

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ

**Análise comparativa das concentrações de fator VIII e fibrinogênio de
crioprecipitados congelados a – 22 °C e a – 79 °C em gelo seco.**

ELAINE CHRISTINA FERREIRA SÁ

Fortaleza - Ce

2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ

Análise comparativa das concentrações de fator VIII e fibrinogênio de crioprecipitados congelados a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ em gelo seco.

ELAINE CHRISTINA FERREIRA SÁ

Monografia apresentada ao Curso de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para a obtenção do título de especialista.

Orientador:

Dr. Marcos Antônio Martins da Silva

Co-orientador:

Dr. Gentil Claudino Galiza Neto

Fortaleza

2001

“Não se pode ensinar tudo a
alguém, pode-se apenas ajudá-lo
a encontrar por si mesmo.”

Galileu Galilei

A Deus que me fortaleceu física e intelectualmente para realizar este trabalho. Dedico também aos meus pais, que mesmo à distância, foram incentivo maior, acreditando nos meus esforços e empenho a fim de concretizá-lo.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela força, luz e proteção.
- Aos meus pais, que muito contribuíram para a razão dos meus esforços e da minha existência.
- Aos mestres, que compartilham seus ensinamentos, prestando significativo auxílio ao nosso crescimento intelectual.
- Ao Dr. Marcos Antônio Martins da Silva, pela paciência, empenho e dedicação com que conduziu esse trabalho.
- Ao Dr. Gentil Claudino Galiza Neto, que muito colaborou na correção e orientação do meu trabalho.
- A Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha pelo auxílio na realização do trabalho estatístico.
- A Dra. Ana Cláudia Sobreira e a funcionária Kátia Valéria Lima de Oliveira, pela presteza e auxílio na realização das técnicas de estudo.
- Aos funcionários do Setor de Fracionamento pelo trabalho e fornecimento do material analisado.
- A todas as pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização dessa monografia.

ÍNDICE

RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	08
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3. RESULTADOS.....	20
4. DISCUSSÃO.....	28
5. CONCLUSÃO.....	33
6. ABSTRACT.....	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

O uso do crioprecipitado (crio) tem sido aos poucos substituído, pelos concentrados liofilizados, que apresentam maior segurança e eficácia terapêutica, porém custo mais elevado. O crioprecipitado continua sendo útil na deficiência congênita do fibrinogênio, doença de von Willebrand, CIVD, entre outros. Por isso, vários estudos têm sido realizados para melhorar a qualidade dos crios. Neste trabalho, foi feita uma análise comparativa dos níveis de fator VIII e de fibrinogênio, de cinquenta bolsas de crioprecipitado, congelados a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ em freezer e a $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ em gelo seco, produzidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (Hemoce/SESA). Nos crioprecipitados produzidos de 01 de Outubro de 2000 a 30 de Novembro de 2000, o teor médio de fator VIII e de fibrinogênio nos crios congelados a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ em freezer foi 49,8 UI/bolsa e 375,9 mg/bolsa, respectivamente, já nos crios congelados a $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ em gelo seco, o teor médio de fator VIII foi de 117,7 UI/bolsa e do fibrinogênio foi 587,8 mg/bolsa. A análise dos dados coletados, permitiu-nos verificar um considerável aumento nos parâmetros das proteínas estudadas, percebendo ao mesmo tempo, que o congelamento rápido dos crios em temperatura $\leq -70^{\circ}\text{C}$ é crucial para a manutenção dessas proteínas, principalmente do fator VIII. Com a realização desse estudo, podemos afirmar que a manutenção de crioprecipitados com especificações superiores ao mínimo exigido pelas normas é absolutamente factível.

INTRODUÇÃO

As primeiras referências históricas com relação a doenças hemorrágicas são datadas alguns anos depois de Cristo. No século II, foram descritos vários casos de óbito por hemorragia após a circuncisão, operação simples, de caráter religioso, que tinha a finalidade de remover o prepúcio. Anos mais tarde, no século X, Albucasis observou que homens de um povoado apresentaram hemorragias severas por pequenos ferimentos ou simples operações. Diante de tantos episódios hemorrágicos, somente no século XVII, práticas transfusionais foram iniciadas, utilizando-se sangue de animais em humanos. Em 1840, um médico em Londres, fez uma grande descoberta, achou que estava faltando algo no sangue do hemofílico e decidiu aplicar sangue de uma mulher sadia em um hemofílico que estava sangrando, e alcançou bons resultados, mais somente muitos anos depois entenderam a importância de tal fato. (Cavalcanti, 1997a; Givisiez, 1998; O que, 1994).

Somente no século XX, a utilização do sangue no processo de cura, passou a adquirir bases científicas, com a descrição dos grupos sanguíneos do sistema ABO. Desde então, pôde-se realizar e prever as conseqüências de uma transfusão, que nesse período era realizado do braço do doador para o braço do receptor (Givisiez, 1998).

Naquela época, no ato transfusional, o paciente recebia o sangue total (ST), mesmo precisando de componentes específicos. A partir daí, começou-se a entender melhor a composição do sangue. Descobriu-se que o plasma era tão importante, por ser uma parte líquida do sangue, rica em proteínas, entre as quais, incluem-se os fatores da coagulação, dentre eles o fator VIII. Pouco tempo depois, tornou-se viável a separação do plasma dos demais componentes sanguíneos, o que veio facilitar o estudo destes (Givisiez, 1998).

Em 1965, Judith Pool observou numa porção do plasma congelado em processo de descongelamento, que pequenos flocos se sedimentaram no fundo da bolsa, e através do estudo destes elementos, ela descobriu que tais flocos apresentavam apreciável quantidade de fator VIII, que eram insolúvel em plasma a 4°C, e desde então, passaram a ser chamados de Crioprecipitado (crio). (Givisiez, 1998; Junqueira, 1979).

