



**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 todos 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 inexistia de fato técnica 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.

Vesículas extracelulares: Micropartículas, Microvesículas, Corpos apoptóticos, Corpos multi-vesiculares, Exossomas, Endossomas, Ectossomas

A primeira descrição com o termo micropartículas foi feito em 1967 por Peter Wolf. Esta denominação foi usada por ele para designar “manchas como pequenas plaquetas”, posteriormente conhecido como micropartículas de plaquetas no artigo intitulado *The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma*.

No texto, o autor descreveu:

“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.”

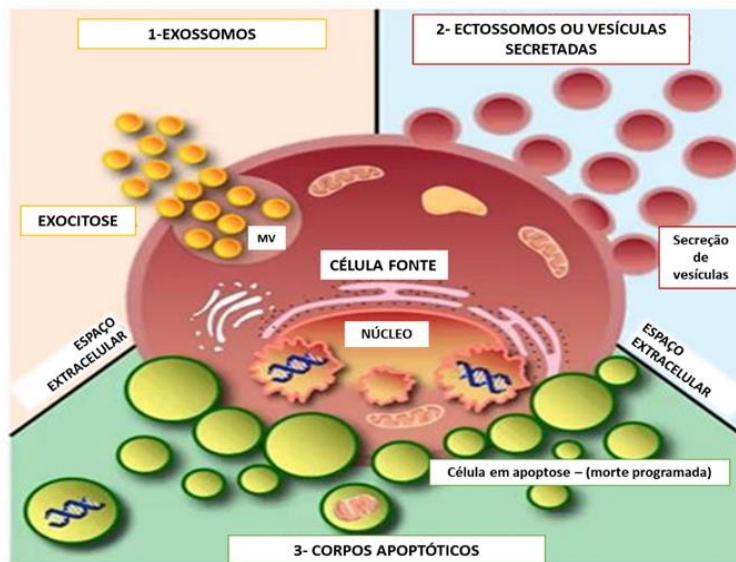
Neste trabalho, o autor demonstrou que as plaquetas emitiam microestruturas com atividade pró-trombótica, por microscopia eletrônica (10).

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

é que surge o primeiro trabalho de micropartícula de hemácias (11) e em 1994 surge a terminologia de vesiculação em artigo publicado sobre monócitos (12), e em 1999 o termo usado para a análise da vesiculação das células endoteliais foi “micropartículas” (13). A partir daí um grande número de diferentes denominações surgiram na literatura especializada: *exosomes*, *exosome-like vesicles*, *vesicles*, *endosomes microvesicles*, *particles*, *microparticles*, *apoptotic bodies*, *tolerosome*, *texosome*, *proteasome*, *nanovesicles*, etc. Em 2005, sob a égide da comunidade científica foi constituído pela Organização Mundial da Saúde um grupo de trabalho para a análise da terminologia e a classificação a partir de dados dos diferentes consultores. Este grupo de trabalho fundou em 2012 uma sólida Instituição, com aproximadamente 1.000 colaboradores no mundo todo denominada de *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV)(14).

As vesículas extracelulares (VEs) são partículas heterogêneas produzidas pelas células animais e estão envolvidas na comunicação/interação célula-célula (15). Sabe-se que a comunicação entre as células é essencial para a homeostase dos organismos vivos e que existem diferentes tipos de comunicação celular: dependente de sinal, endócrina, sináptica, parácrina e autócrina (16) As VEs tem um papel coordenador destes sinais e diferem entre si quanto à sua biogênese, tamanho, composição e função (17), apresentando vários subtipos, hoje denominados vesículas extracelulares (Figura 1).

Figura 1 – Subtipos de Vesículas Extracelulares quanto à biogênese



Fonte: Imagem traduzida de Kaira et al.Int.J.Mol.Sci.(2016)Feb 6;17(2).(15)

Desde 2012, sob a orientação a ISEV vem respondendo diversas perguntas sobre a biogênese das VEs, denominação esta que engloba todas as demais tais como microvesículas, micropaftrículas, exossomas, endossomas, ectossomas, corpos apoptóticos, oncossomas, proteassomas, etc. Alguns dos questionamentos, bem como as respostas, o grupo de trabalho estão representados na Figura 2 (18):

Figura 2 – Dúvidas sobre VEs e o posicionamento da ISEV



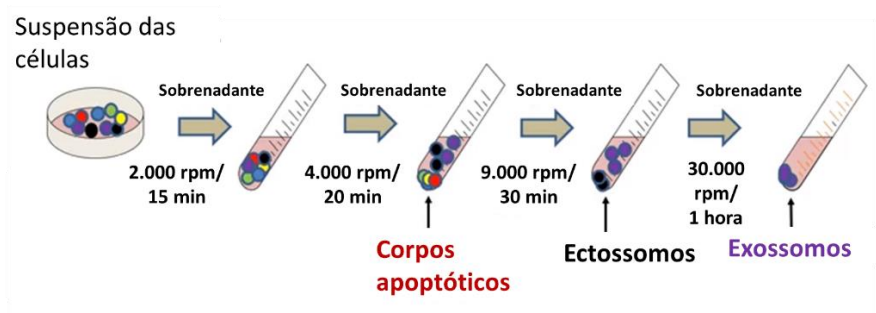
Fonte: Adaptado de Soares RP, Xander P, Costa AO, et al. Highlights of the São Paulo ISEV workshop on extracellular vesicles in cross-kingdom communication. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2017;6(1):1407213. doi:10.1080/20013078.2017.1407213.

Dados recentes destacam a importância do estudo das VEs, com ênfase em: 1) identificação de marcadores que poderiam identificar diferentes tipos de VEs, poderão ser utilizados para purificação das mesmas; 2) estudo da identificação funcional das VEs, podem ser estudados e relacionados com estado de saúde e doença(19–21).

Vários métodos estão descritos na literatura, como ferramentas de identificação, isolamento e enriquecimento de VEs de acordo com suas características: ultracentrifugação, gradiente de densidade, cromatografia de exclusão por tamanho e imunoafinidade, entre outros, além de existirem propostas de isolamentos simples de VEs, tendo em vista, que o surgimento de VEs é dependente de forma direta do método de obtenção das mesmas (14) (Figura 3). Os

métodos de análise incluem a citometria de fluxo, proteômica, metabolômica, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal, entre outros (22)

Figura 3 – Método de separação dos subtipos de VEs por centrifugação



Fonte: Traduzida de Biogenesis and Release of Extracellular Vesicles – Curso Online.

Quanto ao tamanho das VEs identificadas na literatura são classificadas entre três faixas: de 30-150nm, entre 100 e 1.000nm e maiores de 1.00nm e menores de 5.000nm (Quadro 1).

Quadro 1 – Características de subtipos de vesículas extracelulares

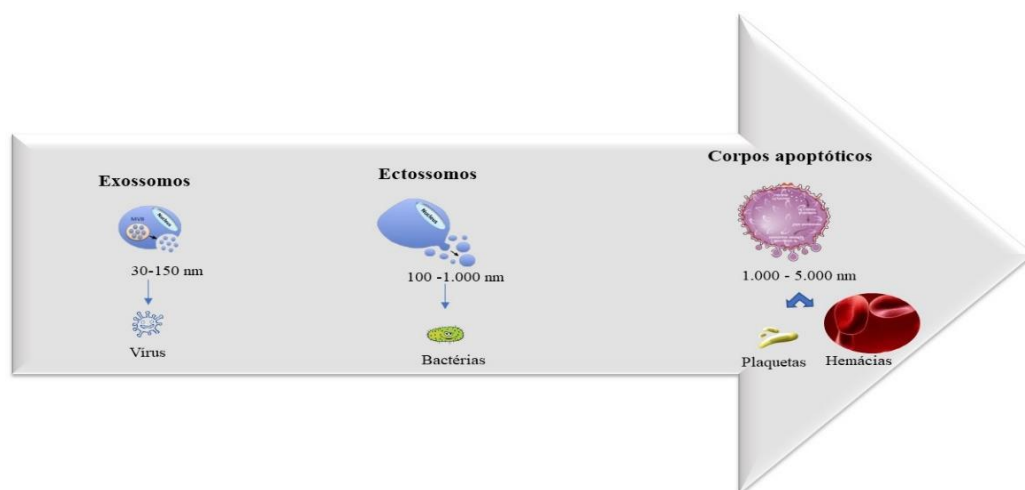
	Exossomas	Ectossomas	Corpos apoptóticos
Tamanho em nm	30-150	100-1.000	1.000-5.000
Origem	Formados por brotamento interno da membrana endossômica.	Formados por brotamento direto da membrana plasmática.	Formados em células submetidas à morte celular programada.

