usar água destilada como branco. Fazer a leitura das densidades ópticas (DO) em 415 nm;

- Cálculo:

$$\%HbA_2 = \frac{DO\ HbA_2}{DO\ HbA_2 + 5\ (DO\ HbA_1)} \times 100 \quad (\text{Valor de Referência: } 2,5 - 3,7\%)$$

3.3.1.2 - Eletroforese quantitativa em acetato de celulose pH 8,6 - dosagem de hemoglobina S (Marengo e Rowe, 1965)

Este método permite a quantificação das frações de HbA₁, HbS e HbA₂, as quais possuem diferentes mobilidades eletroforéticas. Utilizaram-se os mesmos equipamentos e reagentes da técnica anterior.

Procedimentos:

- Preparar a solução de hemoglobina com 50 microlitros de sangue total e 50 microlitros de saponina;
- Aplicar 10 microlitros da solução de hemoglobina por meio de pipeta;
- Após o fracionamento as hemoglobinas A₁, S e A₂, sem prévia coloração, foram recortadas longitudinalmente com tesoura e eluídas em tubos de ensaio contendo água destilada na quantidade de 3,0 ml para HbA₂, 15 ml para HbS e 15 ml para HbA₁;
- Deixar a eluição se processar, aproximadamente por 2 horas à temperatura ambiente, agitando os tubos a cada 15 minutos. Nas eluições superiores a 2 horas, conservar o material na geladeira. Usar água destilada como branco. Fazer as leituras das densidades ópticas (DO) em 415 nm.

- Cálculo:

$$\% HbA_2 = \frac{DO\ HbA_2}{DO\ HbA_2 + 5\ (DO\ HbA_1 + DO\ HbS)} \times 100$$

$$\% HbA_1 = \frac{\% HbA_2 \times 5 \times DO\ HbA_1}{DO\ HbA_2} \quad \% HbS = 100 - (\% HbA_1 + \% HbA_2)$$

Valores de Referência: HbA₁= 60-70,0%; HbS = 30-40,0% e HbA₂ = 2,5-3,7%

3.3.1.3 - Dosagem de Hemoglobina Fetal (Método de Betke *et al.*, 1959)

A Hb Fetal é alcali-resistente, enquanto que as Hb A₁, A₂ e os tipos normais são facilmente desnaturáveis por soluções alcalinas. O teste é realizado adicionando uma determinada quantidade de soluções alcalina em uma concentração conhecida de hemolisado. Após um tempo específico, a desnaturação é bloqueada por adição de sulfato de amônio saturado, ou parcialmente saturado. O sulfato de amônio diminui o pH e precipita a hemoglobina desnaturada. Após a filtração, a quantidade de hemoglobina inalterada é avaliada e expressa como hemoglobina álcali-resistente (ou Hb Fetal) em valores percentuais.

Materiais:

- Espectrofotômetro e cronômetro
- Tubos de ensaio 17 x 10 mm
- pipetas de 1, 2, 5 e 10 ml
- Funis pequenos - 3 a 4 cm de diâmetro
- papel de filtro Whatman 9mm N° 2 = 40

Reagentes:

Solução de Ferricianeto de Potássio (Drabkin):

- Ferricianeto de Potássio $K^3 [F^2 (CN)^6]$ 0,20 g
- Cianeto de Potássio (KCN) 0,20 g
- Água destilada q.s.p. 1000 ml

Solução de Hidróxido de Sódio 1,2 N:

- Hidróxido de Sódio (NaOH) 48,0 g
- Água destilada q.s.p. 1000 ml

Procedimentos:

- Diluir 0,6 ml da solução de hemoglobina (hemolisado com água e clorofórmio), em um tubo contendo 10 ml da solução de Drabkin. Homogenizar por inversão;
- Colocar 5,6 ml de hemoglobina diluída em um tubo rotulado "HbF". Adicionar 0,4 ml da solução de hidróxido de sódio 1,2 N e acionar o cronômetro. Homogenizar cuidadosamente por 10 segundos;
- Ao final de 2 minutos exatos, adicionar 4 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Homogenizar por inversão e deixar em repouso por 5 a 10 minutos, no máximo;
- Preparar a solução padrão colocando em um tubo de ensaio 1,4 ml da solução de hemoglobina diluída, 0,6 ml de água destilada e 2 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Transferir 1ml desta solução para outro e adicionar 9 ml da solução de Drabkin. A solução de hemoglobina total é 10 vezes mais diluída que a solução de hemoglobina álcali-resistente;
- Filtrar o conteúdo do tubo "HbF" em papel de filtro;
- Ler a densidade óptica dos tubos padrão e "HbF" em 540 nm, usando solução de Drabkin como branco;

- Cálculo:

$$\% \text{ Hb Fetal} = \frac{\text{DO. Hb Fetal}}{\text{D.O. Hb Padrão} \times 10} \times 100 \quad (\text{Valor de Referência: 0 a 2\%})$$

3.3.1.4 - Dosagem da metahemoglobina no sangue (Dacie & Lewis, 1984)

A metahemoglobina está presente em pequenas quantidades no sangue normal, e compreende entre 1 a 3% da hemoglobina total. A elevação da metahemoglobina ocorre como resultado da oxidação da hemoglobina ou por

deficiência enzimática . Sua absorção óptica máxima é de 630 nm. A avaliação é realizada pela adição de KCN e Ferricianeto, resultando em medidas específicas.