De acordo com os conceitos mais atualizados, o crioprecipitado trata-se de um concentrado de proteínas plasmáticas, obtidas através de uma doação individual de sangue, a partir do descongelamento lento de uma unidade do plasma fresco congelado a temperatura entre 2°C e 6°C. Com a sedimentação do crio, o plasma é removido, permanecendo na bolsa cerca de 10 a 15ml. Preparado o crio, ele é recongelado em freezer a -18°C ou menos, onde pode permanecer válido por um ano. Não se deve deixar ultrapassar mais de uma hora, do momento em que o plasma atinge a consistência lodosa e o momento em que o crioprecipitado é recongelado, pois a exposição do plasma a temperaturas elevadas ou um retardo no recongelamento do crio pode, conseqüentemente, causar considerável diminuição da atividade final do fator VIII (Pisciotta, 1989; Harmening, 1990).

As proteínas plasmáticas presentes no crioprecipitado são:

- Fator VIII: glicoproteína de baixo peso molecular, ativado pela trombina e inativado pela plasmina. Também conhecido como fator VIII: C ou fator antihemofílico.
- Fator de von Willebrand (vWF): molécula multimérica, grande, que atua na fase da hemostasia primária e é parcialmente inativada pela plasmina. Esse fator circula no plasma unido por ligações não covalentes ao fator VIII.

- Fibrinogênio: molécula formada por três pares de cadeias polipeptídicas ($A\alpha$; $B\beta$; $Y\gamma$), ligadas por pontes dissulfídicas. Essa é cindida pela trombina e pela plasmina e se transforma em fibrina.
- Fator XIII ou fator estabilizador da fibrina: é constituído por duas unidades polipeptídicas, unidas por ligações não covalentes. Ele promove a ligação da fibrina ao colágeno, através de moléculas de fibronectina (Lorenzi, 1996).

O fator VIII é mais lábil, mas sua atividade mantém-se acima de 50% mesmo em sangue com 24 horas após a coleta. Os outros fatores, mais especificamente o fibrinogênio, geralmente são estáveis sob as condições de armazenamento em bancos de sangue (Schoeder, 1998).

As preparações de crioprecipitados de uso terapêutico devem conter em média, 80 – 100 unidades de fator VIII, 3 – 4 g/dl de fibrogênio, 30% de fator XIII e aproximadamente 40 – 70% de fator de von Willebrand (Pisciotta, 1989).

O crioprecipitado é indicado no tratamento da Hemofilia A clássica (doença congênita do fator VIII:C, ligada ao cromossomo X), deficiência congênita de fibrinogênio, na deficiência do fator XIII, situações associadas ao consumo de fibrinogênio (CIVD), e também na doença de von Willebrand (disfunção plaquetária devido a deficiência do vWF). Esse produto também tem sido empregado no tratamento de tendências hemorrágicas ligadas a uremia. Recentemente, pequena quantidade de crio foi usada na produção de cola de fibrina, substância que pode ser aplicada topicamente com adesivo biológico em locais cirúrgicos, reduzindo o risco de hemorragias e na remoção de cálculos renais fragmentados (Pisciotta, 1989; Harmening, 1999; Farrugia, 1992; Guide, 1999; Burnouf, 2000).

O grupo ABO é escrito na bolsa, mas o fator Rh não é necessário. É preferível que administração do crioprecipitado seja ABO compatível, uma vez que pequenas quantidades de aloaglutininas anti-A e anti-B estão presentes,

muito raramente ocorrem episódios hemolíticos devido ao título elevado destas (Pisciotta, 1989; Cairutas, 1986).

Os hemofílicos durante os episódios hemorrágicos, obrigatoriamente se dirigiam aos hospitais, devido à dificuldade de administração e transporte do crio. Naquela época, vários estudos relacionados à preparação e conservação, principalmente do fator VIII foram realizados na tentativa de melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Até que desenvolveram os concentrados liofilizados de fator VIII e fator IX, que são mais apropriados para serem usados a domicílio. Os produtos liofilizados são estáveis e estéreis, obtidos através de um “pool” de plasmas preparados através de um processo de fracionamento de doações sanguíneas. Existem vários tipos de concentrados de fator VIII disponíveis comercialmente, que apresentam grande vantagem por terem volume e dosagem conhecida, mostrando-se ao mesmo tempo, capazes de corrigir as alterações da coagulação, permitindo também, um certo controle e prevenção dos episódios hemorrágicos (Pisciotta, 1989; Cavalcanti, 1997b; O que, 1994).

Além da excelente eficácia terapêutica, os produtos liofilizados de fator VIII e IX, são submetidos a diferentes métodos de purificação e atenuação viral, diminuindo consideravelmente, porém não eliminando, os riscos de transmissão de doenças infecciosas e de vírus como o da hepatite e do HIV. Embora, esses processos reduzam os níveis de recuperação final do fator VIII e IX, esses produtos têm sido largamente utilizados em substituição ao crioprecipitado no tratamento da hemofilia (Pisciotta, 1989; Oliveira, 2000).

Por apresentar menor segurança com relação a transmissão de doenças infecciosas e vírus, o crio tem entrado em processo de desuso por também oferecer riscos, pois pode produzir sepsis por contaminação bacteriana, reações transfusionais não-hemolíticas (principalmente calafrios, febre e urticária), além disso, a considerável variação da quantidade dos fatores da coagulação de uma

bolsa para outra, tem dificultado o seu uso terapêutico, entre outros (Guide, 1999; Guilard, 1986).

Apesar da conveniência e biossegurança do uso de concentrados liofilizados, eles ainda apresentam um elevado custo, dificultando a disponibilidade desses produtos aos países de 3º mundo. Dessa forma surge a necessidade de se fazer pesquisas e esforços que desenvolvam técnicas que melhorem a produção e qualidade dos crioprecipitados, com conseqüente maior recuperação dos níveis plasmáticos dos fatores VIII e do fibrinogênio (Ribeiro, 1986; Guide, 1999).

Embora, os crios apresentem variadas inconveniências, e por vezes, baixa potência, estes atualmente ainda mostram-se eficientes quando empregados no tratamento da doença de von Willebrand, como fonte de fibrinogênio na hipofibrinogenemia e na CIVD (Mazza, 1990; Guide, 1999; Lorenzi, 1996).