Fonte: Elaborado pela autora.

O mecanismo de formação de cada subtipo de VEs é diferente. Os exossomas são considerados as menores VEs. São formados por brotamento interno da membrana endossômica enquanto que os ectossomas por brotamento chamado direto os corpos apoptóticos ou corpos multi-vesiculares formados pelo mecanismo de morte celular programada (apoptose). Utilizando-se de métodos comparativos pode-se afirmar que os exossomas são em média, do tamanho de vírus enquanto que os ectossomas equiparáveis às bactérias e os corpos apoptóticos são as maiores VEs

(Figura 4). Os exemplos mais remarcáveis para isto são as plaquetas que resultam como VEs dos megacariócitos e as próprias hemácias, que são grandes VEs com funções da maior relevância na homeostase. Destaca-se ainda que estas duas VEs possuem habilidades específicas de vesiculação, sendo que mais especificamente das hemácias será abordada oportunamente.

Figura 4 – Comparação entre os subtipos de VEs conforme seu tamanho



Fonte: Adaptado de Masamitsu Kanada, Michael H. Bachmann, Christopher H. Contag. REVIEW-Signaling by Extracellular Vesicles Advances Cancer Hallmarks. Trends in câncer/DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.12.005>

Da lesão de estocagem às vesículas extracelulares das hemácias

Os CH são os hemocomponentes mais transfundidos no mundo todo perfazendo um total anual de 85 milhões de unidades por ano (23,24). Este dado projeta de forma clara a relevância deste hemocomponente na prática transfusional e na medicina como um todo.

As hemácias são cerca de 5 milhões por microlitro de sangue em indivíduos saudáveis. Seu estoque é constantemente renovado e cada um deles é silenciosamente eliminado a cada três a quatro meses. O prolongamento da vida de prateleira dos CH é um desafio constante para os serviços de hemoterapia desde a Segunda Guerra Mundial, mas, apesar dos grandes progressos da Clínica

Transfusional nas últimas décadas, o conhecimento detalhado das denominadas lesões de estocagem permanece ainda foco de estudo (25).

Hemácias anormais persistem no sangue tanto durante certas doenças, como ao longo da preservação dos concentrados de hemácias sob refrigeração. Estas hemácias são alteradas por inúmeros mecanismos. Levando-se em consideração que o glóbulo vermelho só pode sobreviver adaptando-se continuamente às condições físicas da microcirculação e que essa adaptação é feita graças à fluidez da hemoglobina, à importância da relação superfície / volume (um balão menos inflado se deforma melhor que um balão bem insuflado) e às propriedades de elasticidade e deformabilidade da membrana das hemácias, as hemácias anormais eventualmente se separam e liberam seu conteúdo, o que é chamado de hemólise intravascular (26).

Pesquisadores franceses liderados por Olivier Blanc-Brude da Universidade Paris-Descartes, mostraram que no exato momento da hemólise, as hemácias não desaparecem: na verdade, liberam uma grande quantidade de fragmentos, chamados na época de micropartículas. Sabe-se que esses fragmentos não são inofensivos. As observações realizadas em hemácias de pacientes com doença falciforme é uma das provas disto. A rigidez das hemácias falcizadas leva a uma hemólise particularmente importante e, portanto, mais fácil de estudar. As hemácias contêm hemoglobina. Como resultado, os fragmentos de hemácias também a transportam, mas de forma degradada e tóxica: o ferro previamente contido na hemoglobina é exposto na superfície desses milhares de “micropartículas” de hemácias. É esse recurso que torna as “micropartículas” perigosas (27).

Na verdade, na microcirculação, as partículas de hemácias servem como transportadores de diferentes moléculas e vêm para pressionar as substâncias tóxicas contra as células de revestimento interno dos vasos, as células endoteliais. Esta transferência de heme e ferro das células vermelhas do sangue para a parede vascular interrompe a dilatação, limitando o fluxo de sangue para os tecidos que precisam dele, em função da agressão tissular. Isto determina estresse oxidativo e promove a obstrução dos vasos sanguíneos. Em pacientes com doença falciforme, fragmentos de hemácias estão sendo parcialmente responsáveis por ataques vaso-

oclusivos muito dolorosos. As VEs dos eritrócitos podem representar novos alvos da doença veno-oclusiva e lesão cardiovascular na doença falciforme, devido ao seu enriquecimento em heme e seus níveis elevados durante a hemólise (28,29).

Essas podem ser novas oportunidades terapêuticas para o controle do heme plasmático pela suplementação de hemopexina ou administração de anexina-5. Estas VEs provavelmente também participam de múltiplas lesões causadas por uma crônica falta de oxigenação, principalmente nos rins. Estes resultados inovadores permitem visualizar novas abordagens terapêuticas para prevenir e tratar crises vaso-oclusivas, mas também para prevenir algumas doenças cardiovasculares mais comuns (30).

Essas novas terapias podem ter como alvo vários componentes das VEs de hemácias, como elementos de membrana, como a fosfatidilserina, ou heme livre. A hemopexina é uma molécula naturalmente presente no sangue e cujo papel é conhecido por eliminar as hemácias danificadas e fornecer proteção sistêmica contra o estresse oxidativo. Um suplemento de hemopexina neutralizaria o heme livre transportado por VEs de hemácias. *In vitro*, a hemopexina captura o heme separando-o das VEs de eritrócitos falcizados. Isto anula a produção endotelial subsequente de espécies reativas de oxigênio e diminui a apoptose. *In vivo*, a hemopexina impede VEs transportadoras de heme de comprometer a dilatação microvascular ou induzir a vaso-oclusão. Isto implica que o heme associado às VEs, provavelmente na superfície da mesma, tenha um efetor primário da toxicidade endotelial (31,32).

As alterações de hemácias transfundidas devido ao tempo de conservação ("fresco" versus "velho") e modificação de parâmetros de sobrevivência e eficiência no contexto de condições patológicas agudas tem sido estudadas atualmente. A vida útil máxima dos CH baseia-se nos critérios de hemólise e desempenho transfusional. Um impacto do tempo de armazenamento dos CH transfundidos em pacientes tem sido relacionado com a morbidade, infecções nosocomiais, tempo de permanência no hospital), entre outros indicadores. Uma das grandes preocupações do momento é se dependendo do tempo de armazenamento das bolsas transfundidas, os CH podem ser alterados pelo ambiente do paciente "receptor" de acordo com sua

condição clínica (33).

O impacto das lesões de estocagem na Clínica Transfusional e a compreensão total dos efeitos adversos está longe de ser alcançada, mas, levando em consideração de que as VEs são bioativas a hipótese de que as VEs de hemácias estejam implicadas como mediadores das reações transfusionais tem cada vez mais adeptos (34).

Vesiculação das hemácias

As hemácias são células extremamente sensíveis e, embora não tenham núcleos e mitocôndrias, são importantes indicadores de saúde. São classicamente definidos como discos bicôncavos, flexíveis, com tamanho médio de 5-7 μ m e são consideradas mais admirável vesícula extracelular da literatura. Além da sua função de transporte de oxigênio, as hemácias transportam um grande número de enzimas de grande relevância e o óxido nítrico (35).

As hemácias maduras são geradas a partir de células-tronco hematopoiéticas multipotentes, através de um processo complexo de maturação que envolve diversas alterações morfológicas para produzir células especializadas altamente funcionais. Nos mamíferos, as etapas terminais envolvem a expulsão do núcleo dos eritroblastos, o que leva à formação de reticulócitos.

Para produzir hemácias bicôncavas maduras, organelas e ribossomos são seletivamente eliminados dos reticulócitos, assim como a membrana plasmática sofre remodelação. A enucleação envolve a condensação dramática da cromatina e o estabelecimento da polaridade nuclear, que é impulsionada por um rearranjo do citoesqueleto de actina e pela geração de vacúolos dependente de clatrina na junção citoplasmática nuclear. Parece impossível portanto a formação de exossomos, ectossomos e endossomos pelas hemácias. As VEs das hemácias correspondem aos corpos apoptóticos, com tamanho entre 1.000 e 5000 μ m. O esqueleto de membrana composto de espectrina / actina e a hemoglobina densamente empacotada no seu interior devem ser proibitivos para a internalização de vesículas de membrana (36).

