

ELIANE MÂRCIA GUNHA DA SILVA

ESTUDO COMPARATIVO DA VIABILIDADE
DAS HEMÁCIAS ESTOCADAS SOB A FOR
MA DE SANGUE TOTAL E EM CONCEN
TRADO DE HEMÁCIAS COM ANTICOAGU
LANTE - CPDA - 1

Trabalho apresentado como re-
quisito final ao Curso de especiali-
zação em Hematologia e Hemoterapia.
Convênio: UFC - MEC - BID III.
Orientador: Prof. Hélio Frota Vieira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FORTALEZA - CEARÁ
1988

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela presença em todos os momentos de minha vida.

Ao Dr. JOSÉ MURILO MARTINS, pelos constantes esforços em favor da melhoria da qualidade deste curso.

Ao Prof. HÉLIO FROTA VIEIRA, pela dedicação e orientação, os meus reconhecimentos e sincera gratidão.

A Dra. HELENA PITOMBEIRA, pelas sugestões imprescindíveis à realização deste trabalho.

As amigas EDILMA MARIA DE ALBUQUERQUE e GIANA MENDES RIBEIRO, ambas do Laboratório de Implantação de Técnica e Controle de Qualidade do Hospital das Clínicas da UFC, pela colaboração na montagem experimental deste trabalho.

Também as amigas MARIA AUXILIADORA DE AZEVEDO ALVES e MARIA LUIZA SCHMITT, pelo apoio na realização da parte experimental.

Aos demais professores e colegas do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia e aos que não foram citados, mas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

AOS MEUS PAIS E

AO CARLOS

DEDICO ESTE TRABALHO

Í N D I C E

	<u>pág.</u>
01 - INTRODUÇÃO	05
02 - MATERIAL E MÉTODOS	07
03 - RESULTADOS	11
04 - DISCUSSÃO	26
05 - CONCLUSÃO	31
06 - SUMMARY	32
07 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

. o o o .

ESTUDO COMPARATIVO DA VIABILIDADE DAS HEMÁCIAS ESTOCADAS SOB A FORMA DE SANGUE TOTAL E EM CONCENTRADO DE HEMÁCIAS COM ANTICOAGULANTE - CPDA - 1

ELIANE MÁRCIA CUNHA DA SILVA*

Um estudo foi feito para comparar a viabilidade das hemácias estocadas por 35 dias, a 4°C, sob a forma de sangue total e concentrado de hemácias com anticoagulante CPDA-1. Os seguintes parâmetros foram medidos em ambas preparações: contagem de hemácias, hematócrito, hemoglobina total e plasmática, fragilidade osmótica, pH, sódio e potássio plasmático. A avaliação do aspecto morfológico das hemácias foi também executada.

Os resultados mostraram alterações em quase todos os parâmetros estudados durante o processo de estocagem.

Foi observado um aumento da hemoglobina plasmática como consequência da hemólise ocorrida durante a estocagem, diminuição dos valores do pH, aumento nos níveis de potássio plasmático, aumento no número de hemácias crenadas, esferócitos, como também aumento da fragilidade osmótica.

Os resultados foram relatados em função do metabolismo das hemácias e do poder tamponante do plasma.

(*) Farmacêutica-Bioquímica, aluna do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia.

01 - I N T R O D U Ç Ã O

O uso do sangue na prática terapêutica é um poderoso elemento auxiliar para o médico, que trata de pacientes acometidos de estados patológicos caracterizados pela insuficiência de produção e perda exagerada dos componentes do sangue.

Nas últimas décadas, o avanço tecnológico e científico tem permitido que o sangue seja fracionado nos seus componentes, preservado e estocado para uso posterior, propiciando assim, maior eficácia na terapia e melhor aproveitamento em termos quantitativos e qualitativos.

Com objetivo de preservar o sangue em estado líquido, mantendo a integridade funcional e a viabilidade dos seus componentes, várias soluções anticoagulantes - preservadoras foram introduzidas na prática, como o ACD (Ácido Cítrico - Citrato - Dextrose) e CPD (Citrato - Fosfato - Dextrose)¹⁷.

Em 1978²³, um novo preservativo do sangue, o CPD-Adenina¹² foi aprovado. Refere-se ao CPD (Citrato - Fosfato - Dextrose) suplementado com 17,3mg de adenina e 25% de dextrose adicional²³⁻³³. A mistura preservativa final deverá conter 0,25mM de adenina³³ quando misturada com 450ml de sangue total.

Essa suplementação da adenina à solução CPD, recebeu a denominação de CPDA-1, por Zuck³¹.

Segundo a hemoterapia atual, seletiva, o sangue total representa apenas o produto inicial do qual se originam os componentes e derivados¹⁷.

¹¹Quando as hemácias são preservadas e estocadas sob a forma de concentrados ou de sangue total, uma série de alterações ocorre nestas células, pois apesar de serem anuclea

das⁴, nelas se realizam intensos e contínuos processos metabólicos. Dentre estes, a glicólise é o mais importante, pois fornece a energia necessária para que as hemácias mantenham a forma, a integridade de sua membrana⁴ e possam desempenhar funções vitais de troca de gases, transporte de íons através da membrana e manutenção da hemoglobina reduzida. //

|| O metabolismo da glicose é feita em grande parte (90%) através da via anaeróbica (Ciclo de Embden-Meyerhof) e os 10% restantes através da via aeróbica, o "shunt" das pentoses⁴⁻²⁶. //

|| Os produtos finais do metabolismo da glicose no organismo são escretados, mas no sangue preservado eles se acumulam no plasma e vão causar efeitos indesejáveis¹. Destes, destaca-se o aumento da acidez, pois quando o pH é inferior a 7 há inativação de enzimas vitais para a glicólise. Como consequência desta diminuição há uma evidente depleção do ATP, o que causa mudança da forma de disco para esfera, dano na bomba de sódio e potássio⁴, aumento da rigidez celular e diminuição da resistência à hemólise osmótica¹⁷⁻²². //

Embora poucas sejam as indicações que justifiquem a preservação de uma bolsa contendo sangue total, que é considerada como um desperdício de componentes e fonte de resíduos indesejáveis¹⁶, o presente estudo tem como objetivo avaliar a viabilidade das hemácias estocadas sob a forma de sangue total e em concentrado de hemácias com anticoagulante CPDA-1.

02 - M A T E R I A L E M É T O D O S

Foi coletado sangue total de doadores de serviço de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), em bolsas plásticas, contendo anticoagulante CPDA-1 (Citrato-Citrato-Dextrose-Adenina) da marca Fenwal.

Esses doadores eram indivíduos, com hemoglobina de mobilidade eletroforética normal (AA) e estudo sorológico negativo para hepatite, sífilis, doença de Chagas e AIDS.

Para o referido estudo foram selecionadas 30 bolsas (unidades) de sangue total. Quinze delas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C (Damon | IEC - modelo 6.000), para obtenção dos concentrados de hemácias, e as 15 restantes foram mantidas como sangue total.

Em seguida, todas as bolsas foram estocadas a 4°C por até 35 dias em posição horizontal. Por ocasião da retirada das amostras para investigação do comportamento das hemācias durante a estocagem, foi realizada hemogeneização com movimentos lentos e laterais.

ANÁLISE PERIÓDICA DAS AMOSTRAS

As amostras consistiram em alíquotas de 10ml do material colhido assepticamente sob fluxo laminar em pequenos tubos de vidros nos 1º, 10º, 20º, 30º e 35º dias da estocagem, e foram levadas ao Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Ceará, para estudo. Na mesma ocasião, eram confeccionados esfregaços de sangue para posterior avaliação do aspecto morfológico das hemácias.

As amostras obtidas foram submetidas as seguintes avaliações:

- 1) Determinação do pH - Esta análise foi feita imediatamente após a coleta no aparelho de pH-Blood Gas Analyzer-1304 - da Instrumentation Laboratory;
- 2) Contagem total das hemácias - Foi realizada no contador automático da Celm;
- 3) Hematócrito - Foi utilizada a técnica do micro hematócrito;
- 4) Dosagem da hemoglobina total - Uma pequena fração da alíquota foi submetida a uma hemólise usando-se uma solução de composição: Ferricianeto de potássio 600 u mol/l, Cianeto 768 u mol/l, Fosfato 1 m mol/l, Tensoativo não iônico 0,5 ml/l, pH $7,2 \pm 0,1$. O hemolizado assim obtido, foi lido em espectrofotometro a 540 nm, da Gilford Instrument-modelo-Stasar III.
- 5) Fragilidade osmótica das hemácias - Foi realizada da segundo a técnica de Dacie²⁵ com soluções salinas tampoadas (com fosfato de Na monobásico e dibásico) e de concentrações variadas (0,10 a 0,90% de NaCl). O restante da alíquota foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para a determinação do sódio e potássio plasmático e da hemoglobina plasmática.

6) Determinação de sódio e potássio plasmático -

Uma pequena fração do sobrenadante foi diluída em água deionizada, e as concentrações e variações do sódio e potássio foram medidas em fotômetro de chama da Micronal-3-262.