O uso demasiado de produtos que contém o fator VIII, como o plasma fresco, crioprecipitados e concentrados de fator VIII liofilizados, tem induzido a produção de anticorpos IgG contras as proteínas presentes em tais produtos, que pode ser conseqüência do processo de Industrialização. Esses anticorpos são conhecidos como inibidores do fator VIII e podem neutralizar a sua atividade. A administração exagerada desses produtos, ainda pode causar uma hiperfibrinogenemia, com conseqüente aumento do risco a tromboembolismo (Cavalcanti, 1997a; Guide, 1999; Lorenzi, 1996).

O Ministério da Saúde usando de suas atribuições, e de acordo com a portaria 1.376, de 19 de novembro de 1993, considera que pelo menos 75% das unidades de crio testadas devam ter no mínimo 80 unidades internacionais de fator VIII/bolsa. O fibrinogênio deve apresentar-se em quantidade variável entre 150 - 300 mg/bolsa. Para se certificar da boa qualidade desse produto é importante que se faça uma análise laboratorial mensal de no mínimo 1% das unidades de crio produzidas (Brasil, 1993; Asociacion, 1990).

Para alcançar tal objetivo, se faz necessário que todas os procedimentos para a produção do crio sejam rigorosa e atenciosamente obedecidos, por uma equipe de profissionais devidamente treinados e capacitados, desde o momento da coleta, até a obtenção do produto final. Diante das numerosas responsabilidades a serem cumpridas em bancos de sangue, estamos constantemente propensos a falhar na eficácia do produto, por erros técnicos ou humanos obtendo-se, por vezes, resultados indesejáveis. As causas de erros mais comuns na produção do crio, têm sido atribuídas a irregularidades da temperatura dos congeladores e geladeiras ou por falha no monitoramento desta, além do excesso de bolsas armazenadas e de uma possível negligência na flebotomia, entre outros (Cairutas, 1986; Givisiez, 1998).

OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo analisar a atividade do fator VIII e do fibrinogênio dos crioprecipitados produzidos no laboratório de Fracionamento do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE/SESA), que foram submetidos a congelamento em freezer a -22°C e a -79°C em gelo seco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cinquenta unidades de sangue total (ST) foram obtidas de doadores voluntários de sangue, atendidos no Hemoce. As amostras foram submetidas a um registro de dados para sua identificação, testes laboratoriais, como o exame de hemoglobina, triagem clínica, entre outros. Essas normas exigidas pela Legislação Federal são respeitadas e obedecidas com a finalidade de racionalizar e especificar o uso dos componentes sanguíneos, proporcionando uma maior segurança e eficácia no seu uso terapêutico (Fabron Júnior, 1998; Brasil, 1994).

O sangue de doadores individuais é obtido através de um sistema de bolsa coletora fechado, estéril e aprotético. A coleta foi feita por flebotomia em bolsa primária, plástica (ASEM/NPBI), com peso equivalente a 50 g, que recebe cerca de 450ml de sangue total. Cada uma delas contém 63ml de solução anticoagulante preservadora CPD (ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio e dextrose). É indispensável que a bolsa esteja, no momento da coleta, sob agitação constante, por meio de um agitador mecânico, para garantir uma homogeneização adequada, manter a viabilidade dos elementos celulares do sangue e a eficiência do produto (Givesiez, 1998; Ribeiro, 1986).

A partir de uma unidade de sangue total, obteve-se o plasma fresco congelado (PFC), que foi processado, em até no máximo 6 horas após a coleta, através de uma forte centrifugação refrigerada, a fim de separar os elementos celulares. O plasma extraído, foi imediatamente passado para uma bolsa de transferência. O ar foi retirado com o auxílio de um extrator de plasma. As bolsas foram pesadas, seladas e etiquetadas, as quais informam sobre o grupo ABO e Rh, data de validade, volume, entre outros parâmetros (Cariutas, 1986; Ribeiro, 1986).

As bolsas de PFC foram colocadas em freezer metálico (horizontal), com temperatura entre -18°C e -22°C , e congelaram em aproximadamente 6 horas. Com sorologia liberada, essas bolsas descongelaram em geladeira metálica na

temperatura de 4°C, por um período de aproximadamente 12 horas. Descongelados, os plasmas foram submetidos a uma centrifugação pesada a 3.500 rpm, a 0°C, por 15 minutos. O plasma sobrenadante foi transferido para uma bolsa satélite, através de um extrator manual de plasma, restando, portanto, uma quantidade mínima desse produto, cerca de 20 ml, na bolsa de crio.

Vinte e cinco bolsas, foram numeradas (1 - 25) e colocadas em freezer a - 22°C, onde recongelaram em aproximadamente 3 horas. Outras vinte e cinco bolsas foram numeradas (26 - 50) e ensacadas 3 a 3 e então, congeladas por imersão a - 79°C em gelo seco, onde permaneceram por no máximo 7 minutos, logo em seguida, foram armazenadas em freezer a uma temperatura igual ou inferior a - 18°C.

As bolsas de crio foram descongeladas em banho-maria Evlab (BM EV: 015) e FANEM(São Paulo - Brasil; modelo 100) a 37° C, atingindo completa dissolução cerca de 15 a 20 minutos. Essas bolsas foram envolvidas em saco plástico, impedindo, assim, que os seus equipos entrassem em contato com a água do banho-maria, evitando uma possível contaminação do crio. Descongeladas, as bolsas de crio foram pesadas em balanço digital, e das mesmas, foram extraídas amostras para efetuar a medida da atividade do fator VIII e do fibrinogênio.

Ao final desses processos, as bolsas foram descartadas pelo setor de esterilização do Hemoce, através de um processo de auto-clavagem.

Determinação de atividade do fator VIII

A avaliação dos níveis de fator VIII dos crioprecipitados foi feita através do método de um estágio, que se baseia na formação de trombina. Essa atividade foi determinada, usando o tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa), na presença de plasma deficiente em fator VIII. Dessa forma o grau de correção do TTPa é proporcional ao nível de fator VIII plasmático das amostras utilizadas para os testes (Fundação Pró-sangue, 2000).

