



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

SEVERINO BORBA DE ANDRADE

**ESTUDO DA ESTABILIDADE DO PLASMA HUMANO FRESCO
CONGELADO, DESTINADO À PRODUÇÃO DE HEMODERIVADOS**

**RECIFE-PE
2013**

SEVERINO BORBA DE ANDRADE

**ESTUDO DA ESTABILIDADE DO PLASMA HUMANO FRESCO
CONGELADO, DESTINADO À PRODUÇÃO DE HEMODERIVADOS**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração: Produção e Controle.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

**RECIFE
2013**

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

A553e Andrade, Severino Borba de.
Estudo da estabilidade do plasma humano fresco congelado, destinado à produção de hemoderivados / Severino Borba de Andrade. – Recife: O autor, 2013.
79 folhas: il. ; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.
Inclui referências apêndices e anexos.

1. Estabilidade de Medicamentos. 2. Fator VIII. 3. Medicamentos Hemoderivados. 4. Medicamentos Fracionados. I. Rolim Neto, Pedro José. (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2015-165)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco e aprovada em 12 de julho de 2013.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto
(Examinador Interno Titular)

Larissa Araújo Rolim
(Examinadora Externa Titular - UNIVASF)

Ana Cristina Lima Leite
(Examinadora Interna Titular - UFPE)

Rosali Maria Ferreira da Silva
(Examinadora Externa Suplente - UFPE)

Miracy Muniz de Albuquerque
(Examinador Interno Suplente - UFPE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

**VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Dalci José Brondani

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite

AGRADECIMENTOS

A Valderez, minha esposa, e a meus filhos, Matheus e Mariana, pela força, vibrações positivas e muita paciência durante esta etapa de minha vida. Sem estes eu não teria conseguido.

Aos meus pais Borba e Prazeres, pelo amor, carinho e dedicação depositados a mim no decorrer da minha existência, minha fonte de energia, pelo exemplo de vida e por terem me ensinado que as conquistas na vida só são alcançadas por meio de muita luta e fé.

Aos meus irmãos, Borbinha, Ivânia e Gil, que sempre estiveram ao meu lado.

A todos os meus familiares e amigos agradeço a força e as vibrações positivas para o meu sucesso profissional

Ao orientador, Prof. Dr. Pedro Rolim Neto, pela orientação competente, pela amizade demonstrada em cada ensinamento, pelos conselhos durante esta caminhada, e pela cobrança de resultados.

A Prof. Dra Larissa Rolim, pela orientação, seus cálculos estatísticos em minha pesquisa e apoio durante a capacitação no exterior do Prof. Dr. Pedro Rolim.

A Prof. Dra Miracy Muniz de Albuquerque que me acompanha desde a época de aluno, de estagiário da Farmácia Escola, e da seleção para farmacêutico da UFPE.

A Prof. Dra. Ana Cristina Leite, por incentivar a minha volta à vida acadêmica.

A Dra. Laís Guimarães, minha professora, primeira empregadora e hoje colega de profissão, que serviu como fonte de inspiração por meio da motivação.

A Dra. Vanda Carvalho (in memória), minha primeira chefe no Hospital das Clínicas. Sua forma de trabalho serviu de referência, e muito do que aprendi com ela aplico hoje.

A Dra. Veronica Noia, que me ensinou a dar os primeiros passos na administração pública.

Aos meus colegas do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM), que não mediram esforços em ajudar e pelo incentivo em especial.

Aos meus colegas da Agência Transfusional do Hospital das Clínicas, em especial a Dra. Patrícia, a Dra. Clécia e a Dra. Selma, que muito me incentivaram durante esta jornada e que não mediram esforços em me ajudar.

Aos meus colegas da Fundação HEMOPE, pelo apoio durante o período do curso.

À Universidade Federal de Pernambuco

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas de Pernambuco.

Há conhecimento de dois tipos: sabemos sobre um assunto, ou sabemos onde podemos buscar informação sobre ele.

[Samuel Johnson]

RESUMO

O plasma humano é a parte líquida remanescente do sangue total após separação das frações celulares sanguíneas, e é utilizado na produção de hemoderivados. A presente pesquisa objetivou demonstrar a estabilidade das proteínas do plasma estocado, em temperaturas diferentes daquelas das regulamentadas. Analisaram-se amostras estocadas a -10°C, -17°C, -20°C e -30°C. Aleatoriamente foram escolhidas cinco bolsas de plasma dos grupos sanguíneos O, A e B, formando um pool, divididas em quatro subgrupos, congeladas e armazenadas. No período de outubro/2012 a abril/2013, foram analisadas as dosagens das proteínas plasmáticas. Observou-se que não houve perdas no teor Albumina, da Imunoglobulina nem da atividade do Fator de Coagulação IX. O Fator de Coagulação VIII (FVIII) apresentou perda de atividade estaticamente significativa quando estocado a -10°C, e a -17°C as perdas foram mínimas. Concluiu-se que o plasma estocado a -17°C pode ser utilizado para produção de hemoderivados, e a -10°C poderá ser utilizado, reduzindo o prazo de estocagem. É possível que a influência do polimorfismo do gene ABO sobre níveis do Fator VIII, de forma indireta, seja um fator redutor no tempo de estocagem do plasma. Propõe-se uma revisão nas legislações atuais, no que tange à liberação do plasma para produção de hemoderivados.

Palavras-chave: Estabilidade. Fator VIII. Polimorfismo. Hemoderivado. Fracionamento.

ABSTRACT

Human plasma is the liquid part remaining of whole blood after separation of blood cell fractions, and is used in the production of blood products. This study aimed to demonstrate the stability of plasma proteins stored at temperatures different from those of the regulated. Samples were analyzed stored at -10°C , -17°C , -20°C and -30°C . Five plasma bags were randomly chosen from the blood groups O, A and B forming a pool divided into four subgroups, frozen and stored. In the period from October/2012 to April/2013, were analyzed the strengths of plasma proteins. It was observed that there was no loss in content Albumin, Immunoglobulin or activity of coagulation factor IX. Coagulation Factor VIII (FVIII) showed statistically significant loss of activity when stored at -10°C , and -17°C the losses were minimal. It was concluded that the stored plasma at -17° can be used for the production of blood products and -10°C can be used, reducing the storage term. It is possible that the influence of the ABO gene polymorphism on levels of Factor VIII, indirectly, be a reducer factor in the plasma storage time. We propose a revision in the current legislation, regarding the plasma release for production of blood products.

Keywords: Stability, Factor VIII, Polymorphism, Blood product, Subdivision.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fitas de eletroforese de proteínas em agarose, coradas com solução alcoólica de azul da Prússia a 5%	21
Figura 2- Leitura de uma fita de eletroforese em densitômetro.....	22
Figura 3- Desenho esquemático de uma molécula de imunoglobulina	26
Figura 4- Modelo em fita do primeiro anticorpo intacto a ser cristalizado (IgG2A).....	27
Figura 5- Diagrama de uma planta para a produção de hemoderivados utilizando o método de Cohn	34
Figura 6- Perfil de decaimento do Fator VII nas amostras armazenadas às temperaturas de -17°C, -20°C e -30°C	42
Figura 7- Perfil de decaimento do Fator VII nas temperaturas de -10°C.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividade de Fator de Coagulação VIII nas diferentes temperaturas de armazenamento.....	44
Tabela 2- Cálculo da cinética de degradação do fator VII nas diferentes temperaturas de armazenamento e grupos sanguíneos.....	45
Tabela 3- Média dos resultados das dosagens do Fator de Coagulação IX (Valores em % de atividade)	45
Tabela 4- Média dos resultados das dosagens de imunoglobulinas (Valores em g/dL).....	46
Tabela 5- Resultado das dosagens de albumina (Valores em g/dL)	46

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CFR	Code of Federal Regulations
DOE-PE	Diário Oficial do Estado de Pernambuco
Hemope	Hematologia de Hemoterapia de Pernambuco
HSA	Albumina Sérica Humana
LFB	Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies
MBR	The Market Research Bureau Inc
SUS	Sistema Único de Saúde
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 GERAL.....	18
2.2 ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	19
3.2 ALBUMINA.....	21
3.2.1 Aspectos Gerais	21
3.2.2 Funções Fisiológicas da Albumina	22
3.2.2.1 Pressão Osmótica Coloidal.....	22
3.2.2.2 Associação de Ligantes	22
3.2.2.3 Efeitos Antioxidantes	23
3.2.3 Indicações para o Uso de Soluções de Albumina	23
3.3 GLOBULINAS.....	25
3.3.1 Imunoglobulinas	25
3.3.2 Farmacopeia Brasileira	28
3.3.3 Consumo	28
3.4 FATORES DE COAGULAÇÃO VIII E IX	29
3.4.1 Fator da Coagulação Sanguínea VIII	30
3.4.2 Fator da Coagulação Sanguínea IX	31
3.4.3 Produção de Hemoderivados	32
3.5 NOVOS MEDICAMENTOS HEMODERIVADOS MODIFICADOS	33
3.5.1 Albumina Humana Peguilada	33

3.5.2 Nanoesferas de Albumina na Terapia Fotodinâmica e Magnetohipertermia	34
3.5.3 Fator Recombinante VII Ativado	34
4 PROCESSOS METODOLÓGICOS	35
4.1 ESCOLHA DA METODOLOGIA PARA O EXPERIMENTO.....	35
4.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	35
4.2.1 Coleta de Sangue.....	35
4.2.2 Preparação das Amostras	36
4.3 DOSAGEM DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS.....	38
4.3.1 Dosagem de Albumina	38
4.3.1.1 Fundamento	38
4.3.2 Dosagem de Imunoglobulina	38
4.3.2.1 Fundamento	39
4.3.3 Dosagem de Coagulação Fator VIII	39
4.3.3.1 Fundamento	39
4.3.4 Dosagem de Coagulação Fator IX.....	40
4.3.4.1 Fundamento	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
6 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE	
ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO NA REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA.....	51
ANEXOS:	
Anexo A	
PARECER DO COMITÊ DE ETICA 009/2013.....	69

Anexo B

PARECER DO COMITÊ DE ETICA 025/2013.....71

Anexo C

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO.....73

Anexo D

ACEITE DA REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA.....75

Anexo E

CÂMARA FRIGORIFICA PARA ACONDICIONAMENTO DE PLASMA.....76

1- INTRODUÇÃO

O sangue humano no passado era utilizado no tratamento de distúrbios hemorrágicos e imunológicos por meio da transfusão direta. Atualmente ele é submetido a processos de separação para a obtenção do plasma, que é uma rica fonte de proteínas humanas. O plasma é uma matéria-prima para a obtenção de uma gama de medicamentos, destacando-se os fatores de coagulação VIII (FVIII), fator de coagulação IX (FIX), fator de von Willebrand, fibrinogênio, selantes de fibrina, concentrado de complexo protrombínico, albumina e imunoglobulinas. Os medicamentos obtidos pelo processamento (fracionamento) são denominados “Hemoderivados”, e o plasma utilizado como matéria-prima de “Plasma humano para fracionamento” (Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição).

A Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição, define:

Plasma humano para fracionamento como a parte líquida remanescente do sangue total após separação das frações celulares sanguíneas, utilizando sistema fechado de coleta de sangue apropriado que cumpra os requisitos exigidos para os recipientes de plásticos utilizados na coleta do sangue humano, contendo uma solução anticoagulante conservadora e preservadora ou separada por filtração contínua ou por centrifugação do sangue anticoagulado no procedimento de aférese para obtenção de produtos derivados do plasma humano (BRASIL, 2010, p 48).

Cerca de 30 milhões de litros de plasma são coletados e fracionados por ano em todo o mundo (BURNOUF, 2011). Os países com maior capacidade de produção e fracionamento estão localizados na América do Norte, Europa e Sudeste Asiático. Atualmente, setenta e cinco por cento de plasma utilizado no fracionamento são obtidos por plasmaférese e, na sua maioria, advindos de doações remuneradas. Países da Europa, como a Inglaterra, importam todo o plasma que precisam dos Estados Unidos. A maioria dos pacientes com distúrbios de coagulação, deficiências imunológicas e doenças autoimunes vive em países pobres na África, Ásia, América do Sul e Central e não tem acesso adequado a medicamentos eficazes e seguros, como os hemoderivados. Nestes países são realizadas transfusões de componentes do sangue, como o plasma e o crioprecipitado, como forma de tratamento (FARRUGIA, 2012). Em nosso país a lei 10.205 de 2001, veda a doação ou exportação de sangue, componentes e hemoderivados, exceto em casos de solidariedade internacional ou quando houver excedentes nas necessidades nacionais em produtos acabados (BRASIL, 2001).

Atualmente, no Brasil, não há indústrias fracionando o plasma, o que levou as autoridades do país a firmar contrato (Contrato nº 77/2007 do Departamento de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Ciência) com a empresa *Laboratoire Français du*

Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) para o processamento, por meio do fracionamento, dos componentes do plasma excedente brasileiro. No ano de 2010 as coletas de sangue no Brasil somaram-se 3.627.529 e, destas, foram produzidas 1.256.938 bolsas de plasma (251.388 mil litros), das quais 239.889 foram descartadas e só 351.769 bolsas foram fracionadas pela LFB para processamento. A LFB produziu com este plasma 12.191.760 UI de Concentrado de Fator VIII, 20.449.582 UI de Concentrado de Fator IX, 2.371.739 gramas de albumina e 484.920 gramas de imunoglobulina. O Programa Segurança Transfusional e Qualidade do Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde distribuiu neste mesmo ano 255.328.250 UI de Fator VIII. O contrato de fracionamento só conseguiu atender a 12,48% do quantitativo necessário para o tratamento dos hemofílicos no Brasil (BRASIL, 2011).

Os parâmetros para estocagem do plasma humano congelado, destinado ao fracionamento, no Brasil, são definidos pela legislação, por meio da Resolução RDC nº 57, de 16 de dezembro de 2010-ANVISA e Portaria Nº 1.353, de 13 de junho de 2011 do Ministério da Saúde, que determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais (BRASIL, 2010).

A Portaria Nº 1.353 e Farmacopeia Brasileira 5ª edição recomendam que o plasma seja estocado a temperaturas inferiores a -20°C , porém a Farmacopeia permite que durante a estocagem, ou durante o transporte, estas temperaturas possam ser superiores. Ela também afirma que plasmas, com valores inferiores a 0,7 UI/mL de Fator de Coagulação VIII, quando produzidos com Boas Práticas, podem ser usados no fracionamento industrial de proteínas.

Atualmente a Farmacopeia Europeia recomenda congelar o plasma em até 24 horas após a coleta, em uma temperatura inferior a -30°C , quando se planeja produzir Fator VIII, e conservá-lo a -20°C . Se a temperatura atingir -15°C durante um intervalo de tempo de até 72 horas, este ainda pode ser utilizado. Porém, se a temperatura de estocagem atingir -5°C este plasma não pode ser fracionado. Esta recomendação garante a qualidade do plasma destinado ao fracionamento para a produção de Fator VIII. O congelamento a -30°C garante a completa solidificação do plasma (Ph.Eur, 2005).

O FDA, por meio do *Code of Federal Regulations* (CFR), recomenda que o plasma, destinado à fabricação de hemoderivados, deve ser armazenado a -20°C , e quando exposto a temperaturas superiores a -20°C e inferiores a 10°C seja rotulado como “plasma fresco fonte recuperado”. O plasma, quando exposto a temperaturas superiores a -20°C e inferiores a -5°C , em um intervalo de tempo inferior a 72 horas, pode ser utilizado na fabricação de

hemoderivados, mas o registro desta não conformidade deve estar disponível e ser apresentado quando solicitado à indústria fracionadora (FDA, 2012).

Como não havia estudos definindo qual era a temperatura ideal para estocar o plasma por períodos mais longos, na Austrália, no período de 1998 a 2001, foi realizado um estudo multicêntrico nos laboratórios de controle de qualidade de sete Serviços de Hemoterapia da Cruz Vermelha. O objetivo deste estudo realizado na Austrália foi obter dados sobre a estabilidade dos fatores de coagulação (Fator V, Fator VIII e Fator IX), bem como dos inibidores da antitrombina III, ao longo do período de três anos de armazenamento do plasma fresco congelado a uma temperatura média de -40°C (entre -38°C e -42°C) (ILLERT, 2001).

Devido às limitações definidas na legislação atual, só uma parte do plasma produzido no Brasil é utilizada para o fracionamento industrial e produção de hemoderivados. Estudos que mostrem a estabilidade do plasma humano e de suas proteínas em temperaturas superiores a -20°C poderão aumentar o aproveitamento do plasma produzido no Brasil, reduzir gastos com energia elétrica na cadeia do frio e reduzir o descarte anual de milhares de bolsas de plasma humano. O aumento do aproveitamento não tornará o Brasil autossuficiente na produção de hemoderivados, mas poderá aumentar o índice de aproveitamento de plasma produzido em curto prazo sem a necessidade de grandes investimentos.