Materiais:

- Espectrofotômetro
- Tubos 17 x 100 mm
- Pipetas de 1 ml , 2ml, 10 ml
- Pipetas de 50 e 100 microlitos

Reagentes:

Solução Tampão Fosfato M/15, pH 6,8 (solução estoque)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9,0 g
- KH_2PO_4 5,7 g
- Água destilada q.s.q 1000 ml

Solução Tampão Fosfato M/60 pH 6,8 (solução trabalho) :

- Solução estoque 250 ml
- Água destilada q.s.p. 1000 ml

Solução de Ferricianeto de potássio a 5% (preparada no dia):

- Ferricianeto de potássio 50 mg
- Água destilada 1 ml

Solução de Cianeto de Sódio ou Potássio a 5% (preparada no dia):

- Cianeto de sódio ou potássio 50 mg
- Água destilada 1 ml

Saponina 1% :

- Saponina P.A. 1,00 g
- Cianeto de potássio (KCN) 0,01 g
- Água destilada q.s.p. 100 ml

Procedimento:

- Em um tubo contendo 200 microlitros de solução de hemoglobina (ou 100 microlitros de sangue total + 100 microlitros de saponina a 1%), adicionar 5 ml de tampão fosfato M/60 pH 6,8;
- Dividir igualmente a solução preparada em dois tubos identificados por A e B;

Ao tubo A:

- Fazer a leitura da densidade óptica (DO) da solução em 630nm e anotar o valor como DO-1. Essa leitura estima a absorção da metahemoglobina existente no sangue;
- Adicionar, a seguir, 50 microlitros de cianeto de sódio ou potássio a 5%, misturar com leve agitação, e após 30 segundos ler a solução em 630 nm e anotar o valor de DO-2. Essa leitura estima a absorção de cianometahemoglobina;

Ao tubo B:

- Adicionar 50 microlitros de ferricianeto de potássio a 5% , misturar com agitação leve, e após 30 segundos fazer a leitura em 630 nm, anotar o valor como DO-3.

Essa leitura estima a capacidade de transformação de oxiemoglobina para metahemoglobina;

- Após a leitura, adicionar 50 microlitros de cianeto de sódio ou potássio a 5%, misturar levemente a solução, e após 30 segundos fazer a leitura em 630 nm, anotando o valor como DO-4. Essa leitura estima a capacidade de reversão da metahemoglobina para cianometahemoglobina;

Branco: Todas as medidas são realizadas contra o branco contendo 2,5 ml de tampão fosfato e 50 microlitros de saponina a 1% (quando se usa hemolisado preparado com saponina) ou com apenas 2,5 ml de tampão fosfato M/60 (quando se usa hemolisado preparado com clorofórmio);

- Cálculo:

$$\frac{(\text{DO-1}) - (\text{DO-2})}{(\text{DO-3}) - (\text{DO-4})} \times 100 = \% \text{ de MetaHb}$$

$$(\text{DO-3}) - (\text{DO-4})$$

Valor de Referência (Sangue total): acima de 3,0% são alterados.

3.3.1.5 - Análise da morfologia eritrocitária (Moura *et al*, 1994)

Dos 5ml coletados, 1ml foi misturado a 1ml de formalina 10% e homogeneizados. Esta solução permaneceu em repouso por 10 minutos. Em seguida foi realizado esfregaço em lâminas de microscopia e coradas com o método de Wright. As lâminas foram observadas em microscopia óptica, com objetiva de imersão e contadas as hemácias falcizadas num total de 500 células analisadas.

No esfregaço sangüíneo, usando coloração de Wright, a hemácia quando amadurecida é acidófila e desprovida de núcleo, quando com HbAA apresentam-se róseas com um pequeno halo central claro, explicável pela sua forma bicôncava, diferenciando da hemácia com presença de HbAS que podem apresentar forma alongada ou em “meia-lua” com extremidades afiladas, na presença de fatores indutores.

Materiais:

- Microscópio óptico; lâminas para microscopia; Pipeta de 50 microlitos
- Cuba com suporte para coloração

Reagente:

Corante de Wright:

- | | |
|-------------------------------------|---------|
| - Corante de Wright em pó (Grubler) | 0,3 g |
| - Glicerina | 3,0 ml |
| - Álcool metílico | 97,0 ml |

Tampão

- Fosfato de potássio primário KH_2PO_4	6,63 g
- Fosfato de sódio secundário Na_2HPO_4	3,20 g
- Água destilada q.s.q	1000 ml

Procedimento

- Cobrir o esfregaço com 20 gotas do corante (1 ml) por 5 minutos.
- Acrescentar 20 gotas de água destilada de reação neutra ou solução tampão, durante 5 minutos;
- Lavar em água corrente, secar e examinar com objetiva de imersão.

3.3.1.6 - Análise do pH

O pH do sangue está compreendido entre 7,35 a 7,45 e as variações refletem nas funções vitais do organismo. Para manter este pH, existe no sangue vários tampões e sistemas fisiológicos tais como, a respiração e eliminação renal. O pH no concentrado de hemácia, no 1º dia de armazenamento, deve estar em torno de 7,5 e no 35º dia cerca de 6,6. Para manter esse pH existe fosfato no anticoagulante CPDA-1, o qual funciona como tamponamento da solução. Para verificação do pH foi utilizado o Peagâmetro.

3.3.1.7 - Análise pelo Contador Coulter T-890

Por meio desse Contador foram avaliados os índices hematimétricos, (VCM, HCM e CHCM), a hemoglobina e o hematócrito.

As células sanguíneas são más condutoras de eletricidade. Quando

uma coluna de células em um meio condutor passa por uma pequena abertura, pelo qual circula uma corrente elétrica há um aumento mensurável da impedância elétrica na abertura, a medida que cada célula passa, esse aumento é proporcional ao volume de material condutor deslocado, portanto, ao volume celular. Dessa forma são contados e medidas as células a partir dos impulsos elétricos que geram.

3.3.1.8 - Controle Bacteriológico

Após o 35º de armazenamento, as bolsas foram submetidas a testes bacteriológicos. O meio de cultura utilizado foi o BHI (Brain Heart Infusion) em frascos, sendo um meio enriquecido, permitindo o cultivo de organismos aeróbicos e anaeróbicos.

3.3.1.9 - Análise Estatística

Para análise estatística foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis, com nível de significância menor que 0,05 e o de Kolmogorov-Smirnov, utilizando os seguintes programas: Instant, Graphad Instant TM e Graphad Software V2.02.

4 - RESULTADOS

Nesse estudo foram analisadas 36 bolsas de concentrados de hemácias, sendo 31 com a presença de traço falciforme (HbAS) e 5 bolsas para controle contendo HbAA. Os testes sorológicos negativos e a morfologia eritrocitária normal, foram os critérios seletivos utilizados. A temperatura de armazenamento das bolsas manteve-se entre 2 a 6°C, a qual foi monitorada de 4 em 4 horas, conforme normas do Ministério da Saúde.