As hemácias têm uma estrutura de membrana altamente especializada e

organizada, que interage e reage a agressões de moléculas inflamatórias, e sofre morte celular programada, semelhante à apoptose, conhecida como eriptose (37) gerando as VEs que conterão parte da hemoglobina degradada e moléculas de ferro altamente tóxicas para endotélio.

Nos últimos anos, os estudos de eriptose se concentraram em determinar se ocorreram alterações na membrana, particularmente se fragmentos de fosfatidilserina, o extravazamento de Ca^{++} na célula, alterações na ceramida e diminuição do volume corpuscular médio da hemácia ocorreram, fatores estes determinantes do surgimento das VEs eritrocitárias. A elucidação da formação de biologia e vesículas é importante para a compreensão do seu papel na saúde e em vários transtornos. Apesar dos diferentes métodos aplicados (citometria de fluxo, microscopia, ELISA), o mecanismo exato e os componentes da formação do processo envolvido na vesícula permanecem apenas parcialmente estabelecidos e requerem estudos adicionais.

Durante a vida, como todos os outros tipos de células, as hemácias liberam VEs, no entanto, os eritroblastos e reticulócitos formam exossomas e ectossomas derivados da ação da maquinaria celular, núcleo e membrana plasmática. Os exossomas das são formados apenas durante o desenvolvimento dessas células na medula óssea e são liberados após a fusão de corpos microvesiculares com a membrana plasmática (32,38). Por outro lado, outros tipos de VEs são geradas durante o envelhecimento normal das hemácias em circulação por brotamento da membrana plasmática devido ao influxo de cálcio mediado pelo complemento, seguido da secreção de vesículas. Como as hemácias são anucleadas, seu mecanismo de vesiculação é diferente e a maioria dos autores consideram se tratar apenas de corpos apoptóticos ou multivesiculares, também denominado de microvesículas antes da padronização da ISEV (39). Isso faz com que as hemácias e os concentrados de hemácias armazenados sejam uma fonte importante de VEs para pesquisas(38).

Vários fatores durante o armazenamento dos CH são conhecidos por desencadear a produção de VEs, incluindo: aumento de cálcio intracelular, aumento da expoliação de potássio e falha de energia com depleção de ATP(32,40). A

composição de VEs em CH é diferente em unidades com coletas recentes e não armazenadas, daqueles conservados em geladeira. Estudos demonstram que quanto mais recentes as unidades armazenadas, menores são as VEs(40).

Os processos bioativos com as quais as VEs em CH estão envolvidas incluem a promoção da coagulação (estímulo à trombose), modulação imune e promoção da adesão endotelial, bem como influência sobre a vaso-regulação através da eliminação de óxido nítrico (41).

Sob condições fisiológicas, a distribuição assimétrica de fosfolípedes da membrana é mantida pela ação cooperativa das translocases (flipase, flopase e escramblase) que concentram aminofosfolipídios carregados negativamente, como fosfatidilserina em seu folheto interno e diante de adversidades, a externalizam (42,43).

Uma das características mais importantes das VEs derivadas de hemácias é de seu tamanho é mais homogêneo, em geral, 0,15 μm (44). Estima-se que as VEs derivadas de hemácias correspondam a 8% do total de VEs presentes em uma bolsa de PFC. Durante os 120 dias de vida das hemácias, estima-se que 20% do volume delas se perca sob a forma de vesículas (45,46). A vesiculação seria uma maneira para eritrócitos se livrarem de agentes tóxicos específicos como hemoglobina desnaturada, complexo de ataque membranário C5b-9, neoantígenos expostos da banda 3 ne (criptoantígenos)(47–49).

As hemácias possuem um importante marcador, o CD47, também conhecido em inglês pelo termo: *don't eat me*. É uma proteína integral de membrana presente na superfície dos eritrócitos, agindo como um marcador de si mesmo. Graças ao CD47, as hemácias normais são reconhecidos como próprios pelos macrófagos e a fagocitose é inibida. CH senescentes ou danificados, cuja expressão de CD47 é reduzida pela eliminação de VEs são mais facilmente reconhecido pelos macrófago (50,51).

Estudos mostram que as alterações de lipídeos e colesterol presentes em indivíduos obesos cursa com uma expressiva diminuição de CD47, favorecendo desta forma a fagocitose dos eritrócitos. Isto pode ter maior relevância quando da necessidade transfusional destes indivíduos, com CH conservados por mais de 28

dias, onde associando-se a diminuição de CD47 do paciente e o aumento das VEs dos CH armazenados, a anemia possa ser recorrente de forma mais rápida (52). Como o CD47 é uma molécula ubiqüitária, tem sido apresentada, mais recentemente como proposta para imunoterapia de câncer (53).

Ainda sobre o processo de envelhecimento das hemácias, dois modelos principais que resultaram em microvesiculação : o modelo da eriptose e o agrupamento da banda 3 , este último ocorrendo por oxidação de proteínas por enzimas bacterianas e virais. Este último processo determina subsequentemente a oxidação da hemoglobina formando derivados da metahemoglobina (54,55).

Tanto o modelo de eriptose como o de oxidação e fosforilação das proteínas da banda 3 compartilham o mesmo desfecho: a formação de VEs e externalização da fosfatidilserina nos fragmentos membranários de hemácias com a degradação do citoesqueleto (56,57).

Controle de qualidade dos concentrados de hemácias

Analisando a estabilidade dos hemocomponentes de um modo geral, podemos afirmar que ela é maior no Plasma fresco congelado, seguido do crioprecipitado, em terceiro lugar encontramos os concentrados de hemácias e o mais lábil de todos, os concentrados de plaquetas. Sabe-se que os hemocomponentes preservados sofrem alterações metabólicas e estruturais durante o armazenamento, apesar da evolução na área. Estas alterações são conhecidas como lesão de estocagem (Quadro 2).

Quadro 2 - Lesão de estocagem em CH : alterações bioquímicas e morfológicas

Alterações da membrana da Hemácia/Meio interno	Meio externo
Acidose : ↓pH intracelular	Acidose ↓ pH
Metabolismo lentificado: ↓ ATP	↑ K ⁺ extracelular
↓ 2,3-DPG, ↓ oferta de O ₂	↑ hemoglobina livre no plasma
Mudanças na forma, dano no citoesqueleto, desnaturação da banda 3	↑ dano, proteínas oxidadas
Perda da bomba de cátions	↑ VEs
Dano oxidativo: ↑ peroxidação lipídica	↑ <i>debris</i> celulares e fatores bioativos
Fragmentação da membrana: formação de VEs	
↓ Volume celular ↓ Deformabilidade	
Perda de fosfolípidos assimétricos	
Hemólise	

Fonte: Adaptado de Sparrow LR. Red blood cell storage and transfusion-related immunomodulation. *Blood Transfus* 2010; 8 Suppl 3:s26-s30 DOI 10.2450/2010.005S

Atualmente 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 (58,59).

Sabe-se que a hemólise é um parâmetro fundamental na avaliação da qualidade durante o armazenamento. Sendo assim, agências regulatórias estabelecem parâmetros e valores aceitáveis para este teste. Para o grau de hemólise no Brasil os valores conformes são < 0,8%, assim como na Europa e Canadá, já os EUA o recomendado é < 1,0% (60–63).

Apesar de ter valores limites pré-definidos, não existe ainda um método padrão para o cálculo do grau de hemólise. Estudos demonstram que o método utilizado assim como os procedimentos preparatórios (força de centrifugação, etapas, tempo) afetam criticamente a determinação do grau de hemólise (64)

As VEs de hemácias são o objeto deste estudo. O objetivo foi o de caracterizá-las em concentrados de hemácias preservados em diferentes dias de estocagem, tendo em vista que as VEs-CH são produzidas normalmente durante a

maturação das hemácias e sua produção é acelerada durante o processamento e armazenamento do CH para transfusão, usando métodos citofluorimétricos comparados com testes clássicos como o grau de hemólise, para posteriormente estabelecer protocolos de estudos para determinar o seu papel na transfusão.

Artigo

Introdução

O concentrado de hemácias (CH) é o hemocomponente mais utilizado na prática hemoterápica. Atualmente cerca de 85 milhões unidades de CH são transfundidas por ano no mundo(1). A segurança na coleta e processamento do sangue total em seus hemocomponentes, contribuem para a eficácia terapêutica desta prática. Porém, mesmo com toda a precaução, ainda existem riscos associados ao seu uso. Dentre eles, atualmente, se destacam os riscos provocados pelo armazenamento deste hemocomponente, conhecidos como lesão de estoque (2).