7) Determinação da hemoglobina plasmática - Outra fração

do sobrenadante foi colocada em contato com a solução de composição: Ferricianeto de potássio a 600u mol/l, Cianeto 768u mol/l, Fosfato 1m mol/l, Tensoativo não iônico 0,5ml/l, pH 7,2 $\pm$ 0,1, e o produto obtido foi lido em espectrofotômetro a 420nm, da Gilford Instrument-m o d e l o Stasar III.

AVALIAÇÃO DO ASPECTO MORFOLÓGICO DAS HEMÁCIAS

Os esfregaços de sangue foram corados pelo May-Grunwald Giemsa e analisados em microscópio óptico, onde as hemácias crenadas* e os esferócitos foram contados em 500 hemácias.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A descrição estatística dos dados seguiu uma abordagem do tipo exploratório, onde foram calculados dados estatísticos com média, desvio padrão e amplitude para as variáveis: contagem de hemácias em milhões/mm³, hematócrito, hemo

(*) Hemácias que apresentam projeções regulares do tipo liso ao redor de todo perímetro celular. Tal artefato é devido a perda de fluido intracelular da hemácia, como visto no sangue com taxa alta de anticoagulante¹⁵.

globina total e plasmática, hemácias crenadas, esferócitos, fragilidade osmótica, sódio, potássio e pH do sangue total e concentrado de hemácias nos 1º, 10º, 20º, 30º e 35º dias de estocagem. Os cálculos foram procedidos através do programa estatístico-computacional SPSS(Statistical Package for the Social Sciences).

03 - R E S U L T A D O S

No presente trabalho foram avaliadas 15 bolsas de sangue total e 15 bolsas de concentrado de hemácias.

Os resultados obtidos para os parâmetros hematológicos das bolsas contendo concentrados de hemácias estocados a 4°C durante 35 dias estão na tabela I e nas figuras 1 a 5.

Os resultados obtidos com relação aos parâmetros morfológicos e bioquímicos das bolsas contendo concentrados de hemácias estocados a 4°C durante 35 dias estão na tabela II e nas figuras 6 a 10.

Os resultados obtidos para os parâmetros hematológicos das bolsas contendo sangue total estocadas a 4°C durante 35 dias se encontram na tabela III e nas figuras 1 a 5.

Os resultados obtidos com relação aos parâmetros morfológicos e bioquímicos das bolsas contendo sangue total estocadas a 4°C durante 35 dias se encontram na tabela IV e nas figuras 6 a 10.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DO CONCENTRADO
DE HEMÁCIAS ESTOCADO A 4°C

CPDA-1 (N=15)

TABELA - I

P A R A M Ê T R O S		1º DIA	10º DIA	20º DIA	30º DIA	35º DIA
NÚMERO DE HEMÁCIAS (MILHÕES/ MM^3)	Xm	6,1	5,9	6,0	6,3	5,6
	XM	9,7	8,0	9,0	9,1	8,7
	$\bar{X}$	8,0	7,2	7,5	7,2	7,4
	S	1,1	6,6	0,9	0,7	0,8
HEMATÓCRITO(%)	Xm	59	58	58	58	56
	XM	84	73	75	72	73
	$\bar{X}$	69,3	67,3	67,2	67,0	66,3
	S	7,3	4,7	5,1	4,4	5,3
HEMOGLOBINA (g/100ml) TOTAL	Xm	18,2	18,2	18,2	18,0	18,0
	XM	28,0	24,0	23,9	23,7	24,9
	$\bar{X}$	22,5	21,5	21,2	21,6	21,6
	S	2,6	1,8	1,4	1,4	1,9
HEMOGLOBINA (mg/100ml) PLASMÁTICA (normal 5mg/100ml)	Xm	10,3	29,6	63,6	33,3	29,6
	XM	92,5	266,4	532,8	1.668,7	3.484,4
	$\bar{X}$	46,9	119,1	235,4	450,1	1.225,1
	S	36,5	58,8	137,3	509,9	955,2
FRAGILIDADE OSMÓTICA (% de NaCl) (NORMAL 0,40 a 0,445% de NaCl)	Xm	0,38	0,43	0,42	0,44	0,46
	XM	0,47	0,50	0,48	0,53	0,55
	$\bar{X}$	0,40	0,50	0,50	0,50	0,50
	S	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03

PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS
DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS ESTOCADO A 4°C

CPDA - 1 (n = 15)

TABELA - II

PARÂMETROS		1º DIA	10º DIA	20º DIA	30º DIA	35º DIA
HEMÁCIAS CRENADAS	X _m	1	5	1	4	16
	X _M	10	28	52	69	90
	X	2,9	13,7	33,1	42,3	55,4
	S	3,1	7,7	15,0	18,1	23,9
ESFERÓCITOS %	X _m	0	1	1	1	4
	X _M	1	3	10	11	30
	X	0,1	0,7	3,3	5,5	11,1
	S	0,4	0,8	2,8	3,0	6,9
pH SANGÜÍNEO	X _m	6,807	6,397	6,244	6,197	6,152
	X _M	7,008	6,697	6,436	6,427	6,419
	X	6,918	6,592	6,362	6,282	6,254
	S	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
SÓDIO PLASMÁTICO (mEq/l)	X _m	171	152	136	140	136
	X _M	206	182	182	216	228
	X	179,2	168,6	156,3	172,3	168,2
	S	9,1	7,9	13,8	22,8	36,3
POTÁSSIO PLASMÁTICO (mEq/l)	X _m	5,4	20,4	32,1	43,5	51,9
	X _M	9,6	39	56,1	77,0	78
	X	6,2	22,4	25,7	33,3	39,2
	S	2,9	29,4	11,9	18,4	34,0

PARÂMETROS HEMATOOLÓGICOS DO SANGUE
TOTAL ESTOCADO A 49C

CPDA - 1 (n = 15)

TABELA - III

PARÂMETROS		19 DIA	109 DIA	209 DIA	309 DIA	359 DIA
NÚMERO DE HEMÁCIAS (Milhões/mm ³)	Xm	3,4	3,4	4,0	3,3	3,9
	XM	5,9	6,0	5,4	5,7	6,1
	X	4,7	4,6	4,6	4,5	4,7
	S	0,7	0,8	0,4	0,7	0,5
HEMATÓCRITO (%)	Xm	32	27	35	31	36
	XM	45	52	51	55	55
	X	39,5	39,3	40,4	41,2	42,2
	S	3,8	6,8	4,0	5,6	5,0
HEMOGLOBINA TOTAL (g/100ml)	Xm	10,2	9,0	11,8	9,9	11,3
	XM	14,8	16,8	16,7	14,6	16,7
	X	12,6	12,8	13,0	12,0	13,4
	S	1,3	2,1	1,5	3,2	1,5
HEMOGLOBINA PLASMÁTICA (normal 5mg/100ml)	Xm	7,4	30	55,5	55,5	37
	XM	66,6	77,7	73,9	218,3	236
	X	27,6	45,4	82,3	119,9	139,4
	S	22,2	22,2	45,9	46,2	51,6
FRAGILIDADE OSMÓTICA (% de NaCl) (Normal 0,40 a 0,445% de NaCl)	Xm	0,39	0,38	0,43	0,42	0,42
	XM	0,48	0,50	0,48	0,50	0,50
	X	0,40	0,40	0,50	0,50	0,50
	S	0,03	0,04	0,02	0,02	0,03

PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E BIOQUÍMICO
DO SANGUE TOTAL ESTOCADO A 49°C

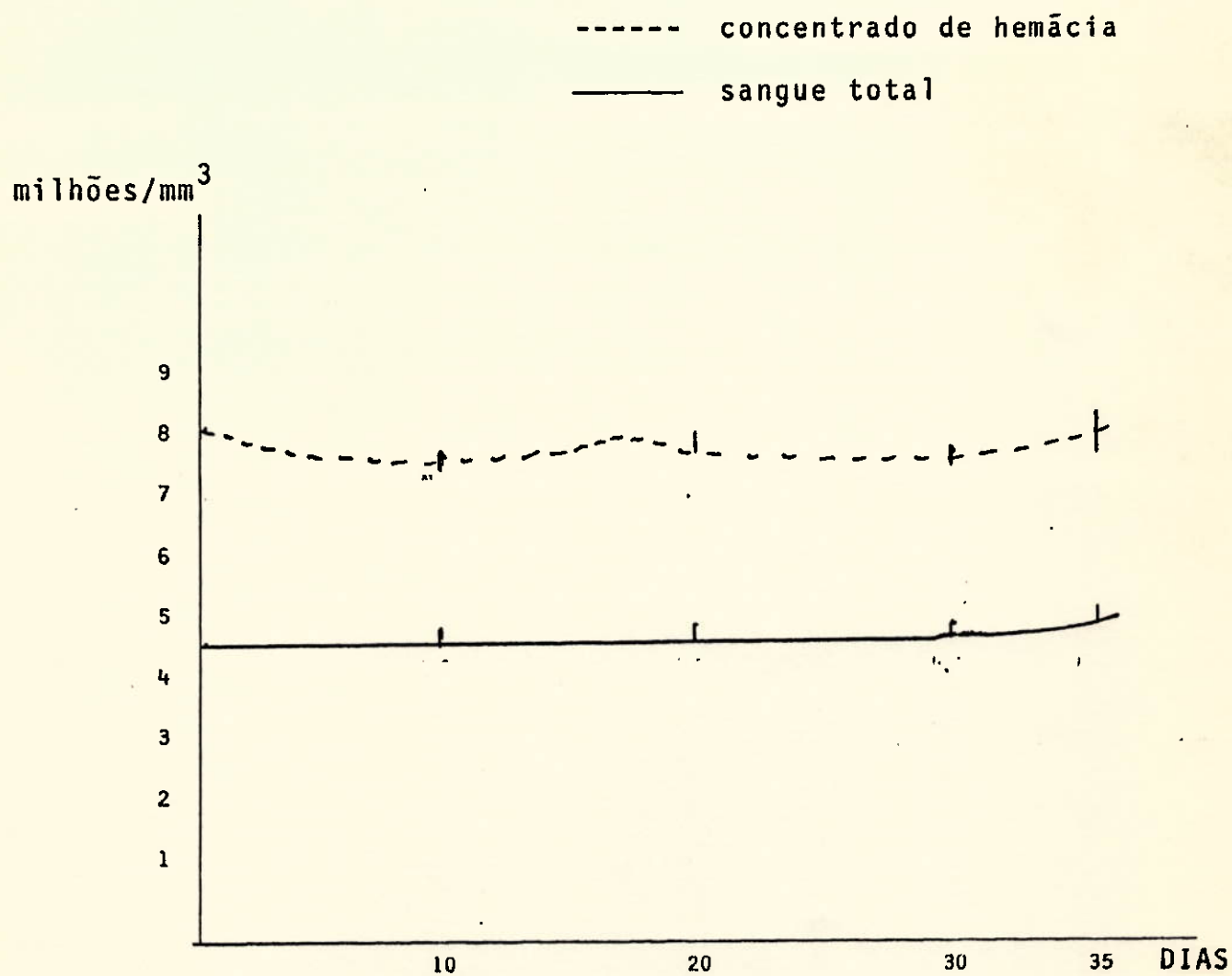
CPDA - 1 (n = 15)

