

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Renata Eliane Boehm

**EFEITO DO TABAGISMO ENTRE DOADORES DE SANGUE SOBRE A
CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS TÓXICOS, ESSENCIAIS E ESTRESSE
OXIDATIVO EM CONCENTRADO DE HEMÁCIAS**

Porto Alegre

2019

Renata Eliane Boehm

**EFEITO DO TABAGISMO ENTRE DOADORES DE SANGUE SOBRE A
CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS TÓXICOS, ESSENCIAIS E ESTRESSE
OXIDATIVO EM CONCENTRADO DE HEMÁCIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Rosane Gomez

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Boehm, Renata Eliane
EFEITO DO TABAGISMO ENTRE DOADORES DE SANGUE SOBRE
A CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS TÓXICOS, ESSENCIAIS E
ESTRESSE OXIDATIVO EM CONCENTRADO DE HEMÁCIAS /
Renata Eliane Boehm. -- 2019.
90 f.
Orientadora: Rosane Gomez.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Tabagismo. 2. Doação e Transfusão de Sangue. 3.
Concentrado de Hemácias. 4. Elementos Tóxicos. 5.
Estresse Oxidativo. I. Gomez, Rosane, orient. II.
Título.

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de Doutora em Farmacologia e Terapêutica, e aprovada em sua forma final, pelo orientador e pela banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica.

Prof. Dra. Rosane Gomez

Orientadora

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Mirna Bainy Leal

UFRGS

Prof. Dra. Flávia Valladão Thiesen

PUCRS

Prof. Dra. Natália Brucker

UFSM

Prof. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Coordenadora do PPG Farmacologia e Terapêutica

Dedico este trabalho aos pacientes cuja vida depende de transfusão de sangue. Há oito anos tenho dedicado a minha vida, dentro das minhas possibilidades, para proteger as suas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade de estar aqui, crescendo, aprendendo e tentando melhorar como Ser Humano todos os dias.

À minha orientadora Dra. Rosane Gomez, que desbravou um universo diferente abraçando a minha ideia desde o início. Você é minha inspiração de dedicação, positividade, amor pelo que faz, cuidado e fortaleza. Você me faz acreditar. Desejo que, mesmo quando findada esta etapa, continuemos a ser uma ótima dupla por muito tempo. Ainda tenho muito a aprender contigo e muito ainda temos a contribuir com a ciência juntas.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica pela oportunidade de aprender com excelentes professores.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por permitir meu aperfeiçoamento profissional e ser uma “fábrica” de pesquisa científica buscando melhorar a saúde pública, instituição que tenho o maior orgulho de fazer parte como colaboradora.

Aos meus colegas do Serviço de Hemoterapia do HCPA por todo incentivo, colaboração e acolhimento nestes 8 anos. Em especial às minhas maravilhosas parceiras de trabalho e amigas Carolina Cohen, Francine Bonacina e Jaqueline Farinon; À Dra. Almeri Marlene Balsan pelo suporte e carinho desde o início. Ao Prof. Dr. Tor G. H. Onsten, Dr. Leo Sekine e Enf. Monalisa Sosnoski; às equipes da Enfermagem e Processamento de Hemocomponentes e à Aline Morais pelo gentil empréstimo do Laboratório de Controle de Qualidade de Hemocomponentes. Sou muito afortunada em fazer parte deste time.

Aos colaboradores deste trabalho, equipe do LATOX, em especial Dra. Sabrina Nascimento e Prof. Dra Solange Garcia e da PUCRJ, Prof. Dra. Adriana Gioda, Rafael Rocha e Enrique Calderon.

Às minhas alunas de iniciação científica Bruna Fukami, Kelly Brolo e Daniela Baglioni.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), CNPQ, FIPE (HCPA), FAPERJ, pelo apoio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho.

À minha família que me criou para o mundo, pela base de tudo, inspiração e paciência. Por entenderem a minha ausência enquanto me aperfeiçoava. Por desejarem para mim sempre as melhores coisas, realização profissional e mais que isso, uma vida com propósito. Cada vitória minha é de vocês. Ao meu irmão Victor, que amadureceu cedo e tem ajudado nossos pais na minha ausência. Sem você, seria muito mais difícil sair de casa para buscar meus objetivos.

Por fim, ao meu marido Diego, por todo amor que eu nem sonhava existir. Pelo apoio, paciência e carinho todos os dias.

RESUMO

A transfusão de sangue é uma das terapias mais realizadas no mundo, mas apesar dos esforços para aumentar a segurança transfusional, está associada a riscos aos receptores. Atualmente não existem restrições para doação de sangue para fumantes. Sabe-se que na fumaça do cigarro já foram identificadas cerca de 5.000 substâncias tóxicas, entre elas o monóxido de carbono (CO) e elementos traço tóxicos. Ainda, o tabagismo contribui para o desequilíbrio entre antioxidantes e oxidantes, sendo uma via importante para o desenvolvimento de doenças. O concentrado de hemácias (CH) é o hemocomponente mais frequentemente transfundido e tende a ser o principal afetado pela toxicidade do cigarro devido à afinidade da hemoglobina por CO e as hemácias serem importantes alvos do estresse oxidativo. Em função da escassez de estudos avaliando a qualidade e a segurança do CH proveniente de doadores fumantes sob um ponto de vista toxicológico, foi conduzido um estudo observacional, longitudinal, de caso-controle, pareado, entre doadores de sangue fumantes (n=36) e não fumantes (n=36) do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Primeiramente avaliamos efeito do tabagismo sobre a concentração de elementos essenciais e elementos traço tóxicos no CH. Como biomarcador de exposição foi quantificada a concentração de carboxihemoglobina (COHb) por co-oximetria e os elementos potencialmente tóxicos determinados foram arsênico, cádmio, chumbo, cromo e níquel e os essenciais, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês, molibdênio, selênio e zinco, por espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Nossos resultados mostraram que a COHb foi 14 vezes mais elevada ($P < 0,001$) no CH de doadores fumantes. Nessas bolsas, encontramos maior concentração de metais tóxicos como cádmio, chumbo ($P < 0,001$) e uma redução global de elementos essenciais ($P < 0,05$), exceto o molibdênio. Adicionalmente, exploramos a influência do tabagismo no estado oxidativo dos CH antes do armazenamento, pela análise dos biomarcadores de efeito malondialdeído (MDA), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), grupos tiol não proteicos e níveis de vitamina C e sua associação com o biomarcador cotinina urinária. O tabagismo foi associado com níveis mais baixos de GPx ($P < 0,001$) e vitamina C ($P < 0,001$) e aumento dos níveis de GST ($P < 0,001$). Correlações

negativas foram encontradas entre os níveis de cotinina, GPx ($r = -0,693$; $P < 0,001$) e vitamina C ($r = -0,381$; $P < 0,001$), além de uma correlação positiva entre os níveis de cotinina e atividade de GST ($r = 0,294$; $P = 0,015$), sugerindo que o cigarro afeta as defesas antioxidantes do CH antes do armazenamento. Os resultados dessa tese sugerem que o tabagismo entre doadores de sangue pode prejudicar a qualidade e segurança do CH indicando um risco potencial aos receptores suscetíveis, especialmente recém-nascidos e crianças. Tais resultados poderão nortear políticas para inclusão da pergunta sobre o hábito de fumar na triagem de doadores em toda rede hemoterápica, bem como contribuir com o estabelecimento de novos protocolos para redução de risco transfusional.

Palavras-chave: banco de sangue, transfusão, carboxihemoglobina, metais, estresse oxidativo, antioxidantes

ABSTRACT

Blood transfusion is one of the widest therapies in the world, but despite efforts to increase transfusion safety, it is associated with the risk to recipients. Currently, there are no restrictions for smoker donors. More than 5,000 toxic substances were already identified in the cigarette smoke, including carbon monoxide (CO) and toxic trace elements. Moreover, smoking contributes to the imbalance between oxidants and antioxidants defenses, being an important pathway for the development of diseases. Red blood cells are the most frequent blood component transfused and probably are the main affected by the cigarette toxicity due to the affinity of hemoglobin for CO. Additionally, red blood cells are important targets of oxidative stress. Because studies evaluating the quality and safety of donated blood from a toxicological point of view are scarce, a longitudinal, case-control, matched case-control study was conducted between smoker ($n = 36$) and nonsmoker blood donors ($n = 36$) from the Blood Bank of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre. Firstly, we evaluated the effect of smoking in essential and trace elements levels in the packed red blood cells (PRBC). Carboxyhemoglobin (COHb) levels were taken by co-oximetry as the marker of cigarette exposure. Arsenic, cadmium, lead, chromium, and nickel, as well as essential elements calcium, manganese, molybdenum, selenium, and zinc, were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Our results showed that COHb was 14 times higher in the PRBCs from smoker than non-smokers ($P < 0.001$). In these bags, we found a higher concentration of toxic metals such as cadmium and lead ($P < 0.001$) and an overall reduction of essential elements ($P < 0.05$), except for molybdenum. Additionally, we investigated the influence of smoking on the oxidative state of PRBCs before storage by the analysis of biomarkers as malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), non-protein thiol groups, vitamin C levels and their association with cotinine biomarker. Smoking was associated with lower vitamin C levels and GPx activity and increased GST activity. Negative correlations were found between cotinine levels and GPx activity ($r = -0.693$; $P < 0.001$), and between cotinine and vitamin C levels ($r = -0.381$; $P < 0.001$). We also found a positive correlation between cotinine levels and GST activity ($r = 0.294$; $P = 0.015$), indicating that smoking impairs the oxidative defenses

of PRBCs before storage. Overall, our results showed that smoking among blood donors can impair the quality and safety of PRBCs indicating a potential risk to susceptible recipients, especially newborns and children. Such results could guide policy to include the question about smoking in blood donor screening, as well as to the establishment of new protocols for reduction of transfusion risks.

Key words: blood bank, transfusion, carboxyhemoglobin, metals, oxidative stress, antioxidants

APRESENTAÇÃO

Os resultados desta tese de doutorado estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos, o primeiro submetido ao periódico *Transfusion* e o segundo a ser submetido ao periódico *Clinica Chimica Acta*.

A tese está organizada como uma introdução geral, que apresenta as bases teóricas e justificativa deste trabalho, seguida pelos dois artigos citados acima, ambos na língua inglesa e uma conclusão geral, englobando os resultados dos dois artigos. Segue-se a ela perspectivas e as referências utilizadas na introdução geral.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 OBJETIVOS..... | 21 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 21 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 21 |
| 3 ARTIGO SUBMETIDO | 22 |
| 4 ARTIGO EM PREPARAÇÃO..... | 46 |
| 5 CONCLUSÕES | 69 |
| 6 PERSPECTIVAS..... | 71 |
| REFERÊNCIAS..... | 72 |
| ANEXO A– PARECER DE PROJETO DE PESQUISA ENCAMINHADO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UFRGS | 77 |
| ANEXO B– PARECER DE PROJETO DE PESQUISA ENCAMINHADO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – HCPA..... | 80 |
| ANEXO C– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO | 83 |
| ANEXO D- QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DOADORES FUMANTES E NÃO FUMANTES DO BANCO DE SANGUE DO HCPA..... | 86 |

1 INTRODUÇÃO

Mais de 100 milhões de bolsas de sangue são coletadas por ano em todo o mundo e o fornecimento de sangue seguro e de qualidade para transfusão é essencial para a manutenção da saúde pública, uma vez que estudos mostram que transfusão de sangue está associada a aumento da morbidade e mortalidade dos receptores (CARSON et al., 2016; PAONE et al., 2014; TANTAWY et al., 2018; WHO, 2017). Em função disso, a seleção de doadores segue leis nacionais e internacionais com o objetivo de aumentar a segurança e qualidade dos componentes sanguíneos (AABB, 2017; FDA, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No Brasil, a Portaria da Consolidação N°5 (28/09/2017) regulamenta os procedimentos hemoterápicos, cujas diretrizes definem critérios integrados para proteção dos doadores e receptores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Embora a busca pela garantia da qualidade e segurança transfusional esteja evoluindo por meio de diversos estudos, desenvolvimento de novas tecnologias para tomada de decisão, aprimoramento de técnicas e atualização das leis, as diretrizes vigentes não abrangem aspectos importantes para avaliação de segurança dos hemocomponentes, sendo escassos os estudos toxicológicos em hemoterapia (BOEHM et al., 2018; CARSON; TRIULZI; NESS, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Atualmente as únicas restrições na seleção de doadores de sangue, sob o ponto de vista toxicológico, se referem ao impedimento de doação de maneira temporária como uso de drogas inalatórias cocaína e crack por 12 meses, maconha e álcool ocasionais por 12 horas; e definitivas como alcoolismo crônico e uso de drogas ilícitas injetáveis(MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Os produtos do sangue estão enquadrados na categoria de medicamentos por se destinarem a cura, atenuação, tratamento ou prevenção de doenças, sendo rigorosamente regulamentados (AABB, 2017; FDA, 2017).

