

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/08/2020.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Mariane Aparecida Risso

**Vesículas extracelulares de concentrado de hemácias:
tempo de armazenamento e controle de qualidade**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune
Coorientadora: Profa. Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo

**Botucatu
2018**

Mariane Aparecida Risso

Vesículas extracelulares de concentrado de
hemácias: tempo de armazenamento e controle de
qualidade

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em
Pesquisa e Desenvolvimento –
Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune
Coorientadora: Profa. Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Risso, Mariane Aparecida.

Vesículas extracelulares de concentrado de hemácias:
tempo de armazenamento e controle de qualidade / Mariane
Aparecida Risso. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
de Botucatu

Orientador: Elenice Deffune

Coorientador: Ângela Cristina Malheiros Luzo

Capes: 90194000

1. Citometria de fluxo. 2. Controle de qualidade.
3. Eritrócitos.

Palavras-chave: Citometria de fluxo; Concentrado
de hemácias; Controle de qualidade.

Dedicatória e Agradecimentos

Dedico este trabalho,

*A Ti Senhor, Força minha,
És a razão da minha existência, fonte de todo amor que tenho.
Sem Ti eu nada seria.*

*À minha família,
Meus pais, irmão, irmãs, sobrinhos e cunhados,
Razão da minha luta, persistência e coragem.
A vocês, com todo o meu amor.*

Meus sinceros agradecimentos,

À DEUS, por me permitir viver tamanha realização, por ser meu refúgio, fortaleza e alegria em todo o percurso até aqui percorrido. Se tenho uma certeza na vida, é a de que estas comigo em todo o tempo.

À Professora Dra. Elenice Deffune, minha orientadora, por todas as oportunidades, e conhecimentos compartilhados, por toda a atenção para comigo durante a realização desse trabalho assim como na minha trajetória profissional. Obrigada pelo carisma e companheirismo de todas as horas, aprendi e aprendo muito com a Sra.

À Professora Dra. Ângela Luzo, minha coorientadora, por toda a dedicação, conhecimento e disponibilidade.

À Professora Dra. Márjorie de Assis Golim, por todo incentivo, apoio e colaboração para a realização desse trabalho.

Ao Fernando Aparecido de Oliveira, pelo companheirismo e apoio de todas as horas, seu incentivo e ajuda foram fundamentais para mim.

À minha amiga Mara, por todo apoio, confiança, incentivo e força. Obrigada por estar presente sempre e, principalmente, quando ninguém mais pode estar.

Ao Hemocentro de Botucatu, pelo apoio, abertura e comprometimento profissional com a pesquisa.

À equipe do Laboratório de Componentes Lábeis: Gislene, Luana, Priscila, Andréia, Giovana, Sarita e Cida, pelo apoio na captação das bolsas necessárias para este estudo, pela paciência, colaboração e ajuda na coleta e processamento das amostras.

À equipe do Laboratório de Citometria de Fluxo: Professora Marjorie, Aline, Rodrigo, Léia, Lia e Mariana, por toda paciência, flexibilidade e disponibilidade para o processamento das amostras nos dias em que eu precisei (e foram muitos!).

À equipe do Laboratório de Imuno-hematologia do Doador: Denise e Marcos, obrigada por todas as PAI positivas (rsrs), por toda a disponibilidade e ajuda de sempre! É sempre um prazer estar com vocês.

Aos meus amigos e também colegas de profissão do Laboratório de Engenharia Celular: Thays, Ana Lívia, Pâmela, Laís (Marmi), Alexandre, Suelen, vocês são parte de mim, fazem parte da minha história, obrigada por todos os momentos compartilhados, todas as alegrias e também momentos

nem tão felizes assim, aprendi muito com cada um.

À todos os estagiários, alunos e ex-alunos que passaram pelo Laboratório de Engenharia Celular, meu muito obrigada por toda a caminhada e aprendizado, aprendemos juntos!

À Ondina, pela amizade, momentos de descontração, carisma e principalmente por toda ajuda, muito obrigada de todo o coração.

Ao Ednelson, por toda paciência e colaboração com os alunos, sabemos que damos trabalho, muito obrigada por ajudar sempre.

À equipe do Almoxarifado do Hemocentro: Jéssica e Jedson, muito obrigada pela ajuda com as compras e recebimentos dos materiais para a pesquisa.