Após a seleção das bolsas de concentrado de hemácias, foram dosadas as hemoglobinas A₁, S, A₂ e Fetal, de suas respectivas amostras de sangue total. A média das concentrações dessas hemoglobinas manteve-se entre os valores de referência, tendo nas 5 bolsas controle: 95,6% de HbA₁; 3,1% de HbA₂ e 1,3% de Hb Fetal, e nas 31 bolsas contendo HbAS essas concentrações foram de 61,1% de HbA₁; 32,6% de HbS; 3,0% de HbA₂ e 1,4% de Hb Fetal.

O concentrado de hemácias de cada uma das 36 bolsas armazenadas, foi submetido aos seguintes métodos de análise: a) morfologia

eritrocitária; b) dosagem de metahemoglobina; c) análise do pH; d) dosagens de hemoglobina, do hematócrito, da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), do Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) pelo Contador Coulter T-890. Todos esses procedimentos foram iniciados 24 horas após a coleta de cada bolsa de sangue, selecionada para esse estudo, sendo que os mesmos foram repetidos de 5 em 5 dias até o último dia de armazenamento, ou seja, no 35º dia.

A morfologia das hemácias nos concentrados foi analisada em 5 campos da lâmina até completar 500 hemácias. Foram analisadas em média 100 células por campo, em microscópio óptico. Após 24 horas de armazenamento, verificou-se que as hemácias com HbAS, começaram a sofrer alteração da forma arredondada para afoiçada. O número de hemácias falcizadas variou de bolsa para bolsa, sendo que em um concentrado foi detectado uma relação de 205/500 hemácias falcizadas no 1º dia de armazenamento, mantendo esse índice até o último dia e outras com um número muito reduzido de hemácias falcizadas, ou seja, 2 em 500 células analisadas (Figuras 2 e 3).

Durante o período de armazenamento foi observado em 6 (19,4%) bolsas, do total de 31 contendo HbAS, um baixo índice de hemácias falcizadas do 1º ao 35º dia de armazenamento, sendo que apenas as amostras de sangue referentes a essas bolsas foram positivas para o teste de resistência globular em NaCl 0,36%, por outro lado, nas 25 (80,6%) bolsas restantes, foi detectado um aumento gradativo no número de células falcizadas, sendo em média de 44 (8,7%) no 1º dia, 59 no 5º, 66 no 10º, 73 no 15º, 78 no 20º, 83 no 25º, 86 no 30º e 94 (18,8%) no 35º dia. Para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre os índices de falcização nos respectivos dias de análise, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, obtendo-se resultado positivo ao nível de

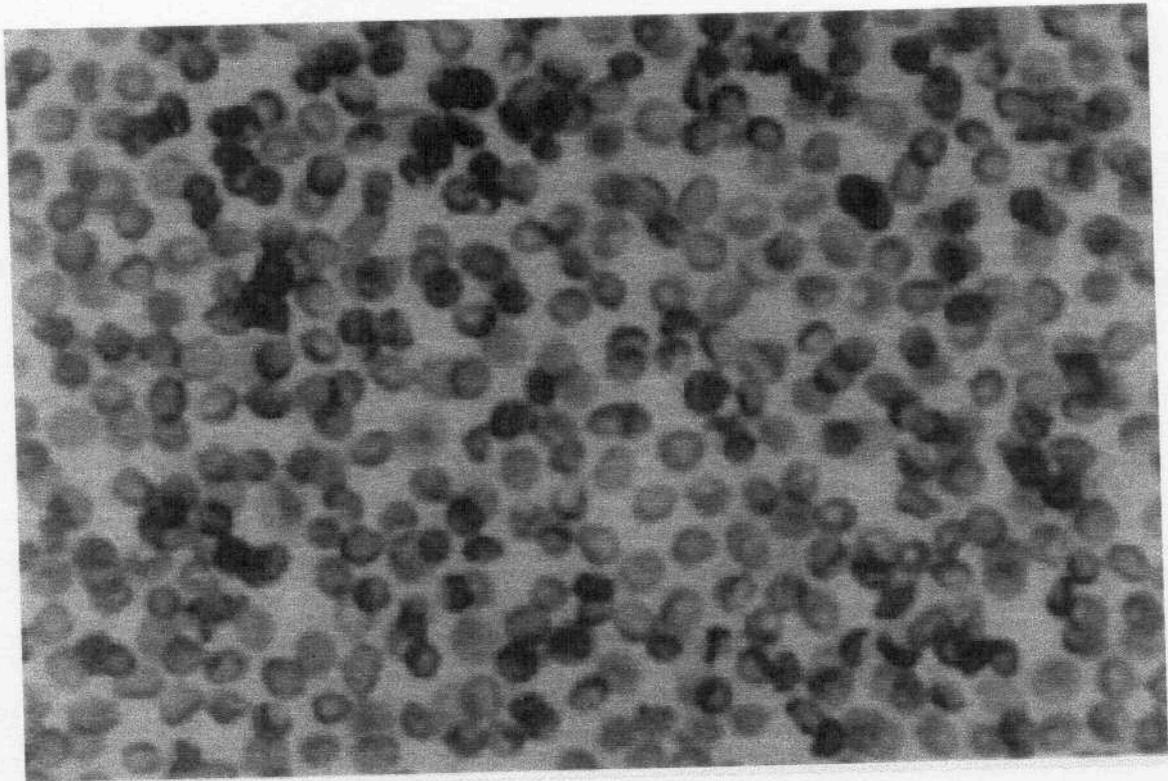


Figura 2: Hemácias normais HbAA em concentrado (Obj. de 40 x)