A fim de realizar tais testes foram usadas amostras de crio diluídos duas vezes em tampão veronal, um "pool" de plasmas citratados de adultos normais, com cerca de 100% de atividade de fator VIII, foi empregado como controle, além de outros reagentes utilizados para a determinação da atividade do TTPa, sendo estes produzidos pela Organon Teknika[®] Corporation e o plasma deficiente em fator VIII foi produzido pela indústria TECO. Os resultados foram cuidadosamente interpretados através do aparelho St₄ (Diagnostica Stago).

Para uma melhor compreensão dos resultados, a atividade do fator VIII dos crios foi analisada através do traçado gráfico de uma curva de referência, em papel di-log, realizada com pool de plasmas de doadores normais, que foi diluído em tampão veronal em 1/5 (100%); 1/10 (50%); 1/20 (25%); 1/40 (12,5%); 1/80 (6,25%); 1/100 (5%); e 1/500 (1%) e através do tempo de coagulação do fator VIII em segundos. Considerando-se a diluição 1:100 como ponto crítico, uma vez que o primeiro ponto é o de 1:5, os resultados foram multiplicados por 20.

As quantidades de fator VIII por bolsa de Crio, foram encontradas através dos valores das dosagens laboratoriais da atividade de fator VIII (%) e o volume da bolsa (\cong 20ml). Considerando que 100% da atividade do fator VIII corresponde a 1,0 UI de fator VIII/ml. Tais valores foram empregados na seguinte fórmula:

$$\text{UI de fator VIII/ml} = \frac{\text{atividade de fator VIII\%}}{100}$$

UI de fator VIII/bolsa = UI de fator VIII/ml x volume do crio
(Givisiez, 1998; Fundação Pró-sangue, 2000; Terra, 2000).

Dosagem do fibrinogênio

A determinação dos níveis plasmáticos do fibrinogênio presentes nas bolsas de crio, foi feita pelo método descrito por Clauss, denominado coagulométrico, que é baseado na conversão do fibrinogênio em fibrina pela ação da trombina. A rede de fibrina formada por polimerização, é estabilizada pelo fator XIII ativado. O tempo necessário para a formação do coágulo, é inversamente proporcional a quantidade de fibrinogênio (Fundação Pró-Sangue, 2000).

Para a dosagem da atividade do fibrinogênio nas bolsas de crio, foram utilizados reagentes Fibriquik, da Organon Teknika[®] Corporation. As amostras e o controle foram diluídos uma vez em tampão veronal. Os resultados foram fornecidos, automaticamente, através do aparelho ST₄ (Diagnostica Stago), que fornece o tempo de formação do coágulo em segundos, sendo os resultados expressos em mg/dl, e a concentração do fibrinogênio é calculada a partir da leitura do tempo de coagulação da amostra analisada. A curva de calibração é obtida a partir do padrão de fibrinogênio, que é fornecido pelo kit utilizado.

Através dos resultados laboratoriais encontrados, pôde-se calcular a quantidade de fibrinogênio por bolsa de crioprecipitado, pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Valor do fibrinogênio mg/ml} = \frac{\text{dosagem do fibrinogênio (mg/dl)}}{100}$$

$$\text{Valor do fibrinogênio mg/bolsa} = \text{valor do fibrinogênio/ml} \times \text{vol. do crio}$$

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados encontrados foi feita através do programa InStat versão 2.05a, Graphpad Software e as amostras foram comparadas através do teste “t” de Student não-pareado, observando os níveis de significância de $\alpha < 5\%$.

RESULTADOS

Após a análise de 50 amostras de crio, foram encontrados resultados bastante consistentes. O teor de fator VIII por bolsa congelada a -22° apresentou uma média de $(49,8 \pm 4,2 \text{ UI/bolsa})$ (Tabela 1, Figura 1), a maior quantidade encontrada foi 110,0 UI/bolsa, e a menor 10,4 UI/bolsa, (Tabela 3). O teor médio de fibrinogênio de crio congelado a mesma temperatura foi de $(375,9 \pm 46,5 \text{ mg/bolsa})$ (Tabela 2, Figura 2), a maior atividade encontrada foi de 830,9 mg/bolsa e a menor 47,4 mg/bolsa (Tabela 3). Na análise do fator VIII, somente 16% das bolsas mostraram estar entre os níveis desejáveis ($\geq 80 \text{ UI/bolsa}$) A atividade de fibrinogênio foi mais satisfatória, pois 92% das bolsas apresentaram uma atividade de fibrinogênio de acordo com os parâmetros exigidos pelas Normas Internacionais e pela Portaria n.º 1376 M.S. que preconizam que cada bolsa deve conter no mínimo 150 mg deste.

A análise da variação da atividade do fator VIII e fibrinogênio dos crios congelados a -79°C em gelo seco, foi aumentada se comparada ao processo anterior. Submetidos a tal temperatura, o teor médio de fator VIII encontrado foi de $(117,7 \pm 9,4 \text{ UI/bolsa})$ (Tabela 1), sendo que a maior atividade apresentada foi de 240,0 UI/bolsa e a menor foi de 66,0 UI/bolsa (Tabela 4). O fibrinogênio de crio congelado pelo mesmo método apresentou um teor médio de $(587,8 \pm 62,8 \text{ mg/bolsa})$ (Tabela 2), sendo que a maior atividade encontrada foi de 1632,0 mg/bolsa e a menor 258,5 mg/bolsa (Tabela 4). Apenas 28% das bolsas dosadas apresentaram níveis de fator VIII abaixo do desejado ($<80 \text{ UI/bolsa}$) e com relação aos níveis do fibrinogênio somente 8% dos valores encontrados não foram satisfatórios.

Observa-se que houve uma grande variação entre os maiores e os menores valores encontrados da atividade tanto do fator VIII como do fibrinogênio congelados pelos diferentes métodos, junto a esses valores também variaram os

volumes das bolsas de crio a -22°C ($29,4 \pm 2,5$ ml) e crio congelado a -79°C em gelo seco ($24,8 \pm 1,9$ ml) (Tabelas 3 e 4).

Os resultados obtidos revelam que o congelamento dos crios -79°C em gelo seco, mostram um considerável aumento das médias do fator VIII e fibrinogênio em 136,3% e 56,4% (Tabela 1 e 2), respectivamente, se comparados aos valores encontrados das mesmas proteínas em bolsas de crio congelados a -22°C .