Uma das consequências da lesão de estoque vem se destacando atualmente nas pesquisas dos efeitos provocados pelo armazenamento: as vesículas extracelulares (VEs). As vesículas extracelulares (VEs) são produzidas pelas células e estão envolvidas na comunicação/interação célula-célula (3). Na literatura, as VEs são identificadas de acordo com a sua biogênese.

As VEs são geradas durante o envelhecimento normal das hemácias em circulação por brotação da membrana plasmática devido ao influxo de cálcio mediado pelo complemento, seguido da secreção de vesículas. Isso faz com que as hemácias e os concentrados de hemácias armazenados sejam uma fonte confiável de VEs para pesquisas(4).

Vários fatores durante o armazenamento dos CH são conhecidos por desencadear a produção de VEs, incluindo: aumento de cálcio intracelular, aumento da expoliação de potássio e falha de energia com depleção de ATP(5,6). A composição de VEs em CH é diferente em unidades com coletas recentes e não armazenadas,

daqueles conservados em geladeira. Estudos demonstram que quanto mais recentes as unidades armazenadas, menores são as VEs(5).

Os processos bioativos com as quais as VEs em CH estão envolvidas incluem a promoção da coagulação (estímulo à trombose), modulação imune e promoção da adesão endotelial, bem como influência sobre a vaso-regulação através da eliminação de óxido nítrico(7).

Dados recentes destacam a importância do estudo das VEs, são elas: 1) identificação de marcadores que poderiam identificar diferentes tipos de VEs, poderão ser utilizados para purificação das mesmas; 2) estudo da identificação funcional das VEs, podem ser estudados e relacionados com estado de saúde e doença(8–10).

Vários métodos estão descritos na literatura, como ferramentas de identificação, isolamento e enriquecimento de VEs de acordo com suas características(11–14). Muitas das vezes esses protocolos incluem a ultracentrifugação. Porém, essa técnica e o processamento das amostras demonstra ter influência no isolamento das VEs, como também no grau de hemólise (11,15,16).

Dessa forma, atenta-se para que o processamento dos hemocomponentes até a transfusão, ocorra de maneira a evitar danos ao material, além dos provocados pelo armazenamento.

Em busca de estabelecer correlação e caracterizar as VEs de CH de maneira não isolada, este trabalho foi delineado para identificar e caracterizar as VEs encontradas em CH nos seus diferentes dias de armazenamento, porém, diferentemente da maioria dos protocolos já descritos, seguiu-se a linha do não isolamento das VEs, levando em consideração que os CH não passam por mais nenhuma centrifugação

pré transfusional, que não aquela que o separa do sangue total no processamento padrão. Dessa forma, espera-se uma análise mais fidedigna possível do estado em que o CH é liberado para transfusão.

Materiais e métodos

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – UNESP. (CAAE: 82072218.6.0000.5411/Parecer: 2.499.289).

Coleta de dados do perfil da doação

Para nível de análise da influência do perfil da doação de sangue sob as dosagens de VEs e controle de qualidade, dados referentes à doação como a tipagem sanguínea ABO e RhD, sexo e idade dos doadores e tipo de bolsa utilizada na doação (dupla ou tripla), foram levantados de todos os doadores participantes do estudo, através do sistema automatizado de registro do Banco de Sangue.

Coleta das amostras

Vinte unidades de CH selecionadas aleatoriamente foram fornecidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu. Apenas unidades de doadores com pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) positivo foram utilizadas neste estudo. Sangue total (450 ml $\pm$ 50 ml) foi coletado de doadores voluntários saudáveis em bolsas de sangue duplas ou triplas (Fresenius Kabi, Zverinek, República Checa) contendo anticoagulante CPDA-1 (63 ml). Após centrifugação e processamento dos

hemocomponentes e conclusão da sorologia e imuno-hematologia dos doadores, as bolsas foram obtidas para a pesquisa. O protocolo utilizado nesse estudo foi adaptado partindo-se da ideia de que manipulação das células influencia na quantidade de VEs. Por isso, não foi realizado o isolamento das VEs para quantificação, devido ao processo necessitar de várias etapas de centrifugação, com isso objetivou-se mimetizar o processamento do CH pré-transfusional. As unidades de CH foram armazenados sob condições padrão do banco de sangue ($4 \pm 2^\circ \text{C}$) até o vencimento (dia 35). As amostras foram coletadas por dispositivo estéril nos dias 5, 15, 25 e 35, e foram testados para a dosagem de vesículas extracelulares e submetidos ao controle de qualidade de CH *standard*.

Determinação do grau de hemólise

Foram medidos o hematócrito (Ht) e a hemoglobina total (Hb) dos CH usando analisador ABX Micros ES 60 (Horiba, Montpellier, França). A concentração de hemoglobina livre (HbL) foi determinada pelo método de espectrofotometria direta de cinco comprimentos de onda (5CO) com as absorbâncias lidas em 370, 415, 510, 577 e 600nm, após centrifugação da amostra em 1307xG por 5 minutos. O grau de hemólise foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{Grau de hemólise (\%)} = 100 - \frac{Ht \times HbL}{Hb}$$

Determinação das vesículas extracelulares por citometria de fluxo

A contagem de vesículas extracelulares (VEs) de CH foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. O marcador usado neste estudo foi anticorpo anti-CD235a humano conjugado a R-ficoeritrina (PE), anti-glicoforina A. O CD235a é uma sialoglicoproteína transmembrana expressa em hemácias e seus precursores, sendo assim, foi utilizado como marcador para hemácias e VEs de hemácias. A amostra de CH foi homogeneizada por inversão em tubo de hemólise para a preparação de suspensão de hemácias a 5% (diluição 1:20) com solução salina isotônica. Dessa solução 25 μ m foram transferidos para os tubos TruCount® (BD Bioscience), contendo um número padronizado de esferas fluorescentes, para permitir a quantificação das VEs, adicionado 2,5 μ l de CD235a. Após incubação por 15 minutos no escuro, completou-se a amostra para volume final de 350 μ l com Isoton. A análise das VEs-CH foi realizada em citômetro FACS Calibur™. Uma amostra não corada foi adquirida para detectar a auto-fluorescência da amostra. A aquisição das imagens foi realizada através do software Cell Quest/BD™. A aquisição da amostra foi interrompida quando o número de *beads* TruCount na região relativa alcançou 1000 eventos. O número de VEs foi calculado a partir da seguinte fórmula(12):

$$VE = \frac{n^{\circ} \text{ de eventos no gate VEs}}{n^{\circ} \text{ de eventos no gate das beads}} \times \frac{n^{\circ} \text{ de beads do lote Trucount}^*}{\text{volume da amostra}(\mu\text{l})} \times FD$$

*o número de *beads* varia de acordo com o lote.
FD= fator de diluição.

Controle Microbiológico

O controle microbiológico foi realizado no D5 e D35 de cada bolsa, de maneira a avaliar provável contaminação das bolsas durante os momentos analisados. Foram utilizados frascos de hemocultura BD BACTEC™ Peds Plus™ (Becton Dickinson™), para detecção de microrganismos aeróbios (bactérias e leveduras).

Análise Estatística

Para verificar se houve correlação entre os valores de grau de hemólise e vesículas extracelulares foi realizada uma correlação de Pearson. Para realizar as comparações, verificou-se se os dados apresentavam uma distribuição simétrica, e para isso, foi realizada um teste de normalidade dos valores. Com a distribuição simétrica dos dados, ajustou-se um modelo linear generalizado seguido de Tukey para as comparações múltiplas dos valores das variáveis: tipagem de sanguínea , sexo, tipo de bolsa da doação e idade.

Considerou-se $p < 0,05$ como nível de significância. O *software* utilizado para realizar as análises foi *Statistical Analysis System*® (SAS), versão 9.3.

Resultados

Perfil da doação

No total, 21 doadores de sangue saudáveis participaram do estudo, porém uma das unidades foi retirada da análise devido à intercorrência durante processamento (queda). Todos os voluntários participantes desse estudo são doadores de repetição com pesquisa de anticorpos irregulares positiva.

As tipagens sanguíneas foram variadas, sendo que A+ foi o mais predominante representando 50% dos doadores do estudo. Com relação ao sexo dos doadores, 12 eram mulheres e 8 homens, com idade média de 38 (19 – 61) anos. As doações foram realizadas em bolsas duplas (n=11) e triplas (n=9), todas em anticoagulante CPDA-1. O volume médio das unidades de CH avaliadas foi de 242 ml (174ml-299ml) no início e 158 ml (116ml-215ml) em D35. Maiores informações são descritas abaixo no Quadro 1:

Quadro 1. Perfil da doação de sangue dos doadores voluntários participantes do estudo.