Este estudo tem como objetivo identificar a temperatura máxima de estocagem do plasma humano destinado à produção de hemoderivados, sem que haja perdas significativas de proteínas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar a temperatura máxima de estocagem do plasma humano destinado à produção de hemoderivados sem que haja perdas significativas de proteínas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a concentração dos fatores de coagulação após a estocagem em temperaturas superiores a -20°C ;
- Verificar a concentração final da albumina e das imunoglobulinas após a estocagem em temperaturas superiores a -20°C ;
- Identificar o fator de degradação dos fatores de coagulação em cada faixa de temperatura definida no trabalho.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

As proteínas são compostos essenciais a todas as células vivas e estão relacionadas, praticamente, a todas as funções fisiológicas, além de desempenharem papéis importantes na estrutura celular. São polímeros de alto peso molecular, cujas unidades básicas, os aminoácidos, são atreladas entre si por ligações peptídicas. Dentre suas funções biológicas, que são influenciadas por sua estrutura e sequência de aminoácido, destacam-se: catálise enzimática, transporte, capacidade de contração ou de movimento, suporte e estrutura, imunoproteção e defesa, coagulação sanguínea, reguladores do crescimento e diferenciação celular (LEHNINGER, 2000).

As proteínas plasmáticas podem ser separadas por eletroforese (Figuras 1 e 2) em duas frações principais: sendo uma a fração de albumina e a outra constituída pelas globulinas, as quais se diferenciam da albumina por apresentarem maior tamanho e peso molecular. A concentração total de proteínas no plasma é de aproximadamente 6,0 a 8,0 g/dL e, em pH 7,4, estas proteínas encontram-se na forma aniônica e, assim, constituem parte significativa do complemento aniônico do plasma. A relação normalmente encontrada entre albumina e globulina é de 2:1 (SILVERMAN, 1998).

A fração alfa-1 globulina é formada principalmente pelas proteínas alfa-1-antitripsina (AAT), alfa-1-glicoproteína-ácida (AGA), alfa-1-lipoproteína (α Lp) e alfa-1-fetoproteína (α Ft), enquanto a fração alfa 2 pela haptoglobina (Hap), ceruloplasmina (Cer) e alfa-2-macroglobulina (AMG). Os principais componentes da fração beta-1 são a transferrina (TRF) e a hemopexina (Hpx), enquanto da beta 2 é a beta-lipoproteína (β Lp), além dos componentes do complemento sérico (C3, C4) e fibrinogênio. A fração gama é formada pelos vários tipos de imunoglobulinas, entre elas IgA, IgM, IgD, IgE, IgG e, e pela proteína C reativa (PCR), tendo neste grupo a IgG como a principal fração, correspondendo a 80% das gamaglobulinas. (SILVA, 2005).

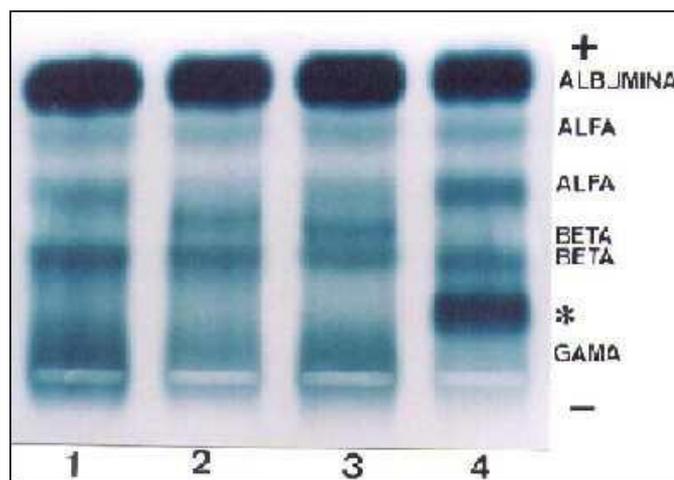
É importante descrever ainda alguns componentes de interesse especial, como as mucoproteínas e glicoproteínas, as quais são encontradas principalmente nas frações globulínicas alfa 1 e alfa 2, e as lipoproteínas que são formadas por uma combinação de lipídeo com proteína e migram com as globulinas alfa e aproximadamente 5% de misturas

semelhantes migram com as globulinas beta (SILVA, 2005). Dentre as glicoproteínas encontram-se os fatores e os cofatores da coagulação sanguínea. A concentração dos fatores de coagulação é bem pequena e em alguns esta concentração chega a ser relativamente muito baixa, como é o caso do fator de von Willebrand (VWF) (1 nM). Porém, os fatores e cofatores possuem atividade fisiológicas essenciais à vida, como a hemostasia (ZAKAS, 2012).

O fígado desempenha um papel fundamental na hemostasia, produzindo não só os fatores da coagulação, mas também a maior parte dos elementos envolvidos na hemóstase, tais como os inibidores dos fatores da coagulação, as proteínas fibrinolíticas e os respectivos inibidores (KANG, 2000). Algumas das proteínas sintetizadas no fígado são a protrombina, o fibrinogênio, os fatores da coagulação V, VII, VIII, IX, X, XI, XII e XIII, a ATIII, o plasminogênio, a α -2-antiplasmina, a proteína C (PC) e a proteína S (PS). O Fator VIII é produzido pelo fígado e também pelo endotélio vascular (KANG, 2000).

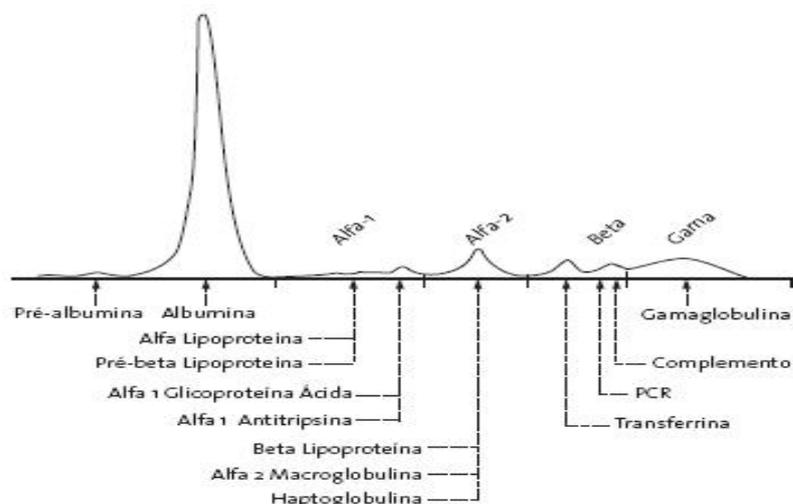
Dentre as proteínas plasmáticas a Albumina, a Imunoglobulina e os Fatores da Coagulação VIII e IX são os de maior interesse para a indústria de hemoderivados no Brasil. Hoje 11.833 brasileiros são portadores de algum tipo de Hemofilia (Brasil, 2013). De acordo com o Ministério da Saúde, o governo federal investiu, no ano de 2011, R\$ 350 milhões na compra de medicamentos para pacientes hemofílicos, quando foram distribuídas 197.697.000 unidades internacionais de Fator VIII e 41.687.000 de Fator IX (BRASIL, 2011).

Figura 1- Fitas de eletroforese de proteínas em agarose, coradas com solução alcoólica de azul da Prússia a 5%



Fonte: Laboratório de Controle de Qualidade Industrial da Fundação Hemope

Figura 2- Leitura de uma fita de eletroforese em densitômetro



Fonte: Sergio Franco-Medicina Diagnóstica – disponível em:
<http://www.sergiofranco.com.br/bioinforme/index.asp?cs= Bioquimica&ps=eletroforeseProteinasSericas>

3.2. ALBUMINA

3.2.1. Aspectos Gerais

A albumina sérica humana (HSA) é a mais abundante proteína do plasma humano, produzida no fígado a uma taxa de aproximadamente 12 g/dia, o que representa 25% da síntese proteica total do fígado e a metade de toda a proteína exportada pelo órgão (OHNISHI, 2002), consistindo em um monômero de 66 KDa (WONG, 2007).

Estruturalmente, a albumina é composta de vários segmentos em alfa-hélice, que se agrupam para formar dois subdomínios (A e B) (GHUMAN, 2005). A HSA tem a sua estrutura constituída por 18 resíduos de tirosina, 6 resíduos de metionina, 1 resíduo de triptofano, 59 resíduos de lisina, 1 resíduo de cisteína, e 17 pontes dissulfetos (WONG, 2007). Os grupos tiol estão envolvidos em várias reações bioquímicas que inativam as espécies reativas de oxigênio, dando à albumina um papel antioxidante importante em nosso organismo (WONG, 2007). A albumina tem uma concentração plasmática típica de 35 - 45 g/L, que representa 30 a 40% da albumina sintetizada no fígado, e o restante encontra-se distribuído entre os músculos e a pele. Sua principal função fisiológica é regular a pressão osmótica (ZUNSZAIN, 2003).

Esta proteína é caracterizada por sua habilidade de se ligar a uma ampla variedade de moléculas hidrofóbicas, ácidos graxos, bilirrubina, hemina, tiroxina e esteróides. Serve como um solubilizador e transportador destes compostos. HSA tem alta afinidade pelo grupo heme (ZUNSZAIN, 2003).

Um dos fatores mais importantes que afetam a distribuição e a concentração ativa de muitas drogas no organismo é a afinidade pela HSA. Um grau de afinidade pela albumina é desejável, para ajudar a solubilizar substâncias que de outra forma poderiam agregar-se e ser pobremente distribuídas. Já em relação às drogas com grande afinidade pela proteína, seriam necessárias grandes doses para atingir uma concentração efetiva *in vivo*, assim, seriam lentamente distribuídas aos sítios de ação e poderiam não ser eficientemente eliminadas.

3.2.2 Funções Fisiológicas da Albumina

3.2.2.1 Pressão Osmótica Coloidal

A função mais importante da albumina é regular a pressão osmótica coloidal. A albumina provê 60% da pressão osmótica coloidal. A proteína é negativamente carregada e, por conseguinte, atrai cátions, como os íons de sódio, os quais, por sua vez, retêm a água (NGUYEN, 2006).

3.2.2.2 Associação de Ligantes

A organização estrutural globular da HSA dá a possibilidade de se ligar com várias substâncias em múltiplos sítios da molécula, unindo-se, assim, a vários componentes endógenos e exógenos. Estes compostos incluem ácidos graxos, bilirrubina, metais, tiroxina e triptofano, assim como drogas que têm características ácidas ou eletronegativas (warfarina, ibuprofeno e diazepam). Estas características fazem com que a HSA seja um dos maiores transportadores de fármacos no sangue (GHUMAN, 2005).

A HSA pode facilitar a ativação de várias substâncias, tais como hormônios ou drogas, ou diminuir a presença de toxinas no plasma. Por exemplo, a ligação do triptofano à HSA regula a deposição daquele nos tecidos. Em pacientes com uma avançada cirrose e hipoalbuminemia, a diminuição dos sítios de ligação gera uma quantidade adicional de triptofano livre, o qual pode gerar o desenvolvimento de encefalopatia hepática. A ligação de

HSA também afeta a farmacocinética e eficácia de muitas drogas. Por exemplo, drogas com alta afinidade pelo HSA têm que ser administradas em altas doses para atingir uma efetiva concentração in vivo; sua distribuição nos sítios de ação poderia ser reduzida ou mesmo eliminada. Apesar disso, uma alta ligação da droga com a HSA poderia ser desejável, porque ajudaria a solubilizar compostos que de outra forma originariam agregados e seriam pobremente eliminados (GRECO, 2000).

3.2.2.3 Efeitos Antioxidantes

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são extremamente voláteis e capazes de reagir com outras moléculas, que dão origem à acumulação de produtos tóxicos finais e dano celular. Estudos in vivo têm mostrado que o HSA pode ligar e, por conseguinte, remover espécies reativas de oxigênio que foram gerados indiretamente por neutrófilos, regulando a sinalização celular que é ativada nos processos inflamatórios (KOUCH, 1999). HSA também influencia o status redox do plasma ao ligar metais como o ferro e o cobre, que de outra forma se transformariam em formas redox-ativas. Desta forma, o HSA tem um papel antioxidante importante em situações de inflamação (KRAGH-HANSEN, 2002).

3.2.3 Indicações para o Uso de Soluções de Albumina

No Brasil, a Resolução - RDC N° 115, de 10 de maio de 2004, aprova as Diretrizes para o uso de Albumina, as formas para a sua obtenção.

Esta resolução analisa as situações clínicas em que deve ser utilizado o medicamento albumina humana, mas também ela é clara em afirmar que não proíbe ou contraindica o seu uso, ou mesmo recolhesse que ela deva ser utilizada em uma situação ou outra. Estas indicações estão divididas em três grupos: indicações formais; indicações discutíveis e indicações não fundamentadas.

As indicações formais são aquelas em que há trabalhos randomizados e controlados mostrando a eficácia da albumina no tratamento dos pacientes. O fato de uma indicação estar incluída na categoria formal não significa que não haja alternativas terapêuticas ao uso da albumina; antes, indica que, se a equipe médica que cuida do paciente optar pela sua utilização, o fará com respaldo na literatura especializada.

As indicações discutíveis são aquelas em relação às quais não há consenso e os

resultados dos trabalhos e das metas-análises são conflitantes. O uso da albumina nestas situações pode eventualmente ser feito, até que haja evidências mais conclusivas na literatura.

As indicações não fundamentadas são aquelas em que os trabalhos mostram que o uso da albumina não traz nenhum benefício para os pacientes.

Indicações Formais:

- Preenchimento (priming) da bomba de circulação extracorpórea nas cirurgias cardíacas.
- Tratamento de pacientes com ascites volumosas, por paracenteses repetidas.
- Após paracenteses evacuadoras nos pacientes com ascites volumosas.
- Como líquido de reposição nas plasmaféreses terapêuticas de grande monta (retirada de mais de 20 ml/kg de plasma por sessão).
- Prevenção da síndrome de hiperestimulação ovariana no dia da coleta do óvulo para fertilização in vitro.
- Pacientes com cirrose hepática e síndrome nefrótica, quando houver edemas refratários aos diuréticos e que coloquem em risco iminente a vida dos pacientes.
- Grandes queimados, após as primeiras 24 horas pós-queimadura.
- Pós-operatório de transplante de fígado, quando a albumina sérica for inferior a 2,5 g%.

Indicações Discutíveis:

- Uso em pacientes críticos com hipovolemia, hipoalbuminemia e má-distribuição hídrica.
- Hiperbilirrubinemia do recém-nato por Doença hemolítica peri-natal (dhpn).
- Em pacientes com cirrose que apresentem peritonite bacteriana espontânea.

Indicações não fundamentadas:

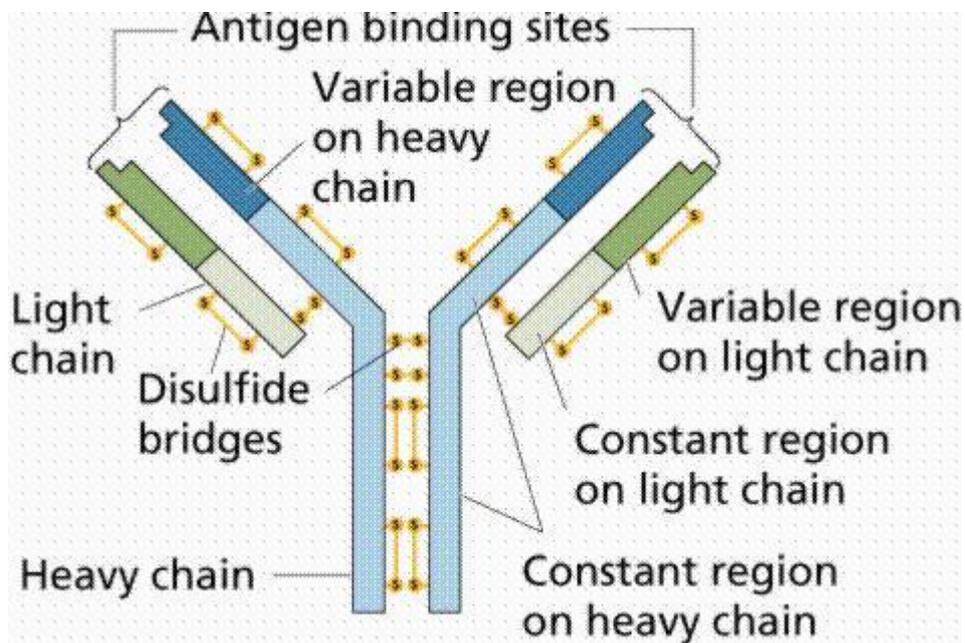
- Correção de hipoalbuminemia.
- Correção de perdas volêmicas agudas, incluindo choque hemorrágico.
- Tratamento de pacientes com cirrose hepática ou com síndrome nefrótica.
- Peri-operatório, exceto nos casos mencionados anteriormente.