Os hemocomponentes são originados a partir da doação de sangue altruísta, voluntária e não gratificada por um doador considerado em bom estado de saúde

nas triagens clínica, hematológica e sorológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). As técnicas de processamento permitem a produção e o armazenamento de diferentes hemocomponentes em condições adequadas para preservação de suas características terapêuticas, possibilitando que o receptor de fato receba, somente os elementos sanguíneos dos quais necessita (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A obtenção de hemocomponentes pode ser de duas maneiras, a mais comum é por coleta do Sangue Total (ST) (Figura 1). A outra forma, mais específica, onerosa e complexa, é a coleta por aférese. Ambas utilizam a centrifugação refrigerada para a separação dos constituintes sanguíneos em concentrado de hemácias (CH), concentrado de plaquetas (CP) e plasma fresco (PF) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015, 2017; REDSANG-SIBRATEC, 2011).

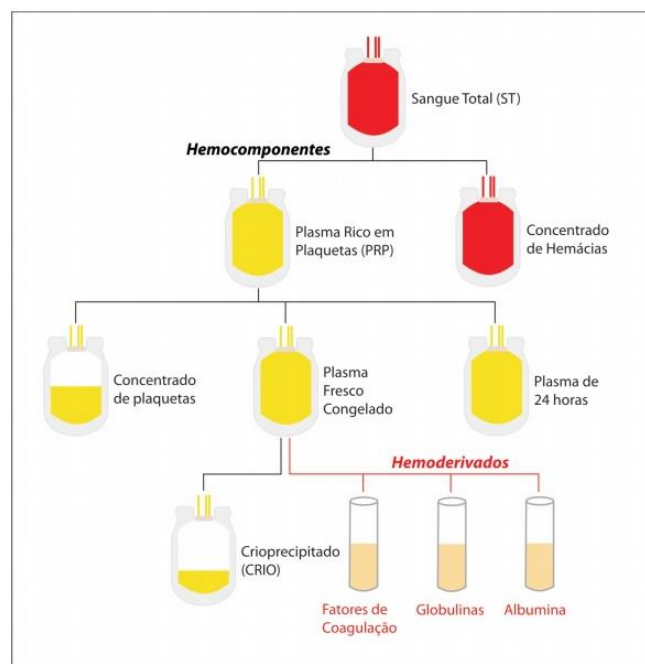


Figura 1- Hemocomponentes e hemoderivados provenientes de doação de sangue total (Adaptado de (REDSANG-SIBRATEC, 2011).

As soluções anticoagulantes-preservadoras e aditivas são utilizadas para a conservação dos hemocomponentes e manutenção de sua viabilidade para a transfusão (HESS, 2006). Dependendo da composição da solução, a data de validade para a preservação do CH pode variar. O CH cujo ST foi coletado em solução CPDA-1 (ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose e adenina)

tem validade de 35 dias a partir da coleta, mantido sob refrigeração entre 2 e 6°C (HESS, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; UGUREL et al., 2017). Ao final de sua produção, sob condições estéreis, o CH é composto por um hematócrito de 65 a 80% diluído em uma pequena quantidade de plasma e solução de armazenamento, com volume final de \pm 250 mL (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Dentre os hemocomponentes, o CH é o mais frequentemente transfundido no mundo, cujos principais receptores são os recém-nascidos prematuros, sendo estes comumente submetidos à múltiplas transfusões durante o período de internação. (CARSON; TRIULZI; NESS, 2017; MIMICA et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; UEZIMA et al., 2013). Para reduzir custos e o risco de exposição desses pacientes a vários doadores, é prática comum a utilização de bolsas de transferência pediátricas, isto é, o conteúdo de CH proveniente de um único doador é fracionado em 4 bolsas satélites, sendo estas reservadas para transfusão em um único recém-nascido (GIRELLI et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; UEZIMA et al., 2013).

A principal função do eritrócito é o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos, provendo a todas às células a quantidade requerida para o seu metabolismo (MOHANTY; NAGABABU; RIFKIND, 2014). Assim, a transfusão de CH é uma prática consolidada na medicina há mais de 100 anos para tratar ou prevenir condições de anemia aguda (hemorragias) ou crônica (secundária a disfunções da medula óssea); terapêutica para a qual ainda não existem substitutos (FDA, 2017; FRANCHINI et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; MOHANTY; NAGABABU; RIFKIND, 2014). Apesar dessa intervenção ter potencial de salvar vidas, está associada a riscos de efeitos adversos imunes e não-imunes. Por esse motivo, deve-se sempre avaliar o risco-benefício para o receptor e a conduta transfusional deve ser restritiva (CARSON; TRIULZI; NESS, 2017; MARTÍ-CARVAJAL; SIMANCAS-RACINES; PEÑA-GONZÁLEZ, 2015).

As hemácias na circulação sanguínea são expostas continuamente a fontes endógenas e exógenas de espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem danificar seus componentes celulares e prejudicar sua função no organismo (MOHANTY; NAGABABU; RIFKIND, 2014; ORHAN; EVELO; SAHIN, 2005). As EROS endógenas são geradas pelas grandes tensões de oxigênio as quais as

hemácias são expostas devido a sua função inerente e à lenta auto-oxidação da hemoglobina, que produz metahemoglobina, superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A auto-oxidação da hemoglobina aumenta, quando a hemoglobina está parcialmente oxigenada na microcirculação, durante a transferência de oxigênio para os tecidos. Neste momento, as EROS reagem com proteínas e lipídios da membrana celular, produzindo peroxidação lipídica prejudicando sua deformabilidade nos microvasos, liberação de oxigênio, consequente dano tecidual e inflamação (BARDYN; TISSOT; PRUDENT, 2018; MOHANTY; NAGABABU; RIFKIND, 2014; ORHAN; EVELO; SAHIN, 2005). Para minimizar os efeitos das EROS e estresse oxidativo (EO), os eritrócitos possuem um extenso sistema de proteção, envolvendo antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular como vitamina C, vitamina E e glutathione (GSH); e enzimas como superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e peroxiredoxina-2 (PRDx2)(BARDYN; TISSOT; PRUDENT, 2018; MOHANTY; NAGABABU; RIFKIND, 2014). Apesar dessa proteção, o eritrócito é incapaz de reparar seus componentes celulares por ressíntese, sendo completamente dependente da sua defesa antioxidante ao longo de seus 120 dias de vida útil na circulação (ORHAN; EVELO; SAHIN, 2005). Devido a sua composição celular, os efeitos oxidativos das EROS exógenas na membrana das hemácias são maiores que em outros tecidos. Fontes exógenas de EROS incluem uma série de fatores como tabagismo, radiações e exposição a xenobióticos que podem igualmente alterar a função metabólica celular e levar à hemólise (METTA et al., 2015).

Quando as hemácias são armazenadas, elas enfrentam condições muito diferentes da circulação sanguínea. Elas são separadas dos outros componentes sanguíneos, ficam em bolsas plásticas gás-permeáveis, suspensas em solução de armazenamento, em baixa temperatura (2 a 6 °C) e sem agitação até a transfusão levando a célula a uma série de mudanças deletérias metabólicas, estruturais, bioquímicas e moleculares (BARDYN; TISSOT; PRUDENT, 2018; SANFORD et al., 2017). Estas condições não são fisiológicas e então as hemácias passam a acumular várias lesões durante a estocagem, capazes de reduzir sua função e sobrevivência após a transfusão (BARDYN; TISSOT; PRUDENT, 2018). As lesões de estoque se caracterizam por depleção de adenosina trifosfato (ATP), 2,3-

difosfoglicerato (2,3-DPG), GSH e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH / NADPH) com subsequente oxidação de hemoglobina, exaustão dos antioxidantes endógenos, vazamento de lactato, lactato desidrogenase (LDH), hemoglobina e potássio para o meio de suspensão. Micro-vesiculação de membrana bem como alterações morfológicas reversíveis e irreversíveis podem ocorrer (D’ALESSANDRO et al., 2015; HESS, 2010; SANFORD et al., 2017; UGUREL et al., 2017).

O principal contribuinte para a geração de lesões de estoque é o estresse oxidativo que aumenta com o tempo de armazenamento devido ao consumo de antioxidantes endógenos (SANFORD et al., 2017). O acúmulo de lipídios oxidados nos CH podem promover efeitos adversos graves como lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão (TRALI) e outras reações trombóticas e inflamatórias nos receptores (D’ALESSANDRO et al., 2015; HESS, 2010). Como o sangue é um produto biológico, é muito provável que as variações individuais dos doadores como gênero, fatores genéticos, constituição corporal e estilo de vida como dieta, atividade física, sono e tabagismo afetem o potencial das hemácias para oxidação (BARDYN; TISSOT; PRUDENT, 2018). O conjunto de mudanças que ocorrem no eritrócito da doação até a transfusão estão ilustradas na Figura 2. As características do CH dependem das características do doador e dos processos de fabricação deste hemocomponente. Durante o armazenamento, as hemácias acumulam progressivamente lesões de armazenamento que podem prejudicar a recuperação celular quando uma transfusão é realizada, com possíveis efeitos deletérios para o paciente.

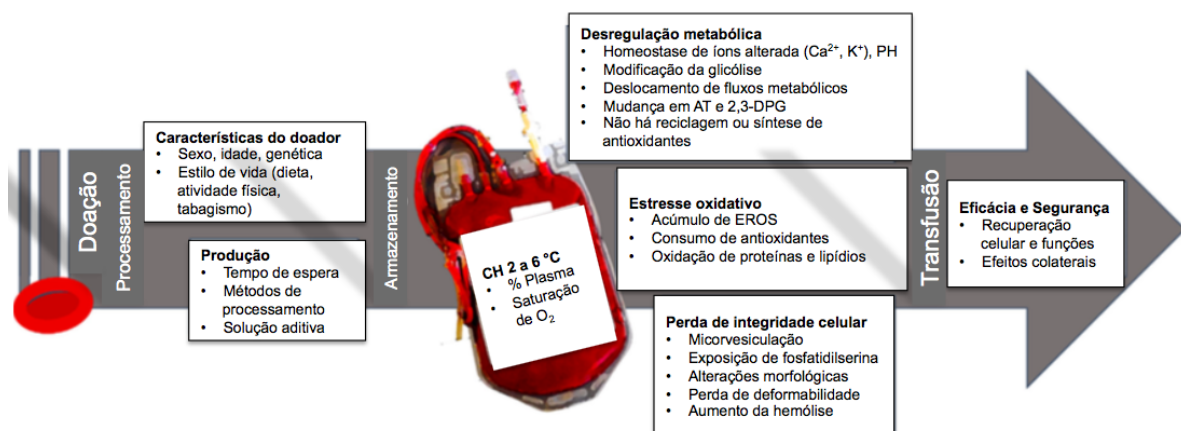


Figura 2- Esquema da trajetória ex vivo de um eritrócito para transfusão. (Adaptado de Bardyn, et al. 2018).

Uma característica individual de estilo de vida apresentada por 5,9% dos doadores de sangue que pode ter influência na diminuição da qualidade e segurança do CH é o tabagismo (BOEHM et al., 2018). O tabagismo é uma das maiores epidemias que o mundo já enfrentou, matando mais de 7 milhões de pessoas por ano, sendo a principal causa de doenças e mortes preveníveis (WHO, 2018). No Brasil, 14,7% da população geral é fumante e Porto Alegre está em segundo lugar dentre as capitais (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014; MALTA et al., 2015).

O principais tipos de morte associadas ao tabagismo são os cânceres, doenças cardiovasculares e metabólicas, doenças pulmonares e reprodutivas. O tabagismo afeta o corpo humano de inúmeras maneiras e os efeitos na saúde são vistos não apenas em fumantes, mas também em indivíduos expostos ao fumo passivo. O impacto do tabagismo na saúde depende da duração do hábito de fumar ao longo dos anos e da exposição à fumaça do cigarro. O mecanismo pelo qual a fumaça do cigarro desencadeia efeitos tóxicos envolve múltiplas etapas como resultado da exposição aos radicais livres presentes no cigarro, levando ao aumento do estresse oxidativo, inflamação e dano ao DNA (NATIONAL CENTER FOR CHRONIC DISEASE PREVENTION AND HEALTH PROMOTION (US) OFFICE ON SMOKING AND HEALTH, 2014). As toxinas químicas são transferidas dos pulmões para a corrente sanguínea, onde são transportadas para quase todas as partes do corpo humano (ONOR et al., 2017).

