



ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE
DE LISBOA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA



INSTITUTO
POLITÉCNICO
DE LISBOA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**IMPACTO DO MÉTODO DE CONGELAÇÃO DO PLASMA
PARA FRACIONAMENTO NO DOSEAMENTO DE FATOR VIII
EM COLHEITAS DE DADORES DE SANGUE**

JOÃO PEDRO DUQUE FERNANDES

ORIENTADOR: DOUTORA EDNA SORAIA GREGÓRIO RIBEIRO - ESCOLA
SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA / INSTITUTO POLITÉCNICO
DE LISBOA

ORIENTADOR: DOUTOR ANTÓNIO MANUEL ROBALO NUNES - ESCOLA
SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA / INSTITUTO POLITÉCNICO
DE LISBOA

Mestrado em Tecnologias Clínico Laboratoriais

Lisboa, 2024

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**IMPACTO DO MÉTODO DE CONGELAÇÃO DO PLASMA
PARA FRACIONAMENTO NO DOSEAMENTO DE FATOR VIII
EM COLHEITAS DE DADORES DE SANGUE**

JOÃO PEDRO DUQUE FERNANDES

ORIENTADOR: DOUTORA EDNA SORAIA GREGÓRIO RIBEIRO - ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA / INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ORIENTADOR: DOUTOR ANTÓNIO MANUEL ROBALO NUNES - ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA / INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

JÚRI:

PRESIDENTE: DOUTORA CARINA ALEXANDRA LADEIRA – ESCOLA SUPERIOR DE
TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA – ESTeSL-IPL

ARGUENTE: ESPECIALISTA PEDRO PARRACHA VENTURINI – DIREÇÃO GERAL DE SAÚDE
- DGS

Mestrado em Tecnologias Clínico Laboratoriais

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2024

DIREITOS DE CÓPIA

Autorizo a Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa o direito de arquivar e publicar a presente dissertação e de a divulgar em repositórios científicos para fins educacionais ou de pesquisa não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao autor.

AGRADECIMENTOS

Esta etapa na minha vida é fruto não apenas de um esforço pessoal, mas também de um conjunto de pessoas que me deram um incentivo. A todos os que me ajudaram a concluir esta fase desafiadora e gratificante, o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, aos meus orientadores, Doutora Edna Ribeiro e Doutor António Robalo, pelo constante apoio e incentivo ao longo de todo o processo. A vossa experiência e percurso profissional são um motivo de inspiração.

Um especial agradecimento a toda a equipa do serviço de Imuno-hemoterapia da Unidade Local de Saúde do Médio Tejo, por todo o apoio e colaboração durante este período, bem como a todos os dadores de sangue que aceitaram participar neste estudo.

A toda a minha família, pais, sogra, companheira e filhos, que foram fundamentais, foram pacientes e resilientes nos momentos de maior stress (não é fácil aturar-me), deram-me todo o suporte emocional e compreenderam os momentos de ausência sempre que precisei. Obrigado por acreditarem em mim e estarem sempre a meu lado. Vocês são o meu pilar! Filhos, que vos sirva de exemplo, só há progresso, quando há desconforto. Procurem o vosso desconforto! Um dia vão perceber que sem esforço nada se conquista!

RESUMO

O Plasma é a fração líquida do sangue, rico em albumina, imunoglobulinas e fatores da coagulação. O uso de produtos derivados do plasma é essencial e tende a aumentar mundialmente, nomeadamente os concentrados de FVIII (FVIII), um fator lábil cuja atividade é influenciada por diversas variáveis, nomeadamente a congelação. O FVIII é obtido por tecnologia recombinante e pelo fracionamento pela indústria dos constituintes do plasma colhido em dadores de sangue. O aproveitamento do Plasma é uma recomendação do Conselho da Europa e uma estratégia nacional, possibilitando diminuir a dependência externa de hemoderivados. Neste contexto, é relevante a otimização dos processos inerentes à produção de Plasma para fracionamento (PF).

Com o objetivo de avaliar como a congelação em arca ultracongeladora e num congelador rápido de plasmas, influenciam a concentração de FVIII no PF foi realizado um estudo observacional comparativo, no Serviço de Sangue da Unidade Hospitalar de Torres Novas, da Unidade Local de Saúde do Médio Tejo (ULSMT). Envolveu 124 dadores benévolos de sangue, cujas amostras foram colhidas em três momentos, no início da colheita, no plasma antes da congelação do PF e um mês após a congelação. Foram também relacionadas outras variáveis de forma a responder a objetivos específicos, como o grupo sanguíneo e FVIII, o tempo desde a colheita de sangue total até à congelação e a diferença de FVIII entre estes dois momentos.

Espera-se que os resultados obtidos contribuam de uma forma importante, na escolha do melhor método de congelação para a preservação do FVIII, bem como contribuir para a adoção de boas práticas na produção de Componentes Sanguíneos (CS).

Palavras-chave: Dadores de sangue, Plasma para fracionamento, Fator VIII, Congelação de plasma

ABSTRAT

Plasma is the liquid fraction of blood, rich in albumin, immunoglobulins, and coagulation factors. The use of plasma-derived products is essential and tends to increase worldwide, particularly FVIII concentrates (FVIII), a labile factor whose activity is influenced by various variables, including freezing. FVIII is obtained through recombinant technology and the fractionation of plasma components collected from blood donors, by the industry. The utilization of plasma is recommended by European Council and is a national strategy to reduce external dependence on blood products. In this context, optimizing the processes involved in the production of plasma for fractionation (PF) is relevant.

To evaluate how an ultra-freezer and a rapid plasma freezer, influence the concentration of FVIII in PF, a comparative observational study was conducted at the Torres Novas Hospital Blood Service, part of *Unidade Local de Saúde do Médio Tejo* (ULSMT). The study involved 124 voluntary blood donors, whose samples were collected at three different times: at the beginning of the collection, in the plasma before the freezing of the PF, and one month after freezing. Other variables were also related in order to respond to specific objectives, such as blood group and FVIII, the time from whole blood collection to freezing and the FVIII difference between these two moments.

It is expected that the results obtained will contribute in an important way to choose the best freezing method for the FVIII preservation, as to the adoption of good manufacturing practices in blood components production.

Key words: Blood Donors, Plasma for fractionation, Factor VIII, Plasma freezing

ÍNDICE GERAL

DIREITOS DE CÓPIA	I
AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRAT	VII
ÍNDICE GERAL	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
ABREVIATURAS	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA	3
2.1 Plasma para fracionamento em Portugal.....	4
2.2 Plasma e derivados plasmáticos	6
2.3 Fracionamento de Plasma pela indústria.....	7
2.4 Congelação e armazenamento do plasma para fracionamento produzido nos serviços de sangue	9
2.5 Descongelção do plasma	10
2.6 Critérios de qualidade e segurança do Plasma destinado a fracionamento	11
2.7 Fator VIII	12
3. OBJETIVOS E HIPÓTESES DO ESTUDO.....	17
3.1 Questão de investigação	17
3.2 Objetivos	17
3.2.1 Objetivo geral.....	17
3.2.2 Objetivos específico	17
3.3 Hipótese de estudos.....	17
4. METODOLOGIA.....	18
4.1 Tipo de Estudo	18
4.2 Local de estudo.....	18

4.3	Amostragem.....	18
4.4	Variáveis	18
4.5	Instrumentos de recolha da amostra	19
4.6	Procedimentos	19
4.7	Tratamento estatístico.....	20
4.8	Considerações éticas e legais.....	21
5.	RESULTADOS	22
5.1	Estatística Descritiva.....	22
5.1.1	Duração da Colheita de ST e Processamento em PF	22
5.1.2	Volume de ST e PF	23
5.1.3	Grupos sanguíneos ABO e Rh (D) da amostra.....	23
5.1.4	Resultados do doseamento de fviii.....	24
5.1.5	FVIII inicial e Grupo Sanguíneo ABO	26
5.1.6	FVIII do PF antes e após a congelação de acordo com o método utilizado.....	26
5.2	Estatística Indutiva.....	27
5.2.1	Correlação entre variáveis	27
5.2.2	Grupo sanguíneo ABO e FVIII.....	28
5.2.3	FVIII nas três diferentes fases do estudo	29
5.2.4	Método de congelação e preservação do FVIII	30
6.	DISCUSSÃO	31
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
8.	LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
	APÊNDICES	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Volume de colheitas de plasma por região geográfica (2007-2015). Adaptado de Strengers et al. (2016).....	3
Figura 2.2 - Produção, utilização e inutilização de plasma. Legenda: IgG: Imunoglobulina tipo G; PMF: Plasma Master File. Adaptado de Burnouf et al. (2014).....	4
Figura 2.3 - Produção de plasma para fracionamento a partir do Sangue Total. Imagem inédita.	6
Figura 2.4 - Evolução do processo tradicional de fracionamento de plasma. Legenda: Alfa 1-AT. Alfa 1-antitripsina; aFII, fator II ativado (trombina); AT, antitrombina; FVII, fator VII; FVIII, fator VIII; FIX, fator IX; IgG, imunoglobulina G; PC, proteína C; PCC, complexo protrombínico, vWF, fator von Willebrand. Adaptado de Burnouf et al. (2016).....	8
Figura 2.5 - Arca ultracongeladora vertical -80°C - Thermo Scientific® (esquerda) e congelador rápido de plasmas CSF61 - B Medical Systems® (direita). Imagem inédita.	10
Figura 2.6 - Descongelador de plasmas Plasmatherm - Barkey®. Imagem inédita.....	11
Figura 2.7 - Estrutura e locais de interação da proteína do FVIII. Adaptado de Graw et al. (2005).....	12
Figura 2.8 - FVIII na cascata da coagulação. ⁴⁹	13
Figura 2.9 -Genética da hemofilia hereditária. ⁶³	15
Figura 5.1 - Duração da colheita de Sangue Total.	22
Figura 5.2 - Distribuição do grupo sanguíneo ABO.	24
Figura 5.3 - Distribuição do grupo sanguíneo ABO e Rh.	24
Figura 5.4 - Contagem de FVIII durante as três fases do estudo.	25
Figura 5.5 - Tendência nas quantidades de FVIII (UI/dl) nas três fases do estudo.....	25
Figura 5.6 - FVIII inicial por Grupo Sanguíneo "Não O" e "O".	26
Figura 8.1 - Diferentes tipos e categorias de plasma. .***PCC Significa Complexo de Protrombina,.****Poderá ser submetido a medidas de segurança adicionais, com redução de patógenos. ²⁸	47
Figura 8.2 - Parâmetros de avaliação no controlo de qualidade do plasma destinado ao fracionamento. ³⁷	50
Figura 8.3 - Procedimento e responsabilidades nas Fases do estudo.	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1 - Critérios de elegibilidade para integração no estudo.....	18
Tabela 4.2 - Variáveis do estudo.....	19
Tabela 4.3 - Instrumentos de recolha da amostra.....	19
Tabela 5.1- Duração entre a colheita de ST e a congelação do Plasma (hh:mm).....	23
Tabela 5.2 - Volume de ST e de Plasma para fracionamento.	23
Tabela 5.3 - FVIII do Plasma para fracionamento antes e após a congelação, por método de congelação. Fator VIII (UI/dl).....	27
Tabela 5.4 - Resultados da aplicação da correlação de Spearman entre as variáveis.....	28
Tabela 5.5 - Resultados dos testes estatísticos aplicados para relacionar grupo “Não O” e grupo “O”. nível de significância é 0,05.	28
Tabela 5.6 - Estatística do teste de Friedman. O nível de significância é 0,05.....	29
Tabela 5.7 - Diferença de FVIII antes e após congelação, por método de congelação. O nível de significância é 0,05.....	30

ABREVIATURAS

AIQ – Amplitude interquartil

BC – *Buffy-coat*

BPF – Boas Práticas de Fabrico

CHMT – Centro Hospitalar do Médio Tejo, EPE

CS – Componentes Sanguíneos

CSLI – Instituto de Padrões Clínico Laboratoriais

edQM – Guia para a preparação, uso e garantia de qualidade dos componentes do sangue do Conselho da Europa, versão 21

ESTESL – Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa

FAH – Fator anti hemofílico

FVIII – Fator VIII

FvW- Fator von Willebrand

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IPST - Instituto Português do Sangue e da Transplantação

Máx – Valor máximo

Mín – Valor mínimo

MD - Mediana

PF – Plasma para fracionamento

PON – Procedimentos Operacionais Normalizados

rFVIII – Fator VIII recombinante

ST – Sangue Total

SS – Serviço de Sangue

TSDT - Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica

ULSMT- Unidade Local de Saúde do Médio Tejo

1. INTRODUÇÃO

O fracionamento de plasma é uma indústria em expansão, com um volume crescente de plasma fracionado, de modo a responder à procura de medicamentos derivados do plasma. Assumem um papel relevante na medicina, integrando a lista de Medicamentos Essenciais pela OMS. No entanto, ainda há um desperdício significativo deste recurso, o que representa uma oportunidade perdida para melhorar a saúde pública mundial.^{1,2}

O Plasma faz parte do sistema circulatório humano e representa cerca de 55% do volume total do sangue no organismo, é constituído por água e proteínas, designadamente albumina, imunoglobulinas e fatores da coagulação.³ Desempenha um papel vital em várias funções do organismo, entre as quais a coagulação sanguínea, tornando o Plasma numa matéria prima importante na produção de concentrados de fatores da coagulação necessários para a profilaxia e tratamento de doentes com distúrbios hemorrágicos. São exemplo os doentes com Hemofilia A, uma doença genética recessiva associada ao cromossoma X, caracterizada por uma hemorragia prolongada devido à diminuição da atividade do FVIII.

A principal estratégia terapêutica na hemofilia A é a infusão intravenosa do fator da coagulação em défice, o FVIII, que poderá ser obtido de diferentes formas, anticorpos monoclonais de FVIII, FVIII recombinante e FVIII derivado do Plasma.^{4,5}

O FVIII derivado do Plasma é obtido através de *pools* de Plasma provenientes das colheitas de sangue total e plasmaferese realizadas a doadores de sangue, posteriormente fracionado pela indústria do Plasma, de acordo com Boas Práticas de Fabrico (BPF).

A fim de minimizar a perda da atividade da coagulação, o processo de produção deve ser otimizado. Um indicador para medir a eficiência do manuseamento, congelação e descongelação do Plasma será o FVIII, uma glicoproteína pró-coagulante com características lábeis, que circula na corrente sanguínea na forma de heterodímero juntamente com o fator de von Willebrand (FvW).^{6,7} A degradação do FVIII é influenciada por diferentes fatores, entre os quais o método de congelação, o Plasma deverá ser congelado até 24 horas após a colheita e assegurado que o centro (*core*) do Plasma atinge uma temperatura igual ou inferior a -25°C nas primeiras 12 horas de congelação.⁸

Deste modo, será relevante entender como diferentes métodos de congelação podem afetar a atividade do FVIII, garantindo a qualidade e eficácia dos produtos derivados do Plasma produzidos pela indústria, recorrendo ao Plasma colhido em doadores nos Serviços de Sangue (SS).

Esta avaliação poderá ter impacto na produção de hemoderivados e permitirá disponibilizar produtos com níveis adequados de FVIII para o tratamento de pacientes com distúrbios da coagulação.

2. CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA

Nos países desenvolvidos, milhões de litros de plasma são descartados por serem impróprios para o fracionamento, uma perda económica e moralmente imperdoável. De acordo com Burnouf et al. (2019), vários estudos demonstraram que a utilização de concentrado de FVIII tem tendência a aumentar à medida que os recursos económicos também aumentam.^{9,10} Strengens et al. (2016), afirmaram que em 2014 os derivados plasmáticos na Europa eram essencialmente provenientes dos Estados Unidos da América, que historicamente têm dominado o mercado do Plasma (Figura 2.1), país onde é legal compensar financeiramente os doadores, ao contrário da maioria dos países europeus, onde a dádiva é benévola.^{11,12}

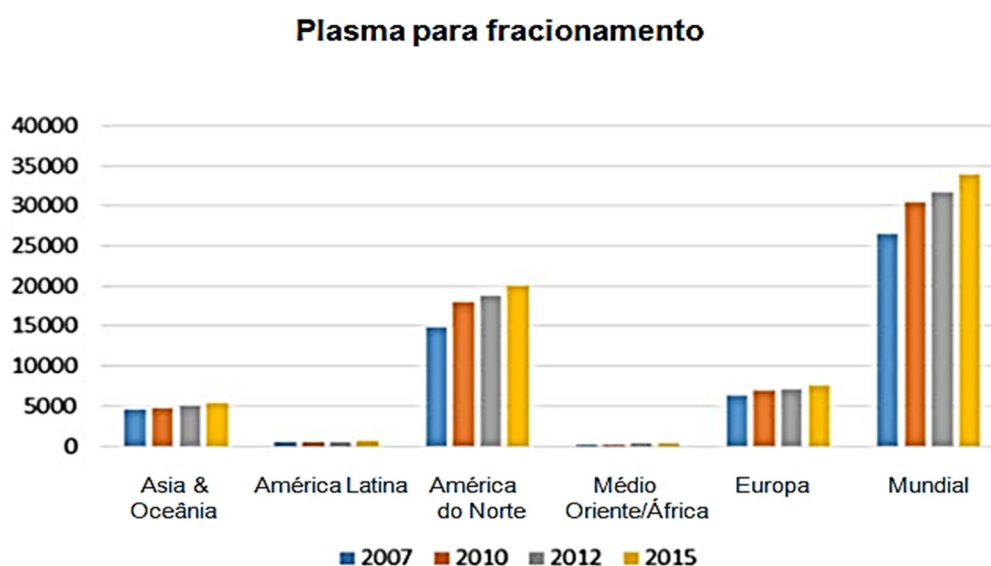


Figura 2.1 - Volume de colheitas de plasma por região geográfica (2007-2015). Adaptado de Strengens et al. (2016).