3.3 GLOBULINAS

3.3.1 Imunoglobulinas

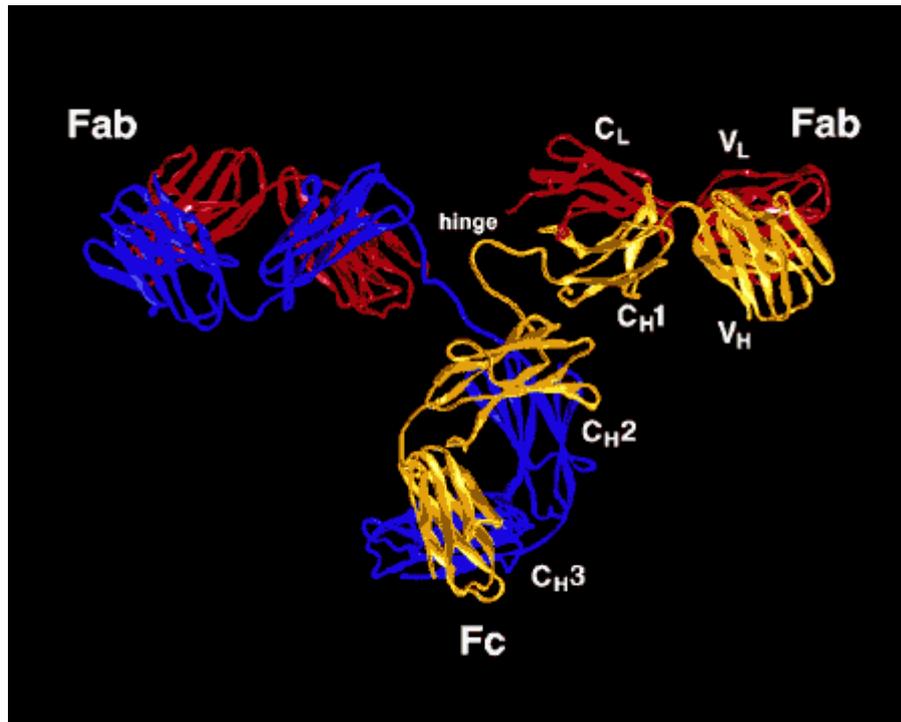
As Imunoglobulinas são proteínas de alto peso molecular (PM) 150 kD e também são chamadas de anticorpos. Possuem em sua estrutura também duas cadeias "leves" (PM 25 kD) e duas cadeias pesadas (PM 50 kD), as quais são ligadas entre si por pontes de dissulfeto, formando estrutura simétrica em Y (Figura 3). As cadeias têm sua porção amino terminal próxima ao topo da estrutura em Y, onde se encontra o sítio determinante do anticorpo, denominado fragmento Fah 37. As sequências dos aminoácidos neste fragmento determinam a especificidade do anticorpo e o tipo de imunoglobulina, as quais são agrupadas em cinco classes principais: as imunoglobulinas Gama (IgG), as imunoglobulinas Mu (IgM), as imunoglobulinas Alfa (IgA), as imunoglobulinas Delta (IgD) e as imunoglobulina Épsilon (IgE).

Figura 3- Desenho esquemático de uma molécula de imunoglobulina



Fonte: HARRIS et al, 2000

Figura 4- Modelo em fita do primeiro anticorpo intacto a ser cristalizado (IgG2A)



Fonte: HARRIS et al, 2000

No Brasil, as definições, as classificações e as indicações de uso e recomendações das imunoglobulinas estão descritas na Consulta Pública nº 36, de 20 de maio de 2004.

1 DEFINIÇÃO:

As imunoglobulinas são proteínas presentes em grande concentração no plasma humano. São os vetores da imunidade humoral, tendo como função precípua unir-se aos antígenos estranhos ao indivíduo, de modo a neutralizá-los. Garantem, portanto, a proteção do organismo contra vírus, bactérias, alérgenos, toxinas etc.

As imunoglobulinas são constituídas por milhares de moléculas de espécies diferentes, existindo tantas moléculas de imunoglobulinas quantos anticorpos específicos. São produzidas pelos plasmócitos que, por sua vez, resultam da transformação dos linfócitos B.

Esta enorme diversidade de moléculas de imunoglobulinas pode ser agrupada em cinco famílias, ou classes, segundo suas características imunológicas e físico-químicas: as imunoglobulinas A, D, E, G e M (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).

As imunoglobulinas, independentemente da sua classe, possuem uma estrutura composta por duas cadeias polipeptídicas pesadas, cujo peso molecular pode variar de 50 a 70.000 Daltons, e duas cadeias polipeptídicas leves, do tipo Kappa e Lambda (peso molecular em torno de 23.000 Daltons).

O quadro I resume as principais características das cinco classes de Imunoglobulina:

Quadro I: Características das Imunoglobulinas

Classe	Subclasse	Peso Molecular (Daltons)	Concentração Sérica	Vida Média
IgG	IgG ₁	150.000	1.200 mg%	23 dias
	IgG ₂			
	IgG ₃			
	IgG ₄			
IgM		900.000	100 mg%	5 dias
IgA	IgA ₁	160.000	200 mg%	6 dias
	IgA ₂			
IgD		180.000	3 mg%	3 dias
IgE		200.000	0,03 mg%	2 dias

2 OBTENÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS HUMANAS PARA USO INTRAVENOSO

As preparações de imunoglobulina humana para uso terapêutico são obtidas a partir do fracionamento industrial do plasma. O plasma que se destina à indústria de fracionamento pode ser colhido por aférese ou ser proveniente de uma doação de sangue total. Neste último caso, o plasma é excedente do uso terapêutico.

3 TIPOS DE IMUNOGLOBULINAS

Existem dois tipos de imunoglobulinas para uso clínico: as imunoglobulinas poli-específicas e as imunoglobulinas específicas. As imunoglobulinas poli-específicas, são utilizadas por via intravenosa, embora haja relatos de utilização por via subcutânea, intratecal, oral e até intra-auricular. Estão disponíveis para uso em apresentações de 500 mg, 1g, 2,5g, 5g, 6g e 10g, e têm como componente principal as IgG, apesar de também conterem IgM e IgA, em quantidades que variam de acordo com o fabricante.

As imunoglobulinas específicas são aquelas que possuem altos títulos de anticorpos específicos – por exemplo, anti-hepatite B ou antitétano. São produzidas a partir de plasma humano hiperimune, ou seja, com altos títulos de determinados anticorpos. Podem ser usadas por via intravenosa ou intramuscular, dependendo do tipo de produto e do fabricante.

4 INDICAÇÕES PARA O USO DE IMUNOGLOBULINAS POLI-ESPECÍFICAS

4.1 Indicações formais

4.1.1 - Terapia de reposição

4.1.2 - Infecção recorrentes em crianças com aids

4.1.3- Prevenção da doença do enxerto contra hospedeiro e deinfecções em paciente submetidos a transplantes de medula óssea

4.1.4 - Doença de Kawasaki

4.1.5 - Púrpura trombocitopênica idiopática (PTI)

4.1.6 - Síndrome de Guillain Barré

4.1.7 - Trombocitopenia neonatal alo-imune

4.1.8 - Necrólise epidérmica bolhosa (Síndrome de Lyell)

3.3.2 Farmacopeia Brasileira

A Farmacopeia Brasileira 5ª Edição descreve as monografias dos seguintes tipos de Imunoglobulinas:

- Imunoglobulina humana contra a hepatite A
- Imunoglobulina humana contra a hepatite B
- Imunoglobulina humana contra a hepatite B para uso intravenoso
- Imunoglobulina humana contra a raiva
- Imunoglobulina humana contra a rubéola
- Imunoglobulina humana contra a varicela
- Imunoglobulina humana contra a varicela para uso intravenoso
- Imunoglobulina humana contra o antígeno D
- Imunoglobulina humana contra o sarampo
- Imunoglobulina humana contra o tétano
- Imunoglobulina humana normal
- Imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa

3.3.3 Consumo

O consumo de imunoglobulina no mundo chega a 90 toneladas por ano, podendo chegar a 100 toneladas, em 2012, segundo a *The Market Research Bureau Inc.* (MBR). No entanto, a produção atual da indústria farmacêutica não atende à demanda crescente pelo produto no mundo. No Brasil, o Ministério da Saúde importou 4 toneladas de imunoglobulina para o Sistema Único de Saúde (SUS) em 2009. Não se sabe exatamente a quantidade importada anualmente pelas empresas privadas para atender ao mercado nacional (HEMOBRAS, 2013).

Para fazer frente a uma demanda similar à inglesa (considerada a mais baixa da Europa Ocidental), e que é de 1,5 Kg/100.000 habitantes por ano (PENNY, 2002), o Brasil necessitaria processar pelo menos 600.000 litros de plasma, quantidade muito acima da oferta de plasma excedente de qualidade industrial do país. Desta forma, o Brasil continua a precisar da importação deste hemoderivado, tendo por isto que pagar os crescentes preços do mercado internacional de imunoglobulinas (entre 40 e 70 dólares por grama).

3.4 FATORES DE COAGULAÇÃO VIII E IX

O sangue humano no passado era utilizado no tratamento de distúrbios hemorrágicos e imunológicos mediante transfusão direta. Atualmente ele é submetido a processos de separação para a obtenção do plasma, que é uma rica fonte de proteínas humanas. O plasma é uma matéria-prima para a obtenção de uma gama de medicamentos, destacando-se os fatores de coagulação VIII (FVIII), fator de coagulação IX (FIX), fator de von Willebrand, fibrinogênio, selantes de fibrina, concentrado de complexo protrombínico.

A resolução RDC nº 23, da ANVISA de 24 de janeiro de 2002, proíbe a utilização de Crioprecipitado como fonte de reposição dos fatores de Coagulação VIII. Esta Resolução determina:

Constituem condições para indicação de uso de crioprecipitado:

I - repor fibrinogênio em pacientes com hemorragia e déficits isolados congênitos ou adquiridos de fibrinogênio, quando não se dispuser do concentrado de fibrinogênio industrial;

II - repor fibrinogênio em pacientes com coagulação intra-vascular disseminada - CID e graves hipofibrinogenemias;

III - repor Fator XIII em pacientes com hemorragias por déficits deste fator, quando não se dispuser do concentrado de Fator XIII industrial;

IV - repor Fator de von Willebrand em pacientes que não tem indicação de DDAVP ou não respondem ao uso do DDA VP, quando não se dispuser de concentrados de fator de von Willebrand ou de concentrados de Fator VIII ricos em multímeros de von Willebrand;

V - compor a fórmula da cola de fibrina autóloga para uso tópico.

Art. 2º Fica vedada a utilização de crioprecipitado para tratamento das Hemofilias e Doença de von Willebrand, salvo nas situações apontadas no item IV.

§ 1º Os serviços que prestam assistência à saúde aos portadores de coagulopatias hereditárias deverão manter estoque de fatores da coagulação compatível com a demanda do serviço.

§ 2º No caso de desabastecimento dos fatores da coagulação os serviços assistenciais deverão comunicar, por escrito, a falta destes ao órgão responsável pela distribuição dos hemoderivados na localidade.

Art. 3º O uso de crioprecipitado nos casos não previstos no Art. 1º, deverá ser comunicado à Vigilância Sanitária, na localidade onde ocorreu o fato, por meio de documento, conforme modelo anexo.

Art. 4º Para a transfusão de crioprecipitado em crianças, deve haver compatibilidade entre o anticorpo do sistema ABO presente no plasma do doador e os antígenos do mesmo sistema presentes nas hemácias da criança. Caso isto não seja possível, a ocorrência de hemólise deverá ser criteriosamente monitorada.

3.4.1 Fator da Coagulação Sanguínea VIII

O fator de coagulação sanguínea VIII (FVIII) Humana é uma glicoproteína plasmática não enzimática e tem função crítica na cascata de coagulação do sangue. FVIII é sintetizado no fígado, e é constituído por uma cadeia de polipeptídeo com 2332 aminoácidos, e estão organizadas em três principais domínios: um domínio de "A", que é repetido três vezes, o domínio de um centro de 'B' e 'C' domínio repetido duas vezes. Estes três principais domínios são acompanhados por três regiões de peptídeos ácidos pequenos. A primeira junta aos domínios A1 e A2 (com aminoácidos 337-372); outro junta ao domínio A2 (com aminoácidos 711-740); e o último uma liga o domínio B com o terminal amino do domínio A3 (com aminoácidos 1649-1689). O domínio B, que representa 40% da massa do FVIII, não tem nenhuma função reconhecida. O FVIII tem uma baixa atividade coagulante necessitando ser ativado pela trombina em seus sites de clivagem proteolítica específicas, para poder tomar parte na cascata de coagulação (D'AMICI, 2011).

A hemofilia A é uma doença hemorrágica hereditária grave comum que afeta 1 em cada 7.500 homens no mundo, ela é provocada por uma mutação no gene F8 no cromossomo X. Esta mutação provoca a diminuição ou mesmo a produção de FVIII sem atividade na cascata da coagulação do sangue. A infusão de plasma ou do hemoderivado fator coagulação fator FVIII (pdFVIII) ou do fator VIII recombinante (rFVIII) é o tratamento para hemorragia em pacientes hemofílicos A. O tratamentos de escolha para a hemofilia A é a administração de concentrados de FVIII, seja extraída a partir do plasma humano (hemoderivados) ou biosintetizados obtidos mediante uso de tecnologia de ADN recombinante (COPPOLA, 2009). Devido a fatores econômicos, esta terapia só está disponível para 30% dos pacientes no mundo. Para alcançar a profilaxia de doenças articulares incapacitantes e mesmo os sangramentos esporádicos, são necessárias várias aplicações semanais destes medicamentos (GRINGERI, 2003).

No entanto, após a administração de reposição com ambos pdFVIII e rFVIII, alguns pacientes têm desenvolvido anticorpos inibidores do FVIII (GRINGERI, 2003). Diante deste novo contexto, grupos de pesquisa em todo o mundo realizam estudos tentando identificar como o processo de purificação ou grau de pureza dos pdFVIII e rFVIII comerciais afeta a resposta imunológica nos medicamentos purificados por cromatográfica e eletroforética (TIMPERIO, 2010).

3.4.2 Fator da Coagulação Sanguínea IX

O fator de coagulação sanguínea IX (F IX) é uma glicoproteína de cadeia com peso molecular de aproximadamente 68.000 Dalton. É um fator de coagulação dependente de vitamina K e é sintetizado no fígado. Fator IX é ativado pelo fator XIa na via intrínseca da coagulação e pelo complexo do fator do tecido/fator VII na via extrínseca. Fator IX ativado, em combinação com fator VIII ativado, ativa o fator X. Fator X ativado converte protrombina à trombina. A trombina converte fibrinogênio em fibrina e o coágulo é formado.

A Hemofilia B é uma doença hereditária ligada ao sexo, que causa distúrbio da coagulação sanguínea devido aos níveis baixos de fator IX, que resulta em sangramento profuso nas articulações, músculos e nos órgãos internos. A reposição deste fator pode ser realizada mediante infusão de plasma fresco ou por meio da administração de FIX industrializado. A meia-vida biológica da molécula de FIX é de aproximadamente 20 horas. Nas apresentações comerciais, a concentração máxima é alcançada após 10 a 30 minutos.

O concentrado de FIX é indicado na terapia e profilaxia de episódios de sangramento decorrentes de deficiência congênita ou adquirida de fator IX (hemofilia B), hemofilia B com inibidor do fator IX, deficiência adquirida do fator IX devido ao desenvolvimento espontâneo do inibidor do fator IX (TIMPERIO, 2010).

3.4.3 Produção de Hemoderivados

A produção mundial de hemoderivados se iniciou na década de 40, nos Estados Unidos, quando Cohn, um químico norte-americano, desenvolveu um sistema de precipitação do plasma pelo etanol, capaz de originar uma fração proteica purificada rica em albumina. Desenrolava-se a segunda guerra mundial, e a albumina, um potente expansor do volume sanguíneo, muito útil para o tratamento imediato de hemorragias agudas, rapidamente se torna um produto estratégico (BRASIL, 2006).

Diversas empresas americanas começaram a produzir a albumina pelo método de Cohn, e a albumina, embora ainda tendo um custo de produção relativamente elevado, tornou-se um medicamento altamente popular (BRASIL, 2006).

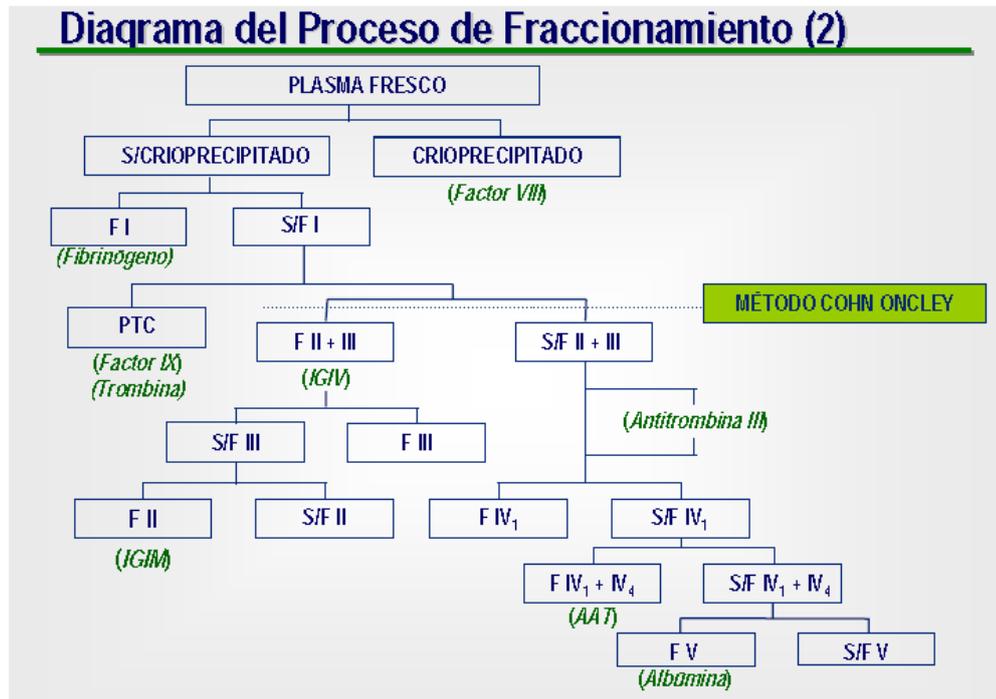
Nos anos 70, surgiu um segundo grande avanço na então incipiente indústria de hemoderivados: a possibilidade de obtenção de um concentrado de Fator VIII liofilizado purificado a partir do plasma humano. Este produto, assim como os concentrados de fatores

da coagulação dependentes de vitamina K, entre os quais se inclui o Fator IX, mudou radicalmente o tratamento dos hemofílicos, promovendo uma drástica diminuição nas taxas de morbidade e de mortalidade deste grupo de pacientes (BRASIL, 2006).