Tabela 1 – Dosagem de Fator VIII (UI/bolsa) nos crioprecipitados congelados a - 22°C e em Gelo Seco

Parâmetro Avaliado	Crio- 22°C n =25	Crio-79°C (Gelo Seco) n =25	Incremento (%)
Fator VIII UI/bolsa	49,8 ± 4,2	117,7 ± 9,3*	136,4

Os valores estão expressos com a média ± EPM. *vs Crio - 22°C, considerado extremamente significante ($p < 0,0001$, teste “t” de Student não pareado).

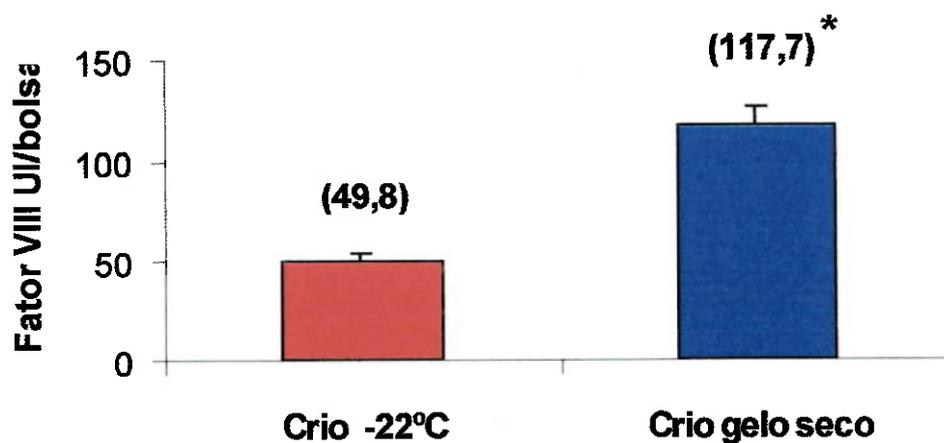


FIGURA 1 – Dosagem de Fator VIII (UI/bolsa) nos Crioprecipitados congelados a – 22 °C e a – 79 °C em Gelo seco. Os valores representam média ± EPM. Os números entre parênteses referem-se as médias obtidas. * vs Crio –22°C (p<0, 0093, teste “t” de Student não pareado).

Tabela 2 – Dosagem de Fibrinogênio (mg/bolsa) nos crioprecipitados congelados a -22 °C e em Gelo Seco

Parâmetro Avaliado	Crio - 22 °C n =25	Crio -79 °C (Gelo Seco) n =25	Incremento (%)
Fibrinogênio mg/bolsa	375,9 ± 46,5	587,8 ± 62,8*	56,4

(Os valores estão expressos com a média ± EPM. *vs Crio - 22°C, considerando extremamente significante ($p < 0,0093$, teste “t” de Student não pareado).

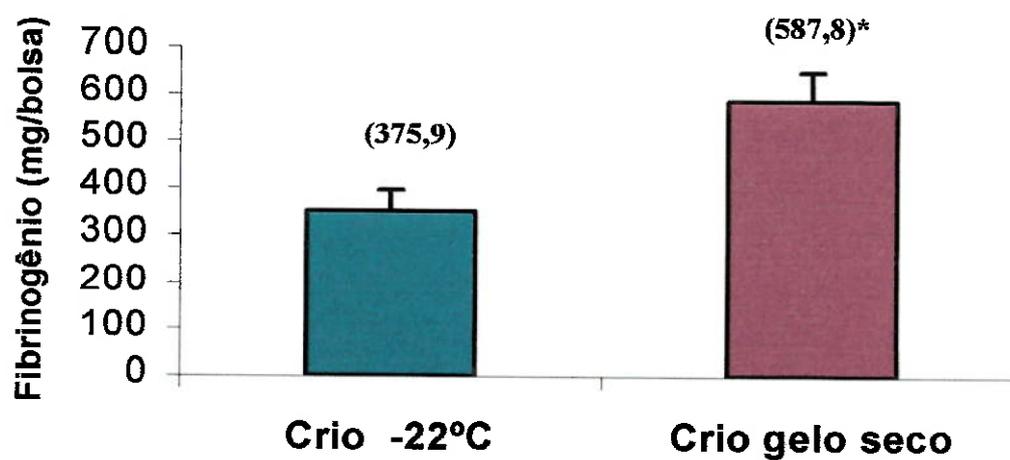


FIGURA 2 - Dosagem do Fibrinogênio (mg/bolsa) nos Crioprecipitados congelados a -22°C e a -79°C em Gelo seco. Os valores representam média \pm EPM. * vs Crio -22°C ($p < 0,0093$; teste "t" de Student não pareado).

TABELA 3 -Resultado das Dosagens de Fator VIII e Fibrinogênio em Crioprecipitados congelados a - 22 °C

NºBolsa	Volume,ml	Fator VIII U.I/bolsa	Fibrinogênio mg/bolsa
174578-6	38,0	54,7	157,2
175883-7	34,0	40,8	557,7
175889-6	34,0	47,6	358,6
175856-0	44,0	110,0	485,8
175937-0	30,0	36,6	299,9
176318-0	26,0	32,0	333,5
175614-1	32,0	32,0	161,5
176057-2	28,0	25,2	345,2
176290-7	32,0	51,2	197,2
176271-0	28,0	72,8	403,1
175561-7	38,0	28,0	779,2
176317-2	20,0	28,0	168,3
175641-9	24,0	29,3	102,0
175622-2	32,0	39,7	47,4
171444-7	20,0	25,6	301,7
172657-9	26,0	37,4	392,2
175213-8	32,0	52,5	830,9
175355-0	16,0	60,8	228,0
174550-6	26,0	46,8	426,5
174558-1	36,0	90,0	455,6
173912-3	26,0	15,6	231,6
175327-4	26,0	52,0	411,4
174503-4	32,0	10,4	416,5
175343-6	28,0	80,0	263,4
175333-9	26,0	36,0	426,5
Média	29,4	49,8	351,2
DP	6,3	23,3	186,7
EPM	2,5	4,2	46,5
Valor Mínimo	16,0	10,4	47,4
Valor Máximo	44	110,0	779,2
Total (N)	25	25	25

DP: Desvio padrão da média. EPM: Erro padrão da média.
n: nº de bolsas analisadas.