Segundo De Silvestro et al. (2019), em Itália o plasma enviado para a indústria estava a aumentar lentamente, no entanto, a quantidade enviada ainda não era suficiente para responder à procura. Em 2014, os custos de aquisição de produtos derivados do plasma no mercado externo foram estimados em 252.000.000 euros.¹³

A disponibilidade de produtos plasmáticos fracionados é extremamente desequilibrada a nível mundial. Nos países em desenvolvimento a escassez de produtos de plasma está associada a vários fatores, que incluem a falta de recursos económicos para importar essas terapias de países industrializados, à quantidade e qualidade insuficiente de plasma para sustentar um programa de fracionamento com uma empresa fracionadora externa e à falta de capacidades económicas, técnicas e humanas para construir uma instalação de fracionamento de plasma nacional viável (Figura 2.2).^{2,10,14}

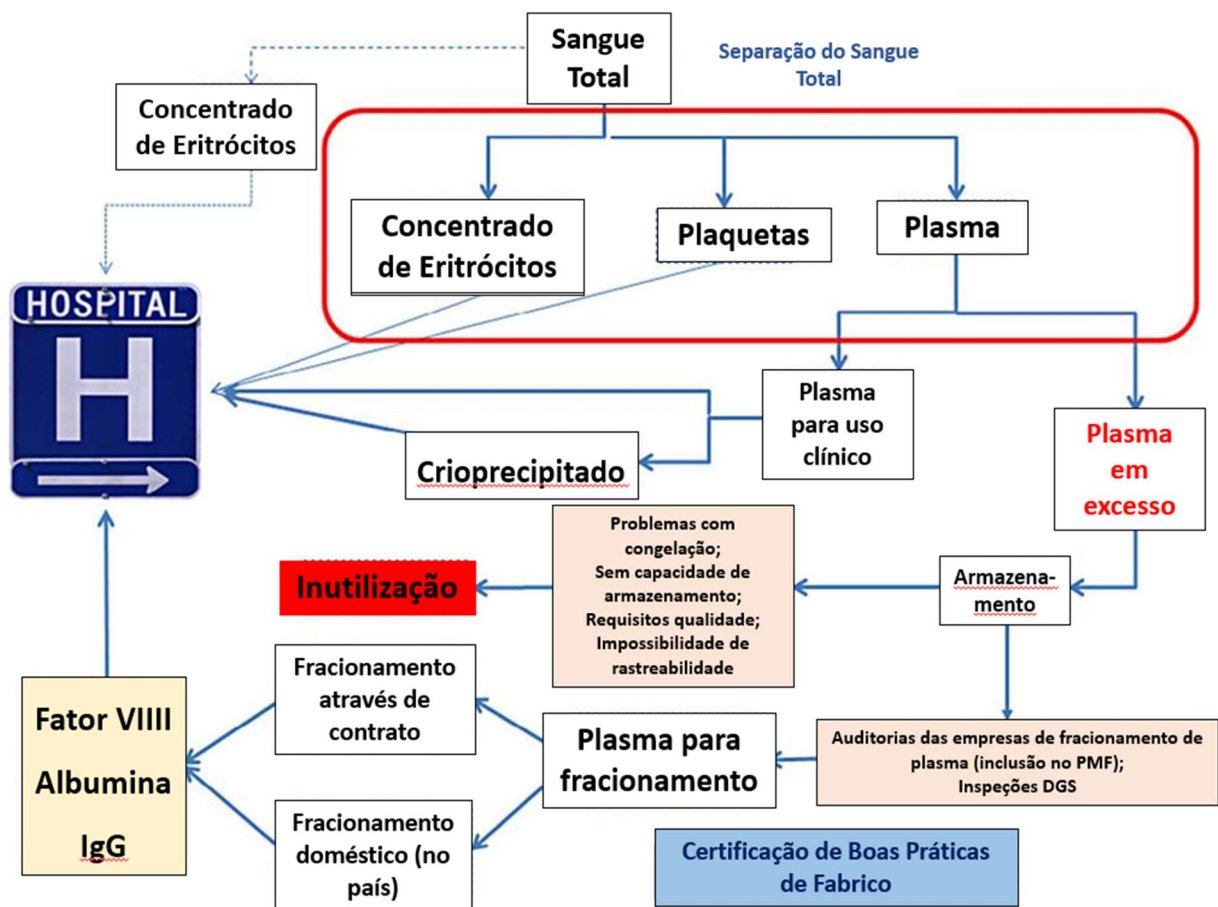


Figura 2.2 - Produção, utilização e inutilização de plasma. Legenda: IgG: Imunoglobulina tipo G; PMF: Plasma Master File. Adaptado de Burnouf et al. (2014).

Enquanto nos países desenvolvidos os doentes beneficiam de terapias obtidas industrialmente provenientes de proteínas plasmáticas, os doentes dos países subdesenvolvidos enfrentam graves dificuldades para receber tratamentos seguros e eficientes. Neste contexto, incorporar os medicamentos derivados do plasma dentro de um paradigma de *Patient Blood Management (PBM)* será uma mais valia de modo a promover o uso.¹⁵

2.1 PLASMA PARA FRACIONAMENTO EM PORTUGAL

De acordo com o Despacho n.º15300-A/2016, “o Conselho da Europa tem vindo a recomendar que os Estados desenvolvam mecanismos que garantam a autossuficiência em Plasma, face às necessidades de utilização do mesmo, bem como dos medicamentos dele derivado, de forma a eliminar progressivamente o seu desperdício”¹⁶, motivo pelo qual foi celebrado em 2017 um contrato programa entre o Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST)

e as doze instituições hospitalares com maior número de colheitas para a realização de um procedimento concursal comum para fracionamento do Plasma. Este Programa Estratégico visou o fornecimento de medicamentos derivados do Plasma resultantes do processo de fracionamento de Plasma humano exclusivamente português, com garantia de segregação da matéria prima de origem nacional.

De acordo com a nota de imprensa de 3 de janeiro de 2019, *“Pela primeira vez, o IPST vai fornecer aos hospitais, já no início deste ano, medicamentos derivados do plasma, a partir de plasma resultante das dádivas benévolas de sangue colhidas em Portugal. Conclui-se assim, na prática, a 1.ª fase do Plano Estratégico Nacional de Fracionamento do Plasma, com a utilização de 30 mil litros de plasma, colhidos na rede do IPST.”*, que representou uma poupança de estimada em 2 milhões de euros.¹⁷

A relevância estratégica da produção de concentrados de fatores da coagulação é confirmada pela sua inclusão na Lista de Medicamentos Essenciais pela OMS, tendo esta instituição emitido recomendações que servem de guia aos serviços de sangue dos países desenvolvidos e em desenvolvimento, de modo a habilitar e facilitar a implementação de procedimentos para a produção segura de Plasma e seus derivados.^{1,18-21}

A União Europeia define recursos estratégicos como *“matérias primas economicamente importantes que estão sujeitas a um maior risco de interrupção do fornecimento”*, nomeadamente o sangue e seus derivados.¹¹

A execução de contratos com a indústria farmacêutica para fracionamento do plasma nacional, tendo em vista a recuperação de proteínas, apresenta como benefícios o facto destas empresas disporem da capacidade necessária, bem como de processos de fracionamento já estabelecidos e licenciados pelas principais entidades reguladoras, permitindo que os produtos apresentem segurança, qualidade e eficácia.²²

O aproveitamento do PF nacional tem como mais valia reduzir a dependência externa dos medicamentos derivados do Plasma e permitir que os doentes portugueses possam receber tratamento com produtos de origem portuguesa, país onde a atividade de colheita, análise, processamento e distribuição de sangue é bastante legislada, regulamentada e inspecionada. Um programa de fracionamento nacional ajuda a melhorar o nível de qualidade dos procedimentos utilizados nos serviços de sangue, com impacto positivo na qualidade e segurança dos componentes sanguíneos. A adoção dos requisitos de BPF tem impactos positivos nos serviços, nomeadamente nos critérios de seleção aplicados aos dadores, nos testes realizados às dádivas de plasma, no aumento da vigilância epidemiológica, na melhoria dos sistemas de informação pós dádiva, nos procedimentos utilizados na colheita para processamento, congelação, armazenamento, transporte de plasma e consequentemente na saúde pública através da melhoria da segurança transfusional.²³

2.2 PLASMA E DERIVADOS PLASMÁTICOS

O plasma é a fração líquida do sangue humano, é essencialmente constituído por água, iões nutrientes e proteínas.²⁴

Os métodos de processamento para obtenção de plasma variam entre continentes, existindo várias normas internacionais.²⁵

Na Europa, os Plasmas para uso terapêutico são produzidos por Serviços de Sangue (SS) a partir de doações benévolas e conseqüente centrifugação do ST (Figura 2.3), e/ou por procedimentos de aférese, resultando num componente de uso terapêutico lábil, fresco.



Figura 2.3 - Produção de plasma para fracionamento a partir do Sangue Total. Imagem inédita.

Poderão também ser fornecidos sob a forma de hemoderivado quando fabricados industrialmente a partir de uma *pool* constituída por vários Plasmas. (APÊNDICE I).

O Plasma fresco congelado inativado, o de quarentena e o Plasma proveniente da indústria, sob a forma de hemoderivado, são os mais utilizados em Portugal.

O plasma fresco congelado é utilizado em doentes com hemorragia ativa e com défice de múltiplos fatores, doenças hepáticas, coagulação intravascular disseminada, transfusão maciça, púrpura trombocitopénica trombótica, deficiência de fator V e deficiência dos fatores II, V, IX e X. Embora a literatura apresente evidências de lesão pulmonar aguda como efeito adverso das transfusões de plasma, a incidência diminuiu com a restrição do uso de plasma feminino para transfusão. O plasma não deve ser utilizado para reposição de volémia.^{24,26}

A utilização clínica de plasma no adulto está descrita na Norma da DGS N^o9/2012, atualizada em 02/12/2015.²⁷

Por outro lado, o Plasma Humano também poderá ser utilizado na produção de produtos farmacêuticos fracionados, conhecidos também por produtos do plasma ou medicamentos derivados do plasma e que contêm milhares de proteínas principalmente albumina, imunoglobulinas e fatores de coagulação, como por exemplo o FVIII.^{11,28,29}

Os constituintes do plasma poderão ser influenciados por diversos fatores, incluindo aspetos relativos aos dadores, tais como a idade, sexo, dieta e perfil genético, por fatores ambientais, por procedimentos de colheita, processamento e separação do sangue, temperatura de armazenamento e métodos de congelação e descongelação. Todos estes fatores modificam os níveis de proteínas presentes no plasma, provocando heterogeneidade.^{24,30}

2.3 FRACIONAMENTO DE PLASMA PELA INDÚSTRIA

A indústria do plasma para fracionamento está baseada em processos conhecidos e comprovados, que gradualmente evoluiu face à necessidade de diversificar os produtos extraídos, melhorar a pureza e segurança contra vírus e de modo a responder às necessidades do mercado.

O plasma pode ser fracionado em várias proteínas importantes. A tecnologia utilizada pela maioria das empresas fracionadoras de plasma baseia-se ainda na utilização de etanol a frio, subsequente a uma etapa de precipitação a temperatura fria, a crioprecipitação.

Esta tecnologia foi desenvolvida na década de 1940 por Cohn e colaboradores, sofreu na Europa algumas simplificações com o objetivo de melhorar a produtividade e a capacidade de recuperação de albumina e imunoglobulinas, a técnica envolve mudanças sequenciais na concentração de etanol, pH e condutividade. Inicialmente o procedimento de fracionamento era destinado apenas à recuperação de albumina e imunoglobulinas, ao longo dos anos foi evoluindo à medida que surgiram as necessidades de produzir outros produtos plasmáticos, permitindo o aproveitamento de proteínas lábeis de maior nível de pureza, bem como aumentar a sua taxa de recuperação.

A diversificação foi alcançada com a implementação da cromatografia. Este método é a principal ferramenta de purificação dos fatores da coagulação lábeis, por exemplo, FVIII, fator IX, fator VII), inibidores da protease, por exemplo, alfa 1-antitripsina) e anticoagulantes (proteína C, antitrombina). As tendências no esquema de fracionamento do plasma estão representadas na Figura 2.4.³¹⁻³³

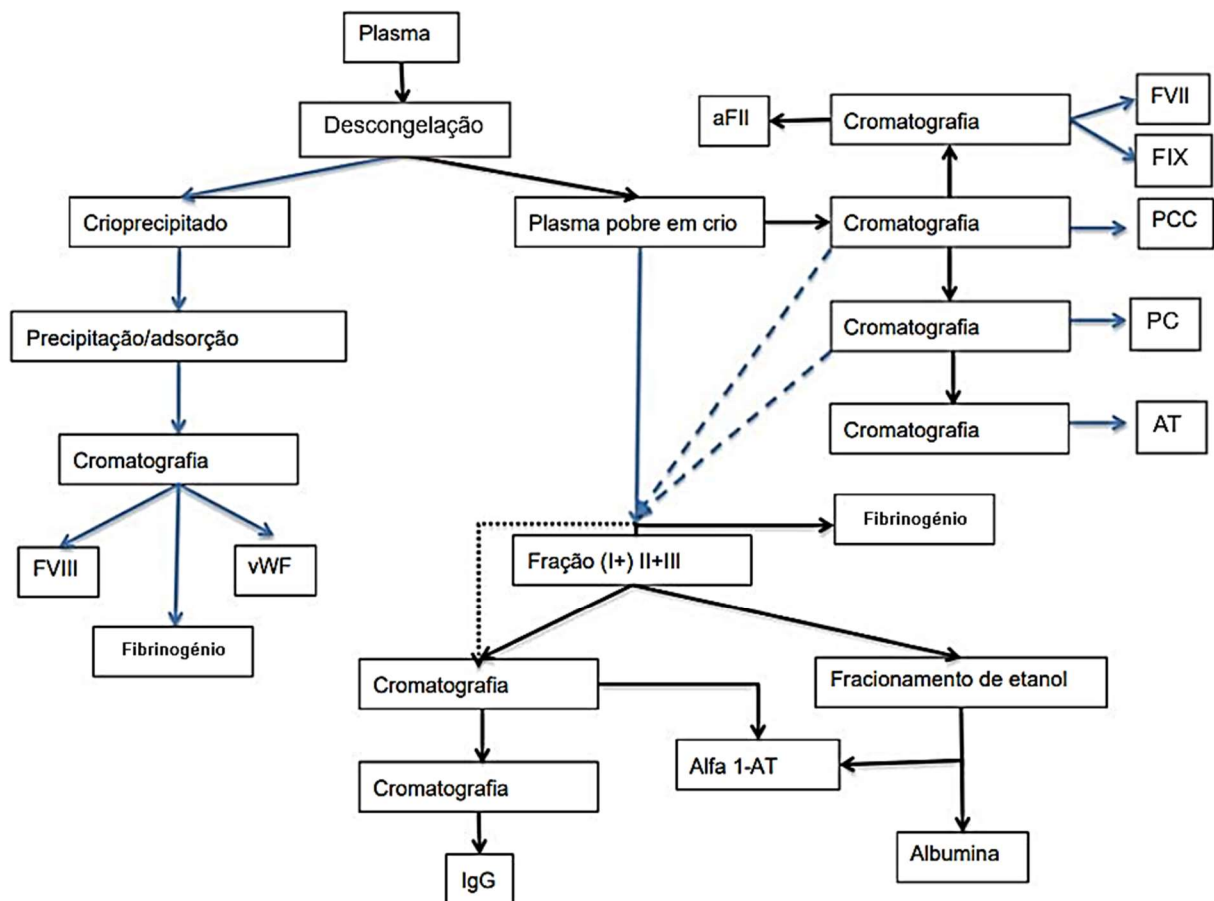


Figura 2.4 - Evolução do processo tradicional de fracionamento de plasma. Legenda: Alfa 1-AT, Alfa 1-antitripsina; aFII, fator II ativado (trombina); AT, antitrombina; FVII, fator VII; FVIII, fator VIII; FIX, fator IX; IgG, imunoglobulina G; PC, proteína C; PCC, complexo protrombínico, vWF, fator von Willebrand. Adaptado de Burnouf et al. (2016).