<i>Tipagem ABO/RhD</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Tipo de bolsa</i>	<i>Volume inicial CH (ml)</i>	<i>Coleta</i>
B+	Feminino	41	DUPLA	213	Externa
A+	Masculino	29	DUPLA	240	Interna
A+	Masculino	61	TRIPLA	244	Interna
A+	Feminino	42	TRIPLA	174	Interna
O negativo	Masculino	40	DUPLA	287	Interna
O negativo	Feminino	36	TRIPLA	243	Interna
A+	Masculino	19	TRIPLA	278	Interna
O negativo	Feminino	42	DUPLA	205	Interna
O negativo	Feminino	32	DUPLA	249	Interna
O negativo	Feminino	36	DUPLA	201	Interna
AB+	Feminino	24	DUPLA	224	Interna
A+	Feminino	31	TRIPLA	250	Interna
A+	Masculino	34	TRIPLA	277	Interna
A+	Feminino	44	DUPLA	257	Interna
O+	Masculino	41	TRIPLA	299	Interna
A+	Masculino	32	TRIPLA	284	Interna
A+	Masculino	35	TRIPLA	286	Interna
A+	Feminino	41	DUPLA	209	Interna
O negativo	Feminino	54	DUPLA	216	Interna
A negativo	Feminino	39	DUPLA	200	Interna

Controle de qualidade

Hemoglobina livre e grau de hemólise

A dosagem de hemoglobina livre teve média de 0,05g/dl (DP=0,03) em D5, 0,17g/dl (DP=0,10) em D15, 0,22g/dl (DP=0,11) em D25 e 0,32g/dl (DP=0,17) em D35.

O grau de hemólise aumentou relativamente com o tempo de estocagem com média de 0,05% em D5 e 0,29% em D35. Todas as amostras apresentaram padrão de qualidade conforme para este índice ($< 0,8\%$) em todos os períodos. Não houve diferença estatística significativa entre o perfil da doação e o grau de hemólise geral nesse estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Relação do perfil da doação com as médias do grau de hemólise (%)

		N	MÉDIA	DP	MEDIANA	MIN	MAX
<i>Tipagem sanguínea ABO/RhD</i>	A neg	1	0.17	0.16	0.11	0.04	0.40
	A+	10	0.19	0.14	0.17	0.02	0.60
	AB+	1	0.21	0.18	0.17	0.06	0.46
	B+	1	0.27	0.18	0.32	0.02	0.42
	O neg	6	0.15	0.08	0.15	0.03	0.32
	O+	1	0.07	0.04	0.06	0.02	0.12
<i>Sexo</i>	Fem	12	0.19	0.13	0.16	0.02	0.49
	Masc	8	0.15	0.12	0.12	0.02	0.60
<i>Tipo de Bolsa</i>	Dupla	12	0.18	0.14	0.16	0.02	0.60
	Tripla	8	0.17	0.12	0.15	0.02	0.49

Controle microbiológico

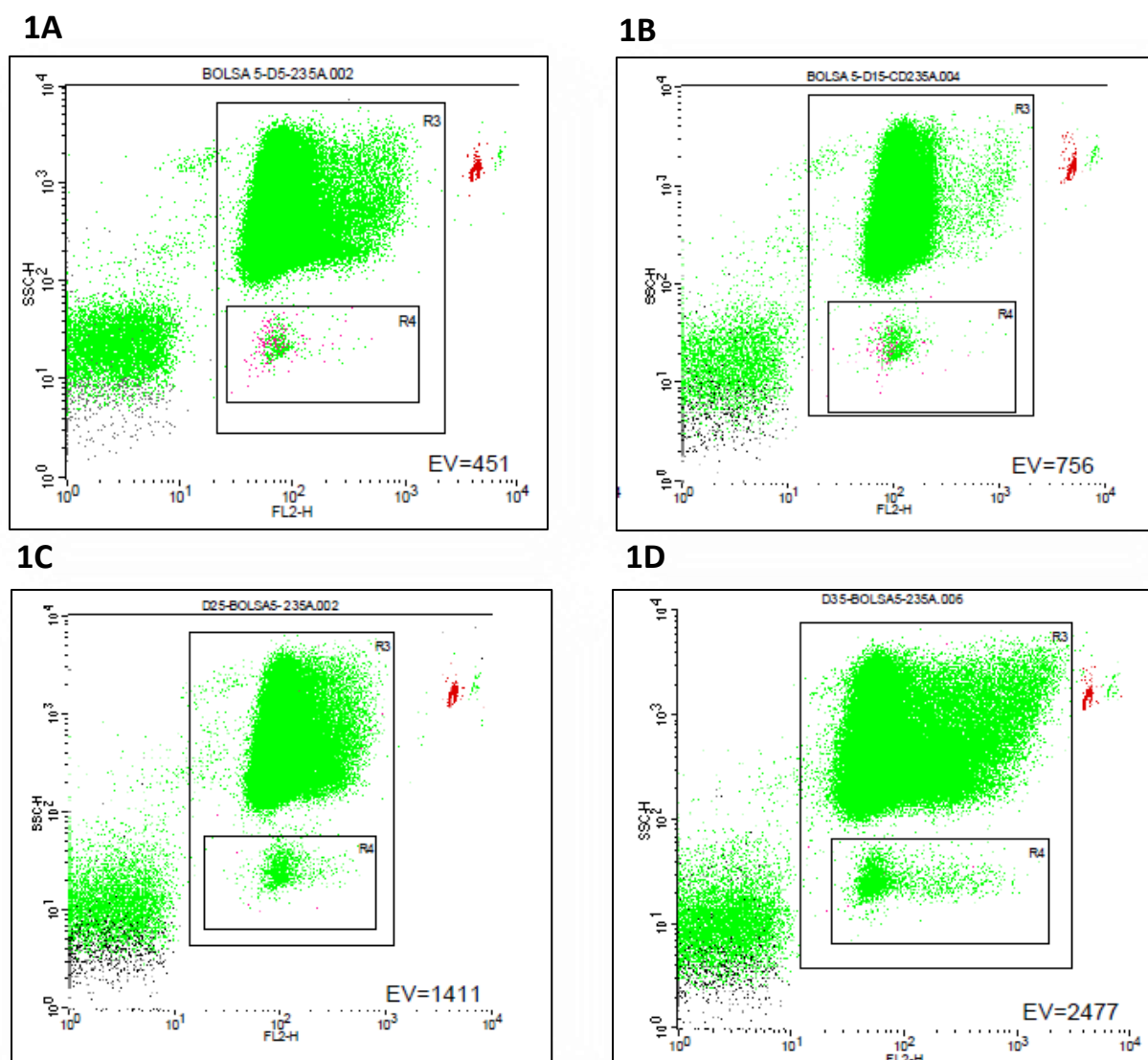
Todas as amostras do estudo tiveram resultados negativos para as hemoculturas tanto em D5 quanto em D35.

Vesículas extracelulares

Citometria de Fluxo

Assim como observado com o grau de hemólise, a dosagem de vesículas extracelulares também apresentou aumento com o tempo de estocagem. Os gráficos obtidos em citometria de fluxo exibem visível aumento no *gate* das VEs (Figura 1A – 1D).

Figuras 1 A-D. Aquisição das imagens da citometria de fluxo bolsa 5 em D5, D15, D25 e D35



Legenda Figuras 1 A-D: R3: *gate* total das células e VEs positivas para CD235a. R4: *gate* das VEs. EV: número de eventos lidos pela CF no *gate* das VEs em 1000 eventos das *beads* Trucount. **A:** CF Bolsa 5 em D5. **B:** CF Bolsa 5 em D15. **C:** CF Bolsa 5 em D25. **D:** CF Bolsa 5 em D35.

Intensidade de fluorescência e tamanho das VEs

O nível de expressão de CD235a mantém-se em eritrócitos e vesículas extracelulares, observado pela média de intensidade de fluorescência (Figura 2).