TABELA - IV

PARÂMETROS		19 DIA	109 DIA	209 DIA	309 DIA	359 DIA
HEMÁCIAS CRENADAS (%)	X _m	1	2	16	28	50
	X _M	18	37	70	90	97
	X	4,4	20,1	38,9	60,7	79,4
	S	4,9	9,7	17,8	17,4	12,3
ESFERÓCITOS (%)	X _m	0	1	1	2	3
	X _M	2	4	6	27	34
	X	0,2	0,5	2,5	7,4	16,2
	S	0,6	1,1	1,6	7,0	9,7
pH SANGUÍNEO	X _m	6,813	6,555	6,402	6,332	6,273
	X _M	7,076	6,932	6,665	6,542	6,509
	X	6,917	6,701	6,547	6,425	6,395
	S	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
SÓDIO PLASMÁTICO (mEq/l)	X _m	118	142	144	112	160
	X _M	194	182	196	212	236
	X	171,1	171,8	169,4	166,9	174,1
	S	18,8	10,8	11,7	24,1	18,6
POTÁSSIO PLASMÁTICO (mEq/l)	X _m	4,4	6,0	15,4	16,4	23,4
	X _M	7,5	18,3	24,6	32	34,8
	X	5,3	12,8	17,5	23,7	28,3
	S	0,9	3,6	7,5	7,6	3,6

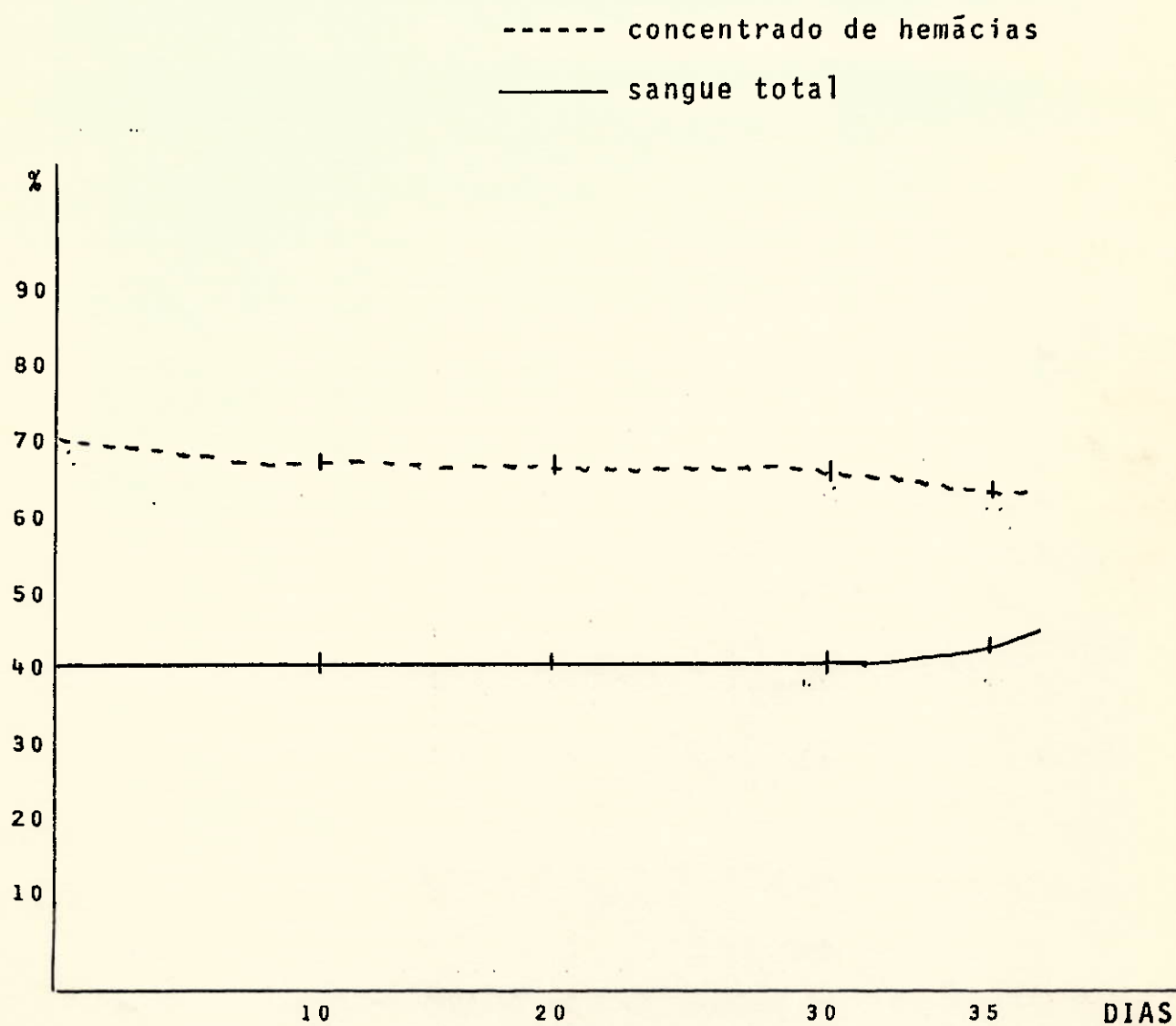
VARIAÇÃO DAS HEMÁCIAS EM MILHÕES/mm³
DURANTE A ESTOCAGEM A 4°C