Nos anos 80, mais precisamente em 1982, porém, após a descoberta da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), começam a surgir casos de contaminação pelo vírus HIV em hemofílicos. Ficava evidente que a contaminação ocorrera devido à transfusão dos concentrados de fatores VIII ou IX. Este fato obrigou as indústrias de hemoderivados, já então numerosas, tanto nos EUA quanto na Europa, a implantar métodos para a inativação viral dos hemoderivados. O primeiro destes métodos foi o tratamento pelo calor, que foi rapidamente seguido pelo tratamento a partir do solvente-detergente. Com isto, a segurança viral dos hemoderivados passava a ser bastante grande, e era complementada pela triagem sorológica rigorosa do plasma utilizado na produção de hemoderivados, e pela aderência às boas práticas de fabricação (BRASIL, 2006).

No Século XXI, a indústria de hemoderivados passa por mais uma transformação: se nos seus primórdios, a albumina era o seu produto-chave, e se nos anos 80 e 90 a produção de Fator VIII era a força que movia a indústria, na primeira década deste século, as imunoglobulinas assumem o papel preponderante dentre todos os hemoderivados, transformando o Fator VIII e a albumina quase que em subprodutos do fracionamento do plasma, sobretudo porque a produção e a utilização de Fator VIII recombinante ganha cada vez mais mercado, substituindo o tradicional concentrado de Fator VIII plasmático (BRASIL, 2006). Apenas as empresas Baxter e Bayer produzem no mundo o FVIII recombinante.

Figura 5- Diagrama de uma planta para a produção de hemoderivados utilizando o método de Cohn



Fonte: Derivados Pasmáticos: História, Situação Actual y Tendencias, Grifos, Espanha

Legendas: F I-Fração I, S/F I – Sobrenadante Fração I, PTC- Precipitado, FII+III-Fração II e III, S/FII+III – Sobrenadante Fração II+Fração III, S/FIII – Sobrenadante Fração III, FII- fração II, S/FII – Sobrenadante Fração II, FIV – Fração IV, S/FIV – Sobrenadante Fração IV, FV-Fração V e S/FV – Sobrenadante Fração V)

3.5 NOVOS MEDICAMENTOS HEMODERIVADOS MODIFICADOS

3.5.1 Albumina Humana Peguilada

A instabilidade relacionada às proteínas, tanto estruturalmente quanto quimicamente, compromete a sua utilização em formulações como um agente terapêutico, isto se deve a um curto tempo de vida quando são submetidas a um estresse químico ou físico. Para melhorar a estabilidade de fármacos de origem proteica, foi desenvolvida uma modificação química em aminoácidos e proteínas denominada peguilação. Neste trabalho, a Albumina foi peguilada a uma molécula de Polietilenoglicol.

As razões para a peguilação de peptídeos e proteínas são numerosas e incluem diminuição da imunogenicidade e da degradação por enzimas do trato digestório e do plasma. A conjugação também aumenta o tamanho da estrutura do polipeptídeo, que deste modo reduzirá a filtração renal com conseqüente aumento no tempo de meia vida do fármaco (COSTA, 2010).

3.5.2 Nanoesferas de Albumina na Terapia Fotodinâmica e Magnetohipertermia

Nanoesferas de albumina estão sendo utilizadas como meio de transporte de fármacos e nanopartículas magnéticas. Devido as suas dimensões comparáveis às dos vírus (20-500 nm), proteínas (5-50 nm) ou até mesmo de um gene (2 nm), oferecem muitas possibilidades atrativas em biotecnologia. Uma delas, a de que quando administradas a um ser vivo, se movimentam mais facilmente no interior e a partir dos tumores. De forma geral, nanopartículas magnéticas menores que 10 nm são rapidamente eliminadas pelos rins. Porém partículas com diâmetro na faixa de 10 nm a 100 nm são consideradas ideais para as aplicações biomédicas, pois suas dimensões são compatíveis com sistemas biológicos, apresentando aspectos favoráveis à biodistribuição, além de responderem adequadamente a campos magnéticos (PORTILHO, 2011).

3.5.3 Fator Recombinante VII Ativado

O fator racombinante VII ativado (rFVIIa) é a forma recombinante do fator VII ativado, produzida a partir da clonagem do gene humano do fator VII (FVII) transfectado para rins de fetos de hamsters; o DNA recombinante é proteoliticamente convertido em sua forma ativa, cuja estrutura é muito semelhante a do FVII ativado intrínseco, e tem meia-vida de duas horas. Sua ação se baseia no conhecimento do mecanismo de coagulação in vivo, no qual o FVII intrínseco liga-se ao fator endotelial (FT), exposto no subendotélio após a injuria vascular, sendo ativado, resultando na ativação de fator IX (FIXa) e na formação de pequena quantidade de trombina (conversão de protrombina em trombina) que irá ativar fator V (FVa) e VIII (FVIIIa), assim como plaquetas acumuladas na superfície da lesão levando à ativação do fator X (FX) (VINCE, 2009).

Este medicamento vem sendo utilizado em pacientes portadores de inibidores de FVIII, adquiridos de forma natural ou através mediante uso do hemoderivado FVIII. Em 25% a 30% dos pacientes portadores de hemofilia grave que realizam terapia de reposição de FVIII desenvolvem anticorpos contra o FVIII. Estes anticorpos conseguem neutralizar a ação do FVIII. Não existe ainda uma explicação clara para o desenvolvimento desta resposta imunológica (WHELAN, 2013).

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 ESCOLHA DA METODOLOGIA PARA O EXPERIMENTO

A legislação atual recomenda que o plasma excedente do uso terapêutico, destinado ao fracionamento industrial, deva ser armazenado em temperatura igual ou inferior a 20°C negativos por até 12 meses, e quando armazenado em temperaturas iguais ou inferiores 30°C negativos o seu prazo de validade passa ser de 24 meses se coletados e congelados em até 24 horas. Neste estudo, estas duas temperaturas estocagem formaram utilizados como referências e comparada à estabilidade das proteínas plasmáticas quando estocadas em temperaturas diferentes das recomendadas. Formaram escolhidas as de temperaturas de 17°C negativos e 10°C negativos, a primeira por ser a mais comum encontrada em freses comerciais e a segunda por extrema (50% do valor da maior temperatura recomendada pela legislação atual).

O estudo foi realizado no período de outubro de 2012 a abril de 2013 na Fundação de Hematologia de Hemoterapia de Pernambuco (Hemope), de acordo com o aprovado pelo comitê de ética, em 29 de maio de 2012, mediante parecer 009/2012 e em 25 de setembro de 2013, mediante parecer 025/2013.

4.2.1 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.2.1 Coleta de Sangue

As amostras de Plasma Humano foram obtidas por meio da centrifugação do sangue, coletado de doadores voluntários, em bolsa plástica, marca Fresenius, tipo CPD SAG-Manitol, lote 71fd23ab00-10, com prazo de validade de março de 2014. Foi utilizado o anticoagulante e conservante CPD SAG-Manitol, que é constituído por ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose, glicose, manitol e adenina. Na composição de CPD SAG-Manitol, o fosfato, além de ser um importante substrato, também ajuda no controle do pH sanguíneo (KURUP et al., 2003). A adição de dextrose, glicose e manitol como fonte de energia, baseia-se no lento consumo desse carboidrato pelo metabolismo celular em baixas temperaturas, o que contribui, inclusive, com a manutenção de níveis adequados de ATP (AUTHEMENT et al., 1986). A adição de adenina está fundamentada no fato de que, com a queda do pH durante a conservação do sangue, há inativação de enzimas que participam da

via glicolítica, levando a um maior consumo de ATP. Essa adição de adenina promove um aumento do adenilato, que servirá de substrato para nova síntese de ATP, aumentando as reservas desse nucleotídeo no interior das células (AUTHEMENT et al., 1986; HÖGMAN et al., 2002). O citrato de sódio tem a função de quelante do cálcio no sangue.

O cálcio é necessário na cascata da coagulação e quando removido paralisa a série de eventos intrínseco e extrínseco responsáveis pelo fenômeno da coagulação. A conversão da pro-trombina em trombina e a ação da trombina no fibrinogênio formando a fibrina são inibidas.

A coagulação sanguínea é ativada após liberação do fator tecidual durante a lesão do vaso sanguíneo. O fator tecidual ativa o fator VII formando um complexo (FVII/FT), o qual é responsável pela ativação do fator X. Outra via de coagulação é a via intrínseca, que ocorre com a ativação do fator XII quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Tal processo é denominado "ativação por contato" e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O fator XII ativado ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado, na presença de fator VIII ativado por traços de trombina, e em presença de íons cálcio (complexo tenase), ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e, subsequentemente, a formação de fibrina (HOFFMAN, 2003).

4.2.2 Preparação das Amostras

Logo após a coleta de sangue, as bolsas foram enviadas ao Setor de Fracionamento, para o fracionamento do sangue total por meio de dois ciclos de centrifugação. No primeiro ciclo, ocorre a separação do concentrado de hemácias e do plasma rico em plaquetas. No segundo ciclo de centrifugação, as plaquetas são separadas do plasma. A partir do banco de dados SBS, os tipos sanguíneos das bolsas de sangue foram rapidamente identificadas e segregadas por tipo sanguíneo.

Foram selecionadas cinco (5) bolsas de plasma do tipo sanguíneo A, cinco (5) bolsas do tipo sanguíneo B e cinco (5) bolsas do tipo O, e só sendo utilizadas bolsas que se apresentavam límpidas, sem resquícios de hemácias, sem coágulos e com volume superior a 150 mL. A escolha dos tipos sanguíneos para a formação dos pools foi fundamentada nos polimorfismos do gene ABO e os níveis circulantes do Fator de von Willebrand (FVW) e

Fator VIII (FVIII). Indivíduos do grupo sanguíneo “O” apresentam, em média, níveis mais baixos de FVIII e FvW do que indivíduos dos outros grupos (PRESTON & BARR, 1964; FISCHER, 1995).

Os plasmas foram transferidos através de conexão estéril para três bolsas de transferência com capacidade de 300ml da marca Fresenius Kabi®, rotuladas respectivamente de Pool “A”, Pool “B” e Pool “O”. Os pools foram homogeneizados por dez minutos em agitador de Klaine. Em uma capela de fluxo laminar, os pools foram alicotados em tubo eppendorf com capacidade de 2,0ml. Cada pool foi distribuído em cento e doze tubos de eppendorf e estes acondicionados em estantes plásticas específicas para este tipo de tubo. Ao término do fracionamento, os tubos foram encaminhados para o congelamento rápido em blast freezer. O procedimento de congelamento seguiu as recomendações da Portaria 1353 de 2011 do Ministério da Saúde, onde o congelamento a - 30°C (30°C negativos) ocorreu em menos de 8 horas após a coleta do sangue.

Após o congelamento, cada pool foi dividido em quatro grupos com vinte tubos cada. Os tubos foram previamente rotulados com o tipo sanguíneo ABO, ao qual o pool pertence. Os grupos de tubos foram acondicionados em caixas estantes e foram assim distribuídas: Caixa 1 A, Câmara fria -30 C; Caixa 2 A, Câmara fria -20 C; Caixa 3 A, Freezer -17 C; Caixa 4 A, Freezer -10C; Caixa 1 B, Câmara fria -30 C; Caixa 2 B, Câmara fria -20 C; Caixa 3 B, Freezer -17 C; Caixa 4 B, Freezer -10C; Caixa 1 O, Câmara fria -30 C; Caixa 2 O, Câmara fria -20 C; Caixa 3 O, Freezer -17 C e Caixa 4 O, Freezer -10C.

O volume de 2,0 mL de plasma do tubo de eppendorff é suficiente para realizar todas as dosagens propostas nesta pesquisa. Com segurança, porém, em cada amostragem são utilizados dois tubos, onde o primeiro é utilizado para a dosagem do fator de coagulação VIII e o fator IX, o segundo para as dosagens de albumina e Imunoglobulinas totais. A cada trinta dias foram realizadas as análises, estas em duplicatas. Neste processo são utilizados dois tubos de eppendorff, e outros dois tubos são transferidos para um freezer a - 80C. Os tubos guardados no freezer a - 80C são as contraprovas, que poderão ser utilizadas para a repetição dos testes.

Algumas dosagens de fatores de coagulação VII e IX não puderam ser realizadas nas datas pré-estabelecidas neste projeto. Estas amostras foram acondicionadas em um freezer a - 80C – e mantidas lá até o momento da análise. O Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias da Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados Ministério da Saúde recomenda que amostras de plasma para dosagem de

Fator VIII sejam armazenadas por até seis anos em freezer com temperatura de - 70°C (BRASIL, 2010).

4.3 DOSAGEM DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Para as dosagens dos fatores de coagulação, foram adotada as recomendações do Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetarias da Coordenação Geral do Sangue e Hemoderivados, da Secretaria de Atenção a Saúde do Ministério da Saúde edição de 2010. Para as dosagens de albumina e as imunoglobulinas, foram adotadas as metodologias disponíveis nos laboratórios da Fundação Hemope e da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.3.1 Dosagem de Albumina

4.3.1.1 Fundamento

Ensaio de Espectrofotometria:

A dosagem de albumina humana nos pools de plasma, foi adotado o método do Bromocresol. A albumina presente na amostra reage com o verde de bromocresol em meio ácido, formando um complexo colorido que é quantificado espectrofotometricamente. A absorvância do complexo formado, medida entre 600 e 640 nm, é diretamente proporcional à concentração da albumina na amostra analisada.

Reagentes e equipamentos utilizados:

Foi utilizado o Kit da Labtest Diagnostica S.A., lote que foi quantificado em espectrofotômetro Micronal Modelo B442 entre 600 e 640nm. Foi utilizado o padrão que acompanha o kit em cada dosagem e confeccionada a curva de calibração para determinar a linearidade do teste.

4.3.2 Dosagem de Imunoglobulinas

4.3.2.1 Fundamento

Ensaio de Imunoturbidimétrico:

Os anticorpos Anti-IgG reagem com o as IgG da amostra, formando um complexo antígeno/anticorpo. A aglutinação resultante é medida por turbidimetria. A turbidez produzida pelos imunocomplexos é proporcional à concentração de Imunoglobulinas na amostra e pode ser lida com espectrofotômetro. A adição de PEG permite a progressão rápida da reação até ao final, aumenta a sensibilidade e reduz o risco de que amostras que contenham antígeno em excesso originem resultados falso-negativos.

Regentes e equipamento utilizado:

As amostras forma processadas em um analisador automatizado da marca Roche/Hitachi COBAS C501, utilizando-se o reagente (anti-IgG) do mesmo fabricante do equipamento do lote 6583401/01 com prazo de validade até novembro de 2014.

4.3.3 Dosagem de Coagulação Fator VIII

4.3.3.1 Fundamento

Método cromogênico:

A dosagem de Fator VIII é realizada pela determinação da atividade biológica do Fator VIII como um cofator na ativação do Fator X pelo Fator IX ativado (IXa) em presença de íons cálcio e de fosfolipídios. A atividade de uma preparação do Fator VIII é calculada por comparação das quantidades respectivas dessa preparação e do Padrão Internacional; ou de uma preparação de referência aferida em unidades internacionais que são necessárias para se obter uma determinada velocidade de formação do Fator Xa, num meio de reação contendo as diferentes substâncias que participam na ativação do Fator X.

O método de aferição colorimétrica consiste em duas etapas sucessivas: a ativação do Fator X sob a ação do Fator VIII numa mistura reativa de fatores de coagulação compostos de substâncias purificadas e a clivagem enzimática de um substrato cromogênico pelo Fator Xa, que libera um cromóforo quantificável por espectrofotometria. Em condições apropriadas de aferição há uma relação linear entre a velocidade de formação do Fator Xa e a concentração do Fator VIII.

Regentes e equipamento utilizado:

Nos testes foram utilizados os reagentes da marca Trinity Biotech T1508A, lote C188003 prazo de validade 13/06/2014, e utilizado o equipamento TCOAG modelo Destiny Plus.

4.3.4 Dosagem de Coagulação Fator IX

4.3.4.1 Fundamento

Método de um estágio.

O método é baseado na habilidade de uma amostra do plasma diluída encurtar o tempo de coagulação em um meio que adiciona plasma deficiente em fator IX, reagente para TTPA (fosfolipídio e ativador de contato) e cálcio. Devido a todos os fatores estarem em excesso em relação ao fator IX, o tempo de coagulação desta mistura é principalmente afetado pela atividade de fator VIII ou IX. Neste caso, o tempo de coagulação reflete o resultado em uma linha linear entre o tempo de coagulação (escala linear) e diluição do plasma padrão (escala logarítmica). Um importante pré-requisito para este ensaio é o paralelismo das diluições do calibrador com as diluições do plasma analisado.