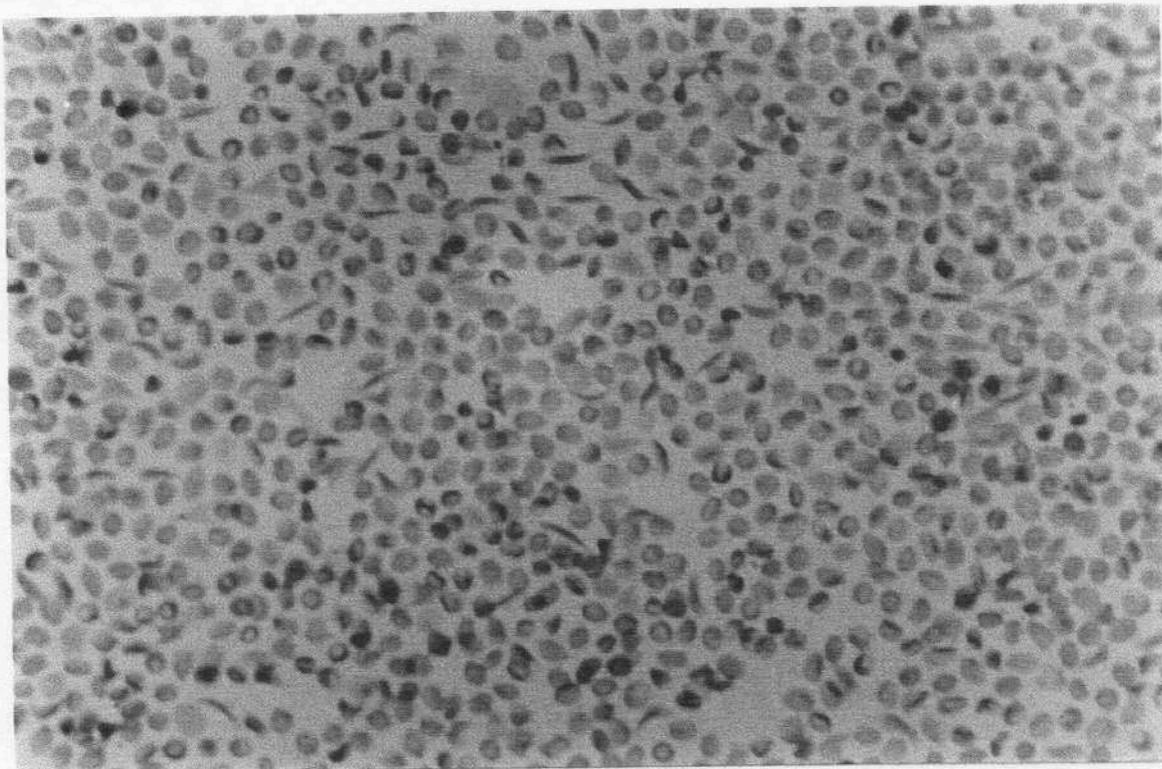


Figura 3.1: Hemácias normais e falcizadas em concentrado, com HbAS, 1º dia
(Obj. de 20 x)

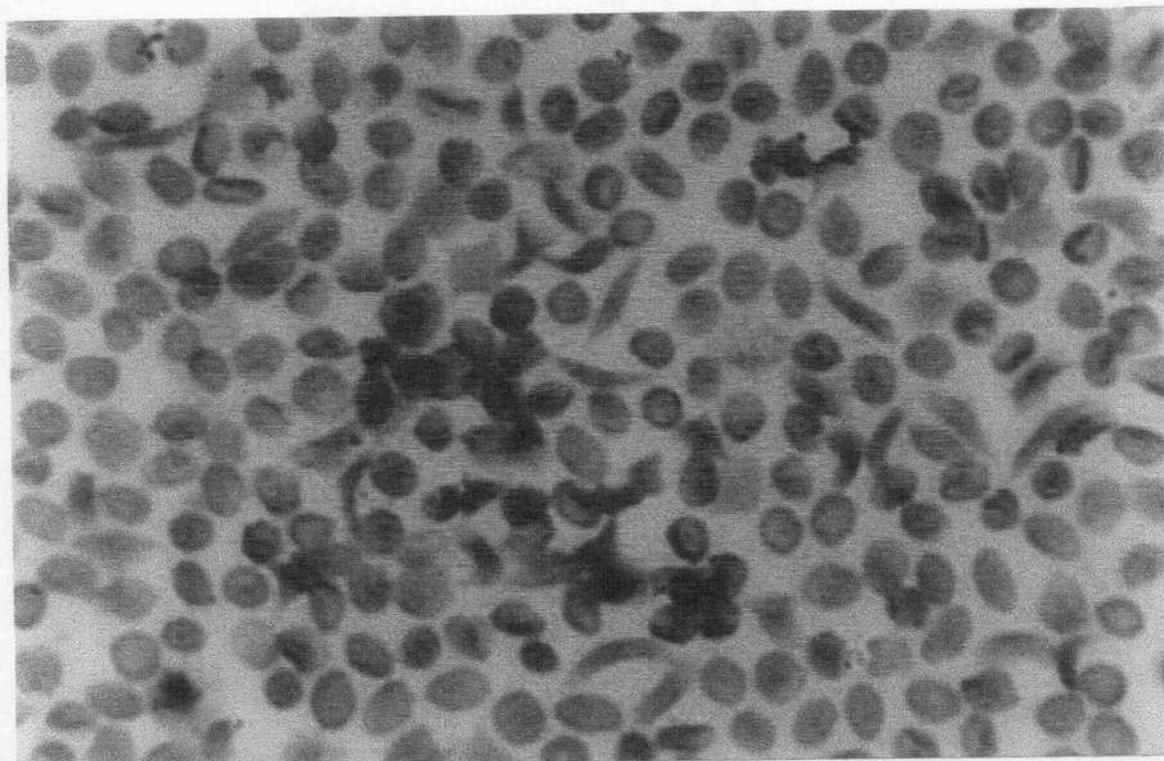


Figura 3.2: Hemácias normais e falcizadas em concentrado, com HbAS, 1º dia
(Obj. de 40 x)

0,05 ($U = 17,41$; $P = 0,015$) e para analisar entre quais dias houve diferença nas porcentagens de falcização das hemácias aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov, sendo que do 1º ao 5º e do 20º ao 25º dia houve diferença significativa, porém do 5º ao 20º e do 25º ao 35º dia essa diferença não foi estatisticamente significativa. Cerca da metade dessas 25 bolsas apresentaram mais de 100 hemácias falcizadas, após o 25º dia de armazenamento, além de presença de pequenos agregados (grumos), que acentuaram-se no 35º dia (Tabela 1 e Gráfico 1). A morfologia das hemácias contidas nas 5 bolsas selecionadas para controle manteve-se normal.