À todos os meus amigos do Peregrinos do Amor, obrigada por me ajudarem a crescer espiritualmente, por me levarem mais pertinho de Deus, sou grata por Deus ter me presenteado com vocês.

Aos meus amigos do Laboratório da Unimed: Jhenni, Fê, Josi e Bia. Muito obrigada pelas inúmeras vezes que me ajudaram com a escala, com as conversas e conselhos, companhia, risadas e companheirismo. O trabalho fica mais legal quando estão por perto.

À minha família, minha base, meu incentivo, obrigada por me proporcionarem momentos especiais em toda essa caminhada, por lutarmos juntos em todas as adversidades, por sermos suporte uns dos outros, por não me deixarem esquecer o motivo de eu continuar sempre em frente, mesmo estando distante. Afinal, parafraseando Padre Léo, “Quem ama nunca está longe! Como posso estar longe de quem está dentro de mim?”

À todos os doadores de sangue, pelo nobre gesto de doarem vida voluntariamente.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade”.

Albert Einstein

Resumo

As vesículas extracelulares (VEs) são formações membranárias heterogêneas de tamanhos submicrométricos, que possuem funções específicas dependentes de sua biogênese. Os Concentrados de hemácias (CH) sofrem inúmeras alterações bioquímicas e morfológicas durante a estocagem comprometendo o meio intracelular e extracelular. O controle de qualidade das unidade de CH avalia essa lesão de estoque das hemácias principalmente a partir da determinação do grau de hemólise através da dosagem de hemoglobina livre. Não se sabe ao certo a quantidade de vesículas extracelulares que um CH pode gerar durante seu armazenamento mas muitos estudos relacionam as VEs com complicações pós-transfusionais. O objetivo deste estudo foi analisar o controle de qualidade de concentrados de hemácias sob o aspecto da identificação de vesículas extracelulares, correlacionando o grau de hemólise e a identificação de VEs em CH de hemácias em diferentes dias de conservação. Métodos: CH foram obtidos de 20 doadores saudáveis, refrigerados armazenados por 35 dias, e avaliados para o perfil de doação de sangue, grau de hemólise e dosagem de VEs por citometria de fluxo nos dias 5, 15, 25 e 35 de armazenamento. Resultados: Não houve diferença estatística significativa entre o perfil da doação e as dosagens de grau de hemólise e VEs. O número total de VEs aumentou significativamente com o armazenamento assim como o grau de hemólise, observando maior correlação entre os métodos em D25 ($p=0,0002$) e D35 ($p<0,0001$). O tamanho das VEs foi avaliado pela intensidade de fluorescência que demonstrou VEs $< 3\mu\text{m}$. O grau de hemólise demonstrou ser um parâmetro pouco confiável, já que mesmo nas unidades com baixo volume apresentou conformidade nos valores. Pesquisas em caracterização, quantificação e avaliação de danos provocados pelas VEs poderão nortear novos rumos para o esclarecimento das lesões de armazenamento e mostrar possíveis melhorias na avaliação de qualidade desses hemocomponentes.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares, concentrado de hemácias, controle de qualidade, citometria de fluxo

Abstract

The extracellular vesicles (EVs) are heterogeneous membrane formations of submicrometric sizes, which have specific functions depending on their biogenesis. Red blood cell (RBC) undergo numerous biochemical and morphological changes during storage age compromising the intracellular and extracellular environment. The quality control of these units evaluates this lesion RBCs inventory mainly from the haemolysis determination through the measurement of free haemoglobin. It is unclear how much EVs the RBCs can generate during its storage but many studies related the EVs with post-transfusion complications. The objective of this study was to analyze the RBCs quality control under the aspect of the identification of EVs, correlating the haemolysis and the identification of VEs on different days of conservation. Methods: RBC were obtained from 20 healthy donors, refrigerated and stored for 35 days, and evaluated for blood donation profile, haemolysis and EVs counting by flow cytometry on storage days 5, 15, 25 and 35. Results: There was no statistically significant difference between the donation profile and haemolysis percentual and EVs dosages. The total number of EVs increased significantly with storage as well as the haemolysis, observing a higher correlation between the methods in D25 ($p = 0.0002$) and D35 ($p < 0.0001$). The size of the VEs was evaluated by the fluorescence intensity that demonstrated VEs $< 3\mu\text{m}$. The haemolysis proved to be an unreliable parameter, since even in the low volume units it showed compliance in the values. Research on characterization, quantification and evaluation of damage caused by EVs may guide new directions for the clarification of storage lesions and show possible improvements in the quality evaluation of these blood components.

