

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

Severino Borba de Andrade<sup>1</sup>, Larissa Araújo Rolim<sup>2</sup> & Pedro José Rolim Neto<sup>2\*</sup>

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

<sup>1</sup>HEMOPE – Diretoria de Hemoterapia – Departamento de Laboratórios – Laboratório de Imunohematologia - <sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Ciências Farmacêuticas – Laboratório de Tecnologia dos medicamentos, R. Prof. Artur de Sá, s/n. Cidade Universitária, Recife - Pernambuco, Brasil.

## **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 -10C, 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 5ª 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 Antitrobina (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 a 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), porém 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 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.

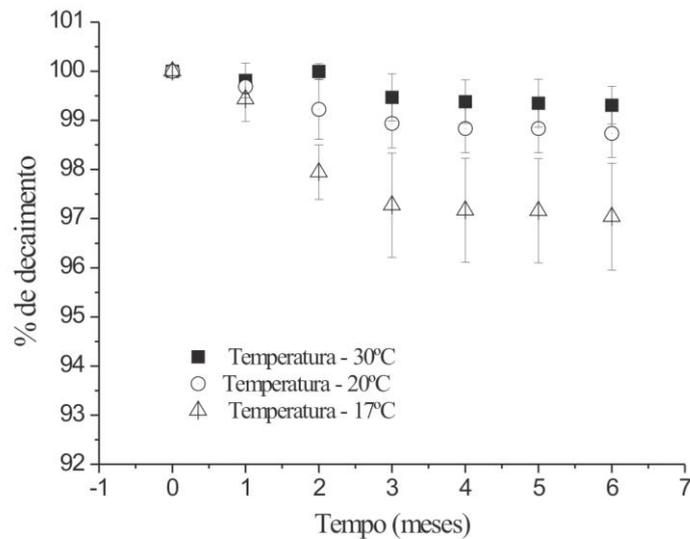
### ***Tratamento Estatístico***

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.

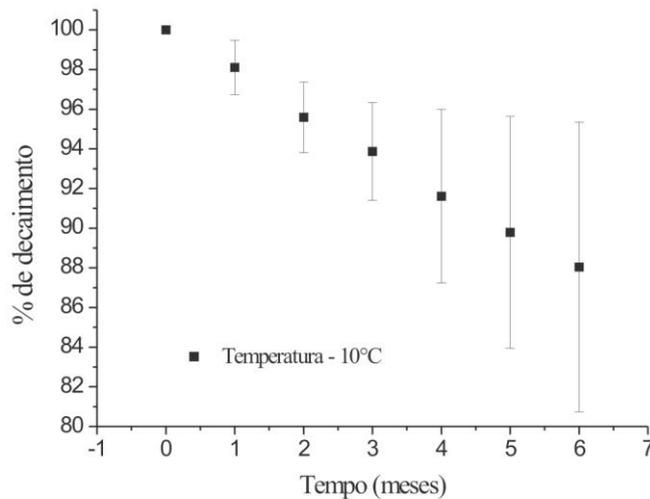
Figura 1. Perfil de decaimento do Fator VII nas amostras armazenadas às temperaturas de -17°C, -20°C e -30°C.



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, porem 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: Ministério da Saúde, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados. Sangue e hemoderivados: produção hemoterápica 2010. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 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: Ministério da Saúde, 2012.

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

European Pharmacopoeia. 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005. Suppl. 973.

Farmacopeia Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. 2

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.

Food and Drug Administration (U.S. FDA). 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, Sängler W, Weidinger S. 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 Ther. Transf. Med*. 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. *Brit. J. Haematol*. 10: 238-245, 1964.

Simon D & Bandinell E. Polymorphism in the promoter region of von Willebrand factor gene and von Willebrand disease type 1. *Genet. Molec. Biol.* 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.