A dosagem da metahemoglobina nos concentrados de hemácias contendo HbAS variou, em média, de 4,46 a 5,05% do 1º ao 35º dia, enquanto que nos utilizados como controle houve uma variação de 2,14% a 3,22%, durante o mesmo período de armazenamento (Tabela 2). Para análise estatística foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, não havendo, portanto, diferença estatisticamente significativa ao nível de 0,05 entre essas concentrações ($U = 12,733$ e $P = 0,079$).

Com relação ao pH, foi verificado nas bolsas de concentrado de hemácias contendo HbAS, um decréscimo médio de 7,05 no 1º dia para 6,55 no 25º dia de armazenamento, o qual manteve-se estável até o 35º dia; esse mesmo comportamento foi observado nas bolsas controle, cuja variação da média do pH nesse mesmo período, foi de 7,16 a 6,66, estabilizando-se, também, a partir do 25º dia (Tabela 2).

Os valores médios dos índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), da hemoglobina e do hematócrito, mantiveram-se praticamente constantes durante todo o período de armazenamento, tanto nas 31 bolsas de concentrado de hemácias contendo HbAS, como nas utilizadas para controle (Tabela 3).

Tabela 1 - Número de células falcizadas em concentrados de hemácias de doadores com hemoglobina AS durante o período de armazenamento (4 a 6°C):

Nº das bolsas com HbAS	Período de Armazenamento							
	1º	5º	10º	15º	20º	25º	30º	35º
109-060.3	16	45	121	86	77	114	120	125
112-022.7	33	51	148	198	186	192	191	196
117-060.7	5	5	1	1	1	2	2	1
120-052.2	74	81	95	67	79	78	92	122
124-061.3	42	51	64	65	84	111	115	126
131-076.0	4	4	4	3	1	1	2	2
131-042.5	31	86	89	88	92	94	94	96
132-060.9	0	6	1	1	1	1	1	1
132-155.9	41	84	95	97	114	118	119	123
134-086.3	39	53	99	120	105	121	115	123
138-048.2	38	56	57	70	131	130	128	129
138-055.2	44	59	74	78	78	80	83	99
139-035.6	12	51	60	69	69	64	73	79
139-120.4	0	3	1	1	1	1	1	1
146-016.8	26	73	64	100	107	116	116	126
152-029.2	44	148	133	139	174	179	148	169
153-069.7	37	57	61	67	31	51	56	61
161-073.9	63	78	100	112	121	149	164	180
166-021.3	46	47	49	63	64	67	62	68
167-018.9	99	97	100	112	123	133	157	162
172-039.9	205	201	123	200	206	170	191	202
173-033.5	133	137	129	122	139	122	140	157
173-060.2	26	32	34	36	38	109	112	124
179-008.7	147	139	153	164	165	153	166	176
180-065.2	47	56	51	53	57	58	63	65
180-048.2	16	6	6	7	8	8	10	14
180-006.7	2	1	1	1	1	1	1	1
182-001.6	3	5	3	4	3	2	1	1
182-070.4	8	21	29	35	42	47	54	60
187-035.8	49	52	56	59	59	68	62	73
187-034.0	27	32	33	36	39	45	37	53
Média	44	59	66	73	78	83	86	94
% / 500 células	8,7	11,7	13,1	14,5	15,7	16,7	17,3	18,8

Tabela 3: Média das porcentagens do VCM, HCM, CHCM, Hb e do Hematócrito obtidas nos concentrados de hemácias com HbAS e HbAA nos 35 dias de armazenamento:

	Período de Armazenamento							
	1º	5º	10º	15º	20º	25º	30º	35º
VCM (FL)								
HbAS	91,0	91,4	92,5	92,6	92,7	93,0	93,6	94,2
HbAA	93,6	94,9	95,5	96,0	96,8	97,2	96,0	96,2
HCM (pg)								
HbAS	29,3	29,0	30,0	30,0	30,0	29,4	29,7	28,6
HbAA	31,3	31,0	31,2	31,3	31,0	30,4	30,6	30,0
CHCM g/dl)								
HbAS	31,8	32,3	32,1	32,1	32,1	31,7	31,8	31,6
HbAA	33,4	32,4	32,5	32,6	31,9	31,2	31,9	31,8
Hb (g/dl)								
HbAS	21,5	21,3	21,4	21,4	21,5	21,5	21,6	21,7
HbAA	23,8	23,4	23,7	23,6	24,0	23,3	23,9	23,2
Hematoc.(%)								
HbAS	65,9	66,3	67,0	67,6	67,2	67,7	68,4	68,8
HbAA	71,1	72,2	71,9	72,4	75,2	74,6	73,7	74,9

As bolsas utilizadas para a coleta de sangue foram fabricadas pela Baxter e ASEM, ambas contendo anticoagulante CPDA-1, não havendo diferença entre os resultados obtidos nessas bolsas.

Após o término de armazenamento todas as bolsas avaliadas foram submetidas ao meio de cultura BHI, permanecendo sob monitorização durante 10 dias, cujos resultados bacteriológicos foram negativos, tanto para organismos aeróbicos como anaeróbicos.

5 - DISCUSSÃO

Diante da necessidade de ampliar estudos em bolsas de concentrado de hemácias com HbAS, além dos descritos na literatura sobre o índice de falcização, nesse estudo foram avaliados, nas 36 bolsas selecionadas vários fatores que pudessem interferir no processo de falcização.