Figura 2. Intensidade de fluorescência CD235a+

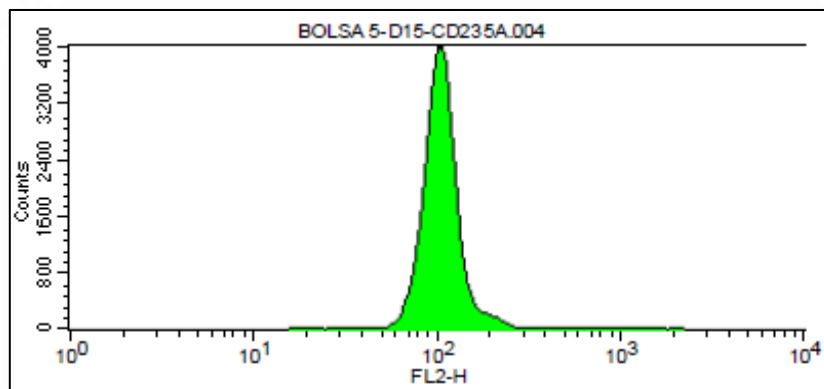


Fig 2. Counts x FL2-H: positividade para CD235a

O tamanho das vesículas extracelulares foi observado em escala de fluorescência. Com isso observou-se que as *beads* Trucount[®] são menores que as hemácias, com um tamanho de aproximadamente 3 μ m, conforme informado pelo fabricante (Figuras 3A-3C).

Figura 3A) *Dot Plot* das células totais obtidos em citometria de fluxo para de-
marcação das áreas de *gate*

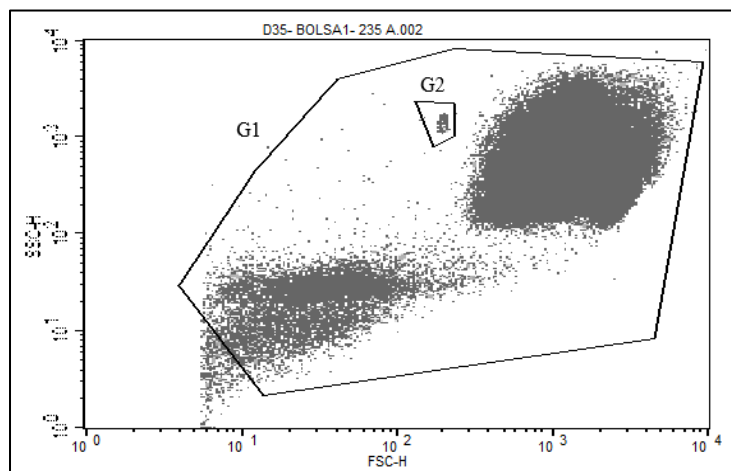


Figura 3A) FSC x SSC Gate 1 (G1): Total de células adquiridas; Gate 2(G2): *Beads* Tru-count® ($\approx 3\mu\text{m}$).

Figura 3B) Histograma D35 Bolsa 1 – População das VEs CD235a+

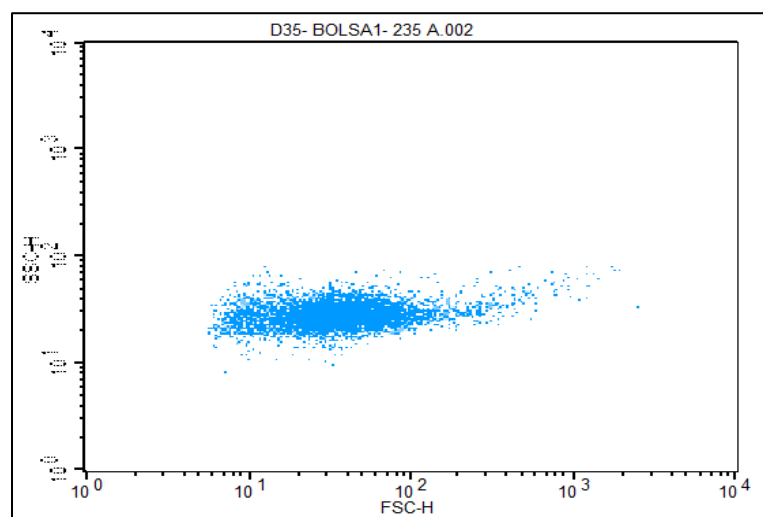


Figura 3B) FSC x SSC: População de VEs CD235a+

Figura 3C) Histograma da contagem x tamanho das *beads* Trucount e VEs

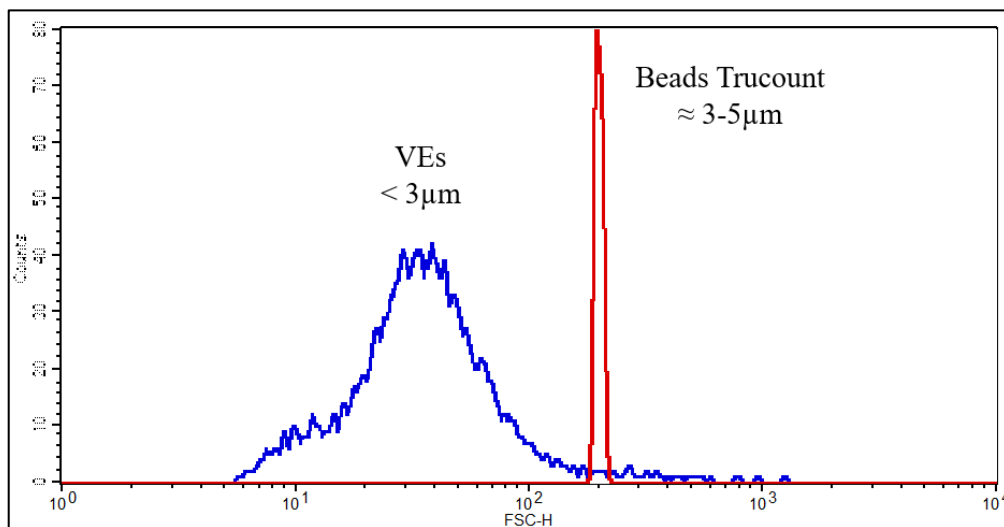


Figura 3C) Histograma de distribuição da contagem de VEs e *beads* (Counts x FSC: População das *beads* e VEs)

Para esclarecer a dúvida sobre o tamanho das *beads* Trucount™ foram realizados testes, em colaboração com o fabricante. Estes testes utilizaram *beads* de calibração, projetadas para uso em citômetros de fluxo BD™ executando o *software* BD FACSuite™. As *beads* permitem que o *software* execute automaticamente o controle de qualidade de desempenho (diário) e de caracterização, que deve ser usado a cada seis meses. As esferas de pesquisa de CS & T são marcadas com fluorocromos que são excitados pelos lasers do citômetro. As *beads* emitem fluorescência nos detectores usados para os fluorocromos, com tamanho conhecido entre dois e três μm . Os testes determinaram que as *beads* Trucount™ são menores que as *beads* de 3 μm do CS & T. O tamanho estimado é de 2,7 μm (Figura 4).

Figura 4 – Determinação do tamanho das *beads* Trucount™

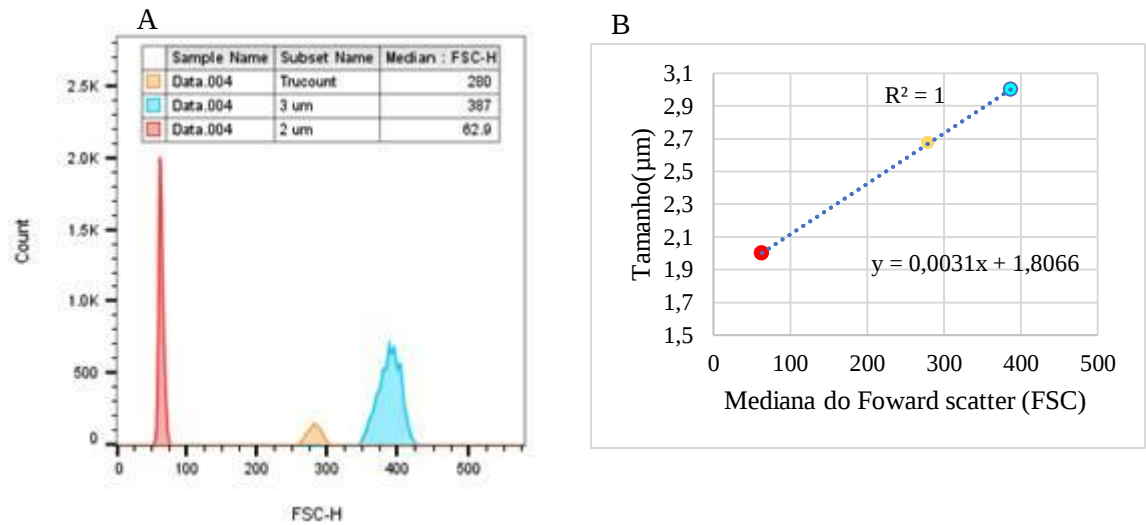


Fig 4A) Testes comparativos das *beads* de tamanho conhecido de 2 e 3 µm CS & T para identificação do tamanho correspondente no lote das *beads* Trucount™ utilizadas. **B)** Coeficiente de correlação de Pearson, onde em vermelho e azul as medianas das *beads* CS & T de 2 e 3 µm e em amarelo forte a mediana do tamanho das *beads* Trucount™.