O plasma demora 7 a 12 meses a ser transformado em medicamentos derivados do plasma, prontos para serem utilizados.¹²

O plasma humano e o seu fracionamento podem servir como uma ferramenta rentável para a purificação e avaliação clínica de novas terapias, algumas estão em desenvolvimento, nomeadamente fatores II, V, X, XII, plasminogénio, plasmina, lipoproteína de alta densidade (HDL), haptoglobina, hemopexina, alfa 1-microglobulina, ceruloplasmina, fator H e alfa 2-microglobulina.³⁴

Os produtos derivados do plasma atingiram um nível elevado de segurança, no entanto, continua a ser importante manter uma vigilância extrema, de modo a evitar riscos infecciosos que no futuro possam estar associados a potenciais agentes patogénicos emergentes que entrem nos plasmas utilizados.³⁴

2.4 CONGELAÇÃO E ARMAZENAMENTO DO PLASMA PARA FRACIONAMENTO PRODUZIDO NOS SERVIÇOS DE SANGUE

Após a colheita e separação do sangue total, o processo de congelamento é fundamental para preservar os fatores da coagulação. Apesar das condições de armazenamento serem idênticas nos Estados Unidos e na Europa, a congelação é substancialmente diferente, de acordo com os padrões utilizados nos Estados Unidos, o plasma deverá ser congelado lentamente a -18°C . Na Europa, para que um método de congelação seja eficaz na preservação dos fatores da coagulação, evitando a sua inviabilidade biológica, o Plasma deverá ser congelado até 24 horas após a colheita e assegurado que o centro (*core*) do Plasma atinge uma temperatura igual ou inferior a -25°C nas primeiras 12 horas de congelação.³⁵

Após a congelação, o plasma deverá ser armazenado a temperaturas iguais ou inferiores a -20°C . No entanto, se o plasma exceder os -20°C , só poderá ser aproveitado para fracionamento, se o período de tempo que esteve exposto a uma temperatura superior a -20°C não exceder as 72 horas, se a temperatura não exceder os -15°C em mais do que uma ocasião e se a temperatura nunca exceder os -5°C .^{3,36,37}

Um dos fatores que poderão influenciar a atividade do FVIII é a formação de cristais de gelo durante o ciclo de congelação. O tempo entre a colheita e o início do processo de congelação, também influencia a atividade do FVIII.⁶

A congelação poderá ser realizada através de procedimentos lentos, em arca ultracongeladora, ou utilizando procedimentos rápidos através de congeladores rápidos de plasma (Figura 2.5), desde que os requisitos de qualidade sejam garantidos.

De acordo com a Norma da DGS N° 021/2017 – “Especificações do Sistema de Qualidade dos Serviços de Sangue e Serviços de Medicina Tranfusional”, todos os equipamentos deverão ser qualificados de acordo com a finalidade a que se destinam, pelo que deverão ser utilizados de acordo com procedimentos validados.³⁸



Figura 2.5 - Arca ultracongeladora vertical -80°C - Thermo Scientific® (esquerda) e congelador rápido de plasmas CSF61 - B Medical Systems® (direita). Imagem inédita.

2.5 DESCONGELAÇÃO DO PLASMA

Após a congelação, as unidades de plasma deverão ser manuseadas com cuidado, de modo a evitar o aparecimento de fissuras e orifícios, essencialmente junto à tubuladura. Uma vez descongelada, a unidade de plasma deve ser sujeita a controlo macroscópico, permitindo avaliar possíveis fugas ou danos. Caso o plasma apresente aparência inesperada, como floculação ou descoloração, a embalagem deverá ser inutilizada. Existem diferentes métodos para descongelar o plasma.

A descongelação por calor seco com agitação, realiza-se através de incubadoras ventiladas com controlo de temperatura, a probabilidade de contaminação bacteriana através deste método é menor, no entanto, têm capacidade limitada.

Os fornos de micro-ondas também poderão ser utilizados para a descongelação do plasma, conseguem descongelar em 2/3 minutos, apresentam como desvantagem capacidade limitada e a possibilidade de criação de pontos quentes nas embalagens. Estudos anteriores sugeriram que a qualidade do plasma é semelhante à da utilização de banho maria.³⁹

O banho maria é dos métodos mais utilizados para a descongelação, o plasma é colocado dentro de bolsas em torno das quais circula uma solução à base de água, evitando que o

plasma seja exposto diretamente com a água e que haja contaminação bacteriana. O tempo médio de descongelação do plasma é de 20 minutos (Figura 2.6).

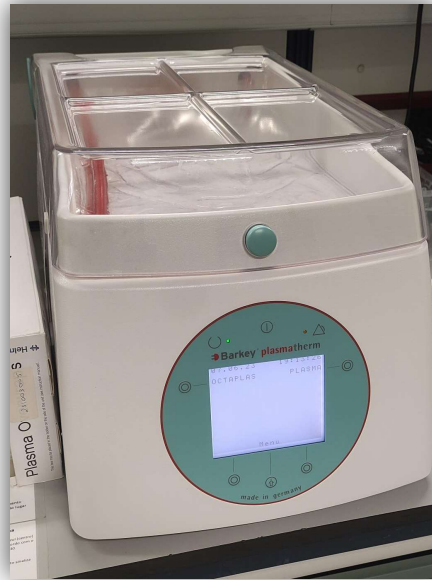


Figura 2.6 - Descongelador de plasmas Plasmatherm - Barkey®. Imagem inédita.

Após a descongelação do plasma e antes da recolha da amostra, é imperativo que o plasma seja adequadamente homogeneizado para doseamento de FVIII. A temperatura ideal para a descongelação do plasma ronda os 37°C, temperaturas próximas dos 4°C favorecem a formação de crioprecipitado, enquanto que temperaturas elevadas afetam a viabilidade das proteínas plasmáticas.^{26,40}

Independentemente do método utilizado, os procedimentos para descongelação de plasma deverão estar validados. Os procedimentos de limpeza e de manutenção dos equipamentos utilizados devem ser descritos e padronizados, através de procedimentos operacionais normalizados (PON), de modo a minimizar o risco de contaminação bacteriana.²⁶

2.6 CRITÉRIOS DE QUALIDADE E SEGURANÇA DO PLASMA DESTINADO A FRACIONAMENTO

O Decreto-Lei nº267/2007 de 24 de julho, alterado pelo Decreto-Lei nº185/2015 de 2 setembro estabelece o regime jurídico da qualidade e segurança do sangue humano, juntamente com o Guia para a preparação, uso e garantia de qualidade dos componentes do sangue do Conselho da Europa (edQm) e a Farmacopeia Europeia, definem os parâmetros que devem ser analisados no controlo de qualidade e que permitem aceitar o plasma com destino ao

fracionamento, nomeadamente volume, doseamento de FVIII, proteínas totais, células residuais antes da congelação e alterações visuais (APÊNDICE II).^{37,41-44}

De acordo com a Farmacopeia Europeia, deverá ser realizada em cada a dádiva a pesquisa dos anticorpos para o vírus da imunodeficiência 1 e 2, antigénio de superfície da Hepatite B, anticorpos para o vírus da Hepatite C.

O doseamento do FVIII em unidades individuais de plasma serve como um indicador de BPF. Em dádivas de sangue a preservação deste fator está relacionado com os procedimentos de colheita e manipulação do ST e do PL. Com a adoção de boas práticas, espera-se atingir uma concentração de 70UI/dl, no entanto, unidades de plasma com concentrações inferiores também poderão ser úteis na produção de proteínas coagulantes.³⁷

2.7 FATOR VIII

O FVIII é uma glicoproteína que participa na coagulação do sangue também descrita como fator anti hemofílico.

O gene responsável pelo FVIII está localizado no cromossoma X e foi identificado em 1984. Este gene tem 26 exões e codifica uma proteína composta por 2351 aminoácidos, com três domínios principais (A, B e C) e três domínios menores (a1, a2 e a3). Esses domínios contêm áreas que permitem ao FVIII interagir com outras proteínas de coagulação, como os fatores IX e X, além de se associar ao fator de von Willebrand (FvW), que o protege contra a degradação do plasma. O FVIII é ativado pela trombina durante a coagulação. A Figura 2.7 mostra os 9 domínios da proteína FVIII e os locais onde interage com o FIX ativado (F9a), FX (F10), FX ativado (F10a), fator de von Willebrand e fosfolípidos das plaquetas (PL).^{45,46}

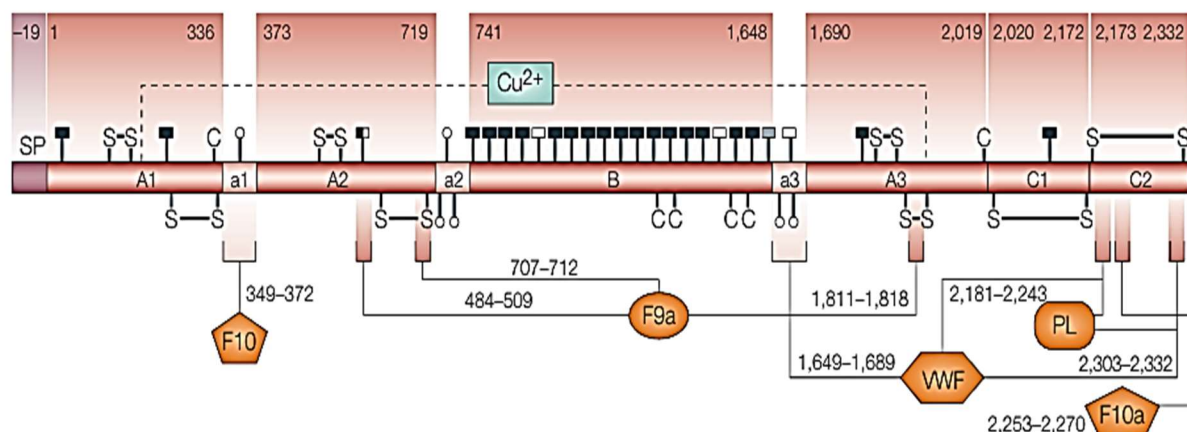


Figura 2.7 - Estrutura e locais de interação da proteína do FVIII. Adaptado de Graw et al. (2005).

O RNA mensageira e a proteína do FVIII foram identificados em muitos tecidos humanos, incluindo baço, pulmão e rim, no entanto, o fígado constitui a principal fonte de síntese de FVIII, embora os hepatócitos possam sintetizar FVIII, este fator é produzido principalmente pelas células endoteliais sinusoides.

Circula na corrente sanguínea na forma de heterodímero ligado ao fator de von Willebrand (FvW), de modo a impedir a degradação, bem como a depuração prematura do FVIII, possibilitando com esta ligação prolongar a semivida do FVIII em circulação, as atividades hemostáticas e os ciclos de vida destas glicoproteínas na circulação estão intrinsecamente ligados.

Este fator participa na via intrínseca da coagulação do sangue e na presença de cálcio e fosfolípidos funciona como cofator da ativação do fator X (Figura 2.8).⁴⁷⁻⁴⁹

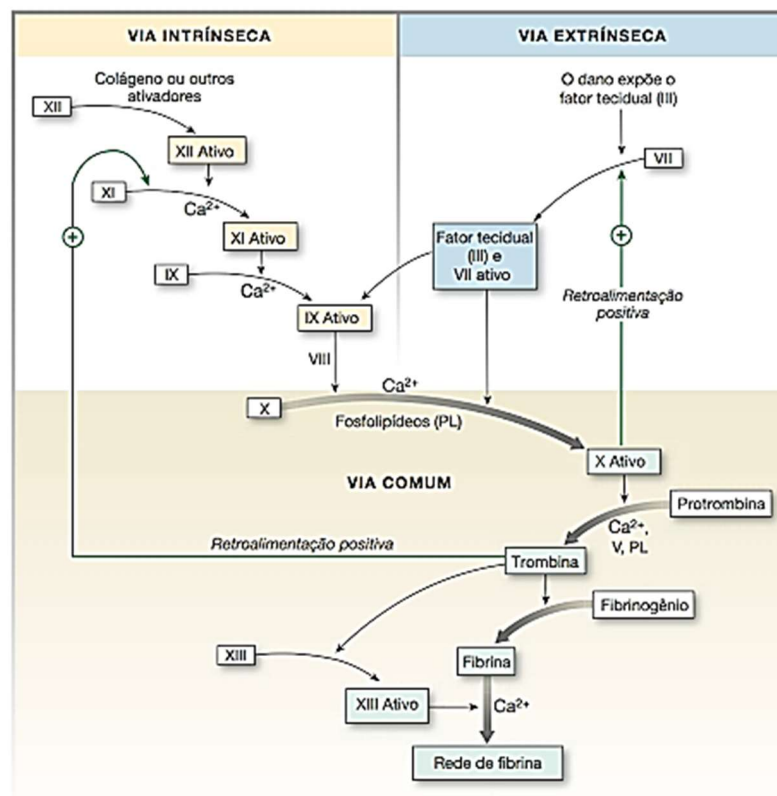


Figura 2.8 - FVIII na cascata da coagulação.⁵⁰

A cascata da coagulação é uma rede altamente regulada por reações de protease, que ocorrem na superfície da membrana de plaquetas ativadas e do endotélio, formando uma malha de fibrina insolúvel. O início da coagulação sanguínea ocorre através de duas vias distintas, a via intrínseca e a extrínseca, que convergem na via comum com a proteólise da proenzima, fator X (FX) e consequente ativação do fator Xa.

A via extrínseca é iniciada no local da lesão vascular quando o fator tecidual (TF), uma proteína de membrana integral, é exposto intravascularmente ao fator VII (FVII), uma proenzima inativa em circulação. A via intrínseca é uma resposta pró coagulante de duração prolongada que amplia e sustenta a formação de coágulos, servindo como um processo essencial para manter a hemostasia. A ativação da trombina, ativa proteoliticamente vários fatores de coagulação na via intrínseca, incluindo o FVIII.⁴⁶

O fator poderá ser obtido através do fracionamento do Plasma humano, mas também ser produzido através engenharia celular e biotecnologia sob a forma de anticorpo monoclonal e de engenharia genética através de tecnologia recombinante, de terceira geração. Embora o FVIII recombinante (rFVIII) seja acessível em países desenvolvidos e seja a terapia recomendada em doentes com deficiência deste fator, o Plasma humano ainda continuará a ser uma fonte importante para fracionamento em FVIII.⁵¹⁻⁵³

Recentemente Von Drygalski et al. (2023) relataram o desenvolvimento de um FVIII modificado ultralongo, beneficiando-se do prolongamento farmacocinético proporcionado pela adição de polipeptídeos hidrofílicos e da quebra de ligação ao FvW, o que permite aumentar a semivida do FVIII.⁵⁴

Este fator está frequentemente associado a doença hepática crónica, atua como fator de risco para trombose e é utilizado como marcador de qualidade do plasma fresco congelado.^{55,56}

A atividade do FVIII é influenciada por vários fatores, designadamente o repouso do ST após colheita (pelo menos duas horas em placas de butanodiol, para arrefecimento de ST), o grupo sanguíneo ABO (níveis de FVIII são maiores em indivíduos dos grupos A, B e AB), a idade, os níveis de FvW, o tempo entre a dádiva e o início do processo de congelação (ocorre perda de atividade do FVIII ao longo do tempo), a temperatura de descongelamento do plasma (que deve estar entre os 30-37°C, temperaturas mais altas podem desnaturar as proteínas da coagulação) e o método de congelação, sendo este crucial para a qualidade e preservação do FVIII.^{35,57-60}

O tempo desde a recolha da amostra até ao doseamento do FVIII também poderá influenciar o resultado. De acordo com o Instituto de Padrões Clínico Laboratoriais (CLSI), este tempo não deverá ultrapassar as 4 horas, (H21-A5). Nos casos em que ultrapasse, os procedimentos deverão estar validados pelo próprio laboratório.⁶¹⁻⁶³

O défice de FVIII está associado à Hemofilia A, doença congénita recessiva ligada ao cromossoma X, afetando principalmente o sexo masculino. Em algumas situações, a hemofilia não ocorre de forma hereditária, surgindo em indivíduos que não apresentam histórico familiar da doença. Ocorrem como resultado de mutações no gene F8, que codifica o FVIII.