FIGURA 1



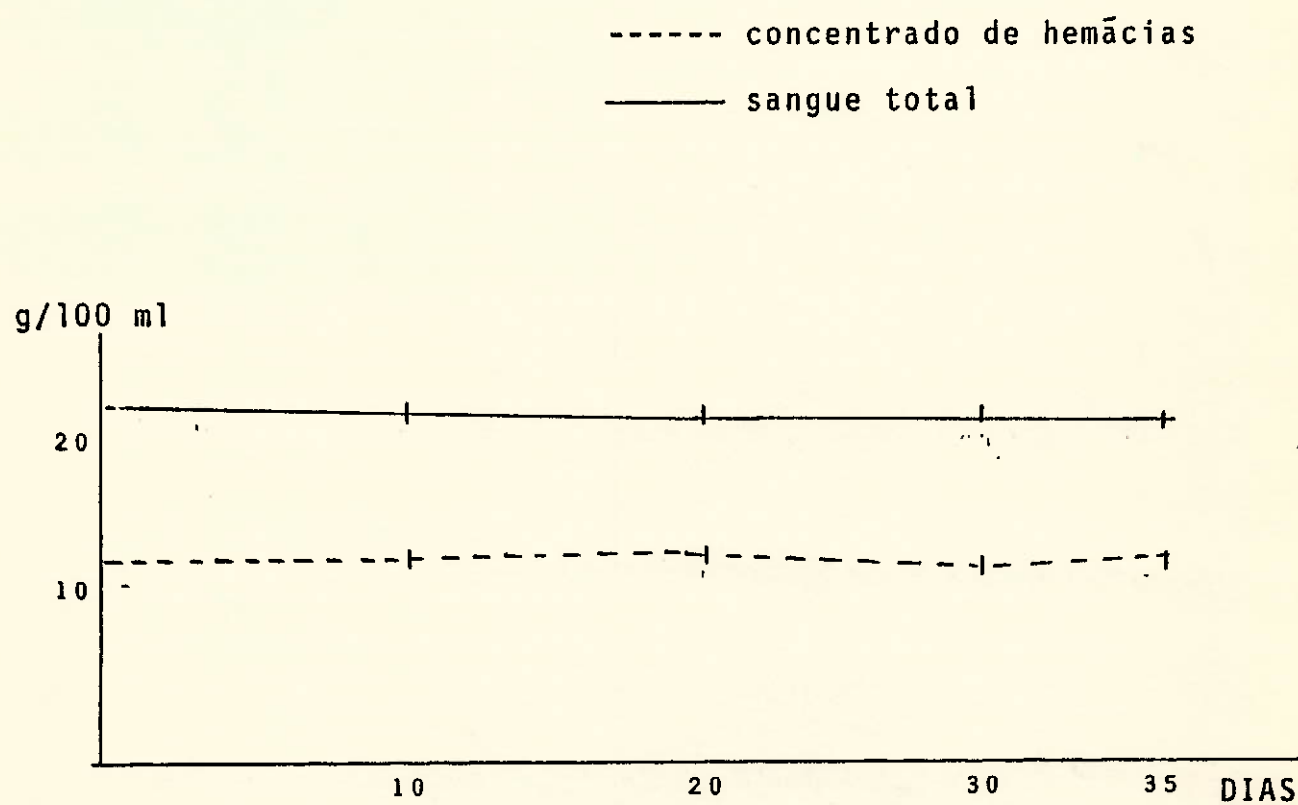
VARIAÇÃO DO HEMATÓCRITO DURANTE A ESTOCAGEM
A 4°C EM POSIÇÃO HORIZONTAL

FIGURA 2



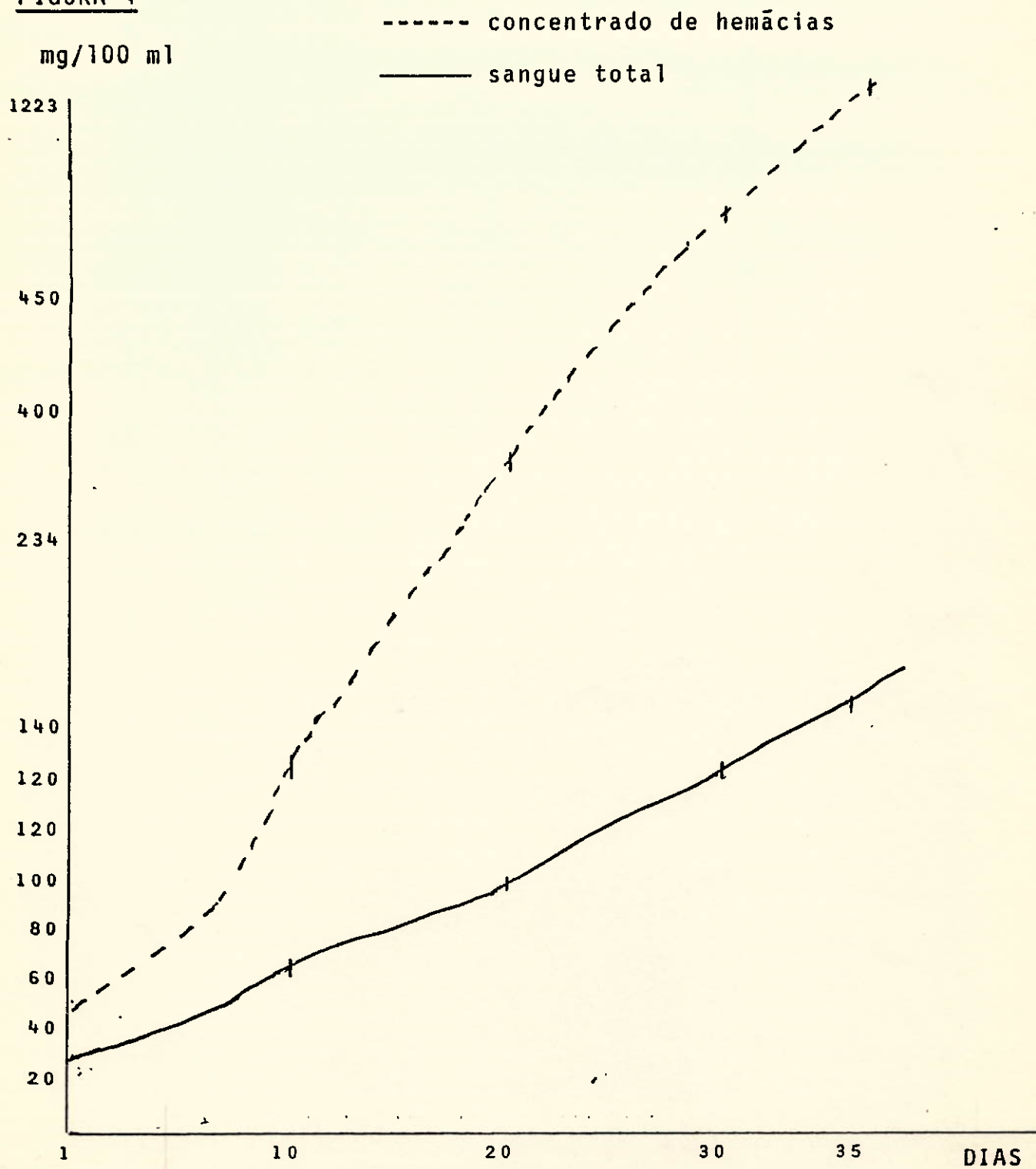
VARIAÇÃO DE HB DURANTE A ESTOCAGEM A
4°C EM POSIÇÃO HORIZONTAL

FIGURA 3



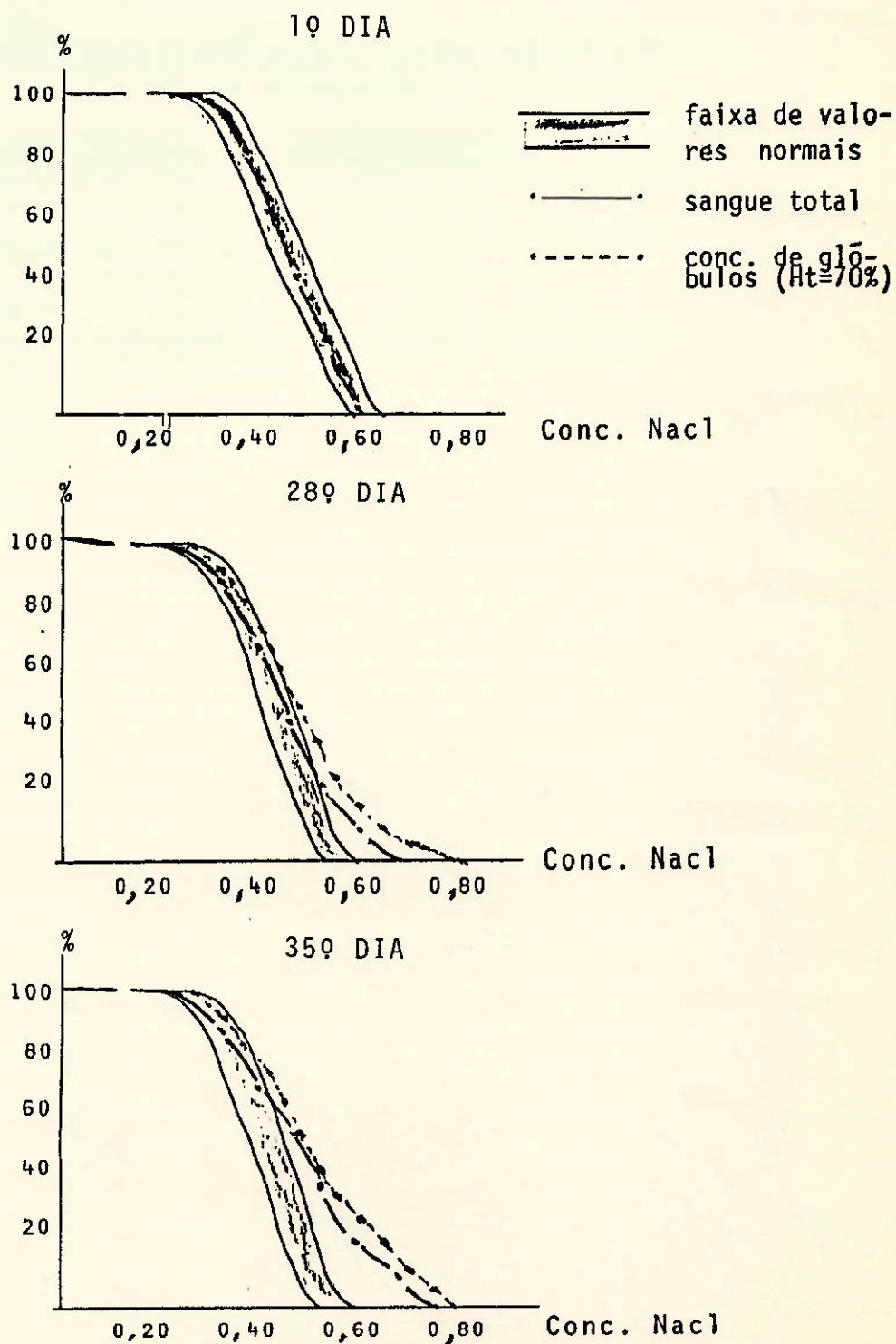
VARIAÇÃO DE HB PLASMÁTICA DURANTE A