A limitação para estimar o tamanho das VEs talvez seja o tamanho delas mesmas. O FACSCalibur™ tem sensibilidade para a análise de partículas a partir de 0,5 µm. Partículas menores que isso, se detectadas em FSC, provavelmente ficarão fora da escala de linearidade. Desta forma, pode-se afirmar que as VEs identificadas nos CH nos diferentes dias de conservação analisado, são menores que 2,7 µm.

Não foi observada correlação dos valores de VEs com o perfil da doação (Tabela 2).

Tabela 2. Relação do perfil da doação com as médias de vesículas extracelulares (VEs/ml) em todos os períodos analisados

		N	MÉDIA	DP	MIN	MAX
<i>Tipagem sanguí- nea ABO/RhD</i>	A negativo	1	1,62E+06	8,89E+05	8,48E+05	2,74E+06
	A+	10	2,65E+06	1,82E+06	5,38E+05	9,03E+06
	AB+	1	2,31E+06	1,77E+06	6,21E+05	4,78E+06
	B+	1	3,71E+06	2,71E+06	8,40E+05	7,15E+06
	O negativo	6	2,78E+06	1,50E+06	9,02E+05	6,36E+06
	O+	1	1,71E+06	5,62E+05	1,15E+06	2,25E+06
<i>Sexo</i>	Feminino	12	2,81E+06	1,73E+06	6,21E+05	7,15E+06
	Masculino	8	2,35E+06	1,65E+06	5,38E+05	9,03E+06
<i>Tipo de Bolsa</i>	Dupla	11	2,78E+06	1,90E+06	6,21E+05	9,03E+06
	Tripla	9	2,44E+06	1,44E+06	5,38E+05	6,94E+06

Correlação entre grau de hemólise e vesículas extracelulares

A correlação entre grau de hemólise e a quantidade de vesículas extracelulares foi diferente nos períodos analisados. Em D5 e D15 foi observada baixa correlação entre os testes, com $r = 0,22209$ em D5 e $r = 0,35037$ em D15 (Figuras 4 e 5). A partir de D25, observou-se aumento dessa correlação, sendo $r = 0,73458$ ($p=0,0002$) em D25, e $r = 0,78435$ ($p<0,0001$) em D35, o que apontou uma correlação forte entre os testes nos períodos analisados. (Figuras 6 e 7).

Figura 4. Correlação e coeficiente de Pearson grau de hemólise X vesículas extracelulares D5

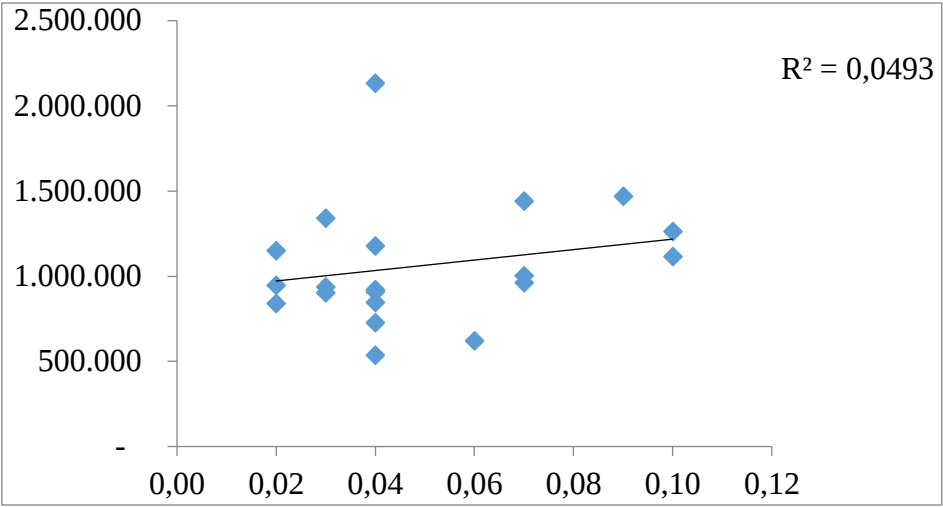


Fig. 4- Coeficiente de Pearson em D5 VEs x GH

Figura 5. Correlação e coeficiente de Pearson grau de hemólise X vesículas extracelulares D15

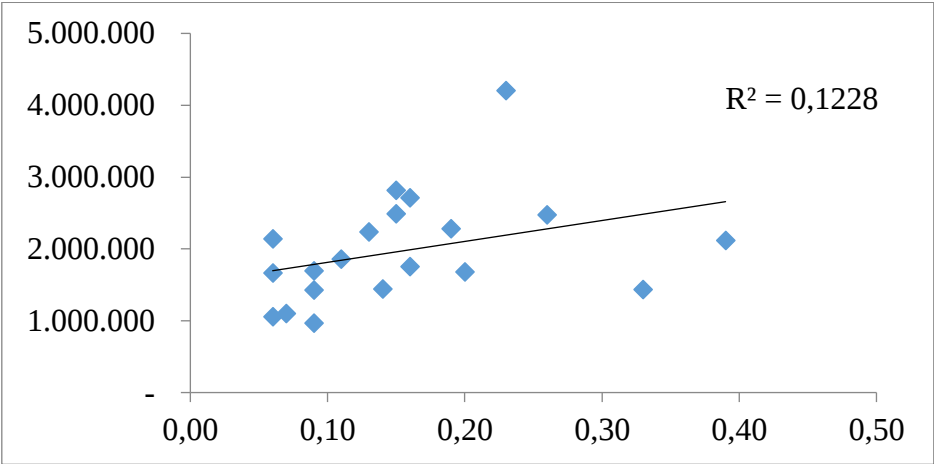


Fig. 4- Coeficiente de Pearson em D15 VEs x GH

Figura 6. Correlação e coeficiente de Pearson grau de hemólise X vesículas extracelulares D25

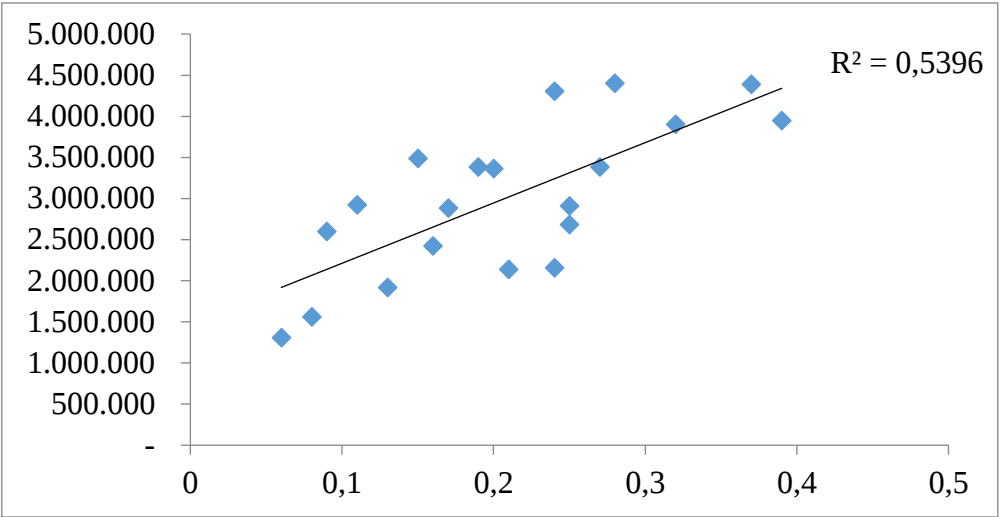


Fig. 4- Coeficiente de Pearson em D25 VEs x GH

Figura 7. Correlação e coeficiente de Pearson grau de hemólise X vesículas extracelulares D35