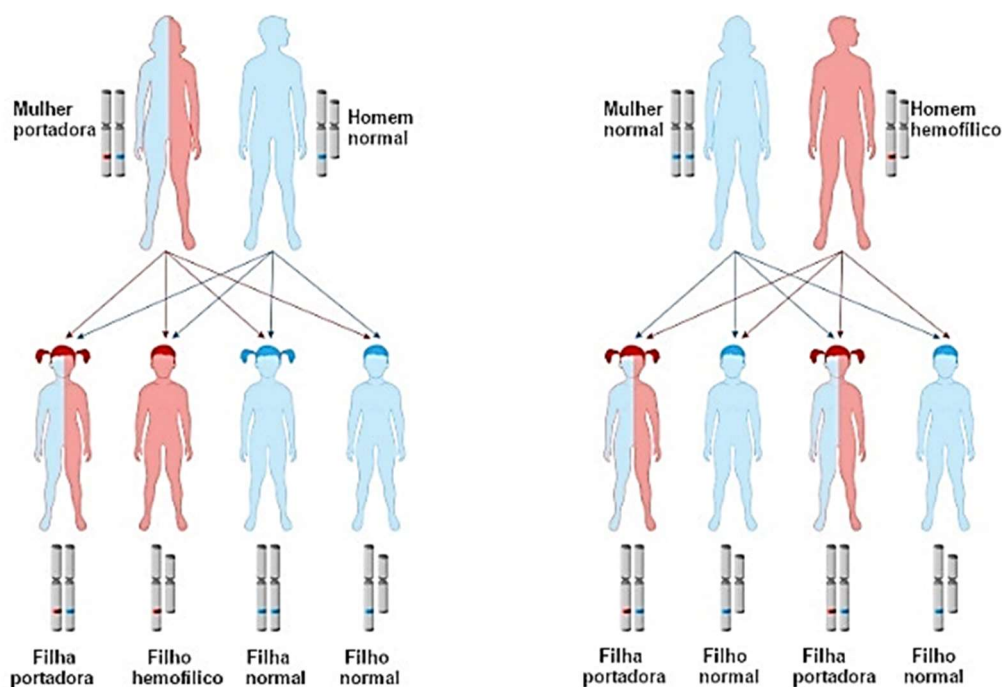


Figura 2.9 -Genética da hemofilia hereditária.⁶⁴

A hemofilia é um distúrbio da coagulação, na qual existe uma anomalia permanente no mecanismo de coagulação do sangue. Manifesta-se através de dor crónica, deformidade, mobilidade reduzida e aumento da mortalidade, podendo ser classificada em grave, moderada ou leve.

Os doentes com Hemofilia A têm uma deficiência de fator VIII, sendo que a gravidade da doença depende dos níveis deste fator, em casos severos não sujeitos a tratamento a principal característica clínica é a hemorragia, frequentemente nas articulações (hemartrose).⁶⁵

Apesar de ser herdado de forma monogénica, as características da hemofilia podem ser influenciadas por outros fatores genéticos, permitindo que esta patologia seja considerada uma das doenças modelo no campo da genética molecular. A elevada esperança média de vida dos hemofílicos, permite que a Hemofilia sirva de base ao desenvolvimento de protocolos de terapia genética, possibilitando monitorizar durante longos períodos os efeitos secundários da terapia genética, bem como a sua eficácia.^{45,65}

O tratamento da Hemofilia A tem evoluído muito nos últimos anos.^{45,46,65}

Em Portugal, o encaminhamento de pessoas com coagulopatias congénitas está descrito na Norma da DGS N°17/2018, atualizada a 29/06/2021.⁶⁶

As terapias atuais recorrem à administração frequente de FVIII, porém o desenvolvimento de aloanticorpos neutralizantes (inibidores) diminui a sua eficácia, apresentando-se como a principal complicação deste tratamento. A ligação de anticorpos anti-FVIII a locais em que este fator interage com outros fatores da coagulação, a clivagem do FVIII por anticorpos catalíticos

e o efeito de anticorpos não neutralizantes na semivida da proteína do FVIII administrado, são exemplos destes mecanismos inibidores.

Este evento adverso está associado a um aumento significativo na morbidade e no custo do tratamento, destacando a necessidade de identificar métodos que limitem a imunogenicidade do FVIII.^{45,67-69}

De acordo com a Circular Informativa Nº121 do Infarmed datada de 21/09/2017, *“não existe uma diferença significativa no desenvolvimento de inibidores entre os medicamentos contendo fator VIII derivado do plasma e contendo fator VIII produzidos por tecnologia de ADN recombinante”*.⁷⁰

3. OBJETIVOS E HIPÓTESES DO ESTUDO

3.1 QUESTÃO DE INVESTIGAÇÃO

Qual o efeito do método de congelação utilizado na produção de Plasma para fracionamento na atividade do fator VIII, em colheitas realizadas em dadores de sangue?

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o impacto do método de congelação do Plasma para fracionamento na atividade do FVIII em plasmas de dadores de sangue.

3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO

- Dosear a degradação do FVIII desde a colheita a dadores, até à congelação do Plasma para fracionamento produzido a partir do sangue total (ST).
- Determinar se existem diferenças estatisticamente significativas na atividade do FVIII entre os métodos de congelação avaliados.
- Identificar o método de congelação que melhor preserva o FVIII no Plasma para fracionamento.
- Verificar se os plasmas para fracionamento produzidos cumprem os parâmetros de qualidade definidos.
- Investigar possível correlação entre características dos dadores de sangue, como por exemplo o grupo sanguíneo, e a quantidade do FVIII.
- Fornecer recomendações práticas para a escolha do método de congelação mais adequado para preservar a atividade do FVIII no Plasma obtido em colheitas de dadores de sangue.
- Contribuir para o desenvolvimento de diretrizes ou protocolos relacionados com o método de congelação do Plasma de forma a otimizar o FVIII.

3.3 HIPÓTESE DE ESTUDOS

A degradação da atividade do FVIII no Plasma para fracionamento congelado em congeladores rápidos é menor, relativamente à congelação em arcas ultracongeladoras verticais de -80°C.

4. METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo observacional comparativo numa população de dadores benévolos de sangue.

4.2 LOCAL DE ESTUDO

O estudo decorreu no Serviço de Sangue (SS) do Centro Hospitalar do Médio Tejo (CHMT) unidade de Torres Novas, convertido em Unidade Local de Saúde do Médio Tejo (ULSMT) recorrendo aos recursos humanos e técnicos existentes.

4.3 AMOSTRAGEM

O estudo incidiu numa amostragem não-probabilística, participaram 124 dadores de sangue elegíveis para colheita de ST e produção de PF. A recolha de amostras decorreu entre janeiro de 2024 a abril de 2024.

Os dadores de sangue foram submetidos aos seguintes critérios de elegibilidade:

Crítérios de inclusão	- Todas as dádivas aptas para obtenção de ST e PF (de acordo com critérios de seleção de dadores de sangue em vigor)
Crítérios de exclusão:	- Dádivas de ST com baixo volume, <350ml - PF com volume \leq 200ml - Colheitas > 15 minutos

Tabela 4.1 - Critérios de elegibilidade para integração no estudo.

4.4 VARIÁVEIS

Na tabela 4.2 são representadas as variáveis suscetíveis de influenciar a atividade do FVIII.

Variável dependente	Atividade Fator VIII (variável quantitativa contínua)
Variáveis independentes	<u>Dador de sangue</u> <ul style="list-style-type: none">• Contagem inicial de FVIII (variável quantitativa discreta)• Grupo sanguíneo (variável qualitativa nominal)
	<u>Colheita</u> <ul style="list-style-type: none">• Tempo de colheita (variável quantitativa discreta)• Volume ST (variável quantitativa discreta)
	<u>Processamento</u> <ul style="list-style-type: none">• Tempo desde a colheita até à congelação do PF (variável quantitativa discreta)• Volume do PF (variável quantitativa discreto)

- Método de congelação: (variável qualitativa nominal)

Tabela 4.2 - Variáveis do estudo.

4.5 INSTRUMENTOS DE RECOLHA DA AMOSTRA

As amostras para doseamento de FVIII foram colhidas utilizando os materiais representados na tabela 4.3.




Primeira amostra (início da colheita de ST)	3 ml em tubo citrato de sódio, <i>S-Monovette</i> [®] , <i>Sarstedt</i> , referência 04.1919.100	
Sangue Total	470 ml em sistema de sacos quádruplos <i>CompoFlow</i> com anticoagulante CPD/SAGM, <i>FRESENIUS-KABI</i> [®] , referência CQ32250	
Colheita de amostras dos sacos de plasma	Tubo descartável	

Tabela 4.3 - Instrumentos de recolha da amostra.

Os dados relevantes para a investigação foram compilados numa Folha de recolha de dados ilustrada no APÊNDICE III.

4.6 PROCEDIMENTOS

O estudo foi desenvolvido em várias fases que se encontram descritas neste ponto e esquematizadas no APÊNDICE IV. O doseamento do FVIII foi efetuado imediatamente após a recolha da amostra no Serviço de Patologia Clínica da ULSMT no equipamento *ACL TOP 300*, *WERFEN*[®], utilizando a técnica de cromatografia.

Primeira fase - Entregue o consentimento informado do estudo aos dadores e esclarecida qualquer dúvida durante a triagem do dador de acordo com os critérios de elegibilidade em vigor. A entrega do consentimento foi da responsabilidade do assistente administrativo, sendo a triagem da responsabilidade do médico.

Segunda fase – Colhidos 470 ml de ST em sacos de sangue quádruplos *CompoFlow* da marca *Fresenius Kabi*[®] e um tubo de citrato de sódio, *S-Monovette*[®] da *Sarstedt* para doseamento de FVIII, recorrendo ao saco satélite acoplado ao saco de colheita. Após a

colheita, o ST ficou em repouso pelo menos duas horas, numa placa de refrigeração *CompoCool, Fresenius Kabi*[®], sob responsabilidade do Enfermeiro.

Terceira fase – Centrifugação do ST em centrífuga da marca *Heraeus Cryofuge 6000i*[®] (temperatura 22°C, 3640 rotações por minuto, aceleração 8, travão 4, 15 minutos), os componentes sanguíneos (CS) obtidos foram fracionados no separador celular automático *Compomat G5* da *Fresenius Kabi*[®], por técnica de *Buffy-coat* (BC).

Após obtenção do PF foi realizada a recolha de uma amostra do saco de PF para um tubo descartável para doseamento do FVIII, sob responsabilidade do TSDT.

Quarta fase – A congelação do PF foi realizada na arca ultracongeladora vertical de -80°C, *Thermo Scientific*[®] ou no congelador rápido de plasmas *CSF61* da *B Medical Systems*[®]. Todos os PF foram armazenados na arca ultracongeladora vertical de -80°C, sob responsabilidade do TSDT.

Os dois equipamentos encontram-se qualificados para a quantidade de plasmas utilizados em cada ciclo de congelação.

Quinta fase – Após um mês de congelação, o PF foi descongelado no equipamento *Plasmatherm*, da marca *Barkey*[®] durante 30 minutos a 37°C e procedeu-se, após homogeneização, à recolha de uma amostra do saco de PF para um tubo descartável para doseamento do FVIII, sob responsabilidade do TSDT.

Sexta fase – Realizada a compilação e análise dos resultados, sob responsabilidade do investigador.

4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O tratamento estatístico foi realizado através do software *IBM SPSS Statistics*, versão 25. Foram abordados dois tipos de estatística, a descritiva e a indutiva.

A estatística descritiva foi utilizada com o objetivo de descrever as variáveis de modo isolado, o que permitiu organizar os dados e salientar algumas das suas propriedades essenciais. Estes dados são descritos através de indicadores como a mediana (MD), valor máximo (Máx), valor mínimo (Mín) e desvio padrão. Para representar estes indicadores foram utilizados gráficos de barras e circulares, tabelas e diagramas de caixa.

A estatística indutiva, ou inferência estatística, permite tirar conclusões com base nos elementos observados e estabelecer relações entre as variáveis.

Para testar a normalidade foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* e para testar a homogeneidade o teste de *Levene*.

Foram utilizados testes não-paramétricos por não se verificarem os pressupostos da normalidade e homogeneidade. Para estes testes foi considerando o intervalo de confiança

de 95% e o nível de significância de 5% ($p=0,05$). A referência aos resultados é realizada através dos valores de mediana e valores máximo e mínimo.

Para avaliar a relação entre as variáveis utilizou-se o coeficiente de correlação de *Spearman*. Foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* de amostras independentes, para verificar se a quantidade inicial de FVIII é idêntica entre os grupos sanguíneos.

O teste de *Friedman* foi utilizado para avaliar a variação do FVIII durante os três momentos do estudo, início, pré-congelação e 1 mês após a congelação e perceber se estas são estatisticamente significativas. Este teste é adequado para dados emparelhados não paramétricos. Para garantir a robustez dos resultados, os valores de significância deste teste foram ajustados pela correção de *Bonferroni*, técnica usada para ajustar os níveis de p quando múltiplos testes estatísticos são realizados simultaneamente. Tem como objetivo controlar erros do tipo falso positivo, que aumentam devido à realização de múltiplas comparações.

Para verificar se existem diferenças entre a quantidade de FVIII antes da congelação e o FVIII um mês após a congelação foi utilizado o teste de *Wilcoxon* para amostras não emparelhadas, para cada método de congelação utilizado.

4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E LEGAIS

Foram cumpridos os princípios da Declaração de Helsínquia⁷¹ e Convenção de Oviedo⁷², bem como a Lei Portuguesa nº58/2019 de 8 de agosto⁷³ sobre a proteção de dados, assegurando a máxima proteção dos dados, mediante leitura e assinatura de um consentimento informado (APÊNDICE V), assim como a boa prática clínica e a confidencialidade dos dados obtidos. Todas as amostras foram pseudo anonimizadas, sendo identificadas com um número previamente estabelecido, não existindo qualquer outra informação sobre o indivíduo do estudo.

Esta investigação foi aprovada pelo Comissão de Ética da Escola Superior de Tecnologia de Saúde de Lisboa, bem como da Comissão de Ética e do Serviço de Apoio Jurídico do CHMT, agora designado ULSMT.

5. RESULTADOS

Os dados recolhidos foram processados e analisados conforme os métodos descritos no capítulo “3.7 – Tratamento estatístico”.

5.1 ESTATÍSTICA DESCRITIVA

5.1.1 DURAÇÃO DA COLHEITA DE ST E PROCESSAMENTO EM PF

Os processos inerentes à colheita e processamento de ST devem estar descritos, controlados e de fácil rastreabilidade, pelo que se verificou que em 94,35% (N=112) das dádivas, a duração das colheitas de ST, tiveram uma duração inferior a 10 minutos (min) e apenas 5,65% (N=7) das dádivas, uma duração entre os 10 e os 15 minutos, (Figura 5.1).

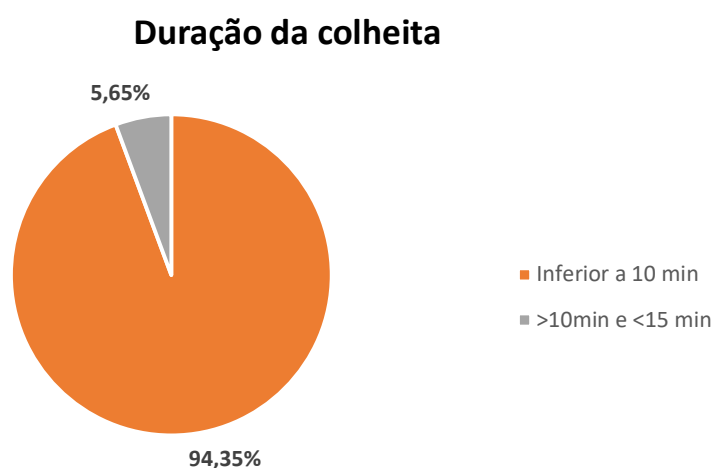


Figura 5.1 - Duração da colheita de Sangue Total.

O tempo que demorou desde a colheita do ST até ao momento da congelação do PF, variou entre as 2 horas e 40 minutos e as 6 horas e 48 minutos, sendo a mediana 4 horas e 57 minutos para a congelação no congelador rápido e de 5 horas e 6 minutos na arca ultracongeladora. (Tabela 5.1).