ESTOCAGEM A 4°C EM POSIÇÃO HORIZONTAL

FIGURA 4



VARIAÇÃO DA FRAGILIDADE OSMÓTICA DURANTE
A ESTOCAGEM A 4°C EM POSIÇÃO HORIZONTAL

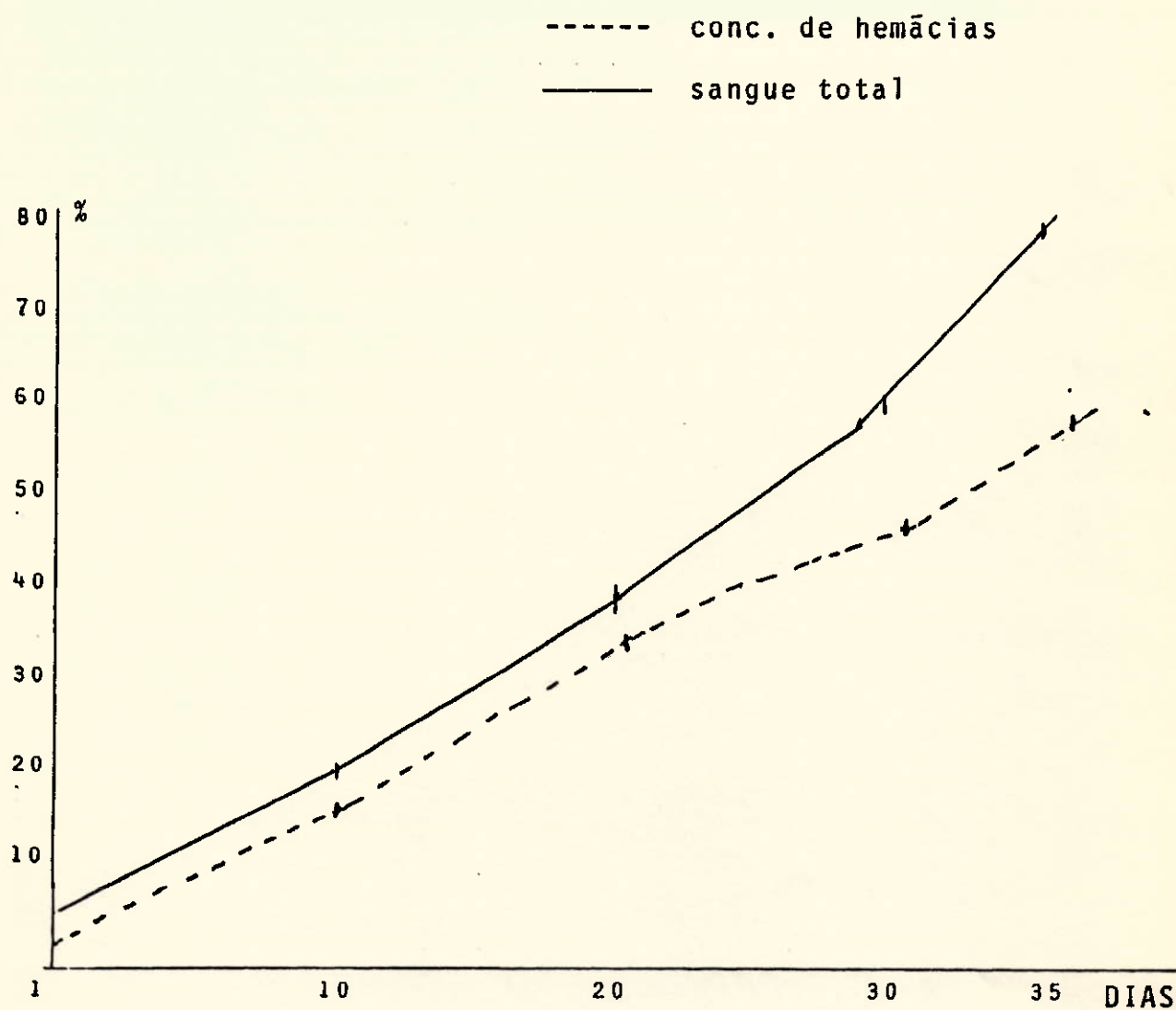
FIGURA 5



N = 15

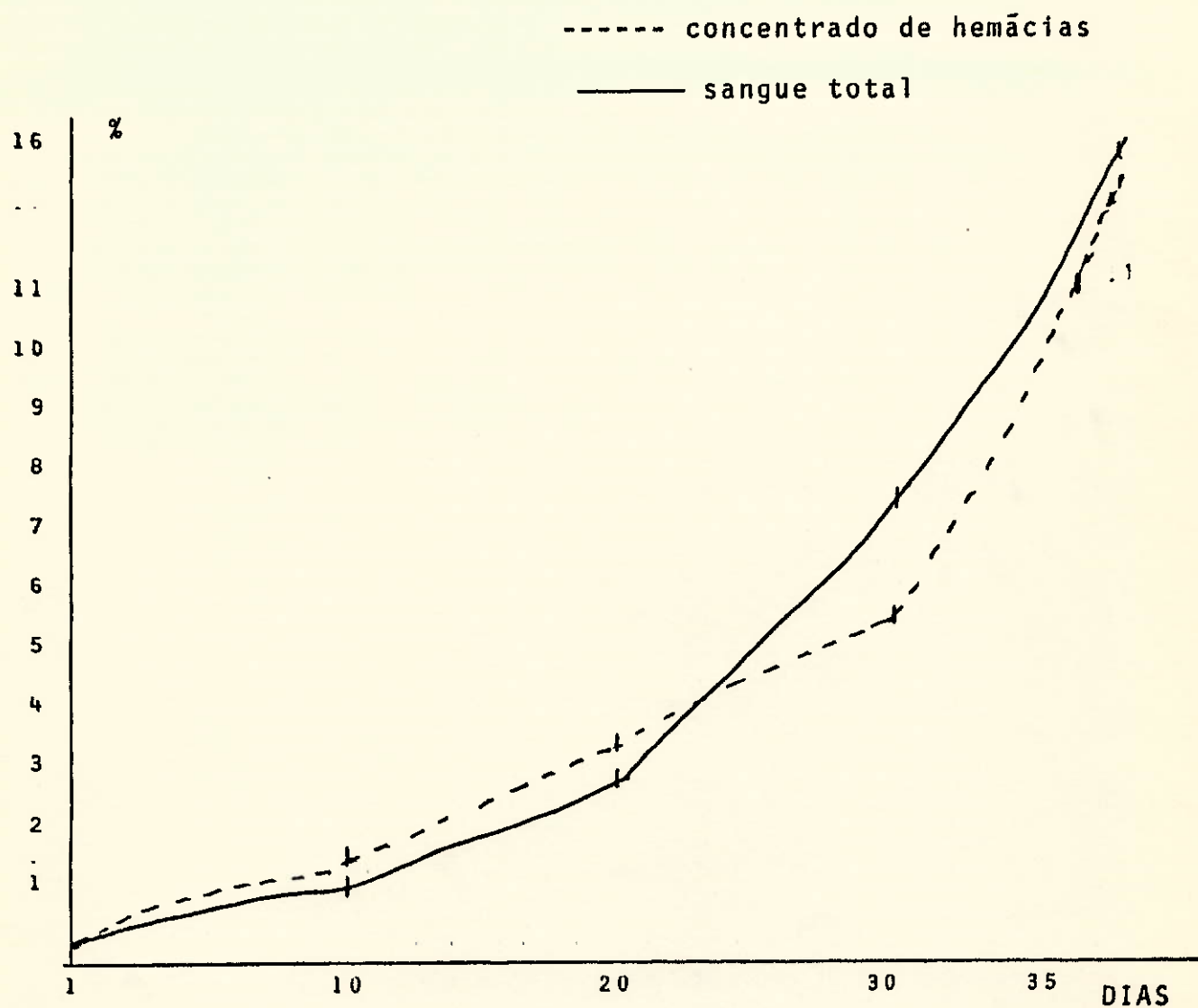
VARIAÇÃO PERCENTUAL DE HEMÁCIAS CRENADAS
DURANTE A ESTOCAGEM A 4°C EM POSIÇÃO HO-
RIZONTAL