TABELA 4. Resultado das Dosagens de Fator VIII e Fibrinogênio em Crioprecipitado congelados a -79°C em Gelo Seco

NºBolsa	Volume,ml	Fator VIII U.I/bolsa	Fibrinogênio mg//bolsa
179484-1	22,0	66,0	412,3
180636-0	28,0	89,6	448,1
180435-9	22,0	96,8	489,9
178014-0	28,0	196,0	769,9
179496-5	20,0	240,0	483,6
180543-6	18,0	162,0	442,9
176961-6	26,0	182,0	474,6
177871-4	30,0	162,0	313,2
179490-6	22,0	78,0	270,6
177780-7	24,0	153,6	468,1
178019-0	26,0	72,8	744,3
178007-7	22,0	81,8	607,2
177779-7	32,0	101,2	1632
178002-6	24,0	78,7	865,2
178005-0	22,0	80,9	1234,2
177999-0	22,0	154,0	745,8
177784-0	28,0	123,2	524,5
178009-3	30,0	72,0	822,2
180533-9	22,0	101,2	282,7
180266-6	24,0	100,8	455,3
180300-0	26,0	72,8	258,5
180349-2	32,0	140,8	576,4
179021-8	26,0	109,2	304,2
180991-1	24,0	72,0	677,4
180329-8	20,0	156,0	391,9
Média	24,8	117,7	587,8
DP	3,8	46,8	314,1
EPM	1,9	9,4	62,8
Valor Mínimo	18,0	66,0	258,5
Valor Máximo	32,0	240,0	1234,2
Total	25,0	25,0	25,0

DP: Desvio padrão da média. EPM: Erro padrão da média.

n: nº de bolsas analisadas

DISCUSSÃO

O estudo da atividade do fator VIII e do fibrinogênio de 50 bolsas de crioprecipitados coletadas e produzidas no período decorrente entre 01 de Outubro e 30 de Novembro de 2000, foi dividido em duas partes: análise dos crios congelados a -22°C e análise dos crios congelados a -79°C em gelo seco.

O controle de qualidade foi realizado comparando-se os valores encontrados com os parâmetros especificados pelo Código Federal de Regulamentação (EUA) e pela portaria 1.376, de 19 de Novembro de 1993.

A análise do fator VIII e do fibrinogênio de crios que foram congelados a -22°C (Tabela 3), mostra que os níveis médios encontrados não foram satisfatórios, já que 84% das bolsas mostraram estar com teor de fator VIII bastante diminuído se comparados aos valores exigidos ($\geq 80\text{UI}/\text{bolsa}$). O fibrinogênio, por ser mais resistente, representando, ao mesmo tempo, a maior proteína que compõe o crio, não mostrou perdas tão significativas, os resultados revelaram que apenas 8% das bolsas apresentaram níveis desta proteína abaixo de 150mg, concordando assim, com o estudo realizado por Farrugia et al (1992), que afirma que, apesar da importância do conteúdo de fibrinogênio em crios processados por métodos convencionais usados pelos bancos de sangue, os níveis desta proteína ainda não estão de acordo com os padrões especificados pela Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB, 1990). Na tabela 3, ainda observou-se que as bolsas de crio apresentaram em média um volume de 29,4 ml, o que também discorda com a literatura, que afirma, que a eficiência do produto também depende do seu volume e que este deve estar entre 10-20ml (Givisiez, 1998).

Essas perdas substanciais dos fatores da coagulação presentes nos crios, atualmente produzidos nos bancos de sangue, são atribuídas a vários erros, técnicos ou humanos, que podem ter ocorrido desde o momento da coleta de

sangue, até a obtenção do produto final. Entre estes, as principais causas que tem comprometido a potência dos crios são:

- congelamento demorado do plasma devido à temperatura elevada dos freezers ou excesso de bolsas armazenadas;
- o congelamento do plasma excedendo 8 horas do horário da coleta;
- descongelamento total ou inadequado do PFC, devido a uma temperatura elevada;
- congelamento demorado do crioprecipitado por mais de uma hora após o seu preparo;
- ativação do processo de coagulação:
 - por negligência na flebotomia e/ou má homogeneização do sangue com a solução anticoagulante preservadora;
 - ordenha insuficiente do tubo coletor após a coleta de sangue total (ST);
 - quando o volume do ST ultrapassar 495ml;
 - tempo de coleta aumentado;
 - volume inadequado do crio (<10ml ou >20ml), por erro técnico ou balança descalibrada (Cairutas, 1986; Gevesiez, 1998).

Vários estudos têm sido desenvolvidos para descobrir quais os melhores métodos de estocagem, congelamento e descongelamento do sangue e seus derivados, que apresentam uma melhor recuperação dos fatores da coagulação. Weaver et al (1967), estudando qual a melhor temperatura para armazenamento de plasma, afirmou ter conseguido recuperar considerável quantidade de fator VIII a 4°C por 21 dias. Atualmente, a sua pesquisa entra em contradição aos estudos de vários outros autores, que afirmam terem encontrado uma melhor recuperação das proteínas de crios obtidos a partir de plasmas congelados e separados dentro de no máximo 6 horas do horário da coleta. Smith et al (1978), estocou ST por 24 horas a 4°C, antes da separação e congelamento do PFC e

obtenção do crio, disse ter recuperado semelhante quantidade de fator VIII, aqueles que foram separados até 6 horas do horário da coleta, mas Hughes et al (1998), usando os mesmos parâmetros com relação a temperatura e diminuindo o tempo de estocagem de 24 horas por 6 horas, provou que as maiores perdas da atividade do fator VIII ocorre realmente após esse período, confirmando o que relatos anteriores documentaram.

Em estudo realizado Allersman et al (1996), afirmou que as bolsas de sangue podem ser estocadas a temperatura ambiente por no máximo 8 horas, ultrapassando esse período de tempo, elas devem ser conservadas de 1 a 6°C, de acordo com regulamentações do FDA. Caso ultrapasse às 8 horas, ou seja, em até 12 a 15 horas, sob a mesma temperatura, adicionado-se 1,4 – butano diol esse sangue mostrou não haver perdas significantes dos fatores da coagulação (Allersma, 1996; Hugues, 1988; O'Neil, 1999).