O tabaco é uma planta da família das solanáceas, sendo que a principal variedade é a *Nicotiana tabacum* L. Mais de 4.700 substâncias já foram identificadas na fumaça produzida pela queima da folha de tabaco na forma de cigarro, charuto, palheiro ou cachimbo (GEISS; KOTZIAS, 2007; TALHOUT et al., 2011). Na fase gasosa são identificados produtos como monóxido de carbono (CO), amônia, cetonas, formaldeído, acetaldeído e acroleína, e na fase particulada, nicotina e alcatrão. Este último carrega metais tóxicos como cádmio (Cd), chumbo (Pb), arsênico (As), cromo VI (Cr), níquel (Ni) e benzopirenos, sabidamente promotores de dano tecidual relacionado com estresse oxidativo e inflamação (ATTANZIO et al., 2019; CARUSO et al., 2013; TALHOUT et al., 2011). Um esquema com os principais componentes tóxicos do cigarro e seus efeitos está ilustrado na Figura 3.

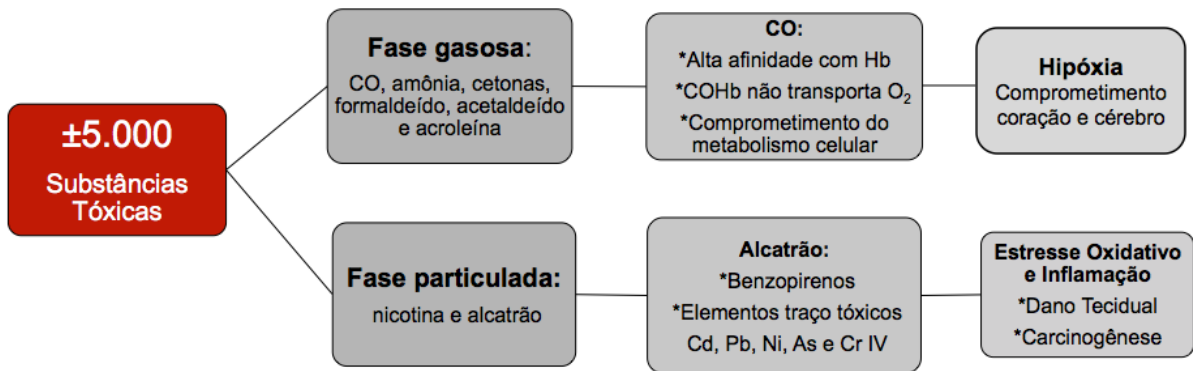


Figura 3- Principais componentes tóxicos do cigarro e seus efeitos no organismo (Adaptado de GEISS; KOTZIAS, 2007; TALHOUT et al., 2011).

Tais constituintes, presentes no sangue do doador, poderiam afetar a qualidade do sangue doado, acumulando-se nos tecidos do receptor e comprometendo sua saúde já precária.

O CO é um gás incolor e inodoro produto da combustão incompleta de combustíveis de múltiplas fontes e está presente no cigarro em grandes quantidades. A sua produção endógena ocorre pelo metabolismo do heme em concentrações que não interferem nas trocas gasosas. O aumento de CO na corrente sanguínea (causado por exposição a fontes exógenas) gera a mais bem estabelecida e importante ação tóxica do CO, a incapacitação do transporte de oxigênio (O_2) pelo sangue, após sua ligação com a hemoglobina, formando a carboxihemoglobina (COHb), resultando em asfixia química e hipóxia tecidual (ÅBERG et al., 2009; SURJU PATEL, 2014). A hemoglobina é o componente do sangue responsável pelo transporte de O_2 aos tecidos e apresenta cerca de duzentas vezes mais afinidade pelo CO do que pelo O_2 . Devido a essa elevada afinidade, o COHb produzido reduz a disponibilidade de O_2 aos tecidos, deslocando a curva de dissociação de O_2 para a direita, afetando o metabolismo celular (ÅBERG et al., 2009; R. C. DARLING, 1944). Não se recomenda transfusão de sangue com altas concentrações de COHb para pacientes susceptíveis, como recém-nascidos e cardiopatas, pelo risco de não produzir a resposta desejada ou promover prejuízo à saúde do indivíduo (EHLERS et al., 2009; EHLERS; MCCLOSKEY; DEVEJIAN, 2003; MCROBB et al., 2011). Em estudo anterior, mostramos que a concentração de COHb em CH provenientes de doadores fumantes era 4 vezes maior quando comparada a CH de não fumantes; e que esses valores são dependentes do tempo

de abstinência ao cigarro. A abstinência por 12 horas, bem como o fato de fumar menos de 20 cigarros por dia reduziu os níveis de COHb em 60% (BOEHM et al., 2018). Apesar da COHb ter potencial de interferir diretamente na principal função das hemácias, não existem diretrizes que instituem níveis seguros de COHb em CH, nem mesmo a análise de COHb é mandatória nos bancos de sangue como teste de triagem (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A nicotina ($C_{10}H_{14}N_2$) é um alcaloide presente nas folhas do tabaco, altamente tóxico que está relacionado com o desenvolvimento de dependência e carcinogênese. A nicotina age através da ligação e ativação dos receptores nicotínicos de acetilcolina levando a diversas respostas, como aumento da pressão sanguínea e estimulação do sistema nervoso central. Esta substância exerce efeitos farmacológicos que podem contribuir para eventos cardiovasculares agudos e aterogênese acelerada em fumantes (BENOWITZ; BURBANK, 2016; HOLBROOK, 2016).

O tabagismo é tóxico, genotóxico e carcinogênico. Entre a ampla gama de substâncias tóxicas do cigarro estão os elementos traço tóxicos. Vários metais encontrados na fumaça do cigarro têm potencial de se acumular nos tecidos do organismo do fumante, entre eles estão o Cd, Pb, Cr VI e Ni (ASHRAF, 2012; CARUSO et al., 2013). Fumar é a mais importante fonte de Cd para a população. Exposição a pequenas quantidades de Cd ao longo dos anos pode causar danos nos rins, pulmões e ossos (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2012; ASHRAF, 2012). O Pb é altamente tóxico, compromete o sistema nervoso central (SNC), hematopoiético, cardiovascular e gastrointestinal (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2007; ALVAREZ-ORTEGA; CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL, 2017; ASHRAF, 2012). Ambos têm potencial carcinogênico reconhecido pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) que classificou o Cd como carcinogênico em humanos (grupo 1) e o Pb como possível carcinogênico em humanos (grupo 2A)(IARC; WHO, 2017).

As crianças são especialmente mais sensíveis a ação tóxica dos metais, especialmente ao Pb que mesmo em baixas concentrações pode causar danos irreversíveis ao seu desenvolvimento fisiológico. Isso se deve a imaturidade do SNC, baixo índice de massa corporal, capacidade de absorção aumentada e reduzidas

taxas de eliminação do organismo em desenvolvimento (ALVAREZ-ORTEGA; CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL, 2017; GRANDJEAN; LANDRIGAN, 2006; YOUSEF et al., 2013). Devido a grande toxicidade de Pb especialmente para crianças, em 2012 o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) Irelatou através de uma nota que não existem níveis seguros para a exposição a Pb (BETTS, 2012). Em estudo realizado em Cartagena, na Colômbia, foi observado que o Pb mesmo em concentrações muito pequenas, isto é $<50 \mu\text{g/L}$, causou alterações hematológicas e cognitivas em crianças (ALVAREZ-ORTEGA; CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL, 2017).

Elementos tóxicos como As, Cd, Pb, Ni e Cr VI, são sabidamente geradores de espécies reativas e estresse oxidativo e esta via está associada com o desenvolvimento de efeitos indesejáveis à saúde dos fumantes (ALBERG, 2002; WANG et al., 2015). Além dessa carga de substâncias promotoras de estresse oxidativo, o sangue do fumante tende a ter menores níveis de antioxidantes e micronutrientes, devido ao consumo destes na tentativa de manter o equilíbrio, hábitos alimentares menos saudáveis e até mesmo pelos fatores envolvidos no metabolismo da nicotina (ALBERG, 2002; NORTHROP-CLEWES; THURNHAM, 2007; SOLAK et al., 2005).

Embora o tabagismo possa carrear esta gama de substâncias tóxicas para o sangue doado, conseqüentemente para os hemocomponentes, e potencialmente possa causar prejuízo aos receptores, a legislação nada dispõe sobre restrição de tabagistas como doadores de sangue. Na triagem clínica obrigatória não constam perguntas investigativas sobre o hábito de fumar, não são realizados testes de triagem toxicológica e poucos são os estudos toxicológicos realizados em hemoterapia (BOEHM et al., 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Devido aos efeitos complexos do tabagismo no que se refere à toxicidade de CO afetar o transporte de O_2 para os tecidos e a grande quantidade de substâncias promotoras de estresse oxidativo relacionadas ao cigarro, nós acreditamos que o CH tende a ser o hemocomponente mais afetado pelo tabagismo. Nossa hipótese é que o tabagismo afete a qualidade do CH a medida que esteja relacionado com o aumento de elementos tóxicos, diminuição de elementos essenciais e gere desequilíbrio oxidativo nas hemácias do concentrado, o que poderia aumentar a

predisposição do CH às lesões de estoque. Nossos achados podem contribuir com a hemoterapia no desenvolvimento de novas diretrizes para aumentar segurança e qualidade de CH para transfusão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tabagismo sobre a qualidade do concentrado de hemácias proveniente de doadores fumantes do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o ponto de vista toxicológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar a concentração de carboxihemoglobina em concentrado de hemácias (CH) proveniente de doadores de sangue fumantes pela técnica de co-oximetria (Artigo 1);
- Identificar e quantificar os elementos essenciais (Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Mo, Se e Zn) e tóxicos (Cd, Pb, Cr, Ni, As, Hg) em CH pela metodologia de ICP-MS (Artigo 1);
- Verificar a correlação entre os elementos tóxicos e a dosagem de carboxihemoglobina (Artigo 1);
- Quantificar o biomarcador de exposição ao tabaco cotinina na urina dos doadores de sangue (Artigo 2);
- Mensurar o marcador de peroxidação lipídica, malondialdeído (Artigo 2);
- Mensurar os marcadores antioxidantes vitamina C, grupos tiólicos não proteicos, GSt e GPx (Artigo 2);
- Verificar correlação entre cotinina, marcadores antioxidantes e marcador de estresse oxidativo (Artigo 2).

3 ARTIGO SUBMETIDO

A seguir está apresentado o primeiro artigo referente a este estudo, que foi submetido ao periódico Transfusion para publicação. Para fins de tese, as tabelas e figuras estão dispostas na ordem que aparecem no texto. Este artigo mostra que o tabagismo está associado com a presença de elementos tóxicos, diminuição de elementos essenciais e elevadas concentrações de carboxihemoglobina em concentrado de hemácias provenientes de doadores fumantes. Estas substâncias presentes no CH representam riscos potenciais para receptores suscetíveis como recém-nascidos e crianças, sendo recomendado que estes hemocomponentes sejam rotulados e destinados para adultos ou pacientes menos comprometidos.

Elevated levels of carboxyhemoglobin, cadmium and lead in packed red blood cells from smoker donors: a risk for pediatric transfusion?

Renata Boehm,^{1,2} Carolina Cohen,² Rianne Pulcinelli,¹ Greice Caletti,¹ Almeri Balsan,² Sabrina Nascimento,³ Rafael Rocha,⁴ Enrique Calderon,⁴ Tatiana Saint’Pierre,⁴ Solange Garcia,³ Leo Sekine,² Tor Onsten,² Adriana Gioda⁴ and Rosane Gomez¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

² Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA); Porto Alegre, Brazil

³ Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

⁴ Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC- Rio), Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding author:

Rosane Gomez

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Rua Sarmiento Leite, 500, room 305

90050170 - Porto Alegre, Brazil

E-mail: rosane.gomez@ufrgs.br

Address reprint requests to: Rosane Gomez, e-mail: rosane.gomez@ufrgs.br or Renata E.

Boehm e-mail: rboehm@hcpa.edu.br

Sources of support: This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and Research Incentive Fund (FIPE) of HCPA.

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

Short running head: COHb, Cd and Pb in PRBCs from smokers

ABSTRACT

BACKGROUND: Smokers currently have no defined restrictions for blood donation. However, cigarette smoke contains toxic substances such as carbon monoxide (CO) and trace elements that can affect the packed red blood cell quality and safety of transfusion. This study evaluated the effects of smoking on the concentration of essential and trace elements and on carboxyhemoglobin (COHb) levels in packed red blood cells (PRBCs) from smoker donors.

STUDY DESIGN AND METHODS: A matched case-control study was conducted to compare COHb levels, determined by the CO-oximetry method, and levels of trace (Cd, Pb, Cr, Ni, As, and Hg) and essential (Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, and Zn) elements evaluated by inductively coupled plasma mass spectrometry, in PRBCs from smoker (n = 36) and non-smoker (n = 36) donors at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

RESULTS: Mean COHb level was 14 times higher in the PRBCs obtained from smoker donors (5.9 [4.0-9.1] vs 0.4 [0.2-0.8]%). Cadmium (1.0 [1.0 -1.8] µg/L vs undetectable) and lead (27 [21-36] vs 19 [14- 26] µg/L) levels were also significantly higher in the PRBCs from smokers. Moreover, except for molybdenum, levels of all essential elements were lower in smoker PRBCs.