FIGURA 6



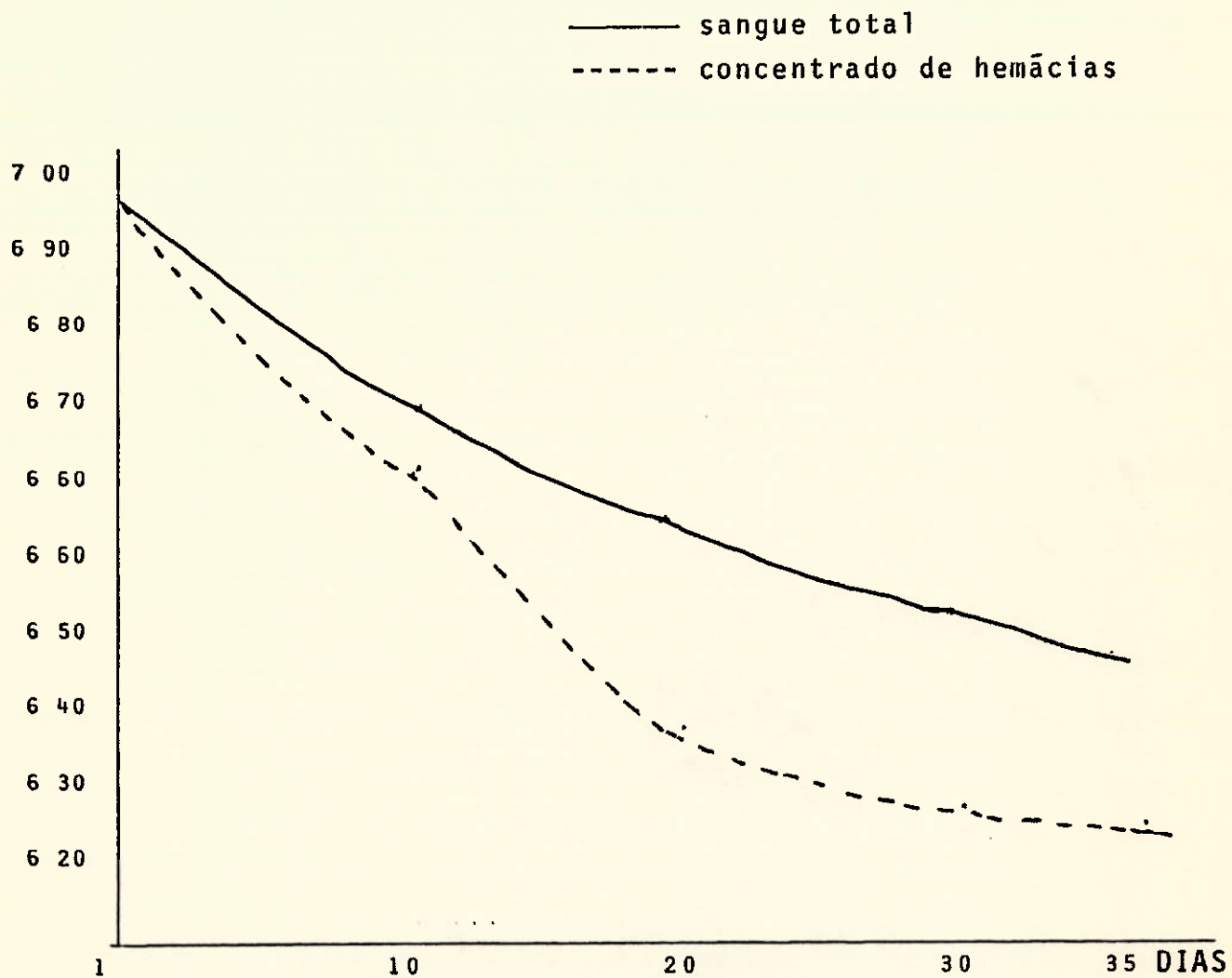
VARIAÇÃO DA PERCENTAGEM DE ESFERÓCITOS
DURANTE A ESTOCAGEM A 4°C EM POSIÇÃO
HORIZONTAL

FIGURA 7



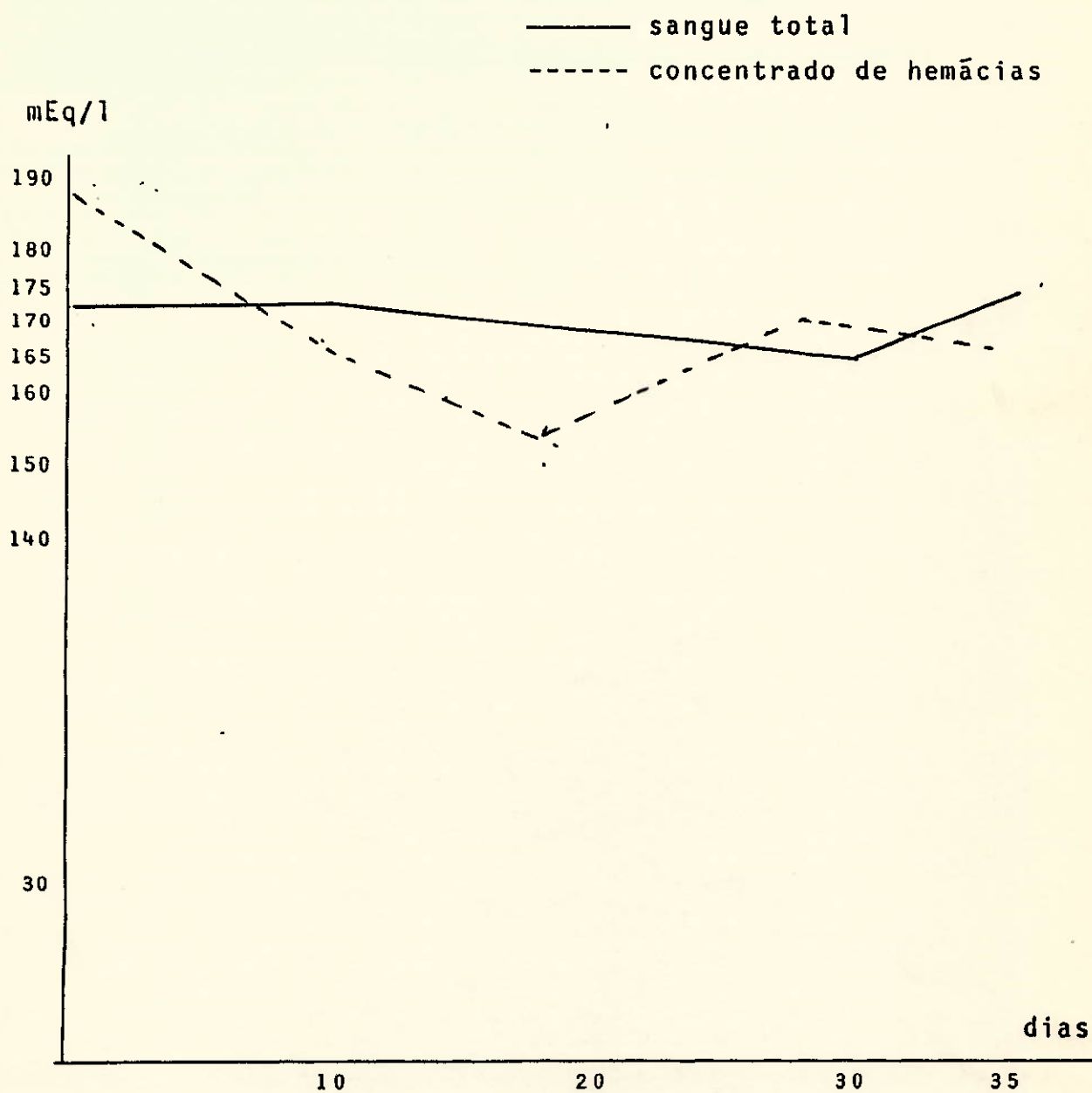
VARIAÇÃO DO pH DURANTE A ESTOCAGEM
A 4°C EM POSIÇÃO HORIZONTAL