O portador do traço falciforme (HbAS) é uma pessoa saudável, podendo levar uma vida normal e não apresenta alterações hematológicas, em algumas circunstâncias pode apresentar hematúria microscópica ou infartos esplênicos e suas hemácias só falcizam quando submetidas a baixa tensão de oxigênio, portanto está clinicamente apto para doar sangue, enquanto suas hemácias mesmo que armazenadas sob condições ideais para transfusão, estão sujeitas a sofrerem influência desses e/ou de outros fatores, que podem alterar a estrutura das hemácias e o meio em que as mesmas se encontram.

Nesse estudo a concentração de Hb S, detectada nos doadores com traço falciforme, demonstrou não ser um fator indutor de falcização, uma vez que,

as 6 bolsas (19,4%) que apresentaram baixo número de hemácias falcizadas tiveram uma concentração média de 31,4% de HbS, semelhante a encontrada nas 25 (80,6%) bolsas restantes, onde o índice de falcização foi maior, porém com concentração média de HbS de 33,3%. A diferença entre essas concentrações, provavelmente, não interferiu no processo de falcização. As hemácias dos seis doadores, cujos concentrados tiveram baixo índice de falcização, não sofreram hemólise quando submetidas ao teste de resistência globular em NaCl 0,36%, o que pode ser atribuído a algum componente na estrutura da membrana celular das hemácias desses portadores de HbS, que além de conferir resistência a hemólise dificultaria o afoiçamento da hemácia.

Estudos têm revelado que a Hb Fetal possui um efeito inibidor sobre a falcização, em pacientes portadores de anemia falciforme (HbSS) com Hb Fetal elevada, pelo fato da mesma não interagir com a HbS na formação dos polímeros e possuir maior afinidade pelo oxigênio dificulta o processo de falcização, portanto, quanto maior a concentração de Hb Fetal melhor poderá ser o quadro clínico do paciente, enquanto que os portadores de traço falciforme possuem além da HbS, as hemoglobinas A₁, A₂, e Fetal, sendo a maior concentração de HbA₁, fato este, que confere a eles uma menor intensidade no processo de formação de polímeros (POWARS & SCHROEDER, 1989).

Os valores da Hb Fetal, não foram significativos em relação ao número encontrado de hemácias falcizadas nas 31 bolsas de sangue com HbAS, pois a bolsa que continha maior concentração de Hb Fetal (3,4%), apresentou um grande número de hemácias falcizadas, não sendo favorável para impedir a falcização e na bolsa com a menor concentração de Hb Fetal (0,5%) obteve-se um baixo índice de falcização, durante todo o período de armazenamento.

Em portadores da anemia falciforme as deformações celulares que ocorrem no processo de falcização alteram as trocas iônicas, afetam a permeabilidade celular e, como consequência, surgem lesões na membrana, o que também contribui para encurtar a vida das células, enquanto que em portadores de traço falciforme tem sido demonstrado que as hemácias possuem sobrevida normal quando transfundidas em receptores normais (CALLENDER *et al.*, 1949; RAY *et al.*, 1959), o mesmo não acontece quando transfundidas em pacientes sob condições de hipóxia, pois são retiradas da circulação pelo baço (KREVANS, 1959). Esses riscos aumentam quando o sangue siclêmico é utilizado para exsanguíneo-transfusão (VEIGA & VAITHIANTHAN, 1963) e, principalmente, em pacientes com diagnóstico de anemia falciforme (KELLEHER *et al.*, 1984).

A porcentagem de hemácias falcizadas em concentrado contendo HbAS durante a estocagem, somada com a que pode ocorrer no receptor, como por exemplo em paciente sob condições de hipóxia, resultará em mais hemácias falcizadas e poderão ser retiradas precocemente da circulação pelo baço, resultando em complicações clínicas para esse receptor. Em paciente portador de anemia falciforme, quando em crises de falcização, ao ser transfundido com hemácias que falcizaram durante a estocagem, seu quadro clínico poderá se agravar, principalmente se elas forem seqüestradas e destruídas pelo baço.

Nos Estados Unidos da América realizou-se um estudo em bolsas com sangue total tendo HbAS, armazenadas a 4°C durante 28 dias, onde foi detectado menos de 1,5% de hemácias falcizadas, esse valor não foi alterado quer as bolsas plásticas permanecessem em repouso ou sofressem forte agitação antes da coleta da amostra de sangue para pesquisa (RAY *et al.*, 1959), enquanto que num estudo realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará

(HEMOCE) em 1993, com 30 bolsas de concentrado de hemácias, armazenadas a 4°C com solução preservadora SAG-M (Salina, Adenina, Glicose e Manitol) foi observado um índice de falcização progressivo a partir de 24 horas de estocagem (média de 11,6%), após o 10º dia foi evidenciada média de 16,6%, sendo que essas bolsas permaneceram em repouso na posição horizontal (CAMPOS, 1999). Esses últimos resultados foram equivalentes aos observados nesse estudo, onde no 1º dia verificou-se uma média de 8,7% de hemácias falcizadas e no 10º esse índice foi de 13,1%.

O baixo número de células falcizadas encontrado por Ray e colaboradores em 1959, pode ser justificado pela pequena amostragem, pelo sangue total na bolsa e talvez seja explicado pelos cinco haplótipos diferentes associados ao gene da HbS, cada um recebendo o nome da região ou grupo étnico em que é mais prevalente: Senegal, Benin, Banto, Camarões e Árabe-indiano. A anemia falciforme associada aos haplótipos Senegal e Árabe-indiano é muito mais benígna do que aquela associada aos demais haplótipos. Como cada haplótipo é predominante em uma região da África ou da Ásia, a proporção de pacientes com diversos haplótipos diverge nas diferentes regiões da América, segundo a origem étnica das populações negras: enquanto na América do Norte e no Caribe predomina o haplótipo Benin, seguido pelo Senegal e Banto em proporções semelhantes, no Brasil, predomina o haplótipo Banto, seguido pelo Benin, sendo quase ausente o haplótipo Senegal. Uma das consequências deste fato é que a gravidade e a evolução clínica da anemia falciforme, no Brasil, podem ser diversas daquelas observadas em outros países (BRASIL, 1996).