CONCLUSION: Red blood cells donated by smokers contain toxic elements that are probably not safe for transfusion in children. Our results might support changes in the current guidelines of blood banks to improve the transfusion safety through inclusion of inquiry about smoking in the clinical screening for blood donation, labelling and reserve of PRBCs from smoker donors for adults or lower risk recipients.

Key words: blood bank, cigarette, hemotherapy, metals, tobacco

INTRODUCTION

Blood transfusion is one of the most common therapies worldwide used in various acute and chronic conditions for saving lives. Despite efforts to improve safety, transfusion is associated with risks of adverse events, morbidity and mortality for recipients.¹⁻³ Among the blood components more frequently used for transfusion are red blood cells, reaching up to 60% of global transfusions.⁴ In packed red blood cells (PRBCs), hematocrit ranges from 65 to 80%, and after transfusion, oxygen delivery to tissues is improved in anemic recipients.^{5,6} Premature infants up to 4 months of age are the patients who receive the highest rate of PRBCs transfusion among patients of all classes and are commonly multi-transfused.^{5,7,8} The need for transfusion at this age is due to anemia resulting from inadequate erythropoiesis, cardiorespiratory problems and hemorrhagic disorders, among other factors.^{5,9} Due to the immaturity of their various organs and systems, newborns are more predisposed to the side effects of transfusion.⁹ Currently, to reduce the exposure of these patients to various donors, PRBCs from one donor are divided into four pediatric packs.^{5,10} In that way, the same child can receive all PRBCs from a single donor in different transfusions. Although neonates are protected from blood incompatibility or risk of transmissible diseases, they could receive potentially toxic elements when they are present in the original PRBCs.

Smoking is one of the leading causes of preventable death worldwide, accounting for about 7 million deaths per year.³ The prevalence of smokers is 14.7% in the general population in Brazil, and 13.6% in Porto Alegre, a capital city in the south of Brazil.^{5,11} In 2015, we found that from 915 total blood donations at the blood bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), 5.9% were from smoker donors.¹² Although blood donation being prohibited for chronic alcoholics, or those who have consumed alcohol up to 12 hours prior or used crack or cocaine in the last 12 months, smokers can donate blood without restrictions. In a previous study, our group showed that refraining from smoking for at least 12 h before

donation significantly reduces carboxyhemoglobin (COHb) levels in PRBCs from smoker donors.¹² Elevated COHb levels in these PRBCs are caused by the higher affinity of hemoglobin for carbon monoxide (CO), a cigarette smoke constituent, than oxygen (O₂).¹³ COHb is unable to transport O₂, increasing the risk of hypoxia mainly in organs with an elevated metabolic rate, such as the heart and brain.^{14,15} Thus, PRBCs with elevated COHb levels could be ineffective or dangerous if transfused to a debilitated elderly recipient or a neonate.^{14,15}

In addition to CO, the cigarette smoke gas phase contains ammonia, ketones, formaldehyde, acetaldehyde, and acrolein, all of them considered toxic substances.^{13,16} On the other hand, the cigarette smoke particulate phase contains nicotine, a psychoactive substance related to tobacco addiction, and other resinous (tar) constituents.¹⁶ Tar is produced by the burning of tobacco and carries benzopyrene and trace elements such as cadmium, lead, nickel, arsenic, and chromium.¹³ These substances promote tissue damage related to oxidative stress and inflammation.¹⁶ Cadmium, for example, is classified by the International Agency for Research on Cancer as a carcinogenic element (group 1) and lead as a possibly carcinogenic element (group 2B) in humans.¹⁷ Cadmium and lead are toxic to tissues such as kidneys, lungs, bones, heart, vessels, brain, and reproductive system, even at low concentrations.^{18–20} In children, lead is associated with impairments to physical growth, learning, memory, leading to cognitive, behavioral and psychological disorders even at blood concentrations below 100 µg/L, it can cause irreversible neurological impairment.^{21–24} Thus, in 2012, the US Centers for Disease Control (CDC) established that there are no safe levels of lead for children.²⁵ Although studies indicate that trace elements, including cadmium and lead, are elevated in the blood of smokers^{20,26}, few have investigated the consequences of cigarette smoking, the predominant form of tobacco used in Brazil, on the blood donated by smokers for transfusion. Thus, in this study, we measured the concentrations of trace and essential

elements and COHb levels in the PRBCs from smoker donors.

STUDY DESIGN AND METHODS

This observational, paired case-control study was conducted from March to June 2017 at the HCPA blood bank in Porto Alegre/Rio Grande do Sul, Brazil. The study included donors of both sexes, over the age of 18 years, who confirmed a smoking habit during the compulsory clinical screening. Although asking about cigarette smoking is not included in the Brazilian clinical screening protocol for blood donation⁴, we added this question as a routine in our service on the basis of a previous study by our group.¹²

The sample size was calculated on the basis of changes in the COHb concentration from smokers (cases) and non-smokers (controls).¹² With a significance level of 5% and statistical power of 90%, considering the standard deviation of COHb concentration between cases of 3.3% and controls of 1.1% with a minimum assumed difference of 2%, the calculated number of PRBC to be tested was 34 from smoker and 34 from non-smoker donors (WinPepi, v. 11.43).

Those blood donors who reported smoking an average of 20 or more cigarettes per day were included as the exposed group in the study after signing an informed consent form explaining the aims and benefits of this research. Non-smoker donors (n = 36), who reported have never made use of cigarettes, matched for age and gender to those in smoker donor (n = 36) group, were invited to compose the control group, following the same research protocol. After consenting to participate, an additional interview was carried out to determine socioeconomic characteristics, health status, and lifestyle. Additional questions about smoking habits such as the number of cigarettes smoked per day and time of abstinence prior to donation of blood were applied to smoker donors. The average smoking load (packs/year) in the group of cigarette smoker donors was calculated as the number of cigarettes smoked

per day, divided by 20 (number per pack), and multiplied by years smoking. Samples of the red blood cells from the smoker and non-smoker groups were collected from the packs under sterile conditions and did not compromise the final destination of the original blood component. Samples from donors who reported exposure to an environment polluted by cigarette smoke (secondhand smoke), or to smoke from burning of firewood/coal or from automobiles or machinery, or to any other possible source of trace elements were excluded.

This study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and registered in the Brazil Platform under No. CAAE 55786016.0.0000.5347.

Sample collection and COHb analysis

Samples were obtained from the original PRBCs, immediately after the whole blood was centrifuged (24 °C and 2,535 rpm for 5 min – KR4i, Thermo Scientific, USA) for separation of the components (Giotto, Delcon, Italy). A 50-mL sample volume from the red blood cells was carefully removed from the original CPDA-1 bag (JP Farma, Ribeirão Preto, Brazil) through a sterile connection (TCD - Haemonetics, Braintree, MA, USA) and transferred to a pediatric transfusion bag with the same characteristics as the original one. The sample (10 mL) was taken from the pediatric transfusion unit by a single puncture and aliquoted into cryogenic vials, which were then refrigerated at 2 to 6 °C for COHb or kept frozen at -80 °C for metals until later analysis. COHb was determined in 4 mL of the sample by the CO-oximetry method (ABL 800-Radiometer, Copenhagen, Denmark), according to Beutler and West (1984)²⁷, in the HCPA Laboratory Diagnosis Service.

Trace element analysis

Potentially toxic elements related to cigarette smoking^{28,29}, including cadmium (Cd), lead (Pb), nickel (Ni), mercury (Hg), chromium (Cr), and arsenic (As), and essential elements, including calcium (Ca), magnesium (Mg), copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn), molybdenum (Mo), selenium (Se), and zinc (Zn) were determined in 500 μ L of red blood cells mixed with 1 mL of 65% bi-distilled nitric acid in a polypropylene tube. This mixture was heated at 95 °C for 4 h, cooled at room temperature, and diluted to 10 mL with ultrapure water.³⁰ The concentrations of the elements were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) using a NexION 300X spectrometer (Perkin-Elmer-Sciex, Waltham, MA, USA). An acidified aqueous solution (1% HNO₃) containing rhodium (Rh) (40 μ g/L) was added to the samples and used as an internal standard. Two analytical curves were used to quantify the metals, one ranging from 5 to 80 μ g/L and another from 50 to 1000 μ g/L. Calibration solutions were prepared using the Multi-Element Calibration Standard 3 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), Multi-Element Calibration Standard 2 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) and 10 mg/L solutions. Calcium (Merck, Darmstadt, Germany) and Hg solutions were used in the experiments (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated on the basis of the standard deviation of the calibration blank (n = 10): three times the standard deviation for LOD (or ten times for LOQ) by the slope of the analytical curve. Accuracy of the analytical method was monitored with reference standards (CliniCal- Recipe, Munich, Germany), which were analyzed at intervals between groups, and the correlation coefficient of the analytical curve ($r \geq 0.999$) was evaluated. For differences greater than 10%, a new calibration was performed.

Statistical analysis

Normality of variables was tested by the Shapiro-Wilk test. Normally distributed data were analyzed by the Student t-test for independent samples. Asymmetrically distributed data were analyzed by the non-parametric Mann-Whitney test. The χ^2 test was used to compare the groups regarding categorical variables. The Pearson or Spearman correlation test was considered to determine the degree of association between the different parameters evaluated according to distribution. Results were described as mean \pm standard error of the mean or as the median and interquartile interval according to the test used. The significance level used was 0.05 and the statistical software used was SPSS, v.18.0 (IBM Company, USA).

RESULTS

Thirty-six samples taken from the PRBCs of smoking donors were matched with non-smoking donors with similar characteristics (Table 1). Smoking donors were mainly male (66.7%), aged 41 ± 14 years, with a smoking history of 34.1 ± 27.5 packs/year and have a regular history of blood donation (more than 3 times) (53%). Most of them had a high school education (53%) and were employed (64%), single (55%), sedentary (75%) and overweight (58%), and lived in Porto Alegre (78%). Because samples were matched considering only age and gender, differences were found in some other parameters, namely education and marital status, as well as regular physical activity and body mass index (BMI). Thus, donors with higher education (high school or higher education: 94.4%) and married (72%) were more frequent in the non-smoker group. Moreover, in the non-smoker donor group, we found a higher frequency of regular physical activity (58%) than in the smoker donor group (25%), but overweight and obesity were more prevalent in the non-smoker (83%) than smoker (58%) group.

Table 1. Demographic characteristics of smoker and non-smoker donors at the blood bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil.

| | Non-smokers (n = 36) | Smokers (n = 36) | <i>P</i> |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------|--------------|
| Men - % | 66.7 (24) | 66.7 (24) | 1.000 |
| Age - years | 41.3 ± 13.8 | 41.3 ± 13.8 | 0.993 |
| Smoking History - packs/year | - | 34.1 ± 27.5 | - |
| Blood Donation Frequency - % | | | |
| First Time | 13.9 (5) | 30.5 (11) | 0.216 |
| Up to Three Times | 16.7 (6) | 16.7 (6) | |
| > Three Times | 69.4 (25) | 52.8 (19) | |
| Education Level ^b - % | | | |
| Elementary School | 5.6 (2) | 33.3 (12) | 0.001 |
| High School | 47.2 (17) | 52.8 (19) | |
| College | 47.2 (17) | 13.9 (5) | |
| Work Activity - % | 75.0 (27) | 63.9 (23) | 0.443 |
| Marital Status - % | | | |
| Single ^a | 27.8 (10) | 55.6 (20) | 0.031 |
| Married | 72.2 (26) | 44.4 (16) | |
| Regular Physical Activity - % | 58.3 (21) | 25.0 (9) | 0.009 |
| Body mass index - % | | | |
| Normal | 16.7 (6) | 41.7 (15) | 0.038 |
| Overweight/Obese | 83.3 (30) | 58.3 (21) | |
| Place of Origin - % | | | |
| Porto Alegre | 86.1 (31) | 77.8 (28) | 0.540 |
| Other Cities | 13.9 (5) | 22.2 (8) | |

^a Includes single, widowed and divorced. ^b Considering complete and incomplete education. Data were presented as mean ± SD for continuous variables and absolute value and percentage for categorical variables. Bold represents significant difference.

Regarding smoking habits, stratified statistical analysis showed no difference in the smoking load regarding gender (male: 20 [8.5, 43.87]; female: 37 [17.37, 47.0] packs/year, respectively; $P=0.190$) and 16 smoker donors (44%) had a smoking load value higher than 30 packs/year.

Mean COHb level in the PRBCs from smoker donors was 14 times higher than that for non-smoker donors. COHb levels ranged from 0 to 1.4% in the PRBCs from non-smoker donors and from 1.6 to 14.8% in smoker donors, with median of 0.4 [0.2-0.8] and 5.9 [4.0-9.1]%, respectively. The highest COHb level was 14.8%, and 9 samples from smoker donors showed more than 9% COHb. Additional statistical analysis showed a negative correlation between abstinence time prior to blood donation and COHb concentration ($r = -0.625$; $P < 0.001$). There was a 75% decrease in COHb after 12 h of abstinence, but less than 40% with 3 to 12 h abstinence, suggesting that refraining from smoking for 12 h or longer before donating blood would be warranted when considering blood COHb level (Fig. 1; $P < 0.001$).