FIGURA 8



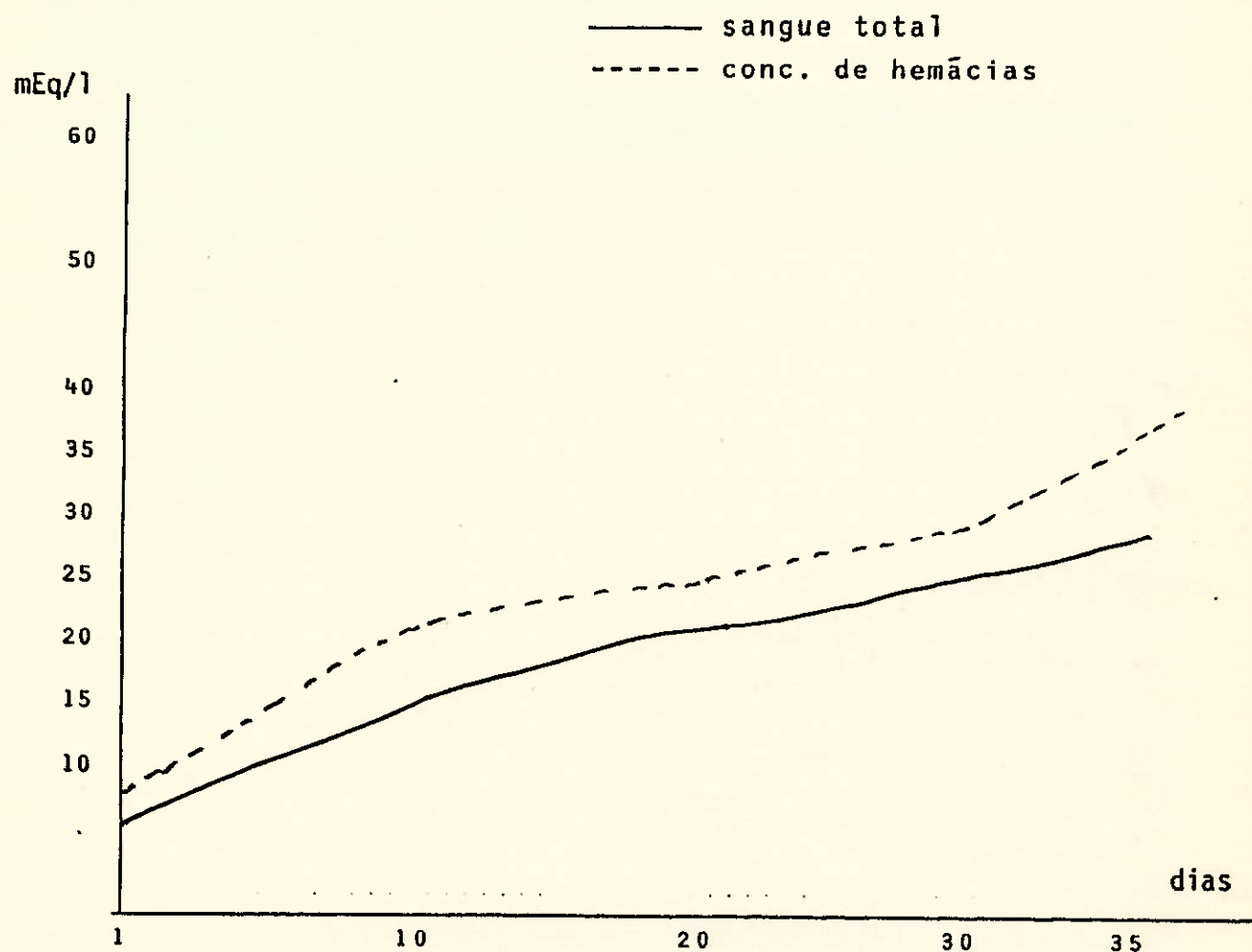
VARIAÇÃO DE SÓDIO PLASMÁTICO DURANTE
A ESTOCAGEM A 4°C, EM POSIÇÃO HORIZONTAL

FIGURA 9



VARIAÇÃO DE POTÁSSIO PLASMÁTICO DURANTE A
ESTOCAGEM A 4°C, EM POSIÇÃO HORIZONTAL

FIGURA 10



04 - D I S C U S S A O

Analizando nossos resultados apresentados nas figuras 1, 2, 3... 10, podemos observar mudanças durante a estocagem a 4°C, em quase todos os parâmetros, bem como uma variação entre as bolsas com sangue total e as com concentração de hemácias.

Analizando os resultados do hematócrito apresentado na fig. 2 podemos observar uma discrepância em relação aos valores obtidos, bem como em relação ao número de hemácias no sangue total¹⁹, fig.1. Se com a estocagem do sangue ocorre hemólise, era esperada uma diminuição gradativa desses valores. Esse fenômeno ocorre, talvez, como consequência da hemólise. Como o estroma celular permanece no meio plasmático, provavelmente irá alterar os valores do hematócrito, como também o número de hemácias, pois a contagem fornecida pelo contador, é provavelmente uma somatória de hemácias com outras partículas celulares.

Quanto aos valores para a hemoglobina total durante a estocagem esperávamos que esses deveriam permanecer constantes¹⁹, pois a mesma não é produzida nem degradada durante a estocagem.

A pequena oscilação observada nos valores obtidos para a hemoglobina total nas bolsas de sangue total ou de concentrados de hemácias (fig.3), pode ser explicada por oscilação do espectrofotômetro nos momentos da leitura.

A liberação da hemoglobina da hemácia sempre ocorre durante a estocagem devido ao processo da hemólise, e nossos resultados demonstram esta grande variação nas bolsas estocadas durante o período de 35 dias.

Foi observado um maior grau de hemólise no concentrado de hemácias, em relação ao sangue total (fig.4) e isto se deve provavelmente ao menor volume de plasma residual contido no concentrado³¹.

Comparados os resultados obtidos com a literatura¹⁹⁻²³⁻³¹ estes demonstram uma maior variação da hemoglobina plasmática tanto nas bolsas contendo sangue total como também nas bolsas contendo concentrados de hemácias. Talvez isto se deva a hemólise provocada durante o manuseio das bolsas, ou a técnica utilizada na dosagem da hemoglobina plasmática.

"O aumento na fragilidade osmótica das hemácias sempre ocorre quando o sangue é estocado por um longo período."

Os nossos resultados demonstram que quando o sangue é estocado sob a forma de concentrado de hemácias, estas tornam-se menos resistentes (fig.5).

"De acordo com Beutler⁴⁻⁷ isso ocorre devido a um grande acúmulo de lactato no interior das hemácias tornando-as hipertônicas em relação ao plasma. Essa hipertonicidade é tida como consequência da presença de substâncias osmoticamente ativas, indicando-se o lactato como sendo o responsável."

Sendo assim, é de se esperar uma maior fragilidade das células estocadas na forma de concentrado de hemácias, onde o metabolismo ativo dessas células induz a uma grande produção de lactato.

As células estocadas na forma de sangue total mostraram que essa fragilidade é menos acentuada (fig.5) durante o período de estocagem, uma vez que o lactato produzido tem maior facilidade para sair da célula por causa do

maior poder tamponante do plasma no sangue total, rico em substâncias tamponantes que favorecem a manutenção de níveis de acidez menores enquanto que, para o concentrado de hemácias o tamponamento é ineficiente, induzindo ao acúmulo de ácido láctico no interior da célula.

O resultado do aspecto morfológico revelou uma maior variação de hemácias crenadas e esferócitos nas bolsas de sangue total em relação as bolsas com concentrado de hemácias durante a estocagem (figs. 6 e 7).

Esta maior variação de hemácias crenadas observadas nas unidades de sangue total é devido, provavelmente, a grande quantidade de anticoagulante¹⁵ presente no plasma, que o torna ligeiramente hipertônico, levando a hemácia a perder água durante a estocagem.

Com relação aos esferócitos, o resultado obtido era esperado, pois, segundo Beal⁴, a progressiva mudança da forma da hemácia (disco/esfera), ocorre mais cedo e em maior extensão nas bolsas contendo sangue total do que naquelas contendo concentrados de hemácias. Esta diferença se deve em parte a remoção inicial do plasma⁴, fornecendo menos adenina para a síntese de ATP e menos proteínas plasmáticas tamponantes e consequentemente uma queda mais rápida do pH, levando a diminuição da glicólise¹⁸ pela via anaeróbica. Com isto, a hemácia passa a utilizar com mais intensidade a via que leva a formação de NADP reduzido (fosfato nicotinamida adenosina dinucleotídeo reduzido), que é indispensável para a manutenção da glutatona reduzida²⁶, metabólito importante para a manutenção da fisiologia normal da membrana celular.

A queda do pH sanguíneo observada nas unidades de concentrado de hemácias e nas de sangue total durante 35 dias de estocagem (fig.8) é devido a metabolização da glicose pela hemácia que produz ácido láctico, levando a acidose

intracelular e este, ao difundir-se através da membrana, promove também a acidose extracelular no sangue conservado.

Os mecanismos tamponantes que o sangue dispõe são representados principalmente pelos sistemas: tampão bicarbonato, tampão fosfato e pela própria hemoglobina (Efeito Bohr) que mantêm o pH nos níveis fisiológicos. A medida que as hemácias metabolizam a glicose, grandes quantidades de âcido lático são produzidas, e o pH diminui, apesar de todo o sistema tamponante além do tampão fosfato³ presente na solução anticoagulante CPDA-1.

A queda mais rápida dos níveis do pH observada no sangue quando este é estocado sob a forma de concentrado de hemácias, ao invés de sangue total, pode ser explicada pela diminuição da capacidade tamponante devido a remoção do plasma¹⁻⁸ onde os sistemas de tampões estão presentes.

Quanto aos íons estudados no plasma nas unidades de sangue total e nas de concentrado de hemácias, podemos observar um aumento no nível de potássio durante o período de estocagem (fig.10). Sabe-se que as concentrações intracelulares de potássio nas hemácias são mantidas pelo transporte ativo³⁵ e para isso requer ATP produzido pelo metabolismo celular e a liberação de energia do mesmo é feita pela enzima ATPase²⁶.

"Durante a estocagem do sangue a 4°C houve um aumento na concentração do potássio plasmático (fig.10) devido aos seguintes fatores: tempo de estocagem que leva a uma diminuição dos níveis de ATP, e com isto diminuição da atividade da bomba de sódio-potássio; temperatura²¹ de estocagem, pois a atividade da ATPase da membrana é mínima a 4°C, não ocorrendo o transporte ativo do sódio/potássio³⁵ e a hemólise²¹, pois há uma maior concentração desse íon no meio intra-celular.

Com relação ao sódio plasmático era esperado uma diminuição gradativa do mesmo^{19 ~ 31}, pois sabe-se que qualquer mecanismo que iniba o transporte ativo, induz a diminuição do sódio. Isso ocorre devido a diminuição do ATP⁴ responsável pelo fornecimento de energia para o transporte ativo. A hemólise que ocorre no período de estocagem favorece a diminuição do sódio plasmático uma vez que a concentração desse íon é menor no meio intra-celular.

Em nosso trabalho, surpreendentemente foi observada oscilação na concentração de sódio plasmático nas bolsas contendo concentrado de hema⁴cias onde, até o 20º dia da estocagem, houve resultados condizentes com o esperado (fig.9) e após esse tempo observamos aumento na concentração de sódio plasmático. Esse fato nos faz supor ter havido problemas técnicos na determinação dos níveis de sódio. Quanto as bolsas contendo sangue total houve também resultados inesperados após o 30º dia (fig.9) de estocagem, devido, também, a problemas de ordem técnica.