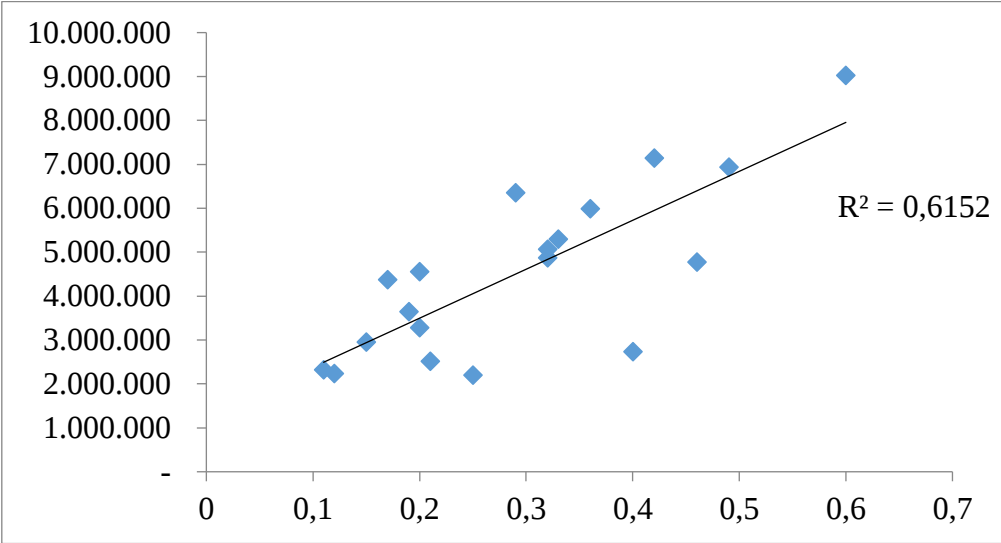


Fig. 4- Coeficiente de Pearson em D35 VEs x GH

Discussão

O grau de hemólise está relacionado com a viscosidade e volume do CH (17). Apesar da diminuição do volume da bolsa-mãe durante as coletas, não observou-se acentuação dos níveis de hemólise nas unidades estudadas, todos permaneceram abaixo do valor recomendado ($<0,8\%$). Este dado pode fazer emergir o fato de que a determinação do grau de hemólise possa não ser um indicador de qualidade.

O aumento de VEs também foi observado como um preditivo para o aparecimento de hemácias de menor volume corpuscular, pois estima-se que a vesiculação das hemácias em estoque fazem com que essas células diminuam em tamanho devido à alteração da membrana plasmática, levando ao aparecimento de poiquilócitos como: esferocitose, equinocitose e esquizocitose. Essas hemácias são retidas pelo baço após a transfusão, não realizando assim seu papel de aumentar o nível de hemoglobina e consequentemente a oxigenação dos tecidos, portanto são consideradas não funcionais (18).

Constatou-se neste trabalho que há uma fraca correlação entre o grau de hemólise e a concentração de VEs nos dias 5 e 15 do armazenamento dos CH, enquanto que essa mesma correlação se torna forte e positiva nos dias 25 e 35. Esses dados corroboram achados recentes da literatura (19) em estudo com bolsas de sangue total filtradas e CH filtrados, onde foram testadas as unidades em D7 e D42 (vencimento), onde os autores encontraram uma moderada correlação entre a concentração de VEs e o percentual de hemólise, para ambos os processamentos testados, com $r^2 = 0,4435$ para CH filtrada ($n=12$) e $r^2 = 0,4783$ para sangue total filtrado ($n=12$).

Neste trabalho não foi possível definir qual a quantidade de VEs/ml que poderia significar riscos aos receptores, porém, estudar a base e compreender a fisiologia das VEs e como se comportam *in vitro*, colabora para que as pesquisas possam evoluir em questões de segurança transfusional e novas técnicas diagnósticas.

De acordo com a avaliação dos tamanhos das VEs nos *dot plots* e histogramas baseados na fluorescência emitida, foi possível analisar que as VEs encontradas nesse estudo apresentam tamanho $< 2,7 \mu\text{m}$, correspondente ao tamanho de corpos apoptóticos. As VEs identificadas são fragmentos que carregam consigo parte da membrana celular, de maneira que a marcação e quantificação só foi possível devido à presença de CD235a nas mesmas.

Neste trabalho evidenciamos que as VEs se acumulam e aumentam gradativamente nos CH durante o tempo de armazenamento, como já descrito, e que há correlação com o teste padrão de avaliação de qualidade, grau de hemólise, principalmente nos dias finais do armazenamento. No entanto, os mecanismos de formação e liberação das VEs ainda não são totalmente elucidados e o conteúdo das mesmas e suas funções variam bastante. A identificação de componentes distintos da lesão de armazenamento com tais qualidades preditivas orientará o atendimento clínico, e também fornecerá uma base racional para o rápido desenvolvimento e adaptação do sistema de armazenamento de CH.

Agradecimentos

À todos os doadores de sangue pelas doações voluntárias ao Hemocentro de Botucatu. Aos Laboratórios do Hemocentro de Botucatu: Componentes Lábeis, Imunohematologia do doador, Citometria de fluxo e Engenharia Celular, e à assessoria técnico científica da BD™ Brasil, por todo apoio e ajuda na realização desse estudo.

Referências (Artigo)

1. 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.
2. Remy KE, Spinella PC. Red blood cell storage age – what we know from clinical trials. *Expert Review of Hematology* [Internet]. 2016;9(11):1011–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17474086.2016.1243051>
3. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. 2016.
4. 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>
5. 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.
6. 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.
7. Said AS, Doctor A. Influence of red blood cell-derived microparticles upon vasoregulation. Vol. 15, *Blood Transfusion*. 2017. p. 522–34.
 8. 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>
 9. Minciocchi 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>
 10. 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>
 11. Taylor DD, Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact downstream analyses of their cargoes. *Methods* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2018 Jul 2];87:3–10. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202315000924?sho>

wall%3Dtrue%26via%3Dhub#ab010

12. Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J Immunol Methods*. 2012;375(1–2):207–14.
13. Menck K, Bleckmann A, Schulz M, Ries L, Binder C. Isolation and Characterization of Microvesicles from Peripheral Blood. *J Vis Exp*. 2017;(119).
14. Antwi-Baffour S, Adjei JK, Agyemang-Yeboah F, Annani-Akollor M, Kyeremeh R, Asare GA, et al. Proteomic analysis of microparticles isolated from malaria positive blood samples. *Proteome Sci*. 2017;15(1):1–15.
15. Acker JP, M.Croteau I, Yi QL. An analysis of the bias in red blood cell hemolysis measurement using several analytical approaches. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2012;413(21–23):1746–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.06.028>
16. 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>
17. Ribeiro M, Alcântara KC de. Avaliação da qualidade de concentrados de hemácias em um Banco de Sangue privado de Goiânia , Goiás. *J Heal Sci Inst*. 2014;32(2):134–8.

18. Roussel C, Dussiot M, Marin M, Morel A, Ndour PA, Duez J, et al. Spherocytic shift of red blood cells during storage provides a quantitative whole cell-based marker of the storage lesion. *Transfusion*. 2017;
19. Almizraq RJ, Holovati JL, Acker JP. Characteristics of Extracellular Vesicles in Red Blood Concentrates Change with Storage Time and Blood Manufacturing Method. *Transfus Med Hemotherapy*. 2018;185–93.

Perspectivas

In vitro:

- reanalisar retrospectivamente a eficácia da determinação do grau de hemólise como indicador de qualidade para CH.
- Determinar de maneira universal a quantificação de VEs em bolsas de CH *standard*, filtrado *in line*, filtrado na bancada, irradiado e lavados.
- Propor a quantificação de VEs por métodos biotecnológicos, rápidos e seguros que sejam economicamente viáveis para serem implantados na prática transfusional (*Lab-on-a-chip*).

In vivo:

- Quantificar VEs em pacientes transfundidos, segundo o sexo, as comorbidades e o tempo de armazenamento dos CH.
- Quantificar VEs em pacientes transfundidos, segundo o sexo, as comorbidades e o tempo de armazenamento dos CH, que tenham tido uma reação adversa imediata ou ineficácia transfusional com sequestro do CH transfundido, mais rapidamente.
- Estabelecer protocolo de infusão de diferentes quantidade de VE de CH, em modelo murino, analisando em grupo de animais as consequências na hemostasia, na produção de citocina séricas e análise histopatológica em cortes histológicos de cérebro, pulmões, rins, fígado e baço 24 e 48 horas após a infusão.

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, Nealieg 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, Kanas 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 Eletronica*. 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. Föller 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 Nº 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>