Keywords: Extracellular vesicles, red blood cells, quality control, flow cytometry.

Sumário

Introdução	11 - 26
Apresentação do Artigo.....	27
Artigo	28 - 51
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	30
Resultados.....	34
Discussão.....	43
Referências – Artigo.....	48
Perspectivas.....	52
Referências Bibliográficas	53

Introdução

Para contextualizarmos o presente trabalho temos que resgatar as palavras chave que nortearam a pesquisa: concentrado de hemácias (CH), vesículas extracelulares (VEs) e controle de qualidade (CQ). Diante da importância da hemoterapia como um todo, em especial da transfusão de CH, CQ vai muito além de uma exigência legal, é um compromisso do serviço com a vida do paciente. Sabe-se que apesar da evolução da hemoterapia, e de quão bem sejam preparados os hemocomponentes, seu armazenamento determina lesões de estocagem, muitas delas com mecanismos ainda pouco esclarecidos. Dentre os indicadores monitorados como padrão de controle da qualidade de CH pode-se citar: peso, volume, taxa de hemoglobina e hematócrito, determinação do grau de hemólise, pH, níveis de eletrólitos, entre eles Na^+ , K^+ , Ca^{++} , concentração de determinadas moléculas como ATP, ou enzimas como a glutatona redutase e 2,3 difosfoglicerato (2,3DPG) sendo que esta coordena a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, entre outros. No entanto, se por um lado a determinação das quantidades de ATP e 2,3DPG têm relevância quando se analisa CH em estoque a $\pm 4^\circ\text{C}$, por outro lado, estas análises são mais difíceis de serem executadas e onerosas, sendo limitadas ao uso em pesquisa. Os demais indicadores são executados de forma sistemática como Controle de Qualidade de CH, além das análises microbiológicas e os testes obrigatórios sorológicos e por tecnologia de ácidos nucleicos, para a comprovação da conformidade do hemocomponente (1).

Além da lesão das hemácias, que ocorrem por armazenamento, ou seja, *in vitro*, as hemácias humanas sofrem a senescência fisiológica. As senescentes apresentam características semelhantes às células nucleadas que sofrem apoptose. Para alguns autores, a hemácia é a fase terminal da apoptose que ocorre durante a eritropoiese envolvendo as diferentes etapas do amadurecimento dos eritroblastos (2,3). A evolução eritroblástica no sentido da formação das hemácias confere a estas últimas um estado pós-apoptótico. Pode se dizer que o processo de envelhecimento das hemácias envolve dois processos distintos: um nos precursores nucleados onde ocorre a apoptose, por ativação das caspases 3,6, 7 e a via do ligante

Fas durante a evolução do processo de expulsão do núcleo e eliminação das organelas como das mitocôndrias, retículo endoplasmático há a ação da DNase tipo II macrofágica. O outro processo, já na etapa anucleada, denominada de eriptose. As vias da eriptose pode ser CD47 dependente e caspase independente (4).

Independentemente dos grandes avanços nos mecanismos celulares e moleculares da morte celular, a morte programada das hemácias envolve grandes enigmas. Por exemplo, para muitos pacientes politransfundidos, sem a presença de alo-anticorpos, a duração do efeito terapêutico de uma transfusão pode ser muito fugaz. Quais teriam sido as razões pelo qual estas hemácias corretamente coletadas e armazenadas foram retiradas da circulação em tão pouco tempo (5). Para Beutler a ineficácia transfusional nestes casos se deve por um lado à profunda ignorância científica que se tem em relação às lesões de estocagem e por outro, pelo fato de que inexistem técnicas simples de avaliar a viabilidade das hemácias (6).

As condições em que os CH são expostos durante o armazenamento tais como a mudança de temperatura e a natureza do meio circundante são diametralmente diferentes daquelas encontradas *in vivo*. Durante a estocagem muitas alterações bioquímicas e fisiológicas ocorrem incluindo o aumento da concentração da hemoglobina livre, de lipídeos com a redução de outros indicadores como pH, diminuição da concentração de ATP e de 2,3 difosfoglicerato. As hemácias estocadas ainda alteram a bomba sódio- potássio com a perda deste último. Este conjunto de alterações tornam a membrana mais rígida havendo a ruptura de fosfolipídeos de forma assimétrica, rearranjando outros complexos lipídicos, que, conseqüentemente leva à exposição da fosfatidilserina induzindo a eriptose com a liberação das VEs (7,8).