Nossos resultados foram discutidos em função da média obtida das 30 bolsas em cada dia de observação, isto é, a média obtida nos 1º, 10º, 20º ... dias de estocagem. A análise estatística desses dados mostraram, para alguns parâmetros estudados, valores de amplitude total bastante elevados, indicando uma não total homogeneidade das bolsas. Isso era-nos esperado pois os sangues coletados, apesar de serem de pessoas clinicamente sadias, mostravam níveis de hemácias, de hemoglobina, de hematócrito diferentes. Isto nos faz assumir que desvios, em relação a média, deveriam ocorrer permitindo que o valor médio possa ser representativo das alterações ocorridas no material estocado ao longo dos 35 dias do experimento.

05 - C O N C L U S Ã O

Os achados, nesse trabalho, evidenciam os danos contínuos que ocorrem nas hemácias durante o período de estocagem, sugerindo ser necessário que os bancos de sangue, serviços de transfusões e clínicas estejam cientes da natureza e quantidade da "lesão de estocagem" que ocorrem nas hemácias, para uma melhor seleção de sangue para uso em transfusões.

06 - S U M M A R Y

A study was conducted to compare the viability of red blood cells stored for 35 days, at 4°C, either in form of whole blood or as concentrated preparation containing anti-coagulant CPDA-1. The following parameters were measured on both preparations: counting of red blood cells, hematocrit, whole and plasmatic hemoglobin, osmotic fragility, plasma sodium and potassium. The evaluation of the morphologic aspect of red blood cells was also carried out.

The results show alteration during storage in almost all parameters studied. It was observed an increase in plasmatic hemoglobin as a consequence of hemolysis during the storage period, decrease of pH values, increase in the number of crenated cells, spherical blood cells, as also an increase osmotic fragility.

The results were related to the metabolic behavior of red blood cells and to the buffering capacity of plasma.

07 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AKERBLOM, Olof & KREUGER, Anders. Studies on citrate-phosphate-dextrose (CPD) blood supplemented with adenine. VOX SANG, 29(2): 90-100, aug, 1975.
02. ANTONI, E. & BRUNORT, M. The derivatives of ferrous hemoglobin and myoglobin. In: _____. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. 1a.ed. Amsterdam, North Holland Publishing Company, 1971. 436p. Cap.2, p.13-25.
03. BARRETO, O.C.O.P. et al. Viabilidade de sangue conservado em recipientes de várias procedências. Rev.Ass.Méd.Brasil, 29(516): 102-5, maio-jun, 1983.
04. BEAL. R.W. & ISBISTER, J.P. The storage and use of whole blood: Management of acute haemorrhage. In: _____. Blood component therapy in clinical practice. 1a,ed, Melbourne, Blackwell Scientific Publications, 1985. 305p. Cap. 2, p.12-19.
05. BENSINGER, T.A. & ZUCK, T.F. Additional studies concerning the metabolism of packed erythrocytes in CPD adenine. Transfusion, 16(4): 353-356, july-aug, 1976.
06. BENSINGER, T.A. et al. In vitro metabolism of packed erythrocytes stored in CPD - adenine. Transfusion, 15(2): 135-139, mar-apr, 1975.
07. BEUTLER, E. et al. The osmotic fragility of erythrocytes after prolonged liquid storage and after reinfusion. Blood, 59(6): 1141-1147, june, 1982.

08. BEUTLER, ERnest & West, Carol. The storage of hard-packed red blood cells in citrate-phosphate-dextrose (CPD) and CPD-adenine (CPDA-1). Blood, 54(1): 280-284, july, 1979.
09. BISHOP, C. Some in vitro effects of adenine added to stored blood. Transfusion, 4(1): 265-270, jan-feb, 1964.
10. CAIRUTAS, C.M. Produtos celulares. In: _____. Componentes e derivados do sangue para uso terapêutico. 1a.ed. Recife, Editora Universitária, 1986. 379p. Cap.2, p.27-112.
11. CARD, R.T. et al. Deformability of stored red blood cells. Transfusion, 22(2): 96-101, mar-apr., 1982.
12. DAWSON, R.B. et al. Blood preservation XXVI. CPD. adenine packed cells: Benefits of increasing the glucose. Transfusion, 18(3): 339-346, May-june, 1978.
13. _____. Blood preservation XVI packed red cell storage in CPD-adenine. Transfusion, 16(1): 79-81, jan-feb, 1976.
14. HARADIN, A.R. et al. Changes in Physical Properties of Stored Erythrocytes - Relationship to Survival in Vivo. Transfusion, 9(5): 229-37, sept-oct, 1969.
15. INWOOD, M.J. & THOMSON, S. Princípios de Hematologia. In: STANLEY, S. R. LINCK: Técnicas de Laboratório. São Paulo, Manole Ltda., 1986, 1053p. Cap.29, p.765-835.
16. JUNQUEIRA, P.C. O Arsenal Hemoterápico. In: Uso Racional da Hemoterapia. Rio de Janeiro, 1978, 72p. Cap.3, p.20-60.

17. JUNQUEIRA, P.C. Preservação Arsenal Hemoterápico. In: O Essencial da Transfusão de Sangue. São Paulo, Andrei Editora, 1979. 356p. Cap.4, p.217-67 e Cap.6, p.297-348.
18. KREUGER, A. et al. A Clinical Evoluaton of Citrate-Phosphate - Dextrose - Adenine Blood. Vox Sanguinis.29(2) : 81-9, Aug., 1975.
19. LATHAM, Jr., J.T. et al. Chemicaland hematologic changes in stored CPDA-1 blood. Transfusion, 22(2): 158 -160, nov-apr., 1982.
20. LOVRIC, V.A. et al. Packed Red Cell Transfusions - Improved Survival. Vox Sanguinis, 33(6):321-78, Dec., 1977.
21. MICHAEL, J.M. et al. Potassium Load in CPD-Preserved Whole Blood and tho types of Packed Red Blood Cells. Transfusion,15(2): 144-9, mar-apr., 1974.
22. MOLLISON, P.L. The transfusion of red cells. In: _____.Blood Transfusion in Clinical Medicine. London, Blackwell Scientific Publications, 1983. 987p.cap.4, p.93-156.
23. MOORE, G.L. et al. Some Properties of Blood Stored in Anticoagulant CPDA-1 Solution. A Brief Summary. Transfusion,21(2):135-7. Nov-apr., 1981.
24. MOORE, G.L. & LEOFORD, M.E. The Uptake and Egress of Adenine from human red blood cells in vitro. Transfusion, 17(1): 38-43, jan-feb., 1977.
25. NAUM, P.C. Métodos Laboratoriais Auxiliares. In: _____.Diagnóstico das hemoglobinopatias. São Paulo, Sarvier, 1977. 242p. Cap.19, p.175-201.

26. OLIVEIRA, H.P. Fisiologia do eritrócito - A hemoglobina porfirias eritropoieticas. In: _____. Hematologia Clínica. Rio de Janeiro, Atheneu, 1988. 609p. Cap.3, p.61-77.
27. SCHRIER, S.L. et al. Red blood cell membrane abnormalities during storage - Correlation with in vivo survival. Transfusion, 22(4): 261-6. july-aug, 1982.
28. _____. Red blood cell membrane storage lesion. Transfusion, 19(2): 158-65, mar-apr., 1979.
29. SHIELDS, C.E. Comparison Studies of whole blood stored in ACD and CPD and with adenine. Transfusion, 8(1): 1 - 8, jan-feb., 1968.
30. SINON, E.R. Adenine in blood banking. Transfusion, 17(4) : 317-25, july-aug, 1977.
31. TANAKA, K. et al. Alterações bioquímicas durante a preservação de sangue total e concentração de hemácias com anticoagulante CPD e CPDA-1. LAES, 9 (51): 24-8, fev-mar., 1988.
32. TENTORI, L. & SALVATI, A.M. Hemoglobinometry in human blood. In: COLOWICK, P. & KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology. New York, Academic Press, 1981, v.76, cap.42, p.707-715.
33. VALERI, C.R. et al. Viability and function of red blood cell concentrates stored at 4°C for 35 days in CPDA-1, CPDA-2, or CPDA-3. Transfusion, 22(3):210-16, may-june, 1982.

34. VERDIER, C.H. et al. Adenine in blood preservation: Post transfusion viability and biochemical changes. Transfusion, 4(1):331-38, jan-feb., 1964.
35. WALLAS, C.H. Sodium and potassium changes in blood bank stored human erythrocytes. Transfusion, 19(2): 210-15, mar-apr., 1979.
36. WOLFE, L. The red cell membrane and the storage lesion. In: STANLEY, L. & SCHRIER, M.D. Clinics in haematology. London, W.B. Saunders Company, 1985. v.14, cap.12, p. 259-76.
37. WOOD, L. & BEUTLER, E. The viability of human blood stored in phosphate adenine media. Transfusion, 7(6): 401 -08, nov-dec., 1967.
38. ZUCK, T.F. et al. The in vivo survival of red blood cells stored in modified CPD with adenine. Report of a Multi-Institutional Cooperative Effort. Transfusion, 17 (4) : 374-82, july-aug., 1977.