Método de congelação	N	Mediana	Desvio padrão	Máximo	Mínimo
Congelador rápido	70	4:57	0:47	6:13	2:43
Arca Ultracongeladora	54	5:06	1:01	6:48	2:40
Total	124	5:00	0:53	6:48	2:40

Tabela 5.1- Duração entre a colheita de ST e a congelação do Plasma (hh:mm).

5.1.2 VOLUME DE ST E PF

O volume do ST colhido e do PF obtido após centrifugação e separação do ST, foi calculado tendo em consideração o peso e a densidade de cada componente, através da seguinte fórmula $Volume = (Peso\ Total - Tara\ do\ saco) / Densidade$, o ST tem uma densidade de 1,055 g/cm³ e o Plasma 1,026 g/cm³.⁴¹

Em cada dádiva foram colhidos ST com mediana de 479±6 ml e produzidos PF com uma mediana de 272±16ml.

Os resultados obtidos para estes parâmetros estão representados na Tabela 5.2.

	Volume ST (ml)	Volume PF (ml)
N	124	124
Mediana	479	272
Desvio padrão	6	16
Mínimo	441	236
Máximo	490	307

Tabela 5.2 - Volume de ST e de Plasma para fracionamento.

5.1.3 GRUPOS SANGUÍNEOS ABO E RH (D) DA AMOSTRA

A distribuição dos grupos sanguíneos nos sistemas ABO e Rh(D) foi analisada aos 124 participantes do estudo e encontra-se representada na Figura 5.2 e 5.3, verificando-se que a maioria dos dadores pertencem aos grupos sanguíneos O e A, com 59 e 48 dadores, respetivamente, seguidos do grupo B com 13 dadores e por fim, 4 dadores do grupo AB.

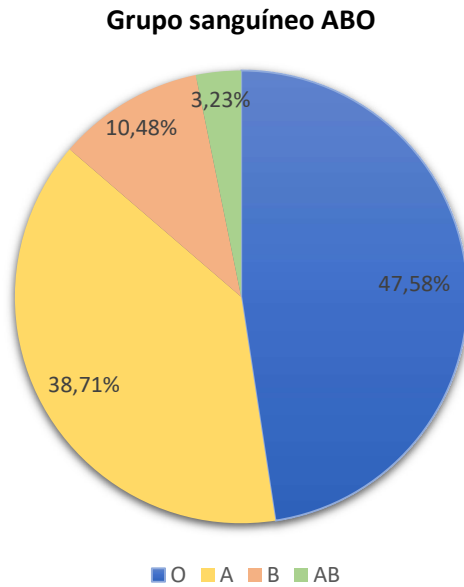


Figura 5.2 - Distribuição do grupo sanguíneo ABO.

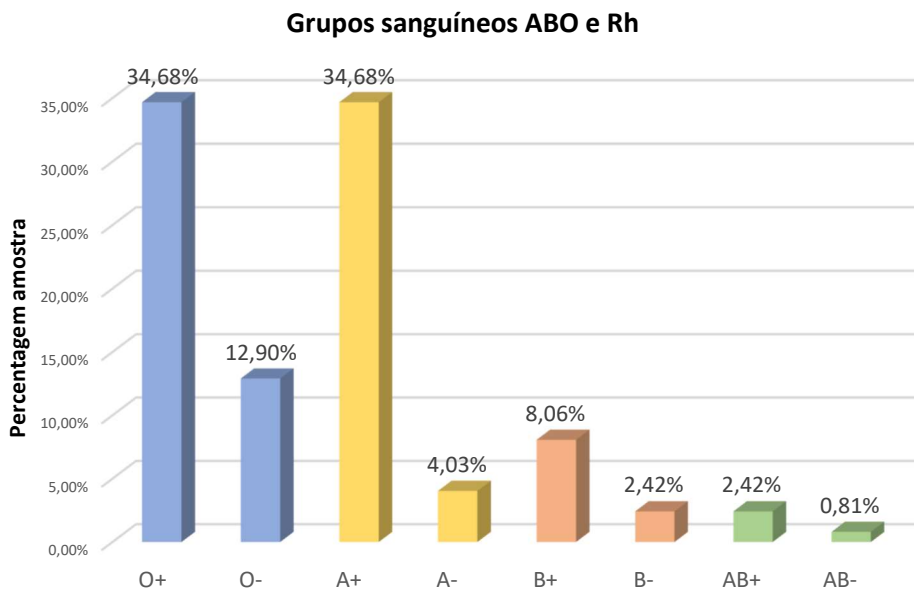


Figura 5.3 - Distribuição do grupo sanguíneo ABO e Rh.

5.1.4 RESULTADOS DO DOSEAMENTO DE FVIII

Foram analisados os dados referentes aos níveis de FVIII medidos em três fases distintas do estudo e através de análise estatística descritiva verifica-se que a quantidade de FVIII inicial, FVIII antes da congelação e FVIII após congelação apresenta a distribuição observada na Figura 5.4.

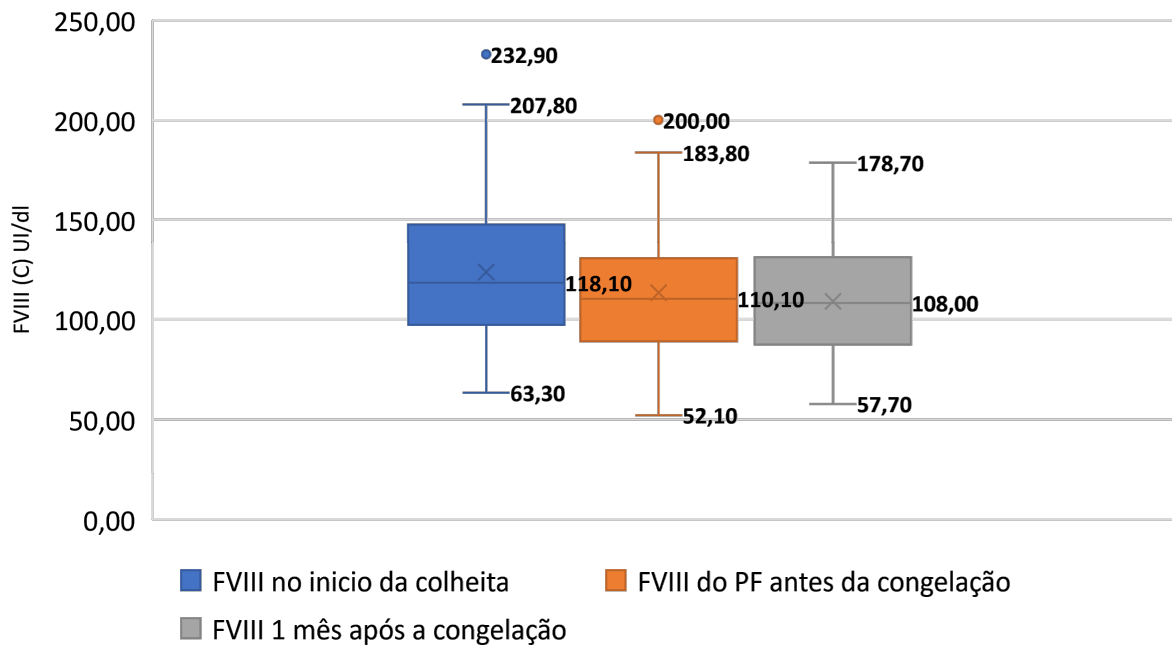


Figura 5.4 - Contagem de FVIII durante as três fases do estudo.

O FVIII no início da colheita apresenta um desvio padrão de 33,64UI/dl, o FVIII do PF antes da congelação desvio padrão de 30,95UI/dl e o FVIII um mês após a congelação 28,03UI/dl. A Figura 5.5 permite-nos visualizar as tendências da média e da mediana nos três momentos diferentes.

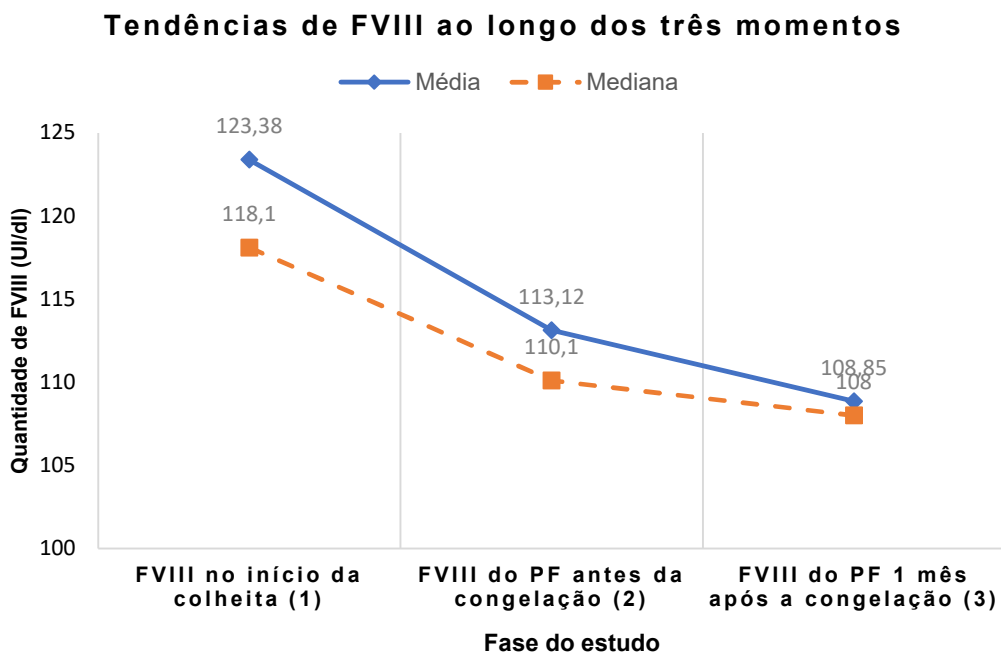


Figura 5.5 - Tendência nas quantidades de FVIII (UI/dl) nas três fases do estudo.

5.1.5 FVIII INICIAL E GRUPO SANGUÍNEO ABO

Face ao reduzido número de dadores do grupo B e AB, procedeu-se à formação de dois grupos, o “O” (N=59) e o “Não-O” (N=65), este último engloba os dadores dos grupos A, B e AB.

De acordo com a Figura 5.6, os dadores do grupo “Não-O” apresentam MD de 134 UI/dl, Máx. de 232,90 UI/dl e Mín. de 77,90UI/dl, enquanto que a MD no grupo “O” é de 106,90 UI/dl, Máx. 203,90 UI/dl e Mín. de 63,30 UI/dl.

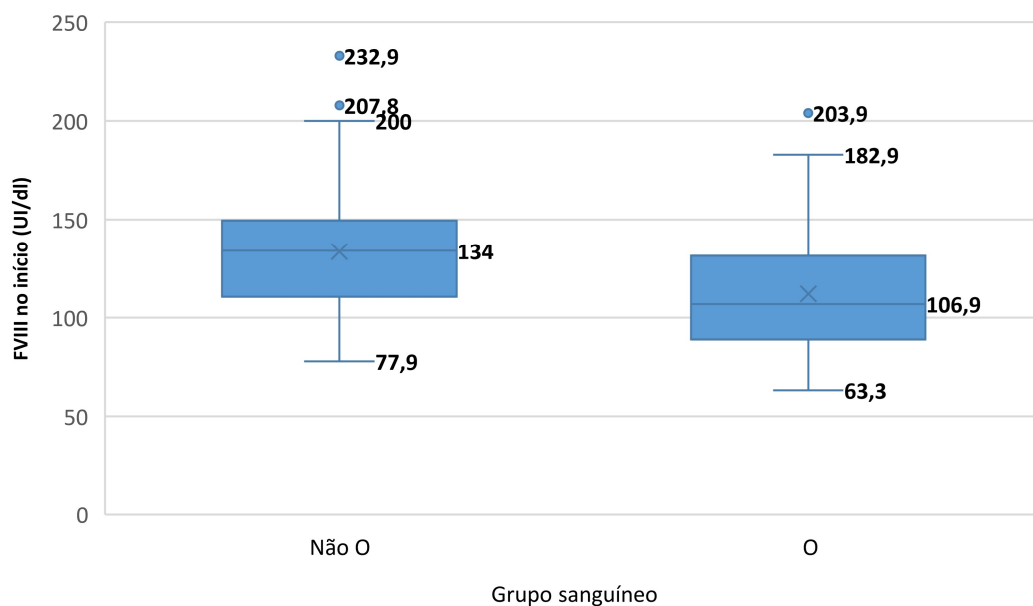


Figura 5.6 - FVIII inicial por Grupo Sanguíneo "Não O" e "O".

O grupo “Não-O” apresenta uma mediana de 134 UI/dl e uma amplitude interquartil (AQC) de 38,85, enquanto que o grupo “O” mediana de 106,90 UI/dl e um AQC de 42,4, o que indica maior variância neste último grupo.

5.1.6 FVIII DO PF ANTES E APÓS A CONGELAÇÃO DE ACORDO COM O MÉTODO UTILIZADO

Dos plasmas obtidos após processamento do ST, 70 foram sujeitos a congelação rápida e 54 em arca ultracongeladora. A Tabela 5.3 indica a mediana, desvio padrão, o valor máximo e mínimo da quantidade de fator VIII dos plasmas antes da congelação e depois da congelação dependendo do método de congelação utilizado.

Método de congelação		FVIII do PF antes da congelação (2)	FVIII após 1 mês (3)
Congelador rápido	N	70	70
	Mediana	110,75	113,5
	Desvio Padrão	27,39	27,04
	Máximo	183,8	178,7
	Mínimo	52,1	62,1
Arca Ultracongeladora	N	54	54
	Mediana	103,35	95,7
	Desvio Padrão	35,29	27,64
	Máximo	203,9	165,3
	Mínimo	58,2	57,7

Tabela 5.3 - FVIII do Plasma para fracionamento antes e após a congelação, por método de congelação. Fator VIII (UI/dl).

5.2 ESTATÍSTICA INDUTIVA

5.2.1 CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS

O teste de correlação de *Spearman* foi utilizado para avaliar a força e a direção da relação monótona entre duas variáveis. Foi utilizado após se verificar que os dados não se encontram normalmente distribuídos.

Os resultados da Tabela 5.4 mostram um coeficiente de correlação negativo de -0,327, entre o grupo sanguíneo ABO e o valor inicial de FVIII, estatisticamente significativo ($p=0,001$; $p<0,05$).

Obteve-se um coeficiente de 0,059 entre as variáveis "Tempo desde a colheita até ao congelamento" e "Diferença entre FVIII do PF antes da congelação e o FVIII no início da colheita", não estatisticamente significativa ($p=0,514$; $p>0,05$).

Para as restantes variáveis os coeficientes de correlação de *Spearman* variaram de 0,850 a 0,895, indicando uma associação forte e positiva entre as variáveis analisadas. Com valores de p de 0,00, estas correlações são significativas ($p<0,05$).

Variáveis	Coefficiente de Correlação de Spearman (r_s)	Valor p
Grupo sanguíneo ABO X FVIII inicial	-0,327	0,001
Tempo desde a colheita até ao congelamento X Diferença entre FVIII do PF antes da congelação e o FVIII no início da colheita	0,059	0,514
FVIII do PF antes da congelação X FVIII 1 mês após a congelação - Congelador rápido	0,850	0,001
FVIII do PF antes da congelação X FVIII 1 mês após a congelação - Arca ultracongeladora	0,895	0,001
FVIII no início da colheita X FVIII 1 mês após a congelação	0,850	0,001

Tabela 5.4 - Resultados da aplicação da correlação de Spearman entre as variáveis.

5.2.2 GRUPO SANGUÍNEO ABO E FVIII

De acordo com a Tabela 5.5, verificou-se que os dados do grupo “O” não seguem uma distribuição normal ($p=0,025$) e as variâncias dos dois grupos são homogêneas ($p=0,700$). Foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* para testar a hipótese nula (H_0 : A quantidade de FVIII no início é idêntica para o grupo sanguíneo “O” e “Não O”; H_1 : A quantidade de FVIII não é idêntica para o grupo sanguíneo “O” e “Não O”). O teste de *Mann-Whitney* mostrou que o grupo sanguíneo tem influência na quantidade inicial de FVIII, o valor de $p=0,001$ (U 1193,50; $p<0,05$). Desta maneira, foi rejeitada a hipótese nula, indicando que há uma diferença significativa na quantidade inicial de FVIII entre os grupos “O” (MD 106,90; AIQ 42,40) e “Não O” (MD 134,0; AIQ: 38,85).