Diante do que foi até agora exposto, a transfusão de CH envolve uma série de efeitos adversos monitorados no mundo todo pelos programas de hemovigilância. Há anos, observa-se que a transfusão de CH pode levar a fenômenos tromboembólicos, em pós-operatório, à Síndrome Inflamatória Sistêmica (SIS), a *Transfusion-Related Acute Lung Injury* (TRALI) sendo que as justificativas ficavam por conta da alteração da viscosidade sanguínea aliada a imobilidade do paciente no leito, e a SIS e TRALI, por liberação de leucotrienos e

citocinas dos leucócitos, em especial dos neutrófilos e pela presença de anticorpos anti-HLA. Com o advento da deleucocitação a diminuição dos efeitos adversos relacionados a fenômenos inflamatórios sistêmicos esperava-se praticamente abolir tais efeitos deletérios. Observou-se que isto de fato não aconteceu. Uma das hipóteses era de que o leucócito tinha que ser removido de forma universal, ainda na bolsa de sangue total. Mas mesmo com este procedimento, SIS continua acontecendo, em menor percentual, mas ocorre. Mais recentemente emergiu a tecnologia das micropartículas, microvesículas, ectossomas, etc, cuja investigação vem corroborar com o entendimento da fisiopatologia de muitas destas reações adversas (9).

Didaticamente abordaremos um histórico da identificação das vesículas extracelulares para posteriormente apresentar uma revisão sobre a vesiculação das hemácias, e então, em forma de artigo, os resultados do estudo realizado.

“The purpose of the present communication is to provide evidence for the occurrence in normal plasma, serum, and fractions derived from coagulant material in minute particulate form, sedimentable by high-speed centrifugation and originating from platelets, but distinguishable from intact platelets.”

Neste trabalho, o autor demonstrou que as plaquetas emitiam microestruturas com atividade pró-trombótica, por microscopia eletrônica (10).

Somente em 1980, em trabalho publicado sobre a senescência das hemácias

Referências Bibliográficas

1. Roback J D, Grossman BJ, Harris TE, Hillyer CD. Technical Manual. MD Am Assoc Blood Banks. 2011;(17ed).
2. Testa U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*. 2004.
3. Bosman GJCGM, Willekens FLA, Werre JM. Erythrocyte aging: A more than superficial resemblance to apoptosis? *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2005.
4. Lorenzo HK, Susin SA. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Letters*. 2004.
5. Scott KL, Lecak J, Acker JP. Biopreservation of red blood cells: Past, present, and future. *Transfusion Medicine Reviews*. 2005.
6. Beutler E. Back to the future in RBC preservation. *Transfusion*. 2000;
7. Lang F, Föller M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, et al. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *Journal of Membrane Biology*. 2005.
8. Grimshaw K, Sahler J, Spinelli SL, Phipps RP, Blumberg N. New frontiers in transfusion biology: Identification and significance of mediators of morbidity and mortality in stored red blood cells. In: *Transfusion*. 2011.
9. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Damienb P, Nguyenb KA, C MP, Pozzettob B, et al. Étude in vitro du processus de préparation et de stockage des concentrés de globule rouge. *Transfus Clin Biol*. 2013;20:285–94.
10. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967;
11. Greenwalt TJ, Steane EA, Lau FO, Sweeney-Hammond K. Aging of the human erythrocyte. *Prog Clin Biol Res*. 1980;
12. Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwège V, et al. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol [Internet]*. 1994 Oct