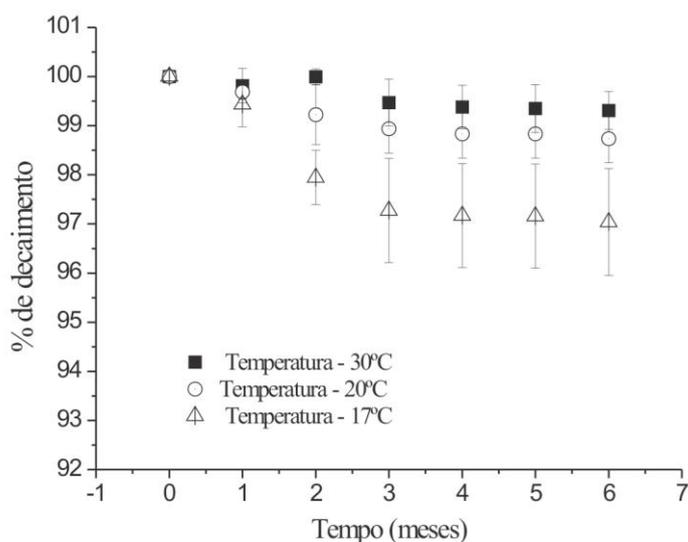
Reagentes e equipamento utilizado:

Nos testes foram utilizados os reagentes da marca Trinity Biotech T1508A, lote C153003 prazo de validade 10/06/2014, e utilizado o equipamento TCOAG modelo Destiny Plus.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se analisar, inicialmente, apenas as temperaturas de armazenamento sem levar em consideração o tipo sanguíneo, verifica-se que nas temperaturas de estocagem de -20°C e de -30°C as perdas de atividade do Fator de coagulação VIII foram pequenas, não sendo estatisticamente significativas quando tratadas por ANOVA, e velocidade de degradação seguiu a mesma ordem de reação em função do tempo de estocagem, bem como na temperatura de -17°C , em que a reação de decomposição do FVIII segue uma escala logarítmica, evidenciando uma reação de segunda ordem, dependente da concentração de dois substratos, representadas na figura 5.

Figura 6- Perfil de decaimento do Fator VII nas amostras armazenadas às temperaturas de -17°C , -20°C e -30°C

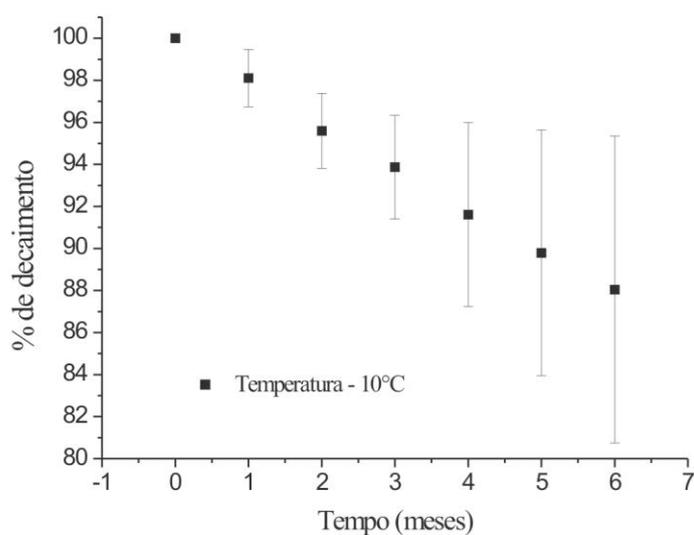


Na temperatura de estocagem de -17°C a perda de teor foi mais acentuada, estatisticamente significativa, porém teria uma influência pequena sobre a estocagem do Fator VIII, já que a partir do cálculo cinético de decomposição é possível prever que demorariam aproximadamente 3 anos para que o teor descaísse cerca de 10% (cálculo realizado a partir da equação: $\% = 2,9769 \cdot \exp^{-t/1,23} + 97,02$, gerada pela média das amostras para os três grupos sanguíneos avaliados). No armazenamento, para a temperatura de -17°C as perdas foram mínimas durante o período avaliado pelo presente estudo e não impossibilitam o uso do

plasma pelas indústrias fracionadoras. Porém, a legislação sanitária atual não permitiria tal uso, pois a temperatura de estocagem de -17°C é superior à temperatura recomendada.

O mesmo não foi observado na temperatura de estocagem de -10°C , em que a diminuição da atividade do FVIII foi bem acentuada, apresentando uma ordem de reação diferente das temperaturas de -17°C , -20°C e -30°C . Como pode ser observado na figura 6, o teor do FVIII decai linearmente quando armazenado a -10°C , o que indica uma reação de decomposição de ordem zero, isto é, independente da concentração dos substratos. Na realidade, a velocidade de decomposição não independe totalmente da concentração dos substratos, pelo contrário, reações de ordem zero, demonstram que a complexidade de fatores envolvidos é tamanha que nenhum substrato se destaca na via metabólica para ser tomado como fator limitante.

Figura 7- Perfil de decaimento do Fator VII nas temperaturas de -10°C



Esse fato não inviabiliza a utilização do plasma armazenado a -10°C , já que esta decomposição é lenta, gradual e linear com o tempo de estocagem. O prazo de validade (tempo para decaimento $\leq 10\%$) deste plasma é de 6 meses, de acordo com os dados obtidos neste estudo (cálculo realizado a partir da equação: $\% = -2,02 \cdot t + 99,91$, com coeficiente de correlação igual a 0,9979, gerada pela média das amostras para os três grupos sanguíneos avaliados), porém a legislação atual não recomenda o uso deste plasma como matéria-prima para a indústria de hemoderivados, o que poderia ser reavaliado pelos órgãos sanitários.

A influência do polimorfismo do gene ABO sobre os níveis plasmáticos de Fator VIII foi confirmada neste estudo, já que indivíduos do grupo O têm teores e atividades mais baixos do fator VIII que os demais grupos, conforme pode ser observado na tabela 1 que evidencia as quatro condições de armazenamento para os grupos separados em teores absolutos de % de FVIII nas amostras testadas.

Tabela 1- Atividade de Fator de Coagulação VIII nas diferentes temperaturas de armazenamento

Temperatura de Estocagem	Amostra	Tempo (meses)							Teor Final
		0	1	2	3	4	5	6	
- 30°C	Tipo A	113,3	112,7	113,2	112,2	112,1	112,0	112,1	98,9%
	Tipo B	95,8	95,7	95,8	95,3	95,2	95,2	95,1	99,3%
	Tipo O	86,4	86,5	86,6	86,4	86,3	86,3	86,2	99,7%
- 20°C	Tipo A	113,3	113,1	112,7	112,0	111,9	111,9	111,8	98,7%
	Tipo B	95,8	95,4	94,4	94,4	94,3	94,3	94,2	98,3%
	Tipo O	86,4	86,2	86,2	86,0	85,9	85,9	85,8	99,3%
- 17°C	Tipo A	113,3	112,1	110,4	109,4	109,3	109,4	109,1	96,2%
	Tipo B	95,8	95,5	93,6	92,7	92,6	92,5	92,4	96,4%
	Tipo O	86,4	86,3	84,6	83,7	83,6	83,5	83,5	96,6%
- 10°C	Tipo A	113,3	110,3	107,4	104,9	101,8	98,7	95,7	84,5%
	Tipo B	95,8	93,8	91,0	88,3	85,6	83,0	80,6	84,1%
	Tipo O	86,4	84,1	81,6	79,8	76,4	74,1	71,9	83,2%

A partir de estudos detectou-se a influência do polimorfismo do gene ABO sobre níveis do Fator VIII, e que de forma indireta este pode ser um fator redutor no tempo de estocagem do plasma destinado ao processamento industrial. Em virtude deste fato, foi calculada a cinética de degradação para cada temperatura e para cada grupo sanguíneo avaliado, descrito na tabela 2. Assim, é possível observar que o valor absoluto das constantes de degradação varia, porém a ordem da reação para os diferentes grupos sanguíneos se mantém a mesma indicando que as vias metabólicas ativadas para degradação do fator VIII são semelhantes, independente do tipo sanguíneo. O mesmo não é observado quando a variável é a temperatura de armazenamento, já que no caso da estabilidade do FVIII a temperatura não atua apenas como um agente catalizador, mudando apenas a velocidade da degradação, ela permite a ativação de diferentes vias metabólicas para degradação do fator VIII dependendo da temperatura de estocagem.

Tabela 2- Cálculo da cinética de degradação do fator VII nas diferentes temperaturas de armazenamento e grupos sanguíneos

Temperatura de Estocagem	Amostra	Equação	Fator de correlação
- 30°C	Tipo A	$\% = 1,49^{(-t/4,09)} + 98,47$	0,92
	Tipo B	$\% = 2,533^{(-t/15,34)} + 97,52$	0,91
	Tipo O	$\% = 0,79^{(-t/3,33)} + 100,17$	0,93
- 20°C	Tipo A	$\% = 1,84^{(-t/3,61)} + 98,25$	0,91
	Tipo B	$\% = 1,87^{(-t/1,72)} + 98,20$	0,92
	Tipo O	$\% = 0,96^{(-t/4,31)} + 99,02$	0,94
- 17°C	Tipo A	$\% = 4,02^{(-t/2,02)} + 95,95$	0,95
	Tipo B	$\% = 1,81^{(-t/1,71)} + 98,02$	0,91
	Tipo O	$\% = 4,57^{(-t/2,78)} + 95,77$	0,96
- 10°C	Tipo A	$\% = 100,01 - 2,57 \times t$	0,99
	Tipo B	$\% = 99,59 - 0,065 \times t$	0,97
	Tipo O	$\% = 100,12 - 2,83 \times t$	0,99

As demais proteínas plasmáticas não sofreram perdas de teor e/ou atividades estatisticamente significativas em nenhuma das condições neste estudo, comprovando a sua estabilidade em temperaturas superiores as recomendadas pela legislação atual (Tabelas 3, 4 e 5). Na tabela 3 verifica-se que a perda máxima de teor de fator XI foi em media de 0,1%, demonstrando a estabilidade térmica desta proteína ao modelo do estudo.

Tabela 3- Média dos resultados das dosagens do Fator de Coagulação IX (Valores em % de atividade)

Temperatura de Estocagem	Amostra	Tempo (meses)							Teor Final
		0	1	2	3	4	5	6	
- 30°C	Tipo A	96,8	96,8	96,7	96,7	96,8	96,7	96,7	99,9%
	Tipo B	97,1	97,1	97	97	97,1	97	97	99,9%
	Tipo O	101,1	101,1	101	101	101,1	101	101	99,9%
- 20°C	Tipo A	98,2	98,2	98,1	98,1	98,2	98,2	98	99,8%
	Tipo B	97,1	97,1	97	97	97,1	97	97	99,9%
	Tipo O	101,1	101,1	101	101	101,1	101	101	99,9%
- 17°C	Tipo A	96,8	96,8	96,7	96,8	96,8	96,7	96,7	99,9%
	Tipo B	97,1	97,1	97	97,1	97,1	97	97	99,9%
	Tipo O	101,1	101,1	101	101,1	101,1	101	101,3	100,2%
- 10°C	Tipo A	96,8	96,8	96,7	96,7	96,8	96,7	96,7	99,9%
	Tipo B	97,1	97,1	97	97	97,1	97	97	99,9%
	Tipo O	101,1	101,1	101	101	101,1	101	101,2	100,1%

Tabela 4- Média dos resultados das dosagens de imunoglobulinas (Valores em g/dL)

Temperatura de Estocagem	Amostra	Tempo (meses)							Teor Final
		0	1	2	3	4	5	6	
- 30°C	Tipo A	665	669	664	667	663	664	665	100,0%
	Tipo B	680	683	680	683	682	683	682	100,3%
	Tipo O	799	798	789	796	799	800	798	99,9%
- 20°C	Tipo A	665	669	669	670	665	667	666	100,2%
	Tipo B	680	680	683	680	683	682	683	100,4%
	Tipo O	799	799	798	799	798	789	796	99,6%
- 17°C	Tipo A	665	666	667	664	666	665	667	100,3%
	Tipo B	680	678	680	680	683	682	678	99,7%
	Tipo O	799	798	789	796	798	789	800	100,1%
- 10°C	Tipo A	665	666	665	665	663	664	664	99,9%
	Tipo B	680	679	683	680	683	682	681	100,2%
	Tipo O	799	798	789	796	798	789	796	99,6%

Tabela 5- Resultado das dosagens de albumina (Valores em g/dL)

Temperatura de Estocagem	Amostras	Tempo (meses)							Teor Final
		0	1	2	3	4	5	6	
- 30°C	Tipo A	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	100,0%
	Tipo B	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	100,3%
	Tipo O	4	4	3,9	4	4	4	4	99,9%
- 20°C	Tipo A	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	100,2%
	Tipo B	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	100,4%
	Tipo O	4	4	4	4	4	3,9	4	99,6%
- 17°C	Tipo A	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	100,3%
	Tipo B	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	99,7%
	Tipo O	4	4	3,9	4	4	3,9	4	100,1%
- 10°C	Tipo A	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	99,9%
	Tipo B	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	100,2%
	Tipo O	4	4	3,9	4	4	3,9	4	99,6%

6 CONCLUSÃO

O estudo mostrou estabilidade do Fator de Coagulação VIII está diretamente relacionada com a temperatura de estocagem do plasma fresco congelado, porém ela não é o único fator de degradação desta proteína. A velocidade de degradação pode passar a ser utilizada como fator limitador para plasmas estocados em temperaturas diferentes das propostas pela legislação atual

A estabilidade do Fator de Coagulação IX, da Albumina e das Imunoglobulinas não sofreu influência nas temperaturas de estocagem utilizadas neste estudo. Plasmas estocados em temperaturas superiores a -20C podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de hemoderivados.

A influência do polimorfismo ABO sobre a atividade do Fator de Coagulação VIII foi evidenciada no estudo. Atualmente só uma parte do plasma fresco coletado no Brasil é utilizado para a fabricação de hemoderivados, não há critério, além do sanitário, para definir quais bolsas de plasma serão utilizadas e quais serão descartadas. A utilização do polimorfismo ABO como segundo critério de escolha de forma imediata e direta aumentam o rendimento da produção de Fator VIII.

. No estudo foi evidenciado que apenas o fator de coagulação VIII sofre perda de teor quando o plasma é acondicionado em temperaturas superiores às recomendadas pela legislação, porém esta perda de atividade é gradual e pode ser estimada através de modelos estatísticos. A combinação de modelos estatísticos a estudos de viabilidade econômica poderia ser uma ferramenta a ser utilizada pela indústria fracionadora para um melhor aproveitamento do plasma estocado em temperaturas diferentes das regulamentadas. A utilização do plasma que não atenda aos requisitos para a produção de outros hemoderivados poderia ser uma estratégia para o aumento da oferta destes produtos nas instituições públicas de saúde.

Propõem-se novos estudos que subsidiem a reavaliação da legislação no que tange a liberação do plasma para a produção de hemoderivados, baseada em outros fatores, como prazo de validade versus temperatura de estocagem.

REFERÊNCIAS

- ADLIN, E.V. Edema and hypertension. In: KINNEY, J.M. JEEJEEBHOY, K.N.; HILL, G. L. & OWEN, O. E. **Nutrition and Metabolism in patient care**. Philadelphia, WB Saunders, 1988. p 455-64
- ANTUNES, S.V. et al. **Manual de tratamento das coagulopatias hereditárias**. Brasília: Ministério da Saúde: 2005, p. 1-39.
- ASHWOOD, C. R. **Tiretz: fundamentos de química clínica**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap. 18, p. 234-274.
- AUTHEMENT, J., WOLFSHEIMER, K., CATCHINGS, S., Canine blood component therapy: Product preparation, storage, and administration. **Journal of the American Animal Hospital Association** v.23, p.489–491, 1986.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, **Hemoderivados**. Rio de Janeiro, 2006.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução, RDC Nº 23**, de 24 de janeiro de 2002, Veta o uso de crioprecipitado para reposição de Fator VIII e Fator IX. Brasília, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução, RDC Nº 57** de 16 de dezembro de 2010. Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria** nº 1.353 de 13 de junho de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução - RDC Nº 115** de 10 de maio de 2004. Aprovar as Diretrizes para o uso de Albumina. Brasília, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Sangue e hemoderivados: produção hemoterápica**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados. 5. Ed. Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados. **Manual de diagnóstico laboratorial das coagulopatias hereditárias e plaquetopatias**. Brasília, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados. **Evidências Reveladoras do Bom Desempenho da Gestão**. Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Hemofílicos terão acesso a novo medicamento de alta tecnologia. **Portal Brasil – o nascimento da cidadania digital**. 08 de março de 2013. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2013/03/08/hemofilicos-terao-acesso-a-novo-medicamento-de-alta-tecnologia> Acesso em 15 de junho de 2013.

BURNOUF T. Plasma fractionation in Asia–Pacific: challenges and perspectives. *ISBT Sci Series*.2011;6:366–372. doi: 10.1111/j.1751-2824.

CFR 21, 2012. U.S. Code of Federal Regulations. Title 21, Part 640- **Additional standards for human blood and blood products**, Food and drug administration department of health and human services, Title 21, Volume 7, 2012.

COPPOLA, A., FRANCHINI, M., TAGLIAFERRI, A., *THROMB. HAEMOST.* 2009, 101, 674–681

COSTA, R.A. **Desenvolvimento e caracterização térmica do pegulado de albumina humana**. Dissertação de Mestrado, PPGCF, UFPE, 2010.

European Pharmacopoeia, 5th Edition. Strasbourg. Council of Europe. Supplement: 973, 2005.

D’AMICI, G.M.; BLASI, B.; D’ALESSANDRO, A.; VAGLIO, S. Plasma-derived clotting factor VIII: Heterogeneity evaluation in the quest for potential inhibitory-antibody stimulating factors. **Electrophoresis**, 2011, 32, 2941–2950.