Grupo	N	Percentil			Teste Shapiro-Wilk (valor p)	Teste Levene (valor p)	Mann-Whitney (valor p)	
		25	50 (Mediana)	75				
FVIII inicial (UI/dl)	Não O	65	110,65	134,00	149,50	0,11	0,700	0,001
	O	59	89,00	106,90	131,40	0,025		

Tabela 5.5 - Resultados dos testes estatísticos aplicados para relacionar grupo “Não O” e grupo “O”. nível de significância é 0,05.

5.2.3 FVIII NAS TRÊS DIFERENTES FASES DO ESTUDO

De modo a avaliar a estabilidade e a mudança nos resultados da atividade do FVIII ao longo do estudo, foi realizada uma análise em diferentes momentos, o início, antes da congelação do PF e um mês após a sua congelação.

Devido à natureza dos dados que não seguem uma distribuição normal e após se ter verificado uma forte correlação entre os resultados destes três momentos, foi utilizado o teste não-paramétrico de *Friedman*. Este teste permitiu verificar a existência de diferenças significativas nos três momentos, Tabela 5.6.

A aplicação deste teste revelou diferenças significativa nos níveis de FVIII analisados ($X^2 = 103,472$, $df = 2$, $p < 0,05$), indicando que existem diferenças estatisticamente significativas desde o início até antes da congelação. Essas mudanças mantiveram-se estáveis até 1 mês após a congelação.

Estatísticas do Teste <i>Friedman</i>	
N	124
Qui-quadrado	103,472
GI	2
Significância Sig.	0

Amostra 1-Amostra 2	Estatística de Teste	Std. Erro	Sig.	Sig. Ajust.
FVIII após 1 mês - FVIII no início	1,161	0,127	0,000	0,000
FVIII antes congelação - FVIII no início	1,052	0,127	0,000	0,000
FVIII após 1 mês-FVIII antes da congelação	0,109	0,127	0,391	1,000

Valores de significância foram ajustados pela correção de *Bonferroni* para múltiplos testes.

Tabela 5.6 - Estatística do teste de *Friedman*. O nível de significância é 0,05.

5.2.4 MÉTODO DE CONGELAÇÃO E PRESERVAÇÃO DO FVIII

Apesar da avaliação realizada anteriormente não mostrar diferenças significativas entre o FVIII após um mês de congelação e o FVIII antes da congelação, procedeu-se à análise das diferenças entre a quantidade de FVIII antes e após um mês de congelação relativamente aos métodos de congelação utilizados.

Foi testada a normalidade e a homogeneidade dos resultados, Tabela 5.7. Não foi verificada normalidade para os resultados de FVIII obtidos antes da congelação através da arca congeladora $p=0,009$ ($p<0,05$), nem homogeneidade, a variância apresentou resultado, $p=0,626$ ($p>0,05$).

Assim, para cada método de congelação foi testada a hipótese nula (H_0 : Não há diferença significativa entre a quantidade de FVIII antes da congelação e o FVIII 1 mês, H_1 : Há uma diferença significativa entre a quantidade de FVIII antes da congelação e o FVIII 1 mês após a congelação), foi realizado o teste de *Wilcoxon*.

O teste de *Wilcoxon* mostrou que não existem diferenças estatisticamente significativas ($z=-1,115$; $p=0,265$) entre a quantidade de FVIII antes da congelação (MD 110,75; AIQ 29,45) e o FVIII 1 mês após a congelação (MD 113,50; AIQ 34,85), para o método “Congelador rápido”, pelo que se aceita H_0 . Não há evidência suficiente para sugerir uma diferença real.

Para o método “Arca ultracongeladora” o valor de p é inferior a 0,05 ($z=-4,930$; $p=0,001$), o que indica que rejeitamos a hipótese nula. Há uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de FVIII antes (MD 103,35; AIQ 55,82) e após a congelação (MD 95,70; AIQ 41,63).

O valor negativo de Z indica que, em geral, os valores após a congelação são menores do que os valores antes da congelação.

		Shapiro Wilk (p-value)	Teste Levene (p-value)	Teste Wilcoxon (p-value)	Z
Congelador rápido	Antes congelação	0,489	0,013	0,265	-1,115
	Após congelação	0,347			
Arca ultra congeladora	Antes congelação	0,009	0,626	0,001	-4,930
	Após congelação	0,072			

Tabela 5.7 - Diferença de FVIII antes e após congelação, por método de congelação. O nível de significância é 0,05.

6. DISCUSSÃO

A necessidade de utilização de produtos derivados do plasma, nomeadamente concentrados de FVIII, continuará provavelmente a aumentar nos próximos anos a nível mundial. A falta de produtos capazes de substituir o sangue é uma das razões pela qual estes produtos são considerados essenciais.⁷⁴

Devido às características lábeis do FVIII, os processos inerentes à colheita, processamento e congelação do plasma para fracionamento devem ser realizados de uma forma rápida de forma a preservar as propriedades e a qualidade do produto.

Este estudo visa entender como os métodos de congelação do plasma influenciam a concentração de FVIII, fator da coagulação crucial no tratamento de discrasias hemorrágicas como a hemofilia A. Para responder a este objetivo principal, a análise focou-se em comparar os níveis de FVIII antes e após a congelação, avaliando se a metodologia utilizada para congelar o PF afeta a concentração deste fator. Também foram relacionadas outras variáveis de forma a responder a objetivos específicos, como o grupo sanguíneo e FVIII, o tempo desde a colheita até à congelação e a diferença de FVIII entre estes dois momentos.

O estudo decorreu no Serviço de Sangue (SS) da Unidade Hospitalar de Torres Novas da Unidade Local de Saúde do Médio Tejo. A amostra foi constituída por 124 dadores benévolos de sangue. A concentração de FVIII circulante foi doseada em três momentos diferentes, no início da colheita em tubo de citrato de sódio, no plasma para fracionamento antes da congelação e um mês após a congelação.

De acordo com o Guia para a preparação, uso e garantia de qualidade dos componentes do sangue do Conselho da Europa (*edQm*), versão 21, se a colheita de ST demorar mais que quinze minutos, o plasma não deve ser utilizado para a preparação de fatores da coagulação (*Evidência Nível C*).⁷⁵ Relativamente ao tempo de colheita, verificou-se que a maioria das colheitas tiveram uma duração inferior a 10 minutos, 94,35% (N=117), e apenas em 5,65% (N=7) das dádivas, uma duração entre os 10 e os 15 minutos, (Figura 5.1).

Através da Tabela 5.1 observa-se que a MD de cada dádiva foi de 479 ± 6 ml, Máx 490 ml e Mín 441 ml. Os PF produzidos tiveram uma MD de 272 ± 16 ml, Máx 307 ml e Mín 236 ml. De acordo com o *edQM*, estes volumes estão dentro dos requisitos, 450 ± 50 ml para o ST e > 200 ml para o PF.⁷⁵

Dos 124 participantes, verificou-se que 59 participantes (47,58%) expressam fenótipo O, sendo que 43 dadores são Rh (+) e 16 Rh (-). Dos 48 dadores (38,71%) com fenótipo A, 43 têm fenótipo Rh (+) e 5 Rh (-). Com uma frequência relativa inferior, participaram 13 dadores (10,48%) do grupo B, sendo que 10 expressavam Rh (+) e 3 Rh (-), enquanto que do grupo

AB a amostra incluiu apenas 4 dadores (3,23%), 3 com fenótipo Rh (+) e 1 com Rh (-), (Figura 5.2 e 5.3).

Verificou-se que as frequências relativas do grupo O e A são diferentes às apresentadas por Duran et al. (2007), num estudo sobre a distribuição dos grupos na população portuguesa realizado em 2007, para o distrito de Santarém, verificaram que a frequência relativa de dadores do grupo O (40,22%) era inferior aos do grupo A (48,57%).⁷⁶

No entanto, a amostragem utilizada neste estudo poderá ser reduzida face à amostragem utilizada por Duran et al. (2007). Considerando que a recolha de amostra apenas foi realizada nos quatro primeiros meses do ano de 2024, outro fator que poderá explicar esta diferença é o intervalo de tempo associado à dádiva de sangue. Seria interessante comparar esta distribuição com estudos recentes, no entanto não foram encontradas referências científicas que explorem esta questão.

Os níveis de FVIII dos dadores que integraram este estudo apresentaram MD de 118,10 UI/dl no início (1), MD de 110,10 UI/dl no PF antes da congelação (2) e MD de 108 UI/dl no PF após um mês de congelação (3), ocorrendo uma redução da mediana de FVIII de 8,55% entre o início e um mês após a congelação (Figura 5.4). Observa-se através da Figura 5.5 que a maior redução na quantidade de FVIII ocorre no intervalo entre a fase de início e o momento antes da congelação do PF.

Um dos objetivos específicos deste estudo era investigar a possível correlação entre características dos dadores de sangue, como o grupo sanguíneo e a quantidade do FVIII. Para estas variáveis obteve-se uma correlação negativa significativa fraca entre o “Grupo sanguíneo ABO” e a quantidade de “FVIII inicial” ($r = -0,327$; $p < 0,05$), o que indica que determinados grupos sanguíneos tendem a estar associados a níveis mais baixos de FVIII.

Para testar este resultado foram agrupados em dois grupos, os dadores do grupo “O” (N=59) e os dadores do grupo “Não-O” (N=65), face ao reduzido número de dadores do grupo B e AB, este último engloba os dadores dos grupos A, B e AB. De acordo com a Figura 5.5, a MD de FVIII no grupo “Não-O” é superior (134 UI/dl), face à MD do grupo “O” (106,90 UI/dl).

Aplicando o teste de *Mann-Whitney*, foi rejeitada a hipótese nula, “A quantidade de FVIII no início é idêntica para o grupo sanguíneo “O” e “Não O”. Este teste mostrou que há uma diferença significativa na quantidade inicial de FVIII entre os grupos “O” e “Não O”, o valor de $p = 0,001$ (U 1193,50; $p < 0,05$), Tabela 5.5.

Estes resultados são semelhantes aos verificados por O'Donnell et al. (2001) e Agarwal et al. (2023), que também verificaram uma redução significativa de FVIII nos indivíduos do grupo O.^{24,77}

De acordo com Hermans et al. (2024), a diferença nos níveis de FVIII entre os grupos sanguíneos é atribuída à variabilidade nas concentrações endógenas de FvW, fator que desempenha um papel crucial na estabilização e proteção do FVIII na circulação sanguínea.⁷⁸

Para verificar o pressuposto que o tempo entre a colheita e o início do processo de congelação influencia a atividade do FVIII relacionou-se a variável “Tempo até ao congelamento” com a “Diferença entre FVIII do PF antes da congelação e o FVIII no início da colheita”, o coeficiente indicou uma correlação extremamente fraca entre as variáveis, sugerindo que o tempo de processamento, com duração mediana de 5 horas não tem uma relação significativa com a variação na quantidade de FVIII entre os dois momentos. O valor de $p=0,514$ é maior que o nível de significância de 0,05, confirmando que a correlação não é estatisticamente significativa. Estes resultados corroboram os resultados obtidos por Omidkhoda et al. (2011), segundo estes autores, a influência do tempo na atividade do FVIII não foi significativa até 6 horas após a colheita.⁵¹ Sward-Nilsson et al. (2006), também não encontraram diferenças significativas na atividade do FVIII quando a congelação é realizada entre as 2 e as 4 horas após a colheita, no entanto, quando a congelação é realizada após as 6 horas, as diferenças foram significativas.⁶

Será importante referir que de acordo com a metodologia utilizada neste estudo, o processamento de ST não foi realizado antes de perfazer as duas horas de placa de butanodiol, que tem como função favorecer a estabilização do FVIII e manter o ST à temperatura de 20-24°C, absorvendo o calor. Ou seja, o tempo desde o momento em que os ST saíram da placa de refrigeração até aos PF serem congelados foi rápido.

Desta forma, podemos concluir que considerando os resultados obtidos, não há evidências suficientes para afirmar que o “tempo desde a colheita até à congelação” influencia a atividade do FVIII, não havendo correlação entre estas variáveis. Outras variáveis ou condições, como os procedimentos realizados, a temperatura ou características individuais de cada amostra, podem ter uma influência maior na diferença de FVIII do que o tempo desde a colheita até à congelação.

Os coeficientes de correlação de *Spearman*, Tabela 5.4, indicaram uma correlação positiva entre os resultados de FVIII obtidos nos três momentos do estudo, início, pré-congelação e pós-congelação. Assim, para verificar em que fase do estudo as diferenças de FVIII verificadas na Figuras 5.4 e 5.5 eram significativas, foi utilizado o teste de *Friedman*.

O valor do qui-quadrado de 103,472, calculado pelo teste de *Friedman*, Tabela 5.6 indica a diferença entre as medianas do FVIII nas três fases do estudo, sugerindo uma diferença substancial, indicada pelo valor de p de 0,001. Esses resultados mostram que as principais alterações nos níveis de FVIII ocorrem antes da fase de congelação do PF, estabilizando posteriormente, uma vez que não houve alterações significativas nos níveis de FVIII durante o armazenamento a -80°C, ou seja, antes da congelação e 1 mês após a congelação, à semelhança do que foi discutido anteriormente ao analisar os três momentos representados na Figura 5.5. No entanto, é relevante referir que os dados do FVIII após um mês de congelação que foram utilizados para esta avaliação, englobaram os dois métodos de

congelamento. Estes resultados vão ao encontro dos resultados obtidos por *Ofuso et al.* (1987), que compararam a atividade do FVIII logo após a produção em plasma e após um mês de congelamento, com armazenamento a -30° , tendo concluído que a atividade do FVIII entre estas duas fases permanecia indistinguível.⁷⁹

Por outro lado, analisando a Tabela 5.7, verificam-se diferenças na quantidade de FVIII antes e após congelamento entre os métodos de congelamento utilizados. Com o objetivo de analisar esta diferença e responder à questão inicial do estudo, foram comparados os resultados obtidos através do teste de *Wilcoxon*.

Os resultados mostraram variações nos níveis de FVIII em função do método de congelamento utilizado, revelando que a congelamento do plasma utilizando um congelador rápido permite manter os níveis de FVIII próximos dos valores pré-congelamento, enquanto que a congelamento através de arca ultracongeladoras mostrou uma redução significativa deste fator da coagulação ($p=0,001$).

Não foram identificados estudos que relacionem os métodos de congelamento do plasma obtido após a colheita de ST em doadores de sangue, a maioria das evidências científicas apenas relacionam as diferentes formas de armazenamento de plasma com a atividade do FVIII, *Woodhams et al.* (2001) e *Alesci et al.* (2009) verificaram que a atividade do fator de coagulação no plasma congelado armazenado a aproximadamente -80°C foi maior que a do plasma congelado armazenado a aproximadamente -20°C .^{80,81}

No entanto, *Subramaniyan et al.* (2016), estudaram o efeito de métodos de congelamento na atividade do FVIII em crioprecipitado, fração insolúvel recuperada por centrifugação quando o plasma fresco congelado é descongelado a 4°C , fonte importante de FVIII concentrado. Estes investigadores verificaram que os níveis de FVIII foram maiores no crioprecipitado congelado num congelador rápido, em comparação com o crioprecipitado congelado numa arca ultracongeladora.⁸²

Será relevante afirmar que a variabilidade intrínseca nas medições de FVIII poderá mascarar o efeito de uma variável. Um tamanho de amostra maior pode ser necessário para obter resultados mais robustos e confiáveis.

Avaliando o impacto que estes dois equipamentos poderão ter nos Serviços de Sangue, verificou-se que a arca ultracongeladora embora apresente como mais valias a capacidade de armazenar grandes quantidades de plasma, um custo inicial reduzido em comparação com o congelador rápido e não necessitar de formação específica para a sua utilização, poderá apresentar alguns desafios operacionais na congelamento do plasma. Este equipamento apenas permite congelar diariamente um número de plasmas reduzido, o que poderá ser insuficiente para a quantidade de PF produzida diariamente, provocando variações de temperatura, quando novas unidades de plasma com temperaturas entre $20-24^{\circ}\text{C}$ são colocadas no interior para congelamento, o que provoca um aumento temporário da temperatura interna, que poderá

comprometer a eficácia do congelamento e a qualidade do plasma. As variações de temperatura e a capacidade limitada de congelamento aumentam o risco de desperdício de plasma.

Por sua vez, o congelador rápido apesar de ter custos de aquisição elevados e necessitar de formação específica para a sua utilização, tem a vantagem de permitir congelar o PF em menos de 30 minutos, bem como permitir a rastreabilidade de todo o processo de congelação, requisito para a aceitação do PF pela indústria de fracionamento. Além disso, tendem a preservar melhor a qualidade e a atividade dos fatores plasmáticos devido à redução do tempo em que o plasma está em temperaturas intermediárias, minimizando a degradação de fatores plasmáticos lábeis como o FVIII, estes equipamentos têm como função principal a congelação.