- 1;153(7):3245 LP-3255. Available from:
<http://www.jimmunol.org/content/153/7/3245.abstract>
13. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*. 1999;
 14. Clayton A, Buschmann D, Byrd JB, Carter DRF, Cheng L, Compton C, et al. Summary of the ISEV workshop on extracellular vesicles as disease biomarkers, held in Birmingham, UK, during December 2017. *J Extracell Vesicles*. 2018;
 15. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. 2016.
 16. Pitt JM, Kroemer G, Zitvogel L. Extracellular vesicles: Masters of intercellular communication and potential clinical interventions. *Journal of Clinical Investigation*. 2016.
 17. Kanada M, Bachmann MH, Contag CH. Signaling by Extracellular Vesicles Advances Cancer Hallmarks. *Trends in Cancer*. 2016.
 18. Soares RP, Xander P, Costa AO, Marcilla A, Menezes-Neto A, Del Portillo H, et al. Highlights of the São Paulo ISEV workshop on extracellular vesicles in cross-kingdom communication. *J Extracell Vesicles*. 2017;
 19. Keerthikumar S, Gangoda L, Liem M, Fonseka P, Atukorala I, Ozcitti C, et al. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(17):15375–96. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/3801>
 20. Minciacchi VR, You S, Spinelli C, Morley S, Zandian M, Aspuria P, et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(13):11327–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25857301>
 21. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize

- heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2016;113(8):E968–77. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1521230113>
22. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013;
 23. Sharma S, Sharma P, Tyler LN. Transfusion of blood and blood products: Indications and complications. *Am Fam Physician*. 2011;
 24. García-Roa M, Del Carmen Vicente-Ayuso M, Bobes AM, Pedraza AC, González-Fernández A, Martín MP, et al. Red blood cell storage time & transfusion: Current practice, concerns & future perspectives. *Blood Transfus*. 2017;15(3):222–31.
 25. Bradley M, Nealiegh M, Oh JS, Rothberg P, Elster EA, Rich NM. Combat casualty care and lessons learned from the past 100 years of war. *Curr Probl Surg*. 2017;
 26. Said AS, Rogers SC, Doctor A. Physiologic impact of circulating RBC microparticles upon blood-vascular interactions. *Frontiers in Physiology*. 2018.
 27. Camus SM, Gausserès B, Bonnin P, Loufrani L, Grimaud L, Charue D, et al. Erythrocyte microparticles can induce kidney vaso-occlusions in a murine model of sickle cell disease. *Blood*. 2012;
 28. Gerotziafas GT, van Dreden P, Chaari M, Galea V, Khaterchi A, Lionnet F, et al. The acceleration of the propagation phase of thrombin generation in patients with steady-state sickle cell disease is associated with circulating erythrocyte-derived micro particles. *Thromb Haemost*. 2012;
 29. Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, Badimon L, Blanc-Brude O, Bochaton-Piallat ML, et al. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases position paper of the european society of cardiology (ESC) working group on atherosclerosis and vascular biology. *Thromb Haemost*. 2017;
 30. Antonelou MH, Seghatchian J. Update on extracellular vesicles inside red blood cell storage units: Adjust the sails closer to the new wind. *Transfus*

- Apher Sci [Internet]. 2016;55(1):92–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2016.07.016>
31. Camus SM, De Moraes JA, Bonnin P, Abbyad P, Le Jeune S, Lionnet F, et al. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood*. 2015;
 32. Kuo WP, Tigges JC, Toxavidis V, Ghiran I. Red Blood Cells: A Source of Extracellular Vesicles. In: *Extracellular Vesicles Methods in Molecular Biology*,. 1660th ed. New York, NY: Humana Press; 2017. p. 15–22.
 33. Chadebech P. Altérations des globules rouges transfusés dues à l'âge (“frais” versus “vieux”) et modification des paramètres de survie et d'efficacité dans le contexte de situations pathologique aiguës. 2013.
 34. Jy W, Ricci M, Shariatmadar S, Gomez-Marin O, Horstman LH, Ahn YS. Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications. In: *Transfusion*. 2011.
 35. Donadee C, Raat NJH, Kaniyas T, Tejero J, Lee JS, Kelley EE, et al. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation*. 2011;124(4):465–76.
 36. Ciana A, Achilli C, Gaur A, Minetti G. Membrane remodelling and vesicle formation during ageing of human red blood cells. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(3):1127–38.
 37. Silva DE, Melo-Gonçalves AL, Miyamoto CA. Eriptose – Morte Programada Dos Eritrócitos. *Rev Conex Electronica*. 2016;
 38. Laurén E, Tigistu-Sahle F, Valkonen S, Westberg M, Valkeajärvi A, Eronen J, et al. Phospholipid composition of packed red blood cells and that of extracellular vesicles show a high resemblance and stability during storage. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2018;1863(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.09.012>
 39. de Vooght KMK, Lau C, de Laat PPM, van Wijk R, van Solinge WW, Schiffelers RM. Extracellular vesicles in the circulation: are erythrocyte microvesicles a confounder in the plasma haemoglobin assay? *Biochem Soc*