Fig. 1

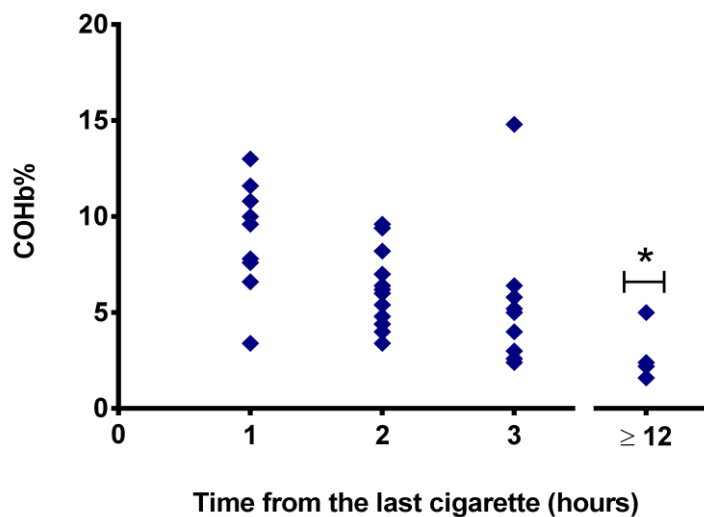


Fig. 1. Carboxyhemoglobin levels (%) in the packed red blood cells from smoker donors according to cigarette abstinence interval (time since the last cigarette before donation). Kruskal-Wallis test ($n = 36$). * Different from other times; $P = 0.003$.

Additionally, we found a positive correlation between COHb levels and smoking load ($r = 0.36$, $P = 0.03$).

Determination of potentially toxic and essential elements

Table 2 shows the levels of potentially toxic elements produced by the burning of cigarettes and transferred to the blood after smoke inhalation by blood donors. Cadmium and Pb levels were significantly higher in the PRBCs from smoker compared with non-smoker donors (Table 2).

Table 2. Potentially toxic elements in packed red blood cells from smoker and non-smoker donors at the blood bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

| Element ($\mu\text{g/L}$) | Non-smokers (n = 36) | Smokers (n = 36) | P |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------|------------------|
| Cd | N.D. | 1.0 [1.0 -1.8] | <0.001 |
| Pb | 19 [14- 26] | 27 [21-36] | <0.001 |
| Cr | 35 [10 - 60] | 40 [23- 88] | 0.176 |
| Ni | < 2 [2 - 3] | 3.1 [2 - 12] | 0.542 |
| As | N.D. | N.D. | 1.000 |
| Hg | N.D. | N.D. | 1.000 |

Cd: cadmium; Pb: lead; Cr: chromium; Ni: nickel; As: arsenic; Hg: mercury. Results are represented as median and 25-75% interquartile range (Mann-Whitney test). Significant differences are in bold. N.D.: Not detectable.

Indeed, Cd was not detectable in the PRBCs from non-smokers donors. On the other hand, Pb levels were lower than 50 $\mu\text{g/L}$ in PRBCs from all non-smokers donors, but were higher than 50 $\mu\text{g/L}$ in five smoker donors. In 2012, the Centers for Disease Control (CDC), in the United States, established a serum Pb level of 50 $\mu\text{g/L}$ as the reference value for

exposure in children.³¹ Both As and Hg were undetectable in all samples. Chromium and Ni levels were similar in PRBC samples from smokers and non-smokers ($P>0.05$). No correlation was found between levels of COHb and potentially toxic trace elements such as Cd ($P= 0.813$) and Pb ($P= 0.354$), not being therefore a good predictor for these elements.

Except for Mo, all macro- and micro-nutrient levels were significantly lower in the PRBCs from smoker compared to non-smoker donors. Indeed, Mo levels were 3 times higher in the PRBCs from smokers. Statistical analysis showed a more prominent decrease in Ca, Fe, and Se levels in PRBCs from smokers (Table 3).

Table 3. Essential macro- and micro-nutrients in packed red blood cells from smoker and non-smoker donors at the blood bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

| | Non-smokers n = 36 | Smokers n = 36 | <i>P</i> |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| Macronutrients | | | |
| Ca ($\mu\text{g/L}$) | 33.4 \pm 3.3 | 27.7 \pm 2.9 | <0.001 |
| Mg ($\mu\text{g/L}$) | 40.4 \pm 3.1 | 37.9 \pm 4.8 | 0.013 |
| Micronutrients | | | |
| Cu ($\mu\text{g/dL}$) | 53.0 [50.0 - 57.8] | 40.0 [22.5 - 87.5] | 0.033 |
| Fe ($\mu\text{g/L}$) | 812.9 \pm 61.5 | 746.6 \pm 60.5 | <0.001 |
| Mn ($\mu\text{g/L}$) | 12.0 [10.0 - 15.0] | 11.0 [9.0 - 13.0] | 0.048 |
| Mo ($\mu\text{g/L}$) | 11.2 \pm 5.3 | 27.2 \pm 6.1 | <0.001 |
| Se ($\mu\text{g/L}$) | 160.0 [140.0 - 200.0] | 145.0 [120.0 - 150.0] | 0.001 |
| Zn ($\mu\text{g/dL}$) | 768.1 \pm 111.5 | 692.3 \pm 92.2 | 0.006 |

Results were represented as mean \pm standard deviation for elements with normal distribution (t-test) or median and 25-75% interquartile range (Mann-Whitney test). Bold represents significant difference. ND: Not detectable. Ca: calcium; Mg: magnesium; Cu: copper, Fe: iron; Mn: manganese; Mo: molybdenum; Se: selenium; Zn: zinc.

DISCUSSION

More than 110 million blood donations are collected worldwide every year. According to the World Health Organization (WHO), safe and adequate blood should be an integral part of every country's national health care policy.³ Similar to other therapies, transfusion is associated with risks of adverse events, morbidity and mortality for the recipients.¹⁻³ In this study, we investigated the presence of toxic and essential elements in the PRBCs from smokers and non-smokers, aiming to improve the safety of transfusion. Our results showed that toxic elements such as Cd and Pb were higher in the PRBCs from smoker donors as compared to non-smoker donors. On the other hand, all essential macro- and micro-nutrients were reduced in the PRBCs from smokers, except for Mo, which was increased in samples from smoker donors.

At the HCPA blood bank, as in other reports, smoker blood donors were mainly adult males, aged 30-40 years.^{12,32} Marital status and schooling were also in agreement with previous publications, indicating a higher frequency of smoker donors who were unmarried individuals with a lower educational level.³³ Although non-smoker donors reported infrequent physical activity, BMI was significantly lower in the smoker group.

In the present study, the mean of COHb concentration was 14 times higher in the PRBCs from smokers compared to non-smokers. These data corroborate previous findings from our group and from other studies, indicating that COHb levels are higher in PRBCs from smoker donors.^{12,14,34,35} It is worrisome that there are currently no guidelines reporting a safe limit for COHb levels in transfusion.^{2,5,10} Moreover, there are no mandatory inquiries about smoking habits in the clinical screening protocols at blood banks in Brazil, nor is there any strategic selection of PRBCs for transfusion in more debilitated patients or newborns and children.³⁶ Ehlers and colleagues (2003) reported a higher risk of complications in a 14-month-old patient, transfused with PRBCs from a smoker donor with an elevated COHb

content.³⁵ Supported by their results, they established that only those PRBCs with COHb levels of <1.5% are acceptable for transfusion in pediatric cardiac surgery and PRBCs from all donors are tested before transfusion.³⁴

According to this limit, all PRBCs from our non-smoker donors would be eligible for transfusion in pediatric cardiac surgery, but no PRBCs from the smoker donors would be eligible (limits: 1.6 to 14.8%), even after 12 h abstinence from smoking (limits: 1.6 to 5.0%). It is therefore essential to review regulatory guidelines to recommend the measurement of COHb levels in the PRBCs from smoker donors and to restrict these bags to use in adults and less critical patients. Still, prohibiting donations from smokers would not be necessary, especially after 12 h abstinence from smoking, since the transfused PRBC volume (~250 mL) may not represent a major risk for an adult patient, since substances in the PRBCs would be diluted in the total blood circulation, resulting in decreased concentrations.

Parallel to determination of COHb levels, other toxicological tests should be conducted to make PRBCs from smoker donors eligible for use in certain high-risk populations, mainly newborns or infants. Indeed, numerous toxic substances present in cigarettes are transferred to the blood and subsequently to PRBCs and to the eventual recipient.^{19,20,26,37} Here, we screened for potentially toxic elements in the PRBCs from smoker and non-smoker donors. We found that Cd and Pb concentrations were significantly higher in the PRBCs from smokers compared with non-smokers.

Cadmium was not detected in the PRBCs from non-smoker donors, but reached values between 1 to 2 $\mu\text{g/L}$ in the PRBCs from smoker donors. An population-based study reported that the Cd concentration in the whole blood from adults in New York City was 0.77 $\mu\text{g/L}$, while heavy smokers had a higher level of 1.58 $\mu\text{g/L}$.³⁸ Undetectable Cd levels in the PRBCs from non-smoker donors in Porto Alegre could be explained by the lower traffic density compared to New York. On the other hand, the higher Cd levels in the PRBCs from our

smoker donors could be related to the local marketing of cigarettes. Indeed, more than 54% of cigarette sales in Brazil in 2018 were illegal, representing more than 57 million units sold per year.^{39,40} Most of them are not produced by regulated tobacco companies and may contain toxic components in addition to those in tobacco leaves. Cadmium is considered carcinogenic to humans (group 1) by promoting disruption of DNA repair and tumor suppressor proteins, affecting DNA methylation patterns and interacting with signal transduction processes, which can contribute to genomic instability.^{17,41} It enters the blood by absorption from different environmental sources and is stored in tissues, remaining there for as long as 10-35 years.^{41,42} Cadmium can cause irreversible renal tubular dysfunction, kidney stones, softening of the bones and osteoporosis, and acute pulmonary edema.^{41,42} Long-term, high-level occupational Cd exposure is associated with chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer.^{18,42} Because children show immature detoxification mechanisms, making them more susceptible than adults to the effects of toxic substances, it would be recommended to avoid unneeded exposure to Cd, such as from transfusion with blood from smoker donors.

Lead, on the other hand, is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a possibly carcinogenic element (group 2B) for humans.¹⁷ It acts mainly on heme synthesis and thiol-containing enzymes, counteracting antioxidant mechanisms and increasing oxidative stress and apoptosis in different tissues.⁴³ At the low end of the blood Pb concentration range, adverse effects include delayed sexual maturation, increased blood pressure, impaired renal glomerular filtration rate, and delayed or impaired development of the central nervous system.^{21-24,43} In adults, Pb is absorbed from different sources and almost 100% is excreted from the body within a couple of weeks.⁴³ However, only about 30% of Pb leaves a child's body within the same time period, accumulating in the bones and remaining there for decades.^{25,43} Studies have reported neurobehavioral deficits in children associated with Pb exposure, with decreased cognitive scores even at concentrations below 100

$\mu\text{g/L}$.^{22,23,44} Lead can be particularly neurotoxic to neonates because of their physiological differences related to age and critical period of rapid brain development.^{22,25} For these reasons, in 2012, the CDC declared that there are no safe levels of Pb for children.^{25,31} They also established reference values of 50 $\mu\text{g/L}$ based on blood lead levels in the 97.5th percentile of the population of healthy children ages 1-5.³¹ Confirmed capillary or venous Pb levels equal to or greater than 50 $\mu\text{g/L}$ in children should be followed by a series of measures to avoid additional lead exposure³¹. We found that PRBCs from all non-smokers were below these limits (ranging from 4 to 43 $\mu\text{g/L}$), but 5 of the 36 PRBC samples from smokers were higher than 50 $\mu\text{g/L}$ (ranging from 10 to 72 $\mu\text{g/L}$). Consequently, the PRBCs from smokers could expose children to an unneeded and preventable Pb source, increasing the risk of side effects associated with transfusion. Preterm infants are at an elevated risk for anemia and may receive multiple PRBC transfusions from a single donor.^{5,10} Once more, we would recommend against rejecting these PRBCs. Instead, we would reinforce the need to adequately label these blood components and limit them to adult recipients. Specifically, in adult recipients, a single PRBC transfusion would not characterize a large volume to the body, and Pb would be eliminated in a few weeks. Even in more critical adult patients, with traumatic blood loss, when a large volume of blood is needed to improve oxygen delivery to tissues, it would be unlikely that all PRBCs would be from smoker donors, decreasing the risk associated with Pb toxicity.