European Pharmacopoeia, 5th Edition. Strasbourg. Council of Europe. Supplement: 973, 2005.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations. Additional standards for human blood and blood products. Food and drug administration department of health and human services, Title 21, Part 640, v. 7, 2012.

Farmacopeia Brasileira 5ª edição, volume II. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

FARRUGIA, A. CASSAR, J. Plasma derived medicines: access and usage issues. **Blood transfus.** 2012;10:273–8.

FRANCHINI, M.; TAGLIAFERRI, A.; MENGOLI, C.; CRUCIANI, M.; *CRIT. Rev. Oncol. Hematol.* 2011. DOI: 10.1016/j.critrevonc. 2011.01.002.

GRINGERI, A.; MANTOVANI, L. G.; SCALONE, L.; MANNUCCI, P. M.; *COCIS. Study Group Blood*, 2003, 102, 2358–2363.

HARRIS, L. J. et al. *Nature* 1992, 360, 369-372. © 2000

HEMOBRAS. Empresa Brasileira de Hemoderivados de Biotecnologia. Novo método para produção de imunoglobulina líquida é desenvolvido em Pernambuco. **Notícias**, 01 de junho de 2013. Disponível em:

<http://www.hemobras.gov.br/site/conteudo/noticia.asp?EditeCodigoDaPagina=369>

Acesso em 20 de junho de 2013.

HOFFMAN, M. A cell-base model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood Rev.** 2003;17(Suppl 1):S1-5.

HÖGMAN, C. F., KNUTSON, F., LÖÖF, H., PAYRAT, M.. Improved maintenance of 2,3-DPG and ATP in RBCs stored in a modified additive solution. **Transfusion**, v.42, n. 1, p.824-829, 2002.

ILLERT, W.E. et. al. Long-Term Storage of Fresh Frozen Plasma at -40°C . A Multicenter Study on the Stability of Labile Coagulation Factors over a Period of 3 Years, **Infusion Therapy and Transfusion Medicine**, Australia, 2001;28:189-194.

KANG, Y. Coagulopathies in hepatic disease. **Liver Transpl**, 6(4)S1: S72-S75, 2000.

KURUP, P. A. et al. Modified formulation of CPDA for storage of whole blood, and of SAGM for storage of red blood cells, to maintain the concentration of 2,3-diphosphoglycerate. **Vox Sanguinis**, v.85, p.253–261, 2003.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo, Ed. Sarvier, 2000. cap. 6 e 7, pg 1.134-195.

MYLLYLA G. Factors determining quality of plasma. **Vox Sanguinis**, 1998,**74**:507–51.

OHNISHI, T.; Mohamed, N. A. L.; Shibukawa, A.; Kuroda, Y.; Nakagawa, T.; El Gizawy, S.; Askal, H. F.; El Kommos, M E. Frontal analysis of drug–plasma lipoprotein binding using capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v 27: pp 607–614, 2002.

PENNY R. Intravenous immunoglobulin in Australia. Supply and demand. **Vox Sang**. 2002; 83 Suppl 1:447-51.

PORTILHO F.A., O uso de nanoesferas de albumina na terapia fotodinâmica e magnetohipertermia do tumor de ehrlich. Pós-graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 0000

ROMSCHILD, M.A.; ORATZ, M. & SCHREIBER, S.S. **Albumin synthesis**. N. Engl. J. Med- 286(14):748-57, 1972.

SILVA, D. G. K. C. e; Teodoro, G. M; Sena, L. V. de; Sousa, Z. M. de; Rezende, Perfil eletroforético de proteínas plasmáticas: estudo em crianças atendidas no Hospital de Pediatria - HOSPED/UFRN da cidade de Natal – RN. **Rev. bras. anal. clin.**, 37(4):239-242, out.-dez. 2005.

SILVERMAN, L.M., Christenson, R.H. Aminoácidos e proteínas. In: BURTIS, C.A. v. 23, n. 4, p. 108-119, 1998.

VINCE F.A.H, BRANDÃO M.J.N. uso de fator VII recombinante ativado para tratamento e profilaxia de grandes sangramentos. **ABCD Arq Bras Cir Dig**. 2009, 22(3):171-8.

WHELAN S.F.J. et al. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. **Blood**, 121 (2013), pp. 1039–1048.

ZAKAS P.M. et al. Development and Characterization of Recombinant Ovine Coagulation Factor VIII. **PLoS ONE** 7(11):, e49481. 2012, doi:10.1371/journal.pone.0049481

World Health Organization (WHO), Recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation WHO **Technical Report Series** No 941, 2007.

APÊNDICE

Estudo da estabilidade do plasma humano fresco congelado destinada a produção de hemoderivados.

Severino Borba de Andrade¹, Larissa Araújo Rolim² & Pedro José Rolim Neto^{2*}

¹HEMOPE – Diretoria de Hemoterapia – Departamento de Laboratórios – Laboratório de Imunohematologia

²Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Ciências Farmacêuticas – Laboratório de Tecnologia dos medicamentos, R. Prof. Artur de Sá, s/n. Cidade Universitária, Recife - Pernambuco, Brasil.

*Autor de correspondência: severino.borba@hemope.pe.gov.br

RESUMO

Plasma humano é a parte líquida remanescente do sangue total após separação das frações celulares sanguíneas, e é utilizado na produção de hemoderivados. Objetivou-se demonstrar a estabilidade das proteínas do plasma estocado, em temperaturas diferentes às das regulamentadas. Analisaram-se amostras estocadas a -10°C, -17°C, -20°C e -30°C. Aleatoriamente foram escolhidas cinco bolsas de plasma de cada um dos grupos sanguíneos O, A e B, formado um pool de cada grupo, congelados e armazenados. No período de outubro/2012 a abril/2013, foram analisadas as dosagens das proteínas plasmáticas. Observou-se que não houve perdas no teor Albumina, da Imunoglobulina nem da atividade do Fator de Coagulação IX. O Fator de Coagulação VIII (FVIII) apresentou perda de atividade estaticamente significativa quando estocado a -10°C, e a -17°C as perdas foram mínimas. Conclui-se que o plasma estocado a -17° pode ser utilizado para produção de hemoderivados, e a -10°C poderá ser utilizado, reduzindo o prazo de estocagem. A polimorfismo do gene ABO sobre níveis do Fator VIII, de forma indireta, pode ser uma ferramenta a ser utilizada

para o melhor aproveitamento e rendimento do plasma processado. Propõe-se uma revisão nas legislações atuais, no que tange a liberação do plasma para produção de hemoderivados.

Palavras Chaves: Estabilidade, FatorVIII, Polimorfismo, Hemoderivado e Fracionamento.

ABSTRACT

Human plasma is the liquid portion of whole blood remaining after separation of blood cell fractions and used in the production of blood products. Aimed to demonstrate the stability of plasma proteins stored in different temperatures at regulated. Samples were analyzed stored at -10°C - 17°C - 20°C and - 30°C. Five bags were randomly chosen from the plasma of blood groups A and B formed a pool divided into four subgroups, frozen and stored. In the period of the October/2012 to April/2013, analyzed the strengths of plasma proteins. It was observed that there was no loss in content or activity of albumin, immunoglobulin and coagulation factor IX. Coagulation Factor VIII (FVIII) showed statistically significant loss of activity when stored at -10°C, and -17°C the losses were minimal. It is concluded that the plasma stored at -17 ° can be used for the production of blood products and -10 ° C can be used, reducing the time validity for eight months. The ABO gene polymorphism on levels of Factor VIII can be a tool to be used for better utilization and yield of processed plasma. We propose a revision in the current legislation, regarding the release of plasma for production of blood products.

Key-words: Stability, Factor VIII, Estabilidade, FatorVIII, Polymorphism, blood product and Fractionation.

INTRODUÇÃO

O sangue humano no passado era utilizado no tratamento de distúrbios hemorrágicos e imunológicos através da transfusão direta. Atualmente ele é submetido a processos de separação para a obtenção do plasma, que é uma rica fonte de proteínas humanas. O plasma é uma matéria-prima para a obtenção de uma gama de medicamentos, destacando-se os fatores de coagulação VIII (FVIII), fator de coagulação IX (FIX), fator de von Willebrand, fibrinogênio, selantes de fibrina, concentrado de complexo protrombínico, albumina e imunoglobulinas. Os medicamentos obtidos pelo processamento (fracionamento) são denominados “Hemoderivados”, e o plasma utilizado como matéria-prima de “Plasma humano para fracionamento” (F. Bras., 2010).

A Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição, define:

Plasma humano para fracionamento como a parte líquida remanescente do sangue total após separação das frações celulares sanguíneas, utilizando sistema fechado de coleta de sangue apropriado que cumpra os requisitos exigidos para os recipientes de plásticos utilizados na coleta do sangue humano, contendo uma solução anticoagulante conservadora e preservadora ou separada por filtração contínua ou por centrifugação do sangue anticoagulado no procedimento de aférese para obtenção de produtos derivados do plasma humano (F. Bras., 2010).

Cerca de 30 milhões de litros de plasma são coletados e fracionados por ano em todo o mundo (BURNOUF, 2011). Os países com maior capacidade de produção e fracionamento estão localizados na América do Norte, Europa e Sudeste Asiático. Atualmente, setenta e cinco por cento de plasma utilizado no fracionamento é obtido por plasmaférese e, na sua maioria, obtidos de doações remuneradas. Países da Europa, como a Inglaterra, importam todo o plasma que precisam dos Estados Unidos. A maioria dos pacientes com distúrbios de coagulação, deficiências imunológicas e doenças auto-imunes que vivem em países pobres na África, Ásia, América do Sul e Central e não têm acesso adequado a medicamentos eficazes e

seguros, como os hemoderivados. Nestes países são realizadas transfusões de componentes do sangue, como o plasma e o crioprecipitado, como forma de tratamento (FARRUGIA, 2012). Em nosso país a lei 10.205 de 2001, vedada a doação ou exportação de sangue, componentes e hemoderivados, exceto em casos de solidariedade internacional ou quando houver excedentes nas necessidades nacionais em produtos acabados (BRASIL, 2001).

Atualmente, no Brasil, não há indústrias fracionando o plasma, o que levou as autoridades do país a firmar contrato (Contrato nº 77/2007 do Departamento de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Ciência) com a empresa Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB) para o processamento, através do fracionamento, dos componentes do plasma excedente brasileiro. No ano de 2010 as coletas de sangue no Brasil somaram-se 3.627.529 e, destas, foram produzidas 1.256.938 bolsas de plasma (251.388 mil litros), das quais 239.889 foram descartadas e só 351.769 bolsas foram fracionadas pela LFB para processamento. A LFB produziu com este plasma 12.191.760 UI de Concentrado de Fator VIII, 20.449.582 UI de Concentrado de Fator IX, 2.371.739 gramas de albumina e 484.920 gramas de imunoglobulina. O Programa Segurança Transfusional e Qualidade do Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde distribuiu neste mesmo ano 255.328.250 UI de Fator VIII. O contrato de fracionamento só conseguiu atender a 12,48% do quantitativo necessário para o tratamento dos hemofílicos no Brasil (BRASIL, 2011).

Os parâmetros para estocagem do plasma humano congelado, destinado ao fracionamento, no Brasil, são definidos pela legislação (Farmacopeia Brasileira 5º edição, Resolução RDC nº 57 de 16 de dezembro de 2010 e Portaria Nº 1.353 de 13 de junho de 2011). A Portaria Nº 1.353 e Farmacopeia Brasileira recomendam que o plasma seja estocado a temperaturas inferiores a -20 °C, porém a Farmacopeia permite que durante a estocagem, ou durante o transporte, estas temperaturas podem ser superiores, ela também afirma que

plasmas, com valores inferiores a 0,7 UI/mL de Fator de Coagulação VIII, quando produzidos com Boas Práticas, podem ser usados no fracionamento industrial de proteínas.

Atualmente a Farmacopeia Europeia recomenda congelar o plasma em até 24 horas após a coleta, em uma temperatura inferior a -30°C quando se planeja produzir Fator VIII, e conservá-lo a -20°C . Se a temperatura atingir -15°C durante um intervalo de tempo de até 72 horas, este ainda pode ser utilizado. Porém se a temperatura de estocagem atingir -5°C este plasma não pode ser fracionado. Esta recomendação garante a qualidade do plasma destinado ao fracionamento para a produção de Fator VIII. O congelamento a -30°C garante a completa solidificação do plasma (Ph.Eur, 2005).

O FDA, através do Code of Federal Regulations, recomenda que o plasma, destinado à fabricação de hemoderivados, deve ser armazenado a -20°C e quando exposto a temperaturas superiores a -20°C e inferiores a 10°C seja rotulado como “plasma fresco fonte recuperado”. O plasma, quando exposto a temperaturas superiores a -20°C e inferiores a -5°C , em um intervalo de tempo inferior a 72 horas pode ser utilizado na fabricação de hemoderivados, mas o registro desta não conformidade deve estar disponível e ser apresentado quando solicitado à indústria fracionadora (FDA, 2012).

Na Austrália, como não havia estudos definindo qual era a temperatura ideal para estocar o plasma por períodos mais longos, no período de 1998 a 2001 foi realizado um estudo multicêntrico nos laboratórios de controle de qualidade de sete Serviços de Hemoterapia da Cruz Vermelha. Os plasmas foram estocados a temperatura média de -40°C (entre -38°C e -42°C). Ao final do terceiro ano de estocagem as perdas de atividade dos fatores de coagulação foram avaliadas e foi observado que não houve perda estatisticamente significativa na atividade para o Fator de Coagulação XI e da Antitrombina (AT III), em comparação com os valores iniciais, 101,5 % para Fator XI (perda de Fator XI = 0,17) e de 101 % para a AT III (perda de AT III = 0,66). A perda de atividade do Fator de Coagulação

V (FV) foi de 0,6 % e o de Fator de Coagulação VIII (FVIII) foi de 9 %. Ambos os resultados indicam uma redução estatisticamente significativa (teste t: PFV = 0,048 ; pFVIII : C = 0,033), porem a atividade final dos fatores eram superior a 70% da atividade inicial, índice este aceitável para uso (ILLERT, 2001).

Devido às limitações definidas na legislação atual, só uma parte do plasma produzido no Brasil é utilizado para o fracionamento industrial e produção de hemoderivados. Estudos que mostrem a estabilidade do plasma humano e de suas proteínas em temperaturas superiores a -20°C poderão aumentar o aproveitamento do plasma produzido no Brasil, reduzir gastos com energia elétrica na cadeia do frio e reduzir o descarte anual de milhares de bolsas de plasma humano. O aumento do aproveitamento não tornará o Brasil autossuficiente na produção de hemoderivados, mas poderá aumentar o índice de aproveitamento de plasma produzido a curto prazo sem a necessidade de grandes investimentos.

Este estudo tem como objetivo identificar a temperatura máxima de estocagem do plasma humano destinado à produção de hemoderivados sem que haja perdas significativas de proteínas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta, fracionamento e preparação das amostras

Foram selecionadas cinco (5) bolsas de plasma do tipo sanguíneo A, cinco (5) bolsas do tipo sanguíneo B e cinco (5) bolsas do tipo O no setor de fracionamento de sangue da Fundação de Hematologia de Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) de acordo com o aprovado pelo comitê de ética, em 29 de maio de 2013, através do parecer 009/2013 e em 25 de agosto de 2013 pelo parecer 25/2013, para adequação ao novo título da pesquisa. As amostras de Plasma Humano (PH) foram obtidas de através da centrifugação do sangue,

coletado de doadores voluntários, em bolsa plástica, marca Fresenius, tipo CPD SAG-Manitol, lote 71fd23ab00-10, com prazo de validade de março de 2014. Foi utilizado o anticoagulante e conservante CPD SAG-Manitol que é constituído por ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose, glicose, manitol e adenina (KURUP, 2003)

Logo após a coleta o sangue foi fracionado, através de dois ciclos de centrifugação. No primeiro ciclo, a 2.600 rotações por minuto (RPM), a temperatura de 20 °C por 6 minutos, ocorre a separação do concentrado de hemácias e o plasma rico em plaqueta. No segundo ciclo de centrifugação, 3.500 RPM, a temperatura de 20 °C por 7 minutos as plaquetas são separadas do plasma em centrífugas refrigeradas, Marca Sarval, Modelo RC 3CPI. Após esta etapa, através do banco de dados do SBS SISTEMAS E ADMINISTRAÇÃO, os tipos sanguíneos das bolsas de sangue foram rapidamente identificadas, segregadas por tipo e rotuladas respectivamente de Pool “A”, Pool “B” e Pool “O”. A escolha dos tipos sanguíneos para a formação dos pools, foi fundamentada no polimorfismos do gene ABO e os níveis circulantes do Fator de Von Willebrand (FVW) e Fator VIII (FVIII). Indivíduos do grupo sanguíneo “O” apresentam, em média, níveis mais baixos de FVIII e FVW do que indivíduos dos outros grupos (PRESTON & BARR, 1964; SIMON, 2003).

Os pools foram homogeneizados por dez minutos em agitador de Klaine Evilab, modelo EV:07-E. Em uma capela de fluxo laminar, os pools foram fracionados em alíquotas de 2,0 mL. Ao término do fracionamento as alíquotas foram encaminhadas para o congelamento rápido em blast freezer ACFRI, modelo Type Machine CP20/RL V0706, conforme recomenda o Ministério da Saúde (Portaria n 1353 de 2011), utilizando menos de 6 horas depois da coleta para a separação do plasma fresco, garantindo que o mesmo seja congelado (-30°C) completamente em até 8 horas após coleta.