Em um outro estudo realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Bahia com 15 bolsas de portadores de traço falciforme, as quais sofreram homogeneização antes de cada teste, foi observado após 24 horas de

coleta um índice de 28,8% de falcização, diminuindo para 27,1% no 5º dia e para 11% nos últimos dias de armazenamento (CAMPOS, 1999), diferindo dos índices encontrados por Ray e colaboradores, em 1959.

Outro trabalho, também, realizado no HEMOCE anterior a 1993, com 20 bolsas de concentrado de hemácias contendo HbAS e 5 para controle, com anticoagulante CPD, observou-se um aumento gradativo na média de hemácias falcizadas do 1º ao 25º dia de estocagem, ou seja, de 8,19 a 14,63%, respectivamente, mas apenas entre o 15º e o 25º dia que essa diferença foi estatisticamente significativa ao nível de 0,05. A partir do 25º dia iniciou-se um decréscimo do número de hemácias falcizadas até atingir 11,44% no 30º dia de armazenamento (MORAIS *et al*, 1987). Ao fazer um paralelo entre esses resultados com os obtidos nesse estudo, onde houve um aumento significativo de hemácias falcizadas desde os primeiros 5 dias de estocagem, porém os índices significativos em ambos os trabalhos foram apenas entre o 20º e o 25º dia, após esse dia os índices de falcização diferiram, o que pode ser justificado pela diferença entre os anticoagulantes ou os períodos de armazenamento.

Os valores de metahemoglobina encontrados tanto nas bolsas contendo HbAA como nas com HbAS, aumentaram gradativamente durante o período de armazenamento, porém somente nas bolsas controle esses valores permaneceram dentro do padrão normal. As porcentagens de metahemoglobina nas bolsas com HbAS foram maiores do que os valores de referência a partir de 24 horas de estocagem. A variação obtida entre os 35 dias pode ter sido por acaso, conforme análise estatística, ou por uma maior conversão espontânea da hemoglobina (ou oxiemoglobina) em metahemoglobina, nas hemácias com HbAS. Taxas acima de 5,0% de metahemoglobina torna a hemácia incapaz de

transportar oxigênio, como também, podem causar efeitos sobre os equilíbrios de oxigênio dos tetrâmeros de hemoglobina (WEST, 1989).

A primeira linha de defesa do organismo contra as variações do pH interno é fornecida pelos sistemas de tampões. O plasma sanguíneo tamponado, em parte pelo sistema tampão bicarbonato, mantém o pH do sangue humano com valores próximo a 7,40 (LEHNINGER *et al*, 1995). Por meio desse estudo observou-se que o pH nos concentrado de hemácias variou de 7,16 a 6,55, cuja oscilação encontra-se dentro dos padrões estabelecidos (7,55 a 6,66) pela Associação Americana de Banco Sangue (AABB, 1985). A queda do pH deve-se ao fato, que a hemácia metaboliza a glicose para lactose, com isto íons de hidrogênio acumulam-se no plasma e, conseqüentemente, diminuem o pH. O fosfato contido no anticoagulante (CPDA-1) da bolsa age diretamente no citoplasma da hemácia, capacitando-a resistir uma variação de pH entre 6,4 a 7,4, mantendo a integridade dessa célula (LEHNINGER *et al*, 1995), desse modo, conclui-se que a variação do pH observada em todo o período de armazenamento não induziu a falcização das hemácias.

Os valores do hematócrito, da hemoglobina e dos índices hematimétricos nos concentrados de hemácias com HbAS, quando comparados com os do controle, durante os 35 dias de armazenamento, permaneceram dentro dos valores estabelecidos pela Secretaria de Vigilância Sanitária, Portaria nº 121, de 24 de novembro de 1995.

A baixa tensão de oxigênio constitui-se no elemento mais importante para falcização das hemácias, porém as bolsas, onde foram acondicionadas as hemácias, permitem uma certa permeabilidade aos gases, de modo que o sangue armazenado absorve oxigênio do ambiente

(BARRETO *et al*, 1985), por esse motivo, os índices de falcização detectados nesse estudo não podem ser atribuídos a desoxigenação da molécula de hemoglobina S, mas a possibilidade das bolsas plásticas não absorverem adequadamente o oxigênio, não pode ser afastada.

6 - CONCLUSÃO

Para uma melhor qualidade transfusional, diante do aumento gradativo de hemácias falcizadas em 80% das bolsas avaliadas nesse estudo, sugere-se que o tratamento hemoterápico com esses concentrados deverá ter critérios na indicação, não devendo utilizá-los em cirurgias de grande porte, em cirurgias cardíacas, em pacientes com hipóxia, nos casos de exsangüineo-transfusão, em pacientes com tendência à formação de trombos e principalmente nos portadores de anemia falciforme.

A alta incidência de doadores com traço falciforme, aumenta a possibilidade de transfusões de concentrados de hemácias com essa alteração genética. Os Hemocentros que ainda não fazem testes laboratoriais para triagem do doador de sangue portador do traço falciforme, devem ser incentivados a realizá-los no intuito de minimizar os riscos nas transfusões sangüíneas com esses concentrados, perante o baixo custo financeiro desses testes.

Novos fatores devem ser avaliados para buscar as causas da falcização das hemácias com HbAS em bolsas armazenadas de 2 a 6°C, como níveis de potássio, DHL (Desidrogenase Lática), teste de fragilidade osmótica dessas hemácias, concentrações de CO₂ e de O₂ e estudo dos haplótipos.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. *Biologia Molecular da Célula*. 3ª ed. São Paulo: Artes Médica, p. 489-492, 1997.

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS (AABB). *Technical Manual*. Ninth Edition, 515p., 1985.

BARRETO, O.C.O.P., NONOYAMA, K., SAWATANI, K., OKUMURA, Y. & JAMA, N. Viabilidade de sangue conservado em recipientes de várias procedências. *Rev. Ass. Med. Brasil*, 29: 102-105, 1985.

BARCROFT, J. The Respiratory Function of the Blood. *Hemoglobin*. London: Cambridge University Press, 1928.