Wickerhauser et al (1976), estudou a recuperação do fator VIII a partir de plasma fresco, separando ST e congelando dentro de algumas horas após a coleta, e observou que somente 20 a 25% da atividade do fator VIII foi recuperado do plasma do dia se comparado a valores do fator VIII recuperado a partir de PFC.

Galanakis (1995), estudando uma forma de como obter uma maior atividade final do fibrinogênio em crios, adicionou albumina humana ao plasma fresco e obteve um aumento de 2,8 ($\pm 0,34\text{mg}\%$) na recuperação desta proteína.

Baseados nos resultados obtidos em nossos estudos e em pesquisas realizadas por outros autores, podemos afirmar que há uma melhor recuperação final de fator VIII e do fibrinogênio, a partir de produtos que sejam submetidos a um congelamento e descongelamento rápido. Segundo Ribeiro (1986), plasma rapidamente congelados a -70°C ou menos, usando nitrogênio líquido, uma mistura de etanol e gelo seco ou congeladores a -85°C , conservam melhor a atividade dos fatores da coagulação neles presentes. Sua afirmação mostra estar em completa coerência com os nossos resultados, pois a dosagem de fator VIII e

fibrinogênio de crios congelados em 7 minutos a -79° no gelo seco foram estatisticamente significantes, pois mostraram surpreendente aumento nos níveis de tais proteínas, da ordem de 136,3% para o fator VIII e 56,4% para o fibrinogênio, se comparados aqueles obtidos a partir de crios congelados a -22°C .

Otero et al (1987), revelou em seu estudo, ter tido uma boa recuperação dos fatores da coagulação a partir de crios congelados em uma banho com circulação de água em uma temperatura de 4°C durante 5 a 6 horas, mas estudos atuais mostram que há uma melhor recuperação desses fatores descongelando-se crios em banho-maria a 37°C por no máximo 20 minutos (Ribeiro, 1986; Procedimentos, 1998; Guide, 1999; Junqueira, 1979).

Existem outros parâmetros que podem exercer forte influência na atividade dos fatores da coagulação, que não foram abordados neste trabalho. Piedras et al (1993) e Otero et al (1986), estudaram a influência dos anticoagulantes ACD e CPD nos níveis finais dos fatores da coagulação. O primeiro revelou que o anticoagulantes ACD não modificou a atividade do fator VIII de crios congelados a -70°C e que o CPD reduziu em 50% a potência deste fator sob as mesmas condições de temperatura. Já os resultados de Otero et al, mostraram uma melhor recuperação do fator VIII com o uso de CPD com pH mais elevado. Enfim, há uma certa controvérsia, com relação a melhor opção de anticoagulante a ser usado pelos bancos de sangue, as razões para as diferenças dos resultados não estão claras.

Com a realização deste trabalho, obtivemos resultados surpreendentemente satisfatórios, graças ao emprego do eficiente método de congelamento rápido de crioprecipitado a -79°C em gelo seco. O nosso estudo mostra ser completamente coerente com a literatura já descrita, apresentando um considerável aumento na atividade das proteínas estudadas. Embora, o método empregado tenha mostrado tamanha eficácia, ele mostra ainda um mínimo inconveniente, por apresentar custo elevado, que por vezes, pode inviabilizar o seu uso na rotina de

processamentos de crioprecipitados por diversas instituições e/ou hemocentros no nosso país, devido às dificuldades econômicas presentes nas diversas regiões do Brasil. Entretanto, superando este inconveniente, concluímos o método ser de ótima escolha para uma melhor preparação e obtenção do hemocomponente.

CONCLUSÃO

- A análise dos resultados obtidos, nos permite fazer as seguintes conclusões:
- Das bolsas de crio que foram previamente congeladas em freezer a -22°C , observou-se uma conversão baixa dos níveis de fator VIII, que apresentaram um teor médio de 49,8 UI/bolsa. A redução nos níveis de fibrinogênio de crios submetidas à mesma temperatura não foi tão drástica, apresentando um teor médio desta proteína de 375,9 mg/bolsa.
 - O congelamento de plasmas e crioprecipitados a -79°C em gelo seco, resultaram numa considerável melhora desses parâmetros, pois houve um aumento gradual da atividade final do fator VIII e do fibrinogênio, que apresentaram um teor médio de 117,7 UI/bolsa e 587,8 mg/bolsa respectivamente.
 - Esses resultados nos levaram mais uma vez a confirmar, e até mesmo, enfatizar a importância de temperaturas iguais ou inferiores a -70°C no congelamento rápido de plasmas e crios, pois esta mostrou ser crucial na manutenção de proteínas plasmáticas, sobretudo do fator VIII.

ABSTRACT

The use of cryoprecipitate (cryo) has been substituted little by little, for the lyophilized concentrates that they present larger safety and therapeutic effectiveness, but, of higher cost. The cryoprecipitate continues being useful for congenital fibrinogen deficiency, von willebrand disease, disseminated vascular coagulation (CIVD), among others, for that, several studies have been accomplished to improve the quality of the cryos. In this work, it was made a comparative analysis of the levels of factor VIII and fibrinogen of fifty cryoprecipitates's bags, frozen at -22°C in freezer and at -79°C dry in ice produced in the Center of Hematology and Hemotherapy of Ceará (HEMOCE). In the cryoprecipitates produced of October/01/2000 to November/30/2000 the medium tenor of factor VIII and of frozen fibrinogen at -22°C in freezer were 49,8 UI/bag and 375,9 mg/bag respectively. In the frozen cryos at -79°C in dry ice the medium tenor of factor VIII was 117,7 UI/bag and of the fibrinogen it was 587,8 mg/bag. The analysis of the obtained data allowed us to verify a considerable increase in the parameters of the studied proteins, noticing, at the same time, that the fast freezing of the cryos in temperatures $< -70^{\circ}\text{C}$ are **CRUCIAL** for the maintenance of those proteins, mainly of the factor VIII. With the accomplishment of that study, we can affirm that the cryoprecipitates obtained with specifications superior to the minimum demanded by the norms is quite feasible.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLERSMA, D. P.; IMAMBAKS, R. M. R.; MEERHOF, L. J. Effect of blood storage on factor VIII recovery in fresh frozen plasma and cryoprecipitate. **Vox Sang.**, v. 71, p. 150-154, 1996.