Após o congelamento as amostras foram separadas em câmaras frias ou freezer para avaliação da temperatura de armazenamento no teor e/ou atividade das proteínas plasmáticas.

Foram avaliadas quatro diferentes temperaturas (Câmara fria a -30°C , Câmara fria a -20°C , Freezer a -17°C e Freezer a -10°C) mantendo a segregação por grupo sanguíneo.

A cada trinta dias, durante o período de seis meses foram retiradas das câmaras e freezers quatro amostras de cada um dos pools. Destas duas foram enviadas aos laboratórios para análise e as demais guardadas em um freezer a -80°C como contraprovas e que poderão ser utilizadas para a repetição dos testes. O Ministério da Saúde, Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados, afirma através do Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias, que as amostras de plasma para dosagem de Fator VIII podem ser armazenadas por até seis anos em freezer com temperatura de -70°C (BRASIL, 2012).

Dosagem de Albumina

Para a dosagem da albumina humana nos pools de plasma foi adotado o método do Bromocresol. A albumina presente nas amostras reagiu com o verde de bromocresol em meio acidificado formando um complexo colorido. Foi utilizado o Kit da Labtest Diagnostica S.A., lote que foi quantificado em espectrofotômetro Micronal Modelo B442 entre 600 e 640 nm. Foi utilizado o padrão que acompanha o kit em cada dosagem e confeccionada a curva de calibração para determinar a linearidade do teste.

Dosagem de Imunoglobulinas

O método utilizado para o doseamento de imunoglobulinas foi a turbidimetria, em que a turbidez produzida pelos imunocomplexos antígeno-anticorpo formados por Anti-Imunoglobulina G (IgG) humana e Imunoglobulina G da amostra é proporcional à concentração de imunoglobulinas nas amostras. As amostras foram processadas em um analisador automatizado da marca Roche/Hitachi COBAS C501 utilizando-se o reagente

(anti-IgG) do mesmo fabricante do equipamento do lote 6583401/01 com prazo de validade até novembro de 2014.

Dosagem do Fator de Coagulação VIII

O método de doseamento do fator de coagulação VIII é o coagulométrico de um estágio, o qual é baseado na capacidade em uma amostra de plasma diluída encurtar o tempo de coagulação em um meio que constituído por plasma deficiente em fator VIII, fosfolipídio, ativador de contato e cálcio.

Devido a todos os fatores estarem em excesso em relação ao fator VIII, o tempo de coagulação desta mistura é afetado, principalmente, pela atividade de fator VIII. Neste caso, o tempo de coagulação reflete o resultado em uma linha linear entre o tempo de coagulação (escala linear) e diluição do plasma padrão (escala logarítmica). Nos testes foram utilizados os reagentes da marca Trinity Biotech T1508A, lote C188003 prazo de validade 13/06/2014, e utilizado o equipamento TCOAG modelo Destiny Plus.

Dosagem do Fator de Coagulação IX

O método de doseamento do fator de coagulação IX é o coagulométrico de um estágio, o qual é baseado na capacidade em uma amostra de plasma diluída encurtar o tempo de coagulação em um meio que constituído por plasma deficiente em fator IX, fosfolipídio, ativador de contato e cálcio.

Devido a todos os fatores estarem em excesso em relação ao fator IX, o tempo de coagulação desta mistura é afetado, principalmente, pela atividade de fator IX. Neste caso, o tempo de coagulação reflete o resultado em uma linha linear entre o tempo de coagulação (escala linear) e diluição do plasma padrão (escala logarítmica). Nos testes foram utilizados os

reagentes da marca Trinity Biotech T1508A, lote C153003 prazo de validade 10/06/2014, e utilizado o equipamento TCOAG modelo Destiny Plus.

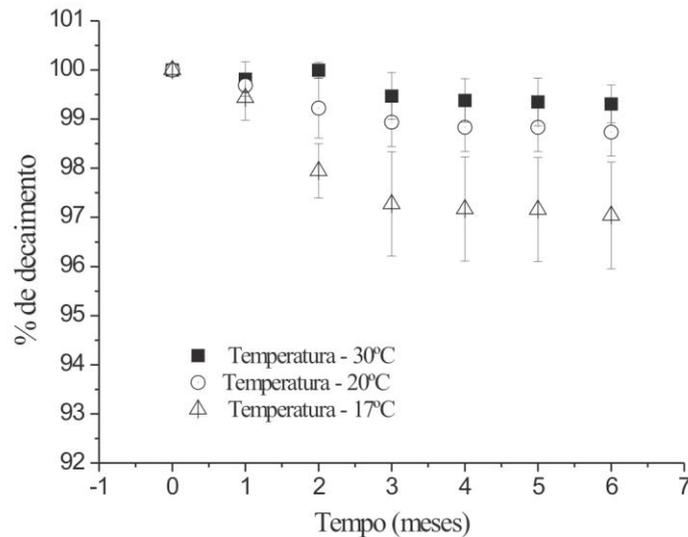
Tratamento Estatístico

Para o tratamento estatístico e cálculo das cinéticas de decomposição dos componentes do plasma sanguíneo foi utilizado o software Originlab 8.0®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisarmos, inicialmente, apenas as temperaturas de armazenamento sem levar em consideração o tipo sanguíneo, verificamos que nas temperaturas de estocagem de -20°C e de -30°C as perdas de atividade do Fator de coagulação VIII, foram pequenas não sendo estatisticamente significativas quando tratadas por ANOVA, e velocidade de degradação seguiu a mesma ordem de reação em função do tempo de estocagem, bem como, na temperatura de - 17°C, em que a reação de decomposição do FVIII segue uma escala logarítmica evidenciando uma reação de segunda ordem, dependente da concentração de dois substratos, representadas na figura 1.

Figura 1. Perfil de decaimento do Fator VII nas amostras armazenadas às temperaturas de -17°C, - 20°C e - 30°C.

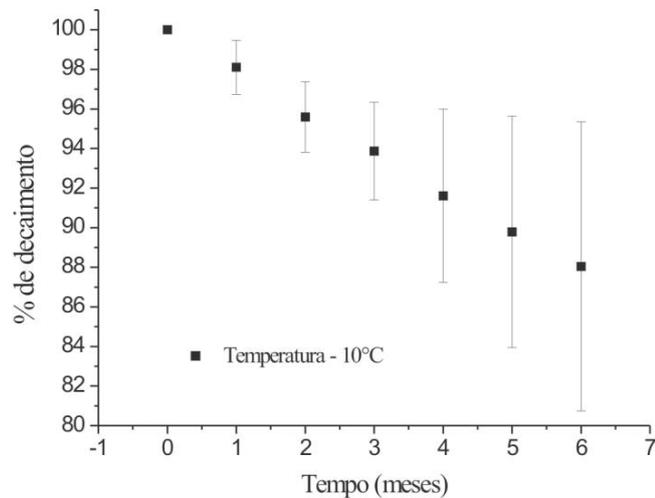


Na temperatura de estocagem de -17°C a perda de teor foi mais acentuada, estatisticamente significativa, porém teria uma influencia pequena sobre a estocagem do Fator VIII, já que a partir do cálculo cinético de decomposição é possível prever que demoraria aproximadamente 3 anos para que o teor descaísse cerca de 10% (cálculo realizado a partir da equação: $\% = 2,9769 \cdot \exp(-t/1,23) + 97,02$, gerada pela média das amostras para os três grupos sanguíneos avaliados). No armazenamento a temperatura de -17°C as perdas foram mínimas durante o período avaliado pelo presente estudo e não impossibilitam o uso do plasma pelas indústrias fracionadoras. Porém, a legislação sanitária atual não permitiria tal uso, pois a temperatura de estocagem de -17°C é superior a temperatura recomendada.

O mesmo não foi observado na temperatura de estocagem de -10°C, em que a diminuição da atividade do FVIII foi bem acentuada, apresentando uma ordem de reação diferente das temperaturas de -17°C, - 20°C e - 30°C. Como pode ser observado na figura 2 o teor do FVIII decai linearmente quando armazenado a -10°C, o que indica uma reação de decomposição de ordem zero, isto é, independente da concentração dos substratos. Na

realidade, a velocidade de decomposição não independe totalmente da concentração dos substratos, pelo contrário, reações de ordem zero, demonstram que a complexidade de fatores envolvidos é tamanha que nenhum substrato se destaca na via metabólica para ser tomado como fator limitante.

Figura 2. Perfil de decaimento do Fator VII nas temperaturas de -10°C .



Esse fato não inviabiliza a utilização do plasma armazenado a -10°C , já que esta decomposição é lenta, gradual e linear com o tempo de estocagem. O prazo de validade (tempo para decaimento $\leq 10\%$) deste plasma é 6 meses, de acordo com os dados obtidos neste estudo (cálculo realizado a partir da equação: $\% = -2,02 \cdot t + 99,91$), com coeficiente de correlação igual a 0,9979, equação gerada pela média das amostras para os três grupos sanguíneos avaliados), porém, a legislação atual não recomenda o uso deste plasma como matéria-prima para na indústria de hemoderivados, o que poderia ser reavaliado pelos órgãos sanitários.

A influência do polimorfismo do gene ABO sobre os níveis plasmáticos de Fator VIII foi confirmada neste estudo, já que, indivíduos do grupo O tem teores e atividades mais baixos do fator VIII que os demais grupos, conforme pode ser observado na tabela 1 que

evidencia as quatro condições de armazenamento para os grupos separados em teores absolutos de % de FVIII nas amostras testadas.

Tabela 1. Atividade de Fator de Coagulação VIII nas diferentes temperaturas de armazenamento.

Temperatura de Estocagem	Amostra	Tempo (meses)							Teor Final
		0	1	2	3	4	5	6	
- 30°C	Tipo A	113,3	112,7	113,2	112,2	112,1	112,0	112,1	98,9%
	Tipo B	95,8	95,7	95,8	95,3	95,2	95,2	95,1	99,3%
	Tipo O	86,4	86,5	86,6	86,4	86,3	86,3	86,2	99,7%
- 20°C	Tipo A	113,3	113,1	112,7	112,0	111,9	111,9	111,8	98,7%
	Tipo B	95,8	95,4	94,4	94,4	94,3	94,3	94,2	98,3%
	Tipo O	86,4	86,2	86,2	86,0	85,9	85,9	85,8	99,3%
- 17°C	Tipo A	113,3	112,1	110,4	109,4	109,3	109,4	109,1	96,2%
	Tipo B	95,8	95,5	93,6	92,7	92,6	92,5	92,4	96,4%
	Tipo O	86,4	86,3	84,6	83,7	83,6	83,5	83,5	96,6%
- 10°C	Tipo A	113,3	110,3	107,4	104,9	101,8	98,7	95,7	84,5%
	Tipo B	95,8	93,8	91,0	88,3	85,6	83,0	80,6	84,1%
	Tipo O	86,4	84,1	81,6	79,8	76,4	74,1	71,9	83,2%

Através do estudo detectou-se a influência do polimorfismo do gene ABO sobre níveis do Fator VIII, e que de forma indireta este pode ser um fator redutor no tempo de estocagem do plasma destinado ao processamento industrial. Em virtude deste fato foi calculado a cinética de degradação para cada temperatura e para cada grupo sanguíneo avaliado, descrito na tabela 2. Assim, é possível observar que o valor absoluto das constantes de degradação variam, porém a ordem da reação para os diferentes grupos sanguíneos se mantem a mesma indicando que as vias metabólicas ativadas para degradação do fator VIII são semelhantes independente do tipo sanguíneo. O mesmo não é observado quando a variável é a temperatura de armazenamento, já que no caso da estabilidade do FVIII a temperatura não atua apenas como um agente catalizador, mudando apenas a velocidade da degradação, ela permite a

ativação de diferentes vias metabólicas para degradação do fator VIII dependendo da temperatura de estocagem.

Tabela 2. Cálculo da cinética de degradação do fator VII nas diferentes temperaturas de armazenamento e grupos sanguíneos.

Temperatura de Estocagem	Amostra	Equação	Fator de correlação
- 30°C	Tipo A	$\% = 1,49^{(-t/4,09) + 98,47}$	0,92
	Tipo B	$\% = 2,533^{(-t/15,34) + 97,52}$	0,91
	Tipo O	$\% = 0,79^{(-t/3,33) + 100,17}$	0,93
- 20°C	Tipo A	$\% = 1,84^{(-t/3,61) + 98,25}$	0,91
	Tipo B	$\% = 1,87^{(-t/1,72) + 98,20}$	0,92
	Tipo O	$\% = 0,96^{(-t/4,31) + 99,02}$	0,94
- 17°C	Tipo A	$\% = 4,02^{(-t/2,02) + 95,95}$	0,95
	Tipo B	$\% = 1,81^{(-t/1,71) + 98,02}$	0,91
	Tipo O	$\% = 4,57^{(-t/2,78) + 95,77}$	0,96
- 10°C	Tipo A	$\% = 100,01 - 2,57 \times t$	0,99
	Tipo B	$\% = 99,59 - 0,065 \times t$	0,97
	Tipo O	$\% = 100,12 - 2,83 \times t$	0,99

As demais proteínas plasmáticas não sofreram perdas de teor e/ou atividades estatisticamente significativas em nenhuma das condições neste estudo, comprovando a sua estabilidade em temperaturas superiores as recomendadas pela legislação atual (Tabelas 3, 4 e 5). Na tabela 3 verifica-se que a perda máxima de teor de fator XI foi em media de 0,1%, demonstrando a estabilidade térmica desta proteína ao modelo do estudo.

Tabela 3. Média dos resultado das dosagens dos demais componentes:

Fator de Coagulação IX (Valores em % de atividade); imunoglobulinas (Valores em g/dL) e albumina (Valores em g/dL).

Temperatura de Estocagem	Proteína	Amostra	Tempo (meses)						Teor Final	
			0	1	2	3	4	5		6
- 30°C	FIX Atividade (%)	Tipo A	96,8	96,8	96,7	96,7	96,8	96,7	96,7	99,9%
		Tipo B	97,1	97,1	97	97	97,1	97	97	99,9%
		Tipo O	101,1	101,1	101	101	101,1	101	101	99,9%
	Imunoglobulinas (Valores em g/dL).	Tipo A	665	669	664	667	663	664	665	100,0%
		Tipo B	680	683	680	683	682	683	682	100,3%
		Tipo O	799	798	789	796	799	800	798	99,9%
	Albumina (Valores em g/dL).	Tipo A	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	100,0%
		Tipo B	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	100,3%
		Tipo O	4	4	3,9	4	4	4	4	99,9%
- 20°C	FIX Atividade (%)	Tipo A	98,2	98,2	98,1	98,1	98,2	98,2	98	99,8%
		Tipo B	97,1	97,1	97	97	97,1	97	97	99,9%
		Tipo O	101,1	101,1	101	101	101,1	101	101	99,9%
		Tipo A	665	669	669	670	665	667	666	100,2%
		Tipo B	680	680	683	680	683	682	683	100,4%
		Tipo O	799	799	798	799	798	789	796	99,6%
	Albumina (Valores em g/dL).	Tipo A	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	100,2%
		Tipo B	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	100,4%
		Tipo O	4	4	4	4	4	3,9	4	99,6%
- 17°C	FIX Atividade (%)	Tipo A	96,8	96,8	96,7	96,8	96,8	96,7	96,7	99,9%
		Tipo B	97,1	97,1	97	97,1	97,1	97	97	99,9%
		Tipo O	101,1	101,1	101	101,1	101,1	101	101,3	100,2%
	Imunoglobulinas (Valores em g/dL).	Tipo A	665	666	667	664	666	665	667	100,3%
		Tipo B	680	678	680	680	683	682	678	99,7%
		Tipo O	799	798	789	796	798	789	800	100,1%
	Albumina (Valores em g/dL).	Tipo A	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	100,3%
		Tipo B	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	99,7%
		Tipo O	4	4	3,9	4	4	3,9	4	100,1%
- 10°C	FIX Atividade (%)	Tipo A	96,8	96,8	96,7	96,7	96,8	96,7	96,7	99,9%
		Tipo B	97,1	97,1	97	97	97,1	97	97	99,9%
		Tipo O	101,1	101,1	101	101	101,1	101	101,2	100,1%
	Imunoglobulinas (Valores em g/dL).	Tipo A	665	666	665	665	663	664	664	99,9%
		Tipo B	680	679	683	680	683	682	681	100,2%
		Tipo O	799	798	789	796	798	789	796	99,6%
	Albumina (Valores em g/dL).	Tipo A	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	99,9%
		Tipo B	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	100,2%
		Tipo O	4	4	3,9	4	4	3,9	4	99,6%

CONCLUSÃO

O estudo mostrou estabilidade do Fator de Coagulação VIII está diretamente relacionada com a temperatura de estocagem do plasma fresco congelado, porém ela não é o único fator de degradação desta proteína. A velocidade de degradação pode passar a ser utilizada como fator limitador para plasmas estocados em temperaturas diferentes das propostas pela legislação atual.

A estabilidade do Fator de Coagulação IX, da Albumina e das Imunoglobulinas não sofreu influência nas temperaturas de estocagem utilizadas neste estudo. Plasmas estocados em temperaturas superiores a -20C podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de hemoderivados.

A influência do polimorfismo ABO sobre a atividade do Fator de Coagulação VIII foi evidenciada no estudo. Atualmente só uma parte do plasma fresco coletado no Brasil é utilizado para a fabricação de hemoderivados, não há critério, além do sanitário, para definir quais bolsas de plasma serão utilizadas e quais serão descartadas. A utilização do polimorfismo ABO como segundo critério de escolha de forma imediata e direta aumentar o rendimento da produção de Fator VIII.