Other potentially toxic elements such as Hg, Ni, and Cr were undetectable in PRBC or did not show statistical differences in levels between smoker and non-smoker donors. Regarding Cr, our technique did not allow us to distinguish Cr^{3+} from Cr^{6+} . Indeed, Cr^{3+} is a trace element essential for human health, while Cr^{6+} is classified as a carcinogenic element (group 1).¹⁷ Moreover, our results were similar as others that found the average Cr concentrations ranging between 0.5 and 2.5 $\mu\text{g/L}$ in blood and between 0.8 and 5.1 $\mu\text{g/L}$ in

serum.⁴⁵ Nickel compounds are also classified as carcinogenic to humans (group 1) and can cause lung and nasal and paranasal sinus cancers.¹⁷ In healthy Italian subjects, blood and serum Ni levels were found to be 2.3 µg/L (range, 0.6–3.8 µg/L) and 1.2 µg/L (range, 0.24–3.7 µg/L), respectively.⁴⁶ Present results show lower Ni levels than that of the Italian study, possibly related to different environmental exposure, beyond cigarette smoking. Despite the reduced levels of these compounds in all PRBC samples, a blood transfusion could be a source of metals in a child's body and could possibly represent a health risk that should be considered.

Complementary results showed that essential macro- and micro-nutrients were significantly reduced in the PRBCs from smokers, except for Mo, which was higher in those samples. Because the main purpose of transfusion is to improve oxygen delivery to tissues in anemic patients, thus decreased levels of macro- and micro-nutrients may not represent a risk for the recipient's health. Studies reporting changes in blood mineral status and cigarette smoking are scarce. Indeed, Kayan and colleagues (2010) also showed that Zn, Cu, Se, and Mg levels were lower in the serum of smokers compared to non-smokers.⁴⁷ Another study did not show differences in plasma Fe levels between smokers and non-smokers, but it showed a strong association between folate deficiency and dietary patterns.⁴⁸ Molybdenum, on the other hand, is an essential element with relatively low toxicity. The diet is the most important source of Mo, and blood concentration reaches 0.6 to 13.1 µg/L, but it can be as high as 150 µg/dL in Mo rich areas.^{49,50} Further studies should be performed to clarify whether a general decrease in nutrients and high concentrations of Mo linked to cigarette smoking may reduce the effectiveness of red blood cells.

Due to ethical obstacles, our study has some limitations. We did not track the PRBCs from smoker donors and measure the COHb and toxic substance levels in the recipients, and we did not investigate the side effects related to these PRBCs. However, the results of this

study might support changes in the current protocol of the blood bank of HCPA and others to improve the safety of transfusion.

In a previous study¹², we concluded that inquiry about smoking habit should be included in the clinical screening protocol for blood donation. We also concluded that smoker blood donors should abstain for at least 12 h to improve the transfusion efficacy and safety for children or other susceptible recipients. The current results confirmed those recommendations and added the information that blood from smokers showed elevated levels of Cd and Pb compared to non-smokers. Children, mainly during the first years of life, are a vulnerable population in whom exposure to toxic substances needs to be avoided, and they are commonly poly-transfused. Because the previous determination of COHb or toxic elements in the donated blood increases costs related to transfusion, we suggest labeling the PRBCs from smoker donors to reserve them for adult or less critical recipients.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

The authors are indebted to the entire staff of Hospital de Clínicas Blood Bank and the Scientific Initiation fellows Bruna Fukami, Kelly Brolo and Daniela Baglioni for their important collaboration in the accomplishment of this study.

REFERENCES

1. Carson JL, Triulzi DJ, Ness PM. Indications for and Adverse Effects of Red-Cell Transfusion. Longo DL, editor. *New England Journal of Medicine*. 2017 Sep 28;377(13):1261–72.
2. National Institute for Health and Care Excellence. Blood transfusion | Guidance and guidelines | NICE [Internet]. 2015 [cited 2017 Dec 4]. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng24>

3. WHO. Blood safety and availability [Internet]. 2017 [cited 2018 Nov 25]. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blood-safety-and-availability>
4. Ministério da Saúde. Caderno de Informação: Sangue e Hemoderivados [Internet]. Brasília, DF; 2014 [cited 2017 Dec 9]. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_informacao_sangue_hemoderivados_7ed.pdf
5. Ministério da Saúde. Guia para uso de Hemocomponentes [Internet]. 2nd ed. Brasília, DF: Ministério da saúde; 2015 [cited 2017 Dec 9]. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_uso_hemocomponentes_2ed.pdf
6. Franchini M, Marano G, Mengoli C, Pupella S, Vaglio S, Muñoz M, et al. Red blood cell transfusion policy: a critical literature review. *Blood Transfus.* 2017 Jul;15(4):307–17.
7. Mimica AFMA, dos Santos AMN, da Cunha DHF, Guinsburg R, Bordin JO, Chiba A, et al. A very strict guideline reduces the number of erythrocyte transfusions in preterm infants. *Vox Sanguinis.* 2008 Aug;95(2):106–11.
8. Uezima CL, Barreto AM, Guinsburg R, Chiba AK, Bordin JO, Barros MMO, et al. Redução da exposição a doadores de sangue em prematuros submetidos a transfusões de hemácias com uso de bolsas de transferência pediátricas. *Rev Paul Pediatr.* 2013;31(3):285–92.
9. Girelli G, Antoncicchi S, Casadei AM, Del Vecchio A, Isernia P, Motta M, et al. Recommendations for transfusion therapy in neonatology. *Blood Transfusion.* 2015;13(3):484.
10. American Association of Blood Banks. Technical Manual of the American Association of Blood Banks. Arlington, Va: Amer Assn of Blood Banks; 2011.
11. Malta DC, Stopa SR, Iser BPM, Bernal RTI, Claro RM, Nardi ACF, et al. Risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey in capitals of Brazil, Vigitel 2014. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* 2015;18:238–255.
12. Boehm RE, Arbo BD, Leal D, Hansen AW, Pulcinelli RR, Thiesen FV, et al. Smoking fewer than 20 cigarettes per day and remaining abstinent for more than 12 hours reduces carboxyhemoglobin levels in packed red blood cells for transfusion. *PLoS ONE.* 2018;13(9):e0204102.
13. Geiss O, Kotzias D. Tobacco, cigarettes and cigarette smoke. Luxembourg: Institute for Health and Consumer Protection, Directorate-General Joint Research Centre. 2007;4–11.
14. McRobb C, Walczak R, Lawson S, Lodge A, Lockhart E, Bandarenko N, et al. Carboxyhemoglobinemia in a pediatric cardiopulmonary bypass patient derived from a contaminated unit of allogenic blood. *Perfusion.* 2011 Jul;26(4):302–7.
15. Surju Patel KB. Neurologic complications of carbon monoxide intoxication. *Handbook of Clinical Neurology.* 2014 Jan 1;120:971–9.

16. Talhout R, Schulz T, Florek E, van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous Compounds in Tobacco Smoke. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Feb;8(2):613–28.
17. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 4]. Available from: <https://monographs.iarc.fr/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans-19/>
18. ATSDR. Toxicological Profile: Cadmium [Internet]. 2012 [cited 2018 Dec 2]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>
19. Lee W, Lee S, Roh J, Won J-U, Yoon J-H. The Association between Involuntary Smoking Exposure with Urine Cotinine Level and Blood Cadmium Level in General Non-Smoking Populations. *Journal of Korean Medical Science*. 2017;32(4):568.
20. Richter P, Faroon O, Pappas RS. Cadmium and Cadmium/Zinc Ratios and Tobacco-Related Morbidities. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017 Sep 29;14(10):1154.
21. Yousef S, Eapen V, Zoubeidi T, Kosanovic M, Mabrouk AA, Adem A. Learning disorder and blood concentration of heavy metals in the United Arab Emirates. *Asian Journal of Psychiatry*. 2013 Oct;6(5):394–400.
22. Alvarez-Ortega N, Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J. Low blood lead levels impair intellectual and hematological function in children from Cartagena, Caribbean coast of Colombia. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2017 Dec;44:233–40.
23. Lanphear BP, Hornung R, Khoury J, Yolton K, Baghurst P, Bellinger DC, et al. Low-Level Environmental Lead Exposure and Children’s Intellectual Function: An International Pooled Analysis. *Environmental Health Perspectives*. 2005 Mar 18;113(7):894–9.
24. Nascimento S, Charão M, Moro A, Roehrs M, Paniz C, Baierle M, et al. Evaluation of Toxic Metals and Essential Elements in Children with Learning Disabilities from a Rural Area of Southern Brazil. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014 Oct 17;11(10):10806–23.
25. Betts KS. CDC Updates Guidelines for Children’s Lead Exposure. *Environ Health Perspect*. 2012 Jul;120(7):a268.
26. Caruso R, O’Connor R, Stephens W, Cummings K, Fong G. Toxic Metal Concentrations in Cigarettes Obtained from U.S. Smokers in 2009: Results from the International Tobacco Control (ITC) United States Survey Cohort. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013 Dec 20;11(1):202–17.
27. Beutler E, West C. Simplified determination of carboxyhemoglobin. *Clinical Chemistry*. 1984 Jun 1;30(6):871–4.
28. FDA C for TP. Rules, Regulations & Guidance - Harmful and Potentially Harmful Constituents in Tobacco Products and Tobacco Smoke: Established List [Internet]. 2012 [cited 2019 Jan 13]. Available from: <https://www.fda.gov/TobaccoProducts/Labeling/RulesRegulationsGuidance/ucm297786.htm>

29. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 13]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/>
30. Lacerda LM, Garcia SC, da Silva LB, de Ávila Dornelles M, Presotto AT, Lourenço ED, et al. Evaluation of hematological, biochemical parameters and thiol enzyme activity in chrome plating workers. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019 Jan;26(2):1892–901.
31. Centers for Disease Control. Consensus Recommendations on Revision of the Blood Lead Reference Value [Internet]. 2017. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/science/lpp/docs/Consensus-Report-LPP-RV-work-group-report-01-13-2017.pdf>
32. Cohen CR, Bonacina F, Boehm RE, Farinon J, Sekine L. Perfil dos doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: Análise de 2005 a 2015. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2017 Nov;39:309.
33. Pennanen M, Broms U, Korhonen T, Haukkala A, Partonen T, Tuulio-Henriksson A, et al. Smoking, nicotine dependence and nicotine intake by socio-economic status and marital status. *Addict Behav*. 2014 Jul;39(7):1145–51.
34. Ehlers M, Labaze G, Hanakova M, McCloskey D, Wilner G. Alarming Levels of Carboxyhemoglobin in Banked Blood. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2009 Jun 1;23(3):336–8.
35. Ehlers M, McCloskey D, Devejian NS. Alarming Levels of Carboxyhemoglobin in a Unit of Banked Blood. *Anesthesia & Analgesia*. 2003 Jul;97(1):289.
36. BRASIL, Ministério da Saúde. PORTARIA No 158, DE 04 DE FEVEREIRO DE 2016. Feb 5, 2016.
37. Ashraf MW. Levels of Heavy Metals in Popular Cigarette Brands and Exposure to These Metals via Smoking. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:1–5.
38. McKelvey W, Gwynn RC, Jeffery N, Kass D, Thorpe LE, Garg RK, et al. A biomonitoring study of lead, cadmium, and mercury in the blood of New York city adults. *Environ Health Perspect*. 2007 Oct;115(10):1435–41.
39. ANVISA. Fiscalização - Tabaco [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 4]. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/tabaco/fiscalizacao>
40. IBOPE. Comércio ilegal de cigarros supera mercado regular no Brasil [Internet]. Agência Brasil. 2018 [cited 2019 Jan 4]. Available from: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2018-11/comercio-ilegal-de-cigarros-supera-mercado-regular-no-brasil>
41. Hartwig A. Cadmium and cancer. *Met Ions Life Sci*. 2013;11:491–507.
42. WHO. Cadmium [Internet]. WHO. 2010 [cited 2018 Dec 2]. Available from: http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/cadmium/en/

43. ATSDR. Toxicological profile for lead -Agency for Toxic Substances and Disease Registry [Internet]. 2007 [cited 2019 Apr 1]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>
44. Kordas K, Canfield RL, López P, Rosado JL, Vargas GG, Cebrián ME, et al. Deficits in cognitive function and achievement in Mexican first-graders with low blood lead concentrations. *Environ Res*. 2006 Mar;100(3):371–86.
45. Jantzen C, Jørgensen HL, Duus BR, Sporning SL, Lauritzen JB. Chromium and cobalt ion concentrations in blood and serum following various types of metal-on-metal hip arthroplasties: a literature overview. *Acta Orthop*. 2013 Jun;84(3):229–36.
46. Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, Pietra R, Pozzoli L, Gallorini M, et al. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. *Sci Total Environ*. 1990 Jun;95:89–105.
47. Kayan M, Naziroğlu M, Barak C. Effects of vitamins C and E combination on element levels in blood of smoker and nonsmoker radiology X-ray technicians. *Biol Trace Elem Res*. 2010 Aug;136(2):140–8.
48. Vardavas CI, Linardakis MK, Hatzis CM, Malliaraki N, Saris WH, Kafatos AG. Smoking status in relation to serum folate and dietary vitamin intake. *Tob Induc Dis*. 2008 Sep 9;4:8.
49. Allaway WH, Kubota J, Losee F, Roth M. Selenium, molybdenum, and vanadium in human blood. *Arch Environ Health*. 1968 Mar;16(3):342–8.
50. Barceloux DG. Molybdenum. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1999;37(2):231–7.