ASSOCIACION AMERICANA DE BANCOS DE SANGRE. **Manual tecnico**. 10. ed. Arlington, 1990. p.58-59.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. Coordenação de Sangue e Hemoderivados. **Preparação de hemocomponentes**. Brasília, 1998. p.36-85 . (Série Telelab).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Assistência a Saúde. Coordenação de Sangue e Hemoderivados. **Normas técnicas para o tratamento de hemofilia**. Brasília, 1994. p.11-12.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Assistência a Saúde. Departamento de Assistência a Saúde. Departamento de Assistência e Promoção a Saúde. Coordenação de Sangue e Hemoderivados. **Normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados**. Brasília, 1993. p. 32-33.

BURNOUF, T. Fibrin glue: production and clinical utilisation. **Rev. Bras. Hemotol. Hemoter.**, v.22, p.302 – 308, 2000.

CAIRUTAS, C. M. **Componentes e derivados do sangue para uso terapêutico**. Recife: Universitária, 1986. p. 188-205.

- CAVALCANTI, A. S. Hemofilia "A" grave com reação adversa ao fator VIII da coagulação. **Rev. Inst. Est. Hematol.**, v. 14, n. 1/2, p. 58-61, 1997a.
- _____. Representação social das mães de pacientes hemofílicos. **Rev. Inst. Est. Hematol.**, v. 14, n. 1/2, p. 12-17, 1997b.
- CEARÁ. Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCE. **Procedimentos hemoterápicos: normas técnicas para o fracionamento**. Fortaleza, 1998.
- FABRON JÚNIOR, A.; BORDIN, J. O. **Indicações e cuidados nas transfusões de sangue**. Marília: FANEMA, 1999. p. 16-19.
- FARRUGIA, A. et al. Modulation of fibrinogen content in cryoprecipitate by temperature manipulation during plasma processing. **Transfusion**, v. 32, p. 755-759, 1992.
- FUNDAÇÃO PRÓ-SANGUE. **Curso de capacitação para profissionais de hemostasia**. São Paulo, 2000.
- GALANAKIS, D. K. Plasma crioprecipitation studies: major increase in fibrinogen yield by albumin enrichment of plasma; **Thromb. Res.**, v. 78, n. 4, p. 303-313, 1995.
- GIVISIEZ, F.N. et al. **Preparação de hemocomponentes**: Brasília: Ministério da Saúde, 1998. p. 36-85. (Série Telelab).
- GUIDE to preparation, use and quality assurance of blood components. 5. ed. Albania: Cover, 1999. p. 121-125.

- GUILARD; F. et al. Contaminação e principais contaminantes microbiológicos em procedimentos hemoterápicos. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemot.**, v. 8, n. 137, p. 6-14, 1986.
- HARMENING, D. M. **Técnicas modernas em bancos de sangue e transfusão**. 2. ed.. Rio de Janeiro: Revinter, 1990. p. 207-208.
- HUGUES, C. et al. Effect of delayed blood processing on the yield of factor VIII in cryoprecipitate and factor VIII concentrate. **Transfusion**, v. 28. p. 566-570, 1998.
- JUNQUEIRA, P. C. **O Essencial da transfusão de sangue**. São Paulo: Andrei, 1979. p. 346-348.
- LORENZI, T. F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 2. ed. São Paulo: Medsi, 1996. p. 191-193.
- MAZZA, J. J. **Manual de hematologia clínica**. Barcelona, 1990. p. 375-376.
- O'NEIL, E. M. et al. Effect of 24-hour whole-blood storage on plasma clotting factors. **Transfusion**, v. 39, p. 488-491, 1999.
- O QUE é hemofilia : guia para jovens. São Paulo, 1994. p. 10-18.
- OLIVEIRA, J. F. et al. Controle de qualidade de crioprecipitado: hemorio. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, p. 110, 2000.

OTERO, P. B.; RUBIO, R. R. Recobrado del F VIII: C en el crioprecipitado; efecto del PH de la solución anticoagulante y el tiempo de descongelacion. Rev. Cubana Hematol. Imunol. Hemoter., v. 3, n. 1, p. 163-171, 1987.

PIEDRAS, J. et al. Effect of plasma freezing temperature, anticoagulant and time of storage On factor VIII: C activity in cryoprecipitate. **Arch. Med. Res.**, v. 24, n. 1, p. 6-23, 1993.

PICIOTTO, P. T. **Terapeutica transfusional: manual para médicos.** 3. ed. . Bethesda: AABB, 1989. p. 24-25.

RIBEIRO, R. A. **Crioprecipitado, Influência da temperatura de congelamento sobre a recuperação final do Fator VIII.** Fortaleza, 1986. Monografia (Especialização em Hematologia e Hemoterapia) - Universidade Federal do Ceará.

SCHOEDER, M. L.; RAYNER, H. L. Transfusão de sangue e dos componentes sanguíneos. In: LEE, G. R. et al. (Eds.) **Wintrobe Hematologia Clínica.** São Paulo: Manole, 1998. v. 1, cap. 21, p. 734-736. 1998.

SMITH, J. R. et al. Methods of assessing factor VIII content of stored fresh frozen plasma intended for preparation of factor VIII concentrates. **Transfusion.**, v.18, p. 7 – 530, 1978.

TERRA. P. **Coagulação. Interpretação clínica do testes laboratoriais de rotina.** São Paulo: Atheneu,. 2000.

WEAVER, R.A. ;GABRIEL, D. A. ; LANDELL, R. D. Concentrated antihemophilic factor (AHF) from out dated blood. Transfusion, v.16, p12-169, 1967.

WICKERHAUSER, M. Preparation of antihemofilic factor from indated plasma. Transfusion, v. 16, p. 350-435, 1997.