Propõem-se novos estudos que subsidiem a reavaliação da legislação no que tange a liberação do plasma para a produção de hemoderivados, baseada em outros fatores, como prazo de validade versus temperatura de estocagem.

REFERÊNCIAS

Brasil. Lei 10.205 de 21 de março de 2001. Regulamenta o § 4º do art. 199 da Constituição Federal. *Diário Oficial da União*. 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.353 de 13 de junho de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. Brasília, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 57 de 16 de dezembro de 2010. Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que

desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. Brasília, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados. Sangue e hemoderivados: produção hemoterápica 2010. 5. ed, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados, Ministério da Saúde, Brasília, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados. Manual de diagnóstico laboratorial das coagulopatias hereditárias e plaquetopatias. Brasília, 2012.

Burnouf T. Plasma fractionation in Asia–Pacific: Challenges and perspectives. *ISBT Sci Series*. 6: 366–372, 2011.

European Pharmacopoeia, 5th Edition. Strasbourg. Council of Europe. Supplement: 973, 2005.

Farmacopeia Brasileira 5ª edição, volume II. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

Farrugia A. & Cassar J. Plasma derived medicines: access and usage issues. *Blood transfus*. 10: 273–278, 2012;

Fischer, RR. A Doença de von Willebrand no Rio Grande do Sul. 1995. Porto Alegre. 62 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations. Additional standards for human blood and blood products. Food and drug administration department of health and human services, Title 21, Part 640, v. 7, 2012.

Illert WE, Butsch H, Nuber D, Howe J, Sanger W, Weidinger S. Long-term storage of fresh frozen plasma at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. A multicenter study on the stability of labile coagulation factors over a period of 3 years, *Infusion Therapy and Transfusion Medicine*, Australia. 28:189-194, 2001

Kurup PA, Arun, P, Gayathri NS. Modified formulation of CPDA for storage of whole blood, and of SAGM for storage of red blood cells, to maintain the concentration of 2,3-diphosphoglycerate. *Vox Sanguinis*.85: 253–261, 2003.

Preston AE. & Barr A. The plasma concentration of factor VIII in the normal population II. the effects of age, sex, and blood group. *British Journal of Haematology*, 10: 238-245, 1964.

Simon D.& Bandinell E. Polymorphism in the promoter region of von Willebrand factor gene and von Willebrand disease type 1, *Genetics and Molecular Biology*, 26, 4, 397-401, 2003.

World Health Organization (WHO), Recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation WHO Technical Report Series No 941, 2007.

ANEXO A

	<p align="center">COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Rua. Joaquim Nabuco, 171- Graças -Recife-PE. CEP: 52011.000 Tel.: 81- 3182-4771 Fax: 81- 3182-4660 C-eletrônico: cep.hemope@gmail.com</p>	 <p align="center">Governador do Estado de PE Secretaria de Saúde do Estado de PE</p>
---	--	--

PARECER FINAL: Nº. 009/2013

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

Título do Projeto: Estudo de otimização das condições de estocagem do plasma humano fresco congelado destinada a produção de hemoderivados

Instituição Solicitante: Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco-HEMOPE.

Pesquisador: Severino Borba de Andrade

CPF: 231.637.554-53. **Telefone:** 81 –30312024

Local de Desenvolvimento do Projeto: Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco-HEMOPE

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Identificar a temperatura máxima de estocagem do plasma humano destinado à produção de hemoderivados sem que haja perdas significativas de proteínas.

Objetivos Específicos:

1. Verificar a concentração dos fatores de coagulação após a estocagem em temperaturas superiores;
2. Verificar a concentração final da albumina e das imunoglobulinas após a estocagem em temperaturas superiores a -20°C;
3. Identificar o fator de degradação dos fatores de coagulação em cada faixa de temperatura definida no trabalho.

3 - PARECER DO RELATOR: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 466/2012 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no **Parecer nº. 009/2013** considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado, (Res. 466/96) devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador, assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório³⁴ do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 446/96.

Homologado na Reunião do CEP de 29/05/2013


Ana Lúcia de Sena
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa - HEMOPE

Anexo B

	<p align="center">COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Rua. Joaquim Nabuco, 171- Graças -Recife-PE. CEP: 52011.000 Tel.: 81- 3182-4771 Fax: 81- 3182-4660 C-eletrônico: cep.hemope@gmail.com</p>	 Governo do Estado de PE Secretaria de Saúde do Estado de PE
---	--	---

PARECER FINAL: Nº. 025/2013

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

Título do Projeto: Estudo da estabilidade do plasma humano fresco congelado, destinado à produção de hemoderivados

Instituição Solicitante: Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco-HEMOPE.

Pesquisador: Severino Borba de Andrade

CPF: 231.637.554-53. **Telefone:** 81 –30312024

Local de Desenvolvimento do Projeto: Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco-HEMOPE

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Identificar a temperatura máxima de estocagem do plasma humano destinado à produção de hemoderivados sem que haja perdas significativas de proteínas.

Objetivos Específicos:

1. Verificar a concentração dos fatores de coagulação após a estocagem em temperaturas superiores a -20°C;
2. Verificar a concentração final da albumina e das imunoglobulinas após a estocagem em temperaturas superiores a -20°C;
3. Identificar o fator de degradação dos fatores de coagulação em cada faixa de temperatura definida no trabalho.

3 - PARECER DO RELATOR: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 466/2012 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no **Parecer nº. 025/2013** considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado, (Res. 466/96) devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa.

A
R

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador, assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório³⁴ do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 446/96.

Homologado na Reunião do CEP de 25/09/2013


Ana Lúcia de Sena
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa - HEMOPE

Anexo C

ATA DA TRECENTÉSIMA TRIGÉSIMA PRIMEIRA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

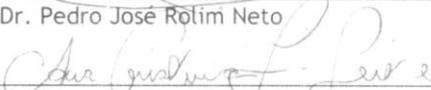
Às oito horas do dia doze de julho de dois mil e treze, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública, a Comissão Examinadora composta pelos Professores Doutores Pedro José Rolim Neto na qualidade de Presidente, Orientador e Primeiro Examinador Interno, Ana Cristina Lima Leite na qualidade de Segunda Examinadora Interna e Larissa Araújo Rolim na qualidade de Examinadora Externa, para avaliar o Trabalho do Mestrando **Severino Borba de Andrade** candidato ao Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. A sessão foi aberta pela secretária com a apresentação da Banca Examinadora e logo passou a palavra ao Senhor Presidente da Mesa, que na oportunidade cumprimentou os presentes e convidou o Mestrando a apresentar o seu Trabalho, concedendo-lhe a palavra. O Mestrando iniciou a apresentação do seu Trabalho intitulado **“Estudo de Otimização das Condições de Estocagem do Plasma Humano Fresco Congelado Destinada a Produção de Hemoderivados”**. Concluída a apresentação, o Professor Doutor Pedro José Rolim Neto concedeu a palavra a Examinadora Externa para os questionamentos. Ela agradeceu o convite para participar da Banca Examinadora, parabenizou o Mestrando pelo conteúdo do Trabalho e pela sua apresentação. Teceu alguns comentários sobre o Trabalho e sugeriu que fossem feitas algumas modificações. Dando prosseguimento, o Senhor Presidente passou a palavra a Segunda Examinadora Interna, que agradeceu o convite para participar da Banca Examinadora, parabenizou o Mestrando pelo conteúdo do Trabalho e pela sua apresentação. Também teceu alguns comentários sobre o Trabalho e sugeriu que fossem feitas algumas modificações. Na sequência, o Senhor Presidente também fez comentários ao trabalho, sugerindo modificações ao mesmo tempo em que arguiu o candidato. Logo depois solicitou a todos que deixassem o recinto para que se procedesse à avaliação do Trabalho apresentado em caráter secreto e para atribuição da menção correspondente. Em seguida, o Senhor Presidente passou a palavra à secretária para que esta, abrindo novamente a sessão ao público, comunicasse a todos que na Trecentésima Trigésima Primeira Defesa de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, o Mestrando **Severino Borba de andrade**, recebeu a menção **“Aprovada”** **“Reprovada”** **“Em Exigência”** , tendo obtido os votos necessários da Banca Examinadora para tal. Considerando-o, assim, **“Apto”** **“Inapto”** a receber o Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, devendo a Universidade Federal de Pernambuco tomar as devidas providências. A secretária informou ainda que, estando em exigência, o Mestrando terá o prazo de noventa dias para a entrega definitiva dos exemplares corrigidos conforme Resolução 10/2008-UFPE. Caso não seja depositada a nova versão com as alterações exigidas pela Comissão Examinadora, o candidato será considerado **reprovado**. Informou ainda que a entrega das dissertações impressas na Secretaria desta Pós-Graduação, está condicionada à emissão de declaração pelo presidente da Banca Examinadora de que foram cumpridas as exigências referentes ao trabalho apresentado,



atendendo assim as normas do Setor de Banca Examinadora e Diploma da PROPESQ. Nada mais havendo a acrescentar, a Professor Doutor Pedro José Rolim Neto encerrou a sessão da qual lavrei esta ata, que segue assinada por mim e por quem de direito.

Recife, 12 de julho de 2013.


Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto


Prof.ª Dr.ª Ana Cristina Lima Leite


Prof.ª Dr.ª Larissa Araújo Rolim


Secretária - Nerilin Trajano da Silva Neto

Edineide Martins Rodrigues
Assistente em Administração
SIAPE 1650576

A SECRETARIA DO PPBCE
PREZADOS,

CONFORME FOI SUBMETIDO PELOS MEMBROS DE BANCA EXAMINADORA,
O TÍTULO DE DISSERTAÇÃO FOI MODIFICADO, FICANDO ASSIM
DEFINIDO: ESTUDO DE ESTABILIDADE DO PLASMA HUMANO
FRESCO CONGELADO, DESTINADO À PRODUÇÃO
DE HEMODERIVADOS

ATENCIOSAMENTE


Prof. Pedro José Rolim Neto
Coord. do Lab. de Tec. dos
Medicamentos
Dep. de Ciências Farmacêuticas

Anexo D



REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA

Órgão Oficial da Associação Brasileira de Farmacêuticos

ISSN 0370-372x e ISSN 2176-0667

Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2015.

Prezados autores, Severino Borba de Andrad, Larissa Araújo Rolim & Pedro José Rolim Neto
É com satisfação que informamos que o "**Estudo da estabilidade do plasma humano fresco congelado destinada a produção de hemoderivados**" submetido sob o número 690/2014, foi aceito para publicação na Revista Brasileira de Farmácia (ISSN 2176-0667) e deverá ser publicado na versão online *no v. 96, n. 1, 2015*.

Atenciosamente,

Revista Brasileira de Farmácia
Carmelinda Monteiro Costa Afonso
Editora-Chefe

Anexo E

Câmara Frigorífica para Acondicionamento de Plasma Humano Fresco Congelado

Descrição

Os órgãos regulamentadores não definem os padrões ou exigem registro dos equipamentos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), como as geladeiras e frízeres destinados à guarda dos produtos do sangue nos Serviços de Hemoterapia, porém os fabricantes devem seguir as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) que é o órgão responsável pela normalização técnica no país, fornecendo a base necessária ao desenvolvimento tecnológico brasileiro. Estas normas são estabelecidas por consenso e aprovadas por um organismo reconhecido, que fornece, para uso comum e repetitivo, regras, diretrizes ou características para atividades ou seus resultados, visando à obtenção de um grau ótimo de ordenação em um dado contexto.

A norma ABNT NBR 15366-3: 2006 define a estrutura dos painéis industrializados com espuma rígida de poliuretano utilizado na confecção de camarás, assim como as diretrizes para seleção e instalação em edificações e câmaras frigoríficas, e a ABNT NBR 15374-1: 2006 define as diretrizes dos equipamentos de refrigeração monobloco para câmaras.

Por meio dessas normas técnicas é possível calcular a energia elétrica consumida diariamente para conservação do plasma humano fresco congelado em uma câmara frigorífica. Para tanto, faz-se necessária a utilização dos dados técnicos do equipamento a ser utilizado.

Neste estudo foram utilizadas duas câmaras frigoríficas de Fundação Hemope, utilizando-se dos dados técnicos descritos no termo de referência da para aquisição de uma delas, publicado no Diário Oficial do Estado de Pernambuco (DOE-PE) do dia 21 de setembro de 2011, onde foi possível calcular a energia para a conservação térmica, considerando que o plasma é previamente congelado, e as intervenções diárias na mesma são mínimas.

▪ **Dados técnicos do equipamento:** capacidade máxima de armazenamento: 5.000 litros de plasma.

Temperatura de Trabalho: 30° negativos

Dimensões: Altura: 3,10 m

Largura: 3,18 m

Profundidade: 5,80 m

Isolamento térmico: Paredes Poliuretano 100 mm

Piso Poliuretano 150 mm

Potencia do motor: 9,8 CV

Temperatura ambiente média: 30°

Calculo do Consumo de Energia em Temperatura de Armazenamento de 30 Negativos

CALCULANDO AS FONTES DE CALOR

Transmissão de calor (QT): o calor atravessa as paredes, o teto e o piso dos ambientes refrigerados, ocasionando diferença entre a temperatura da câmara e o ar externo mais quente. A quantidade de calor depende da diferença de temperatura, do tipo de isolamento, da superfície externa das paredes e do efeito de irradiação solar.

$$QT = A \times \text{Fator de dispersão (Kcal/m}^2 \text{ em 24hs)}$$

Onde:

QT= Quantidade de calor transferido

A = Área da superfície externa da parede (m²)

A norma NBR 15366-3: 2006 determina que os painéis de poliuretano tenham 150 mm com um fator de dispersão de 125 kcal/m²24h e os de 100 mm de 250 kcal/m²24h, para uma variação de temperatura(Δt) de 60° (temperatura ambiente – temperatura interna da câmara).

$QT = \text{área das paredes} \times \text{Fator de dispersão das paredes} + \text{área do teto} \times \text{Fator de dispersão do teto} + \text{área do piso} \times \text{Fator de dispersão}.$

$$QT = 2 (3,1 \times 3,18) \times 250 + 5,8 \times 3,18 \times 250 + 5,8 \times 3,18 \times 125 = 8990 + 4495 + 2247,5$$

$$QT = 15732,5 \text{ kcal/m}^2 \text{ em 24h}$$

Carga devido aos Motores (QM): esta é a carga produzida pelos ventiladores dos evaporadores com convecção forçada, somente não é levada em consideração quando se trata de um evaporador estático.

Equação para a carga devido aos motores:

$$QM = N \times 632,41 \text{ (kcal/h)} \times \text{Tempo de utilização}$$

Onde:

N = potência dos motores

$$QM = 1,0 \times 632,41 \times 20 = 12.648,2$$

Energia térmica total= QT+QM

$$\text{Energia térmica total} = 28380,7 \text{ kcal/m}^2 \text{ em 24h}$$

Energia térmica total=33,00 Kilowatt em 24h

Consumo de energia elétrica mensal: 990 Kilowatt

Calculo do Consumo de Energia em Temperatura de Armazenamento de 20 Negativos

Calculando as Fontes de Calor

Transmissão de calor (QT): a norma NBR 15366-3: 2006 determina que os painéis de poliuretano tenham 150 mm, com um fator de dispersão de 104 kcal/m²24h e os de 100 mm de 208 kcal/m²24h, para uma variação de temperatura(Δt) de 50° (temperatura ambiente – temperatura interna da câmara).

$QT = \text{área das paredes} \times \text{Fator de dispersão das paredes} + \text{área do teto} \times \text{Fator de dispersão do teto} + \text{área do piso} \times \text{Fator de dispersão}.$

$$QT = 2 (3,1 \times 3,18) \times 208 + 5,8 \times 3,18 \times 208 + 5,8 \times 3,18 \times 104 = 8990 + 4495 + 2247,5$$

QT= 13234,208 kcal/m² em 24h

Carga devido aos Motores (QM):

$$QM = 1 \times 632,41 \times 20 = 12.648,2$$

Energia térmica total= 25.882,4 kcal em 24h

Energia térmica total=30,10 Kilowatt em 24h

Consumo de energia elétrica mensal: 903 Kilowatt

Calculo do Consumo de Energia em Temperatura de Armazenamento de 17 Negativos

Calculando as Fontes de Calor

Transmissão de calor (QT): a norma NBR 15366-3: 2006 determina que os painéis de poliuretano tenham 150 mm com um fator de dispersão de 100 kcal/m²24h e os de 100 mm de 200 kcal/m²24h, para uma variação de temperatura (Δt) de 50° (temperatura ambiente – temperatura interna da câmara).

$QT = \text{área das paredes} \times \text{Fator de dispersão das paredes} + \text{área do teto} \times \text{Fator de dispersão do teto} + \text{área do piso} \times \text{Fator de dispersão}.$

$$QT = 2 (3,1 \times 3,18) \times 200 + 5,8 \times 3,18 \times 200 + 5,8 \times 3,18 \times 100 = 7192 + 3688,8 + 1844,4$$

QT=12.725,2 kcal/m² em 24h

Carga devido aos Motores (QM):

$$QM = 2 \times 632,4120 = 12.725,2$$

Energia térmica total 25.373,4 kcal em 24h

Energia térmica total 29,51 Kilowatt em 24h

Consumo de energia elétrica mensal: 885,3 Kilowatt