- BENESCH, R. & BENESCH, R. E. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 26, p. 162-167, 1967.
- BETKE, K., MARTI, N. R., SCHLICHT, I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature*, v. 184, p. 1877-1878, 1959.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação de Sangue e Hemoderivados. *Programa de Anemia Falciforme: grupo de trabalho para elaboração do programa nacional de anemia* (Portaria MS Nº 951, 10/05/1996). Brasília, 13p., 1996.
- BROUSSIOUS, T. & BERTLES, J. F. Simultaneous expression of globin genes for embryonic and adult hemoglobins during mammalian ontogeny. *Science*, 218: 1225-1227, 1982.
- BUNN, H.F. Hereditary Anemias. *Current Issues*, v. III, nº 2, 1989.
- CALLENDER, S. T. E., NICKEL, J. F., MOORE, C. V., POWELL, E. O. Sickler cell disease: Studied by measuring the survival of transfused red blood cells. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 34, p. 90-104, 1949.
- CAMPOS, M. C. C. Sangue Estocado com Heterozigose para Hemoglobina S. *Anais do Encontro Norte Nordeste sobre Anemias e Parasitoses*, Salvador-BA, p.11, 1999.

DACIE, J. V. & LEWIS, S. M. *Practical Haematology*. Sixth Ed. Churchill Livingstone, Edinburg, 453 p., 1984.

INGRAM, V.M. Abnormal human haemoglobin. In: The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobin by "Fingerprinting". *Biochim. Biophys. Acta*, v. 28, p. 539-545, 1958.

KAHN, R. A. I. , et al. *Transfusion*, v. 16, n. 2, 1976.

KELLEHER, J. F. Transfusion of frozen erythrocytes from a donor with sickler trait. *Transfusion*, v.24, p. 167-168, 1984.

KREVANS, J. R. In vivo behavior of sickle-trait erythrocytes when exposed to continuous hypoxia. *Clin. Res.* , v. 7, p. 203, 1959.

LEHMANN, H. & HUNSTMAN, R. G. *Man's haemoglobins*. North Holland Publ. Amsterdam, p. 478, 1974.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D. L. & COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, p. 73-139, 1995.

MARENGO - ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. *J. Clin. Path.*, v. 18, p. 790-792, 1965.

- MELO, S. M. A., ARANTES, S. C. F., BOTELHO FILHO, A., ROCHA, A. F. S., SILVEIRA, E. P. Prevalência de Hemoglobinopatias em Doadores de Sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia-MG. *LAES & HAES*, ano XIX, v. 4, nº 114, p. 104-110, 1998.
- MORAIS, J. F., MARTINS, J. M., VIEIRA, H. F., CHAVES VIEIRA, M. L. Falcização em concentrados de hemácias provenientes de doadores com hemoglobina armazenados em condições normais de Banco de Sangue. *Rev. Med. Univ. Fed. Ceará, Fortaleza*, 25 (1/2), p. 63-69, 1987.
- MOURA, R. A. et al.. *Técnicas de Laboratório*. 3ª edição. São Paulo. Livraria Atheneu, p. 170-173, 1994.
- NAOUN, P. C. *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Sarvier, 171 p., 1997.
- POWARS, D. R., CHAN, I. & SCHROEDER, W. A. The influence of fetal hemoglobin on the clinical expression of sickle cell anemia. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, v. 565, p. 262- 278, 1989.
- RAY, R.N. ; CASSEL, A. & CHAPLIN Jr., H. In vitro and vivo observations on stored sickle trait red blood cells. *Am. J.Clin. Path.*, v.32, p.430-435, 1959.
- SALZANO, F. M. & FREIRE-MAIA, N. *Populações brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos*. São Paulo: Co. Ed. Nacional, 177 p., 1967.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Diário Oficial*. Seção 1,
Portaria nº 121, p.19785, de 24 de novembro de 1995.

VEIGA, S. & VAITHIANTHAN, T. Massive intravascular sickling after
exchang transfusion with sickle-cell trait blood. *Transfusion*, v. 3,
p. 387-391, 1963.

WEST, J.B. *As Bases Fisiológicas da Prática Médica*. Rio de Janeiro: Ed.
Guanabara, p. 317-326, 1989.

TERMO DE CONSENTIMENTO

O traço falciforme é a alteração genética mais comum em nossa população. A sua transmissão ocorre de pais para filhos, porém esses portadores não apresentam sintomas.

O Hemocentro Regional de Uberlândia - Fundação Hemominas, realizará uma pesquisa em bolsas de concentrado de hemácias de 30 doadores portadores do traço falciforme (HbAS).

O teste eletroforese de hemoglobina, utilizado para detecção de traço falciforme, faz parte dos exames realizados em todos os doadores de sangue do Hemocentro Regional de Uberlândia, portanto não há necessidade de nova coleta de sangue para esta pesquisa e você não terá nenhum risco em participar.

Essa pesquisa tem por objetivos buscar novos dados científicos para o descarte dessas bolsas e melhorar a qualidade do sangue, para isso serão avaliados: os índices de falcização das hemácias, o eritrograma, o pH e a dosagem de metahemoglobina durante o período de armazenamento das mesmas, as quais serão utilizadas apenas para essa finalidade. Você terá a garantia em obter esclarecimentos, no Hemocentro, sobre o andamento dessa pesquisa.

A sua identidade será preservada, sendo este um procedimento altamente sigiloso e confidencial, tendo você a liberdade de participar ou não dessa pesquisa, podendo retirar o seu consentimento sem penalização.

O material e os dados coletados serão utilizados unicamente para os objetivos descritos nesse protocolo, sendo que os resultados dessa pesquisa poderão ser publicados para fins científicos.

Portanto, eu _____ autorizo a realização dos testes mencionados acima, no sangue que doe a essa Instituição.

Uberlândia, _____, _____ de 1999.

Nº da bolsa	HbF	HbS	Metahemoglobina	Morfologia eritrocitária	pH	Hb g/dl	Hem. %	VCM FL	HCM pg	CHCM g/dl	OBS.
1º / / / /											
5º / / / /											
10º / / / /											
15º / / / /											
20º / / / /											
25º / / / /											
30º / / / /											
35º / / / /											