4 ARTIGO EM PREPARAÇÃO

A seguir, está apresentado o segundo artigo referente a este estudo, que está sendo preparado para a submissão no periódico Clinica Chimica Acta. Para fins de tese, as tabelas e figuras estão dispostas na ordem que aparecem no texto. Neste artigo, ficou evidente que o tabagismo altera os níveis de antioxidantes nos CH proveniente de doadores fumantes antes do armazenamento, sendo estas bolsas possivelmente mais propensas a desenvolverem lesões de estocagem.

Cigarette smoking impairs antioxidant defenses in the packed red blood cells before storage

Renata E. Boehm^{a,b}, Carolina R. Cohen^b, Sabrina N. Do Nascimento^c, Nuryan S. Fao^c,
Caroline Peruzzi^c, Solange Bandiera^a, Rianne R Pulcinelli^a, Almeri M. Balsan^b, Solange C.
Garcia^c, Leo Sekine^b, Tor G. H. Onsten^b and Rosane Gomez^a

^a
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

^b
Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA); Porto Alegre,
Brazil

^c
Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

Renata E. Boehm

Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Rua Sarmiento Leite, 500, room 305

90050170 - Porto Alegre, Brazil

E-mail: rboehm@hcpa.edu.br

Address reprint requests to: Renata E. Boehm e-mail: rboehm@hcpa.edu.br or Rosane

Gomez, e-mail: rosane.gomez@ufrgs.br

Highlights

- Antioxidant enzymes decrease in the packed red blood cells donated by smokers
- Cigarette smoking is associated with lower levels of serum vitamin C
- Oxidative stress is correlated with cotinine levels in blood donated by smokers

ABSTRACT

Background:

Red blood cells can accumulate lesions during storage, decreasing the benefits of blood transfusion. We aimed to explore the effect of cigarette smoking on the oxidative status in packed red blood cells (PRBCs) before storage.

Methods:

We compared the vitamin C, glutathione peroxidase (GPx), glutathione s-transferase (GST), non-protein thiol groups, and malondialdehyde (MDA) levels in PRBCs from smoking (n = 36) and non-smoking donors (n = 36). We also correlated the cotinine biomarker levels with these parameters.

Results:

Cigarette smoking decreased serum levels of vitamin C ($P < 0.001$) and GPx ($P < 0.001$), and increased GST levels in the PRBCs. We found a negative correlations among cotinine and GPx ($r = -0.693$; $P < 0.001$) and vitamin C levels ($r = -0.381$; $P < 0.001$) and a positive correlation between cotinine and GST activity ($r = 0.294$; $P = 0.015$).

Conclusion:

Cigarette smoking impaired the antioxidant status of PRBCs before storage and these parameters are correlated to cotinine levels. Additional studies are necessary to investigate if PRBCs from smokers may be more affected by oxidative damage throughout the storage time and the consequences for the recipient.

Key words: blood donation, non-protein thiol, oxidative stress, tobacco, transfusion, vitamins

1. Introduction

Transfusion of red blood cells (RBCs) is one of the most common and valuable life-saving treatments practiced in many areas of modern medicine [1,2]. The functional role of RBCs is oxygen transport from the lungs to the tissues, providing all cells with the required oxygenation. Thus, transfusion of RBCs is used for treating acute anemia, due to massive hemorrhage, or chronic anemia, secondary to bone marrow dysfunction [3–5]. Red cells are typically administered as a concentrate called packed red blood cells (PRBCs) preserved in a solution that maintain their viability up to 35 days under refrigerated storage [1,6].

It is well known that RBCs accumulate some metabolic, biochemical, and morphologic lesions during storage [2,7]. In vivo, RBCs are continuously exposed to both endogenous and exogenous sources of reactive oxygen species (ROS) that can damage the RBC and impair its functionality. To minimize the effect of these ROS and the resultant oxidative stress, RBCs have an antioxidant system involving both non-enzymatic low molecular weight antioxidants like glutathione (GSH), the most abundant cellular component of non-protein thiols, and ascorbic acid (vitamin C) [3,8]. RBCs also have enzymatic antioxidant defenses as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione transferase (GST), and peroxiredoxin-2 (PRDX-2) [3,8]. Because the RBCs have limited biosynthesis capacity, they are completely dependent on antioxidant defensive components throughout all its life span [9]. Storage lesions in RBCs are characterized by ATP and 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) depletion, exhaustion of the endogenous antioxidant defenses and subsequent oxidation of hemoglobin, leakage of lactate, lactate dehydrogenase (LDH), hemoglobin, and potassium/calcium ions into the suspending medium [2]. Moreover, membrane micro-vesiculation as well as reversible and irreversible morphological changes occur [4,10]. These changes can lead to the rapid clearance of the RBCs from the patient's bloodstream, decreasing the beneficial impact of the

transfusion [7]. They also may be associated with deleterious side effects such as toxicity/inflammation induced by hemolysis and free-iron, and other adverse events, including a higher infection risk and higher transfusion-dependent mortality rate [7,11]. A major contributor to storage lesions in RBC is related to oxidative stress that progressively increases over the time due to consumption of endogenous anti-oxidants, promoting oxidative lesions to proteins (carbonylation, fragmentation, denatured hemoglobin) and lipids (peroxidation) [4]. Besides the storage time, the donor-to-donor variations due to genetic factors, sex, and social habits as physical activity, sleeping, diet, and smoking, may increase oxidative lesions and affect the quality of the PRBCs [7,12].

Cigarette smoking is rich in carcinogenic and mutagenic molecules, free radicals, and heavy metals, generating ROS and reactive nitrogen species (RNS) that readily react with biomolecules causing DNA injury and lipid peroxidation on tissues [13]. Despite the prevalence of smoking had declined over the years in Brazil due to several control actions, the percentage of smokers in the general populations is about 14,7 [14,15]. In a recent study, we showed that 5.9% of total blood donations were from smoker donors [16]. Actually, there are no restrictions on smoker blood donors [17,18]. Moreover, the effect of cigarette exposure on the quality of donated blood have not been extensively explored [16,19].

Considering that oxidative stress leads to storage lesions in PRBCs and cigarette smoking can lead to oxidative stress, we aimed to explore the influence of cigarette smoking on the PRBCs oxidative status before storage through analysis of a biomarker of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA), endogenous and exogenous antioxidants and their association with cotinine, the main biomarker of cigarette exposure.

2. Material and methods

2.1. Study population

This observational, paired case-control study was conducted from March to June 2017 at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) Blood Bank in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. The study included donors of both sexes, over the age of 18 years, who confirmed a smoking habit during the compulsory clinical screening. Although the investigation about the tobacco smoking habit is not included in the Brazilian clinical screening protocol for blood donation [18], we added this question as a routine in our service based on a previous study from our group [16]. Those blood donors who reported an average consuming of 20 cigarettes per day or more were included as exposed group in the study after signing an informed consent clarifying about the aims and benefits derived from this research. Non-smoker donors (n=36), matched for age and gender to those from smoker donors group (n = 36), were invited to compose the control group, following the same research protocol. After donors consenting, an additional interview was carried out investigating socioeconomic characteristics, health status, and lifestyle. Additional questions about smoking habits such as the number of cigarettes smoked per day, and time of abstinence prior to donation of blood were applied for smoker donors. The average smoking load (pack-years) in the group of cigarette smoker donors was calculated as the number of cigarettes smoked per day, divided by 20 (number per pack), and multiplied by years smoking.

Samples from donors who reported exposure to an environment polluted by cigarette smoke (secondhand smokers), or who work with the burning of firewood/coal, the smoke from automobiles or machinery, or another possible source of trace elements were excluded. Unused samples were discarded. The sample size was calculated using data of our blood donors population, based on changes on the COHb concentration from smokers (cases) and non-smokers (controls) [16]. With a significance level of 5% and statistical power of 90%, considering the standard deviation of COHb concentration between cases of 3.3% and controls of 1.1% with a minimum assumed difference of 2%, the calculated number of PRBCs

to be tested was 34 from smoker and 34 from non-smoker donors (WinPepi, v. 11.43). This study was approved by the Ethic Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and by the Ethic Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and registered in the Brazil Platform at number CAAE 55786016.0.0000.5347.

2.2 Sample collection

Previously to blood donation, approximately 10 mL of urine samples were collected in polyethylene bottles and stored under -80°C until cotinine and creatinine analysis were determined. Total blood samples were collected from all participants by the established venipuncture technique into Vacutainer tubes during routine blood donation. Two tubes of 4 mL were collected, one without anticoagulant providing serum to determine vitamin C and other containing anticoagulant (EDTA) resulting in plasma to determine MDA. Both tubes were centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min at room temperature and aliquots were immediately analyzed.

Additional sample was obtained from the original PRBC, immediately after the whole blood bag was centrifuged (24°C and 2,535 rpm for 5 min – KR4i, Thermo Scientific, USA) for separation of the components (Giotto, Delcon, Italy). A 50 mL sample volume from the red blood cells was carefully removed from the original CPDA-1 bag (JP Farma, Ribeirão Preto, Brazil) through a sterile connection (TCD - Haemonetics, Braintree, MA, USA) and transferred to a pediatric transfusion bag with the same characteristics to those of the original one. The sample (10 mL) was taken from the pediatric transfusion unit by a single puncture and aliquoted in cryogenic vials and refrigerated -80°C until erythrocyte antioxidant analysis (Non-protein thiol, GPx, GST).

2.3 Cotinine urinary levels

Cotinine levels determination in urine samples were performed using a high-

performance liquid chromatographic equipped with a UV detector (HPLC-UV), adapted from Cattaneo et al. (2006) [20]. The chromatographic equipment was purchased from Shimadzu® (Kyoto, Japan). The separation was achieved with a reverse phase C18 column. The mobile phase was a mixture of Milli-Q water/methanol/sodium acetate 0.1 mol L⁻¹/acetonitrile (50:15:25:10, v/v), adding 1 mL of citric acid 0.034 mol L⁻¹ and 5.0 mL of trimethylamine for each liter of solution, adjusting to pH 4.4. The flow rate was maintained isocratically at 0.5 mL min⁻¹. The absorbance of the eluent was monitored at 260 nm; the total run time was 10 min. The 2-phenylimidazole was used as internal standard. The detection limit of the method was 5.0 ng mL⁻¹. For sample, a volume of 25 µL NaOH10M and 100 µL 2-phenylimidazole (1.0 µg mL⁻¹), used as internal standard, were added to 2 mL urine previously centrifuged. After, the extraction was performed with 4.0 mL dicloromethane by rotatory mixer for 40 min and centrifuged at 300×g for 15 min. Then, 2 mL organic phase was dried under compressed air at ambient temperature. Following, 200 µL mobile phase was added, and 20 µL was injected into the HPLC. Cotinine assay was performed in duplicates, and cotinine levels were expressed as ng mL⁻¹. Moreover, cotinine levels were adjusted by urinary creatinine excretion and were also expressed as µg g⁻¹ creatinine.

2.4 Creatinine concentration

Urinary creatinine concentration was determined by spectrophotometry according to Jaffé (2009) [21] with commercial kits (Doles reagents, Goiânia, GO, Brazil). Its results were used for adjustment of cotinine values.

2.5 Oxidative status of PRBCs

2.5.1 Serum vitamin C levels

Determination of serum vitamin C concentration was performed according to Baierle et al. (2012) [22], by HPLC- UV using tris[2-carboxy-ethyl]phosphine hydrochloride (TCEP)

as a reducing agent. Firstly, a deproteinization process of the sample was made with perchloric acid 10% (v/v). Then, the supernatant obtained after centrifugation was injected into the chromatographic system. The results of vitamin C concentrations were expressed as mg/L.

2.5.2 Glutathione peroxidase (GPx) activity

Enzymatic activity of GPx was determined in the PRBC samples. This method is based on the oxidation of NADPH, which can be measured as the decrease in absorbance at 340 nm [23]. Results were expressed as $\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg protein}$.

2.5.3 Non-protein thiol levels

Erythrocytes were hemolyzed with Triton X-100, and then precipitated with 20% trichloroacetic acid (w/v). After centrifugation, supernatant aliquots reacted with 10 mM of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and the non-protein thiol levels were determined in erythrocytes spectrophotometrically at 412 nm, as described by Ellman (1959) [24]. The results were expressed as $[\text{mM}] * (\text{Ht}/\text{Hb})$.