A escolha entre arcas ultracongeladoras e congeladores rápidos depende de várias considerações, incluindo o volume de plasma a ser processado, a sensibilidade dos componentes plasmáticos que precisam ser preservados, o espaço disponível no laboratório e o orçamento disponível para a aquisição dos equipamentos. Cada método tem as suas vantagens e desvantagens específicas, e a decisão deve ser baseada nas necessidades e prioridades específicas do Serviço de Sangue.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mesmo que o FVIII recombinante seja o mais utilizado para o tratamento de Hemofilia A, o Plasma humano ainda é uma fonte importante para a produção de concentrados de FVIII.

A escolha do método de congelação do Plasma poderá afetar a atividade do FVIII, pelo que conhecer qual o mais eficaz pode ser uma mais valia para os serviços de sangue, destacando a importância de uma padronização adequada de todas as etapas do processo de produção de PF, de modo a evitar perdas desnecessárias.

Os resultados obtidos neste estudo confirmaram a conformidade do tempo de colheita de ST e dos volumes de PF produzidos na ULSMT com os requisitos estabelecidos com a Farmacopeia Europeia, bem como a quantidade de FVIII nos dadores analisados, sendo um indicador da utilização de Boas Práticas de Fabrico.^{37,43}

Foi possível identificar diferenças significativas nos níveis de FVIII entre os dadores de diferentes grupos sanguíneos ABO, pelo que se verificou que os dadores do grupo sanguíneo O apresentam níveis mais baixos de FVIII, em comparação com os dadores dos grupos “Não-O”. Apesar de terem sido utilizadas amostras de dadores de sangue para relacionar os níveis de FVIII com o grupo sanguíneo, estes resultados poderão ser extrapolados para doentes, o que realça a importância de uma abordagem personalizada na gestão da terapia com FVIII, levando em consideração as particularidades do grupo sanguíneo de cada doente.

Com base nos resultados do estudo foi possível concluir que a congelação rápida tende a preservar melhor os níveis de FVIII, e que a redução dos níveis deste fator foi mais pronunciada através da congelação do PF em arca ultracongeladora.

Será importante referir que os equipamentos utilizados na congelação dos plasmas encontravam-se qualificados para a congelação do número de plasmas utilizados em cada ciclo de congelação.

Em suma, a capacidade de congelar rapidamente o plasma através de congeladores rápidos e de armazenar o PF já congelado nas arcas ultracongeladoras demonstra a complementaridade entre estes dois equipamentos, o que favorece todo o processo de produção de PF.

Para validar os resultados obtidos seria interessante comparar os resultados da degradação de FVIII obtidos após a congelação do plasma por estes dois métodos, no entanto, não foram encontradas mais referências científicas. Apesar disso, os resultados poderão servir de base para futuras investigações.

8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPETIVAS FUTURAS

Apesar dos resultados interessantes, a amostra foi limitada a um centro de colheitas, pelo que não é representativa de toda a população. Seria benéfico aumentar o período de recolha de amostras, bem como expandir o estudo incluindo vários postos de colheita, possibilitando utilizar uma amostra maior e diversificada.

Embora se tenha verificado uma diferença significativa na quantidade inicial de FVIII entre os grupos “O” e “Não O”, estes resultados apenas se basearam no fenótipo ABO, dadores homocigóticos AA e BB eram indistinguíveis dos heterocigóticos AO e BO. Desta maneira, seria oportuno relacionar a quantidade de FVIII com os genótipos ABO.

Sendo o aproveitamento do Plasma para fracionamento uma realidade recente nacional, os estudos que envolvam esta temática poderão beneficiar e influenciar as BPF nos serviços de sangue, condição essencial para a indústria do Plasma.

Em estudos futuros e em dadores nacionais, seria interessante prolongar o tempo entre a colheita até à congelação do PF, de modo a verificar se a atividade do FVIII diminui significativamente ao longo do tempo. Investigar possíveis correlações entre os níveis de FVIII e de FvW, idade e FVIII, bem como investigar possíveis mutações no gene do FVIII e a influência na sua atividade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. WHO model list of essential medicines - 22nd list, 2021. Technical document [Internet]. 2021;2021. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>
2. Burnouf T, Seghatchian J. “Go no Go” in plasma fractionation in the world’s emerging economies: Still a question asked 70 years after the COHN process was developed! Vol. 51, Transfusion and Apheresis Science. Elsevier Ltd; 2014. p. 113–9.
3. Burnouf T. Modern Plasma Fractionation. *Transfus Med Rev* [Internet]. 2007 Apr;21(2):101–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887796306000940>
4. Gilbert GE. The evolving understanding of factor VIII binding sites and implications for the treatment of hemophilia A. *Blood Rev* [Internet]. 2019;33:1–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.05.001>
5. Peyvandi F, Miri S, Garagiola I. Immune Responses to Plasma-Derived Versus Recombinant FVIII Products. *Front Immunol*. 2021;11(January):1–11.
6. Swärd-Nilsson AM, Persson PO, Johnson U, Lethagen S. Factors influencing factor VIII activity in frozen plasma. *Vox Sang*. 2006;90(1):33–9.
7. Samuelson Bannow B, Recht M, Négrier C, Hermans C, Berntorp E, Eichler H, et al. Factor VIII: Long-established role in haemophilia A and emerging evidence beyond haemostasis. *Blood Rev* [Internet]. 2019;35:43–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.03.002>
8. Gonnade N, Bajpayee A, Elhence A, Lokhande V, Mehta N, Mishra M. and using cord blood for transfusion Azikiwe University Teaching Hospital ,. 2017;12(2):105–11.
9. Stonebraker JS, BRooker M, Amand RE, Farrugia A, Srivastava A. A study of reported factor VIII use around the world. *Haemophilia*. 2010;16(1):33–46.
10. Burnouf T, Faber JC, Radosevic M, Goubran H, Seghatchian J. Plasma fractionation in countries with limited infrastructure and low-/medium income: How to move forward? Vol. 59, Transfusion and Apheresis Science. Elsevier Ltd; 2020.
11. Strengers PFW, Klein HG. Plasma is a strategic resource. *Transfusion (Paris)* [Internet]. 2016 Dec;56(12):3133–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/trf.13913>
12. Covington ML, Voma C, Stowell SR. Letter to Blood Shortage of plasma-derived products: a looming crisis? 2022.

13. De Silvestro G, Marson P, Breda A, De Angelis V. Plasma-derived industry and plasma-derived medicinal products in the Italian National Blood Transfusion Service. Vol. 58, *Transfusion and Apheresis Science*. Elsevier Ltd; 2019. p. 545–9.
14. Farrugia A, Perry R, Rossi F, von Bonsdorff L, Bowie G, Faber J, et al. Generating pathways to domestically sourced plasma-derived medicinal products: Report from a workshop by the International Plasma and Fractionation Association and the Working Party on Global Blood Safety of the International Society of Blood Transfusion. *Vox Sang* [Internet]. 2024 Jun 26; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vox.13698>
15. El Ekiaby M, Diop S, Gouider E, Moftah F. Challenges associated with access to plasma-derived medicinal products in low middle-income and low-income countries. *Vox Sang* [Internet]. 2023 Dec 5;119(2):166–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vox.13555>
16. PARTE C. 2016;(2):37064. Available from: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/despacho/15300-a-2016-105574288>
17. Press_release_medicamerntos_derivados_do_plasma_portugues_Jan2019. [cited 2024 May 11]; Available from: https://ipst.pt/files/IPST/GERAL/Press_release_medicamerntos_derivados_do_plasma_portugues_Jan2019.pdf
18. Calizzani G, Profili S, Candura F, Lanzoni M, Vaglio S, Cannata L, et al. The demand for factor VIII and for factor IX and the toll fractionation product surplus management. *Blood Transfusion*. 2013;11(SUPPL. 4).
19. World Health Organization. General manufacturing recommendations. WHO technical report series No. 941. 2007. 90–91 p.
20. Grazzini G, Ceccarelli A, Calteri D, Catalano L, Calizzani G, Cicchetti A. Sustainability of a public system for plasma collection, contract fractionation and plasma-derived medicinal product manufacturing. *Blood Transfusion*. 2013;11(SUPPL. 4):24–8.
21. Grazzini G, Mannucci PM, Oleari F. Plasma-derived medicinal products: Demand and clinical use. *Blood Transfusion*. 2013;11(SUPPL. 4):2–5.
22. Farrugia A. Product delivery in the developing world: options, opportunities and threats. *Haemophilia* [Internet]. 2004 Oct 8;10(s4):77–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2516.2004.01007.x>
23. Burnouf T. Plasma fractionation in Asia–Pacific: challenges and perspectives. *ISBT Sci Ser*. 2011 Dec;6(2):366–72.

24. Agarwal S, Negi G, Meinia S, Chennamsetty E, Kaur D, Jain A. Association of donor characteristics with coagulation factor levels in fresh frozen plasma. *Asian J Transfus Sci.* 2023;17(2):217.
25. Cardigan R, Green L. Thawed and liquid plasma - what do we know? *Vox Sang.* 2015;109(1):1–10.
26. Green L, Bolton-Maggs P, Beattie C, Cardigan R, Kallis Y, Stanworth SJ, et al. British Society of Haematology Guidelines on the spectrum of fresh frozen plasma and cryoprecipitate products: their handling and use in various patient groups in the absence of major bleeding. *Br J Haematol.* 2018 Apr 1;181(1):54–67.
27. Norma DGS 9/2012, atualizada em 2/12/2015. [cited 2024 May 6]; Available from: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0092012-de-16122012-png.aspx>
28. Garraud O, Coppo P. Types of fresh plasma with focus on therapeutic plasma exchange. *Transfusion and Apheresis Science* [Internet]. 2019;58(3):258–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.04.009>
29. Hellstern P. Fresh-frozen plasma, pathogen-reduced single-donor plasma or bio-pharmaceutical plasma? *Transfusion and Apheresis Science.* 2008;39(1):69–74.
30. Adcock Funk DM, Lippi G, Favaloro EJ. Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(6):576–85.
31. Burnouf T. Current status and new developments in the production of plasma derivatives. *ISBT Science Series.* 2016.
32. Burnouf T. Plasma fractionation. *ISBT Sci Ser* [Internet]. 2012 Jul 13;7(1):62–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-2824.2012.01557.x>
33. Hosseini KM, Ghasemzadeh M. Implementation of plasma fractionation in biological medicines production. Vol. 14, *Iranian Journal of Biotechnology.* Kowsar Medical Publishing Company; 2016. p. 213–20.
34. Burnouf T. An overview of plasma fractionation. *Ann Blood.* 2018 Jun;3:33–33.
35. Runkel S, Hitzler WE, Hellstern P. The impact of whole blood processing and freezing conditions on the quality of therapeutic plasma prepared from whole blood. *Transfusion (Paris).* 2015;55(4):796–804.
36. Hellstern P, Bach J, Haubelt H, Hitzler WE, Mathis S, Vogt A. The impact of the intensity of serial automated plasmapheresis and the speed of deep-freezing on the quality of plasma. *Transfusion (Paris)* [Internet]. 2001 Dec 24;41(12):1601–

5. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1537-2995.2001.41121601.x>
37. Human plasma for fractionation [Internet]. Available from: www.webofpharma.com
38. NÚMERO: [Internet]. [cited 2024 Jul 3]. Available from: <https://normas.dgs.min-saude.pt/wp-content/uploads/2019/10/especificacoes-do-sistema-de-qualidade-dos-servicos-de-sangue-e-servicos-de-medicina-transfusional.pdf>
39. Kuta P, Hauck-Dlimi B, Strobel J, Zimmermann R, Eckstein R. Quality of Clotting Factor Activity in Fresh Frozen Plasma at Thaw with a Microwave System and after Storage at 4°C for 48 Hours. *Clin Lab*. 2016;62(06/2016).
40. Von Heymann C, Pruss A, Sander M, Finkeldey A, Ziemer S, Kalus U, et al. Thawing procedures and the time course of clotting factor activity in fresh-frozen plasma: A controlled laboratory investigation. *Anesth Analg*. 2006 Oct;103(4):969–74.
41. Benson K. Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components . Vol. 39, Transfusion. 1999. 547–547 p.
42. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 185/2015 de 2 de setembro de 2015. *Diário da República*. 2015;1–25.
43. Pharmacopoeia E. Elaboration and use of monographs on human plasma-derived products. 2015;
44. *Diário da República*, 1.ª série-N.º 141-24 de Julho de 2007 [Internet]. [cited 2024 Nov 25]. Available from: <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/decreto-lei/267-2007-636749>
45. Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: From mutation analysis to new therapies. Vol. 6, *Nature Reviews Genetics*. 2005. p. 488–501.
46. Childers KC, Peters SC, Spiegel PC. Structural insights into blood coagulation factor VIII: Procoagulant complexes, membrane binding, and antibody inhibition. Vol. 20, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 1957–70.
47. Thompson AR. Structure and function of the factor VIII gene and protein. *Semin Thromb Hemost*. 2003;29(1):11–22.
48. Berntorp E, Fischer K, Hart DP, Mancuso ME, Stephensen D, Shapiro AD, et al. Haemophilia. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1).
49. Ronayne EK, Peters SC, Gish JS, Wilson C, Spencer HT, Doering CB, et al. Structure of Blood Coagulation Factor VIII in Complex With an Anti-C2 Domain Non-Classical, Pathogenic Antibody Inhibitor. *Front Immunol*. 2021 Jun 10;12.

50. No Title [Internet]. Available from:
<https://arquivobioqui.blogspot.com/2015/11/cascata-da-coagulacao.html>
51. Omidkhoda A, Tabatabaei MR, Atarodi K, Karimi K, Froushani AR, Pourfathollah AA. A comparative study of the effects of temperature, time and factor VIII assay type on factor VIII activity in cryoprecipitate in Iran. *Blood Transfusion*. 2011;9(4):394–9.
52. Morfini M, Coppola A, Franchini M, Minno G Di. Clinical use of factor VIII and factor IX concentrates. *Blood Transfusion*. 2013;11(SUPPL. 4).
53. Oldenburg J, Lacroix-Desmazes S, Lillicrap D. Alloantibodies to therapeutic factor viii in hemophilia A: The role of von willebrand factor in regulating factor viii immunogenicity. *Haematologica*. 2015;100(2):149–56.
54. von Drygalski A, Chowdary P, Kulkarni R, Susen S, Konkle BA, Oldenburg J, et al. Efanesoctocog Alfa Prophylaxis for Patients with Severe Hemophilia A. *New England Journal of Medicine*. 2023 Jan 26;388(4):310–8.
55. Feng L, Zhao Y, Zhao H, Shao Z. Effects of storage time and temperature on coagulation tests and factors in fresh plasma. *Sci Rep*. 2014;4:6–10.
56. Ward SE, O’Sullivan JM, O’Donnell JS. The relationship between ABO blood group, von Willebrand factor, and primary hemostasis. *Blood* [Internet]. 2020 Dec 17;136(25):2864–74. Available from:
<https://ashpublications.org/blood/article/136/25/2864/461790/The-relationship-between-ABO-blood-group-von>
57. Dillard D. of VIII. of. 1964;(7):1984–7.
58. Wang Z, Dou M, Du X, Ma L, Sun P, Cao H, et al. Influences of ABO blood group, age and gender on plasma coagulation factor VIII, fibrinogen, von Willebrand factor and ADAMTS13 levels in a Chinese population. *PeerJ*. 2017;2017(3).
59. Ray D, Kumar N, Hans C, Kler A, Jain R, Bansal D, et al. Impact of ABO blood group antigens on residual factor VIII levels and risk of inhibitor development in hemophilia A. *Blood Res*. 2023;58(1).
60. Rejtő J, Königsbrügge O, Grilz E, Hofer S, Mauracher LM, Gabler C, et al. Influence of blood group, von Willebrand factor levels, and age on factor VIII levels in non-severe haemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020 May 1;18(5):1081–6.
61. Zhao Y, Feng G, Zhang J, Gong R, Cai C, Feng L. Effects of preanalytical frozen storage time and temperature on screening coagulation tests and factors VIII and IX activity. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).