- Trans. 2013;
40. Almizraq RJ, Seghatchian J, Holovati JL, Acker JP. Extracellular vesicle characteristics in stored red blood cell concentrates are influenced by the method of detection. Vol. 56, *Transfusion and Apheresis Science*. 2017. p. 254–60.
 41. Said AS, Doctor A. Influence of red blood cell-derived microparticles upon vasoregulation. Vol. 15, *Blood Transfusion*. 2017. p. 522–34.
 42. Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* [Internet]. 1997 Feb 15;89(4):1121 LP-1132. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/89/4/1121.abstract>
 43. An X, Guo X, Sum H, Morrow J, Gratzner W, Mohandas N. Phosphatidylserine Binding Sites in Erythroid Spectrin: Location and Implications for Membrane Stability. *Biochemistry*. 2004;
 44. Rubin O, Crettaz D, Canellini G, Tissot JD, Lion N. Microparticles in stored red blood cells: An approach using flow cytometry and proteomic tools. *Vox Sang*. 2008;
 45. Minetti M, Malorni W. Redox control of red blood cell biology: the red blood cell as a target and source of prooxidant species. *Antioxid Redox Signal*. 2006;
 46. Mannu F, Arese P, Cappellini MD, Fiorelli G, Cappadoro M, Giribaldi G, et al. Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in beta-thalassemia intermedia erythrocytes. *Blood*. 1995;
 47. Willekens FLA, Werre JM, Groenen-Döpp YAM, Roerdinkholder-Stoelwinder B, De Pauw B, Bosman GJCGM. Erythrocyte vesiculation: A self-protective mechanism? *Br J Haematol*. 2008;
 48. Iida K, Whitlow MB, Nussenzweig V. Membrane vesiculation protects erythrocytes from destruction by complement. *J Immunol* [Internet]. 1991 Oct 15;147(8):2638 LP-2642. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/147/8/2638.abstract>

49. Willekens FLA, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Döpp YAM, Van Den Bos AG, et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood*. 2005;
50. Stewart A, Urbaniak S, Turner M, Bessos H. The application of a new quantitative assay for the monitoring of integrin-associated protein CD47 on red blood cells during storage and comparison with the expression of CD47 and phosphatidylserine with flow cytometry. *Transfusion*. 2005;
51. Arias CF, Arias CF. How do red blood cells know when to die? *R Soc Open Sci*. 2017;
52. Wiewiora M, Piecuch J, Sedek L, Mazur B, Sosada K. The effects of obesity on CD47 expression in erythrocytes. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2017;
53. Yu X, Qiu W, Long F, Yang X, Zhang C, Xu L, et al. A novel fully human anti-CD47 antibody as a potential therapy for human neoplasms with good safety. *Biochimie [Internet]*. 2018 Aug 1 [cited 2018 Jul 23];151:54–66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908418301536?via%3Dihub>
54. Föllner M, Huber SM, Lang F. Erythrocyte programmed cell death. *IUBMB Life*. 2008.
55. Pretorius E. Erythrocyte deformability and eryptosis during inflammation, and impaired blood rheology. *Clin Hemorheol Microcirc [Internet]*. 2018 Apr 14;1–6. Available from: <http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/CH-189205>
56. Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;
57. Repsold L, Joubert AM. Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. *Biomed Res Int [Internet]*. 2018;2018:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/9405617/>

58. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Laboratório de controle de qualidade em hemocomponentes [Internet]. São Paulo; 2016. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2981131/Laboratório+de+CQ+Hemocomponentes/c6d40b9e-a848-4998-9f0d-e0a6ec2c6515>
59. Ministério da Saúde B. Portaria N° 158, De 04 De Fevereiro De 2016. 2016.
60. Ministério da Saúde B. Guia para o Uso de Hemocomponentes. 2015. 135 p.
61. Council of Europe. Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components: Recommendation. Strasbourg; 2003.
62. Canadian Standards Association. Canadian Standards Association Blood and Blood Components. Mississauga, Ont.; 2010.
63. Rbcs M. FDA reviews red cell transfusion products in conjunction with.
64. Almizraq RJ, Yi QL, Acker JP. Impact of technical and assay variation on reporting of hemolysis in stored red blood cell products. Clin Chim Acta [Internet]. 2017;468:90–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2017.02.013>