62. Funk DM, Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays : approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008. 33 p.
63. Kristoffersen AH, Stavelin A V., Ajzner E, Kristensen GBB, Sandberg S, Van Blerk M, et al. Pre-analytical practices for routine coagulation tests in European laboratories. A collaborative study from the European Organisation for External Quality Assurance Providers in Laboratory Medicine (EQALM). *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(10):1511–21.
64. Genética familiar hemofilia [Internet]. [cited 2024 May 2]. Available from: <https://static.preparaenem.com/2021/04/genetica-hemofilia.jpg>
65. Pipe SW, Gonen-Yaacovi G, Segurado OG. Hemophilia A gene therapy: current and next-generation approaches. *Expert Opin Biol Ther*. 2022;22(9):1099–115.
66. 2018-09 Norma DGS N. 17_2018, atualizada 06_2021. [cited 2024 Apr 28]; Available from: <https://normas.dgs.min-saude.pt/wp-content/uploads/2018/09/encaminhamento-de-pessoas-com-coagulopatias-congenitas.pdf>
67. Santagostino E, Young G, Carcao M, Mannucci PM, Halimeh S, Austin S. A contemporary look at FVIII inhibitor development: still a great influence on the evolution of hemophilia therapies. Vol. 11, *Expert Review of Hematology*. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 87–97.
68. Lai J, Hough C, Tarrant J, Lillicrap D. Biological considerations of plasma-derived and recombinant factor VIII immunogenicity. Vol. 129, *Blood*. American Society of Hematology; 2017. p. 3147–54.
69. Peyvandi F, Miri S, Garagiola I. Immune Responses to Plasma-Derived Versus Recombinant FVIII Products. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
70. Circular Informativa [Internet]. Available from: www.infarmed.pt
71. Assembly G. Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *J Indian Med Assoc*. 2009;107(6):403–5.
72. Assembleia da República. Convenção Oviedo. *Diário Da República — I Série-a* [Internet]. 2001;14–36. Available from: https://gddc.ministeriopublico.pt/sites/default/files/documentos/instrumentos/convencao_protecao_dh_biomedicina.pdf
73. Lei nº 58/2019 de 8 de agosto. Proteção das pessoas singulares no que diz respeito ao tratamento de dados pessoais e à livre circulação desses dados.

- Diário da República, 1ª série [Internet]. 2019;(151):3. Available from: www.dre.pt
74. Burnouf T, Faber JC, Radosevic M, Goubran H, Seghatchian J. Plasma fractionation in countries with limited infrastructure and low-/medium income: How to move forward? Vol. 59, Transfusion and Apheresis Science. Elsevier Ltd; 2020.
 75. Edqm. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 21st edition.
 76. Duran JA, Chabert T, Rodrigues F, Pestana D. ABO Portugal IPST. Revista ABO [Internet]. 2007 [cited 2024 Jun 3]; Available from: https://ipst.pt/files/IPST/INFORMACAO_DOCUMENTACAO/ABO_29_2007_pag_5a17.pdf
 77. O'donnell J, Laffan MA. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. Vol. 11, Blackwell Science 343 Transfusion Medicine. 2001.
 78. Hermans C, Pierce GF. Ultra-Long factor VIII: a major step forward toward a hemophilia-free mind. Journal of Thrombosis and Haemostasis. Elsevier B.V.; 2024.
 79. Ofosu FA, Smith LM, Blajchman MA, Campbell J, De Vries C, Wah P. Use of Plasma Segments for Estimating Factor VIII Activity in Pools of Fresh Frozen Plasma. Vox Sang. 1987;52(3):254–6.
 80. Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood Coagulation and Fibrinolysis [Internet]. 2001 Jun;12(4):229–36. Available from: <http://journals.lww.com/00001721-200106000-00002>
 81. Alesci S, Borggreffe M, Dempfle CE. Effect of freezing method and storage at - 20 °C and - 70 °C on prothrombin time, aPTT and plasma fibrinogen levels. Thromb Res. 2009 May;124(1):121–6.
 82. Subramaniyan R, Marwaha N, Jain A, Ahluwalia J. Factors affecting the quality of cryoprecipitate. Asian J Transfus Sci. 2017 Jan 1;11(1):33–9.

APÊNDICES

APÊNDICE I – DIFERENTES TIPOS E CATEGORIAS DE PLASMA FRESCO.

ADAPTADO DE GARRAUD *et al.*” (2019).

SÃO APRESENTADOS OS PRINCIPAIS TIPOS E APRESENTAÇÕES DE PLASMA PARA USO TERAPÊUTICO. INDEPENDENTEMENTE DA IMPLEMENTAÇÃO DE MEDIDAS DE SEGURANÇA RELATIVAS A TESTES E CONTROLO DE QUALIDADE. ***PCC SIGNIFICA COMPLEXO DE PROTROMBINA, UM COMPONENTE SANGUÍNEO LÁBIL. ****PODERÁ SER SUBMETIDO A MEDIDAS DE SEGURANÇA ADICIONAIS, COM REDUÇÃO DE PATOGÊNEOS.

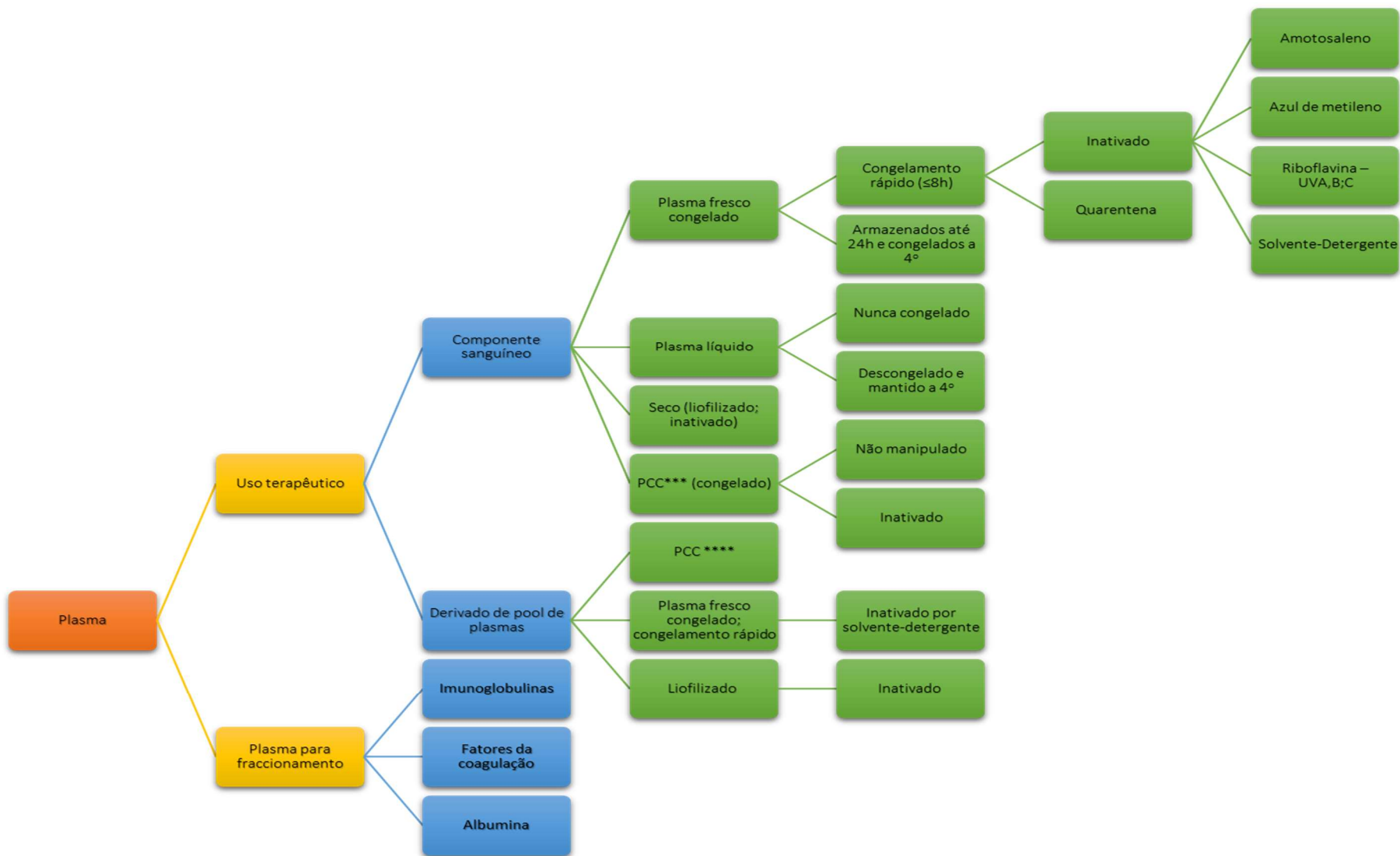


Figura 8.1 - Diferentes tipos e categorias de plasma. .***PCC Significa Complexo de Protrombina,.****Poderá ser submetido a medidas de segurança adicionais, com redução de patógenos.²⁸

APÊNDICE II – PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO NO CONTROLO DE QUALIDADE DO PLASMA DESTINADO AO FRACIONAMENTO.

Parâmetro a verificar	Requisitos de qualidade
Volume	>200ml
Fator VIII	Doseamento do FVIII (1 mês após a congelação $\geq 0,7$ UI/ml) (Pool de 10 U plasmas)
Proteínas Totais	≥ 50 g/L (Pool de 10 U plasmas)
Células residuais antes da congelação	Eritrócitos: $\leq 6.0 \times 10^9/L$ Leucócitos: $\leq 0,1 \times 10^9/L$ Plaquetas: $\leq 50 \times 10^9/L$
Alterações visuais	Ausência de hemólise, coloração anormal ou presença de coágulos visíveis

Figura 8.2 - Parâmetros de avaliação no controlo de qualidade do plasma destinado ao fracionamento.³⁷

APÊNDICE III – FOLHA DE RECOLHA DE DADOS DO ESTUDO.

FOLHA DE RECOLHA DE DADOS – IMPACTO DO MÉTODO DE CONGELAÇÃO DO PLASMA PARA FRACIONAMENTO NO DOSEAMENTO DE FATOR VIII EM COLHEITAS DE DADORES DE SANGUE

AMOSTRA Nº	DATA	Nº DADOR	GS	Nº COLHEITA	DURAÇÃO DA COLHEITA	VOLUME ST	VOLUME PF	TEMPO ENTRE A COLHEITA E O CONGELAMENTO	FVIII NO INICIO DA COLHEITA (1)	FVIII DO PF ANTES DA CONGELAÇÃO (2)	FVIII 1 MÊS APÓS A CONGELAÇÃO (3)	MÉTODO DA CONGELAÇÃO

Legenda:

GS – Grupo sanguíneo

ST – Sangue total

PF – Plasma para fracionamento

APÊNDICE IV – FASES DE ESTUDO

PROCEDIMENTOS NAS DIFERENTES FASES DE ESTUDO

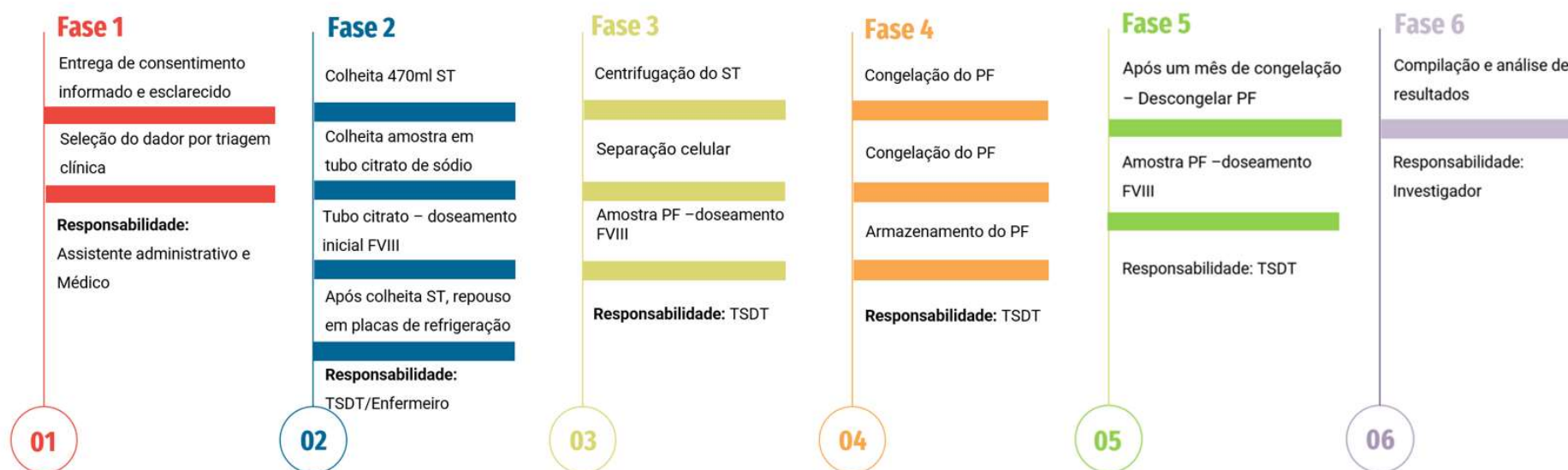


Figura 8.3 - Procedimento e responsabilidades nas Fases do estudo.

APÊNDICE V – CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO

CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO

(De acordo com a Declaração de Helsínquia e a Convenção de Oviedo e em concordância com a Lei n.º 58/2019 de 8 de agosto da proteção de dados)

Projeto de investigação

Impacto do método de congelação de congelação do plasma para fracionamento no doseamento do fator VIII em colheitas de dadores de sangue

Este estudo tem como objetivo avaliar o impacto do método de congelação do plasma para fracionamento, na atividade do fator VIII em colheitas a dadores de sangue. Será relevante entender como diferentes métodos de congelação podem afetar a atividade do fator VIII, garantindo a qualidade e eficácia dos produtos derivados do plasma produzidos pela indústria de fracionamento de plasma, recorrendo ao plasma colhido em dadores nos serviços de sangue. Esta avaliação poderá ter impacto na produção de hemoderivados e permitirá disponibilizar produtos com níveis adequados de fator VIII para o tratamento de pacientes com distúrbios da coagulação.

Desta forma, para a realização do estudo, a decorrer no serviço de Imunohemoterapia, iremos proceder, após assinatura voluntária e esclarecida do consentimento informado, à recolha de uma amostra num tubo de estudo da coagulação com citrato de sódio, no ato da colheita de sangue.

Todos os participantes devem de obedecer aos critérios de elegibilidade para dador de sangue. As amostras serão processadas para o doseamento do fator VIII do dador.

A participação neste projeto de investigação é voluntária e livre, sem encargos associados. O participante tem o direito de recusar a qualquer momento a sua participação no estudo, sem que daí possam resultar quaisquer prejuízos e sem que seja comprometida a privacidade e confidencialidade dos dados obtidos até ao momento. Toda a informação fornecida é confidencial e será utilizada apenas para responder aos objetivos descritos. Toda a informação que permita a identificação do participante (nome, idade, contactos) será codificada e armazenada no arquivo do Serviço de Imunohemoterapia do Centro , Hospitalar do Médio Tejo – Unidade de Torres Novas, separadamente da restante informação e só acessível ao investigador responsável. De acordo, com as regras nacionais de proteção de dados, toda a informação recolhida poderá ser posteriormente modificada, atualizada ou retirada pelo participante, sendo o prazo de guarda dos dados de 30 anos.

Este estudo terá a duração de 6 meses e os resultados obtidos serão utilizados no desenvolvimento de uma tese de mestrado, podendo também serem divulgados em forma de artigos científicos, a fim de serem publicados em revistas nacionais e internacionais com revisão de pares, congressos, encontros e jornadas nacionais e internacionais, sem nunca comprometer a confidencialidade dos participantes. No final do estudo, de acordo com os resultados obtidos serão emitidas recomendações para o serviço.

Os seus dados pessoais serão tratados de acordo com o definido na política de privacidade da instituição, e-mail: geral@chmt.min-saude.pt.

Assinatura do investigador responsável: _____

Torres Novas, ____ de _____ de 20 ____

CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO

AUTOR: João Pedro Duque Fernandes

ÂMBITO: Desenvolvimento da Tese de Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais da Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa

Eu _____,
concordo participar voluntariamente no estudo desenvolvido no âmbito da dissertação de mestrado “Impacto do método de congelação do plasma para fracionamento no doseamento do fator VIII em colheitas de dadores de sangue”.

Declaro que fui informado da natureza anónima do presente estudo, que toda a informação por mim fornecida será tratada confidencialmente e os dados obtidos serão utilizados única e exclusivamente para atingir os objetivos deste projeto. Os resultados poderão ser apresentados em publicações sem nunca revelar dados que identifiquem os seus participantes.

Após terem sido dadas a conhecer as informações acima referidas, concedo o meu consentimento voluntário para colaborar neste projeto.

Assinatura do(a) Dador(a): _____ Data: ____/____/____