2.5.4 Glutathione S-transferase (GST) levels

GST activity was determined in PRBCs using CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) as substrate and 0.15 M GSH according to Habig (1974) [25]. GST activity was expressed as U/mg protein.

2.5.5 Malondialdehyde plasmatic levels

Lipid peroxidation was quantified by analysis of plasma MDA levels using high performance liquid chromatographic with visible detector (HPLC-UV, Knauer), according to a method previously developed by Grotto et al. (2007)[26]. The levels of MDA were expressed as μM .

2.6 Statistical Analysis

Normality of variables was tested by the Shapiro-Wilk test. Normally distributed data were analyzed by the Student's t-test for independent samples. Non-parametric distributed data were analyzed by the Mann-Whitney test. The χ^2 test was used to compare the groups over categorical variables. Spearman correlation test was used to determine the degree of association between the different parameters. Results were showed as mean \pm standard error of the mean or as the median \pm interquartile intervals according to the test employed. The significance level was set at 0.05 and the statistical software used was SPSS, v.18.0 (IBM Company, USA).

3. Results

3.1. General characteristics of the study subjects

Composing the sampling of this study, 36 smoking blood donors were matched by age and gender with non-smoking donors. The general characteristics are showed in the Table 1. Smoking donors were mainly male, aged 41.3 ± 13.8 years, with a smoking history of 34.1 ± 27.5 packages/year and regular blood donation. Demographic characteristics also showed that most donors were single (55%), employed (64%), sedentary (75%) and overweight (58%), had a high school education (53%) and lived in Porto Alegre (78%). Differences between groups were found in parameters such as education and marital status, as well as regular physical activity and body mass index (BMI). Despite we found a higher frequency of regular physical activity in the non-smoker (58%) than in the smoker donor group (25%) the overweight and obesity were more prevalent in the non-smoker than smoker group and both groups not usually take any vitamin supplementation ($P=0.670$).

Table 1. Demographic characteristics of smoker (n=36) and non-smoker (n=36) donors at the blood bank of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil.

| | Non-smokers % (n) | Smokers % (n) | <i>P</i> |
|--------------------------------|----------------------|------------------|--------------|
| Male | 66.7 (24) | 66.7 (24) | 1.000 |
| Age - years | 41.3 ± 13.8 | 41.3 ± 13.8 | 0.993 |
| Smoking History - package/year | - | 34.1 ± 27.5 | - |
| Blood Donation Frequency | | | |
| First Time | 13.9 (5) | 30.5 (11) | 0.216 |
| Up to Three Times | 16.7 (6) | 16.7 (6) | |
| > Three Times | 69.4 (25) | 52.8 (19) | |
| Education Level ^b | | | |
| Elementary School | 5.6 (2) | 33.3 (12) | 0.001 |
| High School | 47.2 (17) | 52.8 (19) | |
| College | 47.2 (17) | 13.9 (5) | |
| Work Activity | 75.0 (27) | 63.9 (23) | 0.443 |
| Marital Status | | | |
| Single ^a | 27.8 (10) | 55.6 (20) | 0.031 |
| Married | 72.2 (26) | 44.4 (16) | |
| Regular Physical Activity | 58.3 (21) | 25.0 (9) | 0.009 |
| BMI | | | |
| Normal | 16.7 (6) | 41.7 (15) | 0.038 |
| Overweight/Obese | 83.3 (30) | 58.3 (21) | |
| Vitamin Supplementation | 11.1 (4) | 5.6 (2) | 0.670 |
| Place of Origin | | | |
| Porto Alegre | 86.1 (31) | 77.8 (28) | 0.540 |
| Other Cities | 13.9 (5) | 22.2 (8) | |

^a Includes single, widowed and divorced. ^b Considering complete and incomplete education.

Data were presented as mean ± SD for continuous variables and absolute value and percentage for categorical variables. Bold represents significant difference.

3.2 Cotinine urinary levels

Cotinine urinary levels were used as a biomarker of exposure to cigarette smoking. Levels of cotinine were significantly higher in smoker than non-smoker donors ($P < 0.001$) (Figure 1). Additionally, when cotinine levels were adjusted by urinary creatinine excretion, the significant difference was maintained: 2.02 [1.14, 2.74] vs. 0.08 [0.05, 0.13] ng g^{-1} creatinine ($P < 0.001$) for smoker and non-smoker donors, respectively.

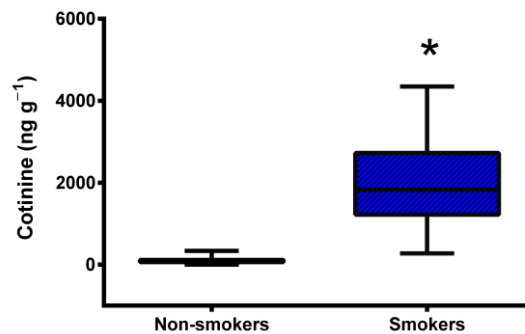


Figure 1. Urinary cotinine levels from non-smokers ($n=36$) and smoker donors ($n=36$). Data are expressed as median \pm interquartile intervals. Mann-Whitney test. * Different from non-smokers ($P < 0.001$).

3.3 Exogenous and endogenous antioxidants and lipid peroxidation biomarker

In the present study, we quantified the vitamin C, an exogenous non-enzymatic antioxidant, and showed that its serum levels were significantly lower in the smoker than non-smoker donors ($P < 0.001$) (Figure 2).

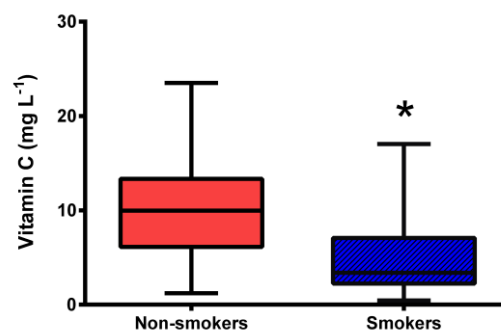


Figure 2. Vitamin C serum levels from non-smoker ($n=36$) and smoker donors ($n=36$). Data are expressed as median \pm interquartile intervals. Mann-Whitney test. * Different from non-smokers ($P < 0.001$).

Additionally, endogenous antioxidant biomarkers (non-protein thiol groups, GST, and GPx activities) were analyzed in the PRBCs. Although not statistically significant, we found that the levels of non-protein thiol groups showed only a tendency to be elevated in PRBC in the smoker group ($P=0.068$) (Figure 3A). On the other hand, the enzymes that use non-protein thiol groups as GSH in their antioxidants mechanisms were statistically different. While GST levels increased (Figure 3B), GPx levels decreased (Figure 3C) in the PRBCs from smoker than non-smoker donors ($P < 0.001$).

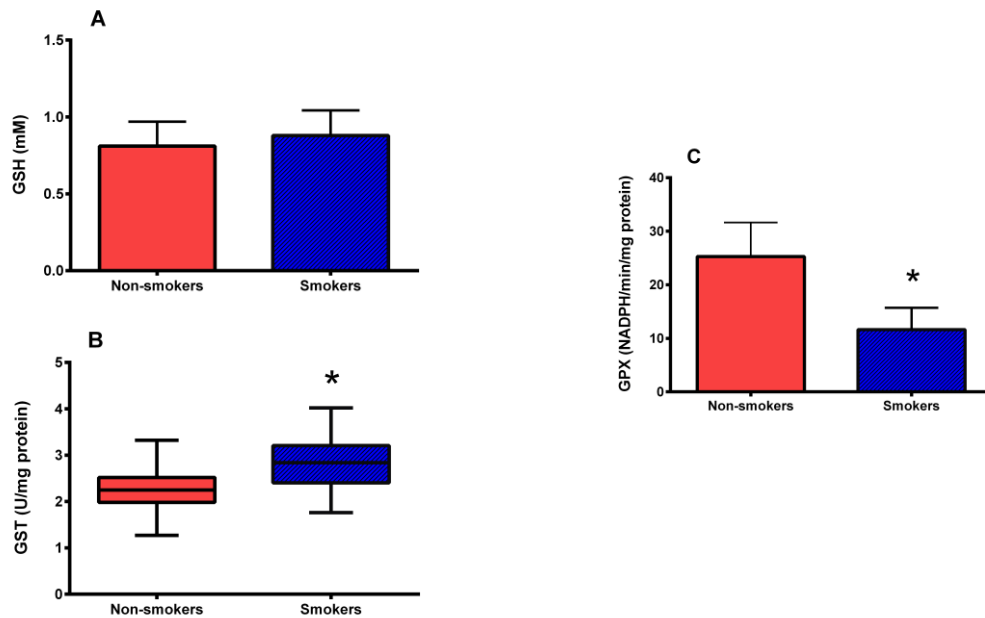


Figure 3. Endogenous antioxidants biomarkers in PRBCs from non-smoker ($n=36$) and smoker donors ($n=36$). a) Non-protein thiol group levels showed as mean \pm standard deviation/t-test b) GST levels showed as median \pm interquartile intervals/Mann-Whitney test; c) GPx levels showed as mean \pm standard deviation/t-test. * Different from non-smoker donors ($P < 0.001$).

Despite significant differences of endogenous (GST and GPx) and exogenous (vitamin C) antioxidant levels between groups, we found no significant difference for the biomarker of lipid peroxidation, MDA, between non-smoker ($9.3 [5.35, 13.64] \mu\text{M}$) and smoker ($9.8 [5.52, 11.40] \mu\text{M}$) donors ($P = 0.956$). Additional statistical analysis showed a

negative correlation between the biomarker of nicotine exposure, cotinine, and GPx activity ($r = -0.693$; $P < 0.001$) and vitamin C levels ($r = -0.381$; $P < 0.001$). In addition, a positive correlation was found between cotinine levels and GST activity ($r = 0.294$; $P = 0.015$), which supported the effect of cigarette smoking on PRBCs antioxidants unbalance.

4. Discussion

In this study, we aimed to explore if cigarette smoking could affect the PRBCs oxidative status before storage. Our results showed that cigarette smoking was associated with lower serum levels of exogenous (vitamin C) antioxidants and changed the levels of endogenous antioxidant enzymes (GST and GPx) in the PRBCs from smoker donors.

Storage lesions in PRBCs have been largely discussed in hemotherapy, but it is unclear whether and in what extension these lesions impair the safety and effectiveness of the blood transfusion [27]. Variability in donated units arises from biological (donor) and technical factors [10,28]. The sustained production of reactive free radicals from the tar and gas phases of cigarette smoke imposes an oxidant stress on the circulating erythrocytes [29].

Biological factors can affect not only a range of physiological properties of stored cells but also is the most significant contributing factors that can affect bag hemolysis and RBC recovery after transfusion [2]. It was been demonstrated that chronic cigarette smoking produces an erythrocyte deformability and this can contribute to impaired oxygen delivery, affecting the main purpose of the blood transfusion [30][3]. Moreover, the sustained production of reactive free radicals from the tar and gas phases of cigarette smoke imposes an oxidant stress on the circulating erythrocytes [29]. It has been well recognized that the main contributor to generation of lesions in RBCs is oxidative stress and the donor-dependent RBC capacity to cope with oxidative injury may be directly linked to the final quality and effectiveness of PRBCs transfusion [2,4,7].

Results from this study showed that demographic characteristics from smoker and non-smoker donors match those from previous studies [31,32]. We also found that the vitamin supplementation intake is not common between blood donors. Despite reduced physical activity and no vitamin supplementation, the cigarette smoking could be directly responsible for our findings where antioxidants would be being expended in response to the oxidative stress caused by the toxic components of cigarette or even the absorption could be impaired [33].

Indeed, cigarette smoke is a vast source of oxidants and numerous oxidant compounds have been identified among the 4,000 to 7,000 constituents in cigarette smoke [34,35]. A single puff of such cigarette smoke contains 10^{17} free radicals in the tar phase and 10^{15} in the gas phase [36]. They produce a shift in the normal balance between oxidants and antioxidants, impacting on the endogenous oxidative stress system [34,35]. Oxidative stress unbalance and the inflammatory tissue response are related to diseases and more than 3 billion death a year caused by cigarette use [14]. Measurement of urinary cotinine can provide a sensitive estimative of tobacco smoking exposure. The urinary cotinine levels presented by smoker group is compatible with reference values for heavy smokers [37,38].

It is well described that cigarette smoking also depletes antioxidants [47]. Concentrations of vitamin C are decreased among smokers [40]. Our findings are in accordance with the literature. In the present study, smokers group had an average 3 times less vitamin C than non-smokers and the biomarker cotinine presented a negative correlation with vitamin C concentration confirming a causal factor [33]. These specific changes in ascorbate appear correspond to an elevated oxidative stress caused by cigarette smoking rather than a dietary intake since none of the groups used expressively vitamin supplementation [33,41].

Endogenous antioxidant responses against smoking changed in the present study. Both non-protein thiols (GSH) levels and GST and GPx enzymes activity have an important role

against oxidative stress induced by xenobiotics [3,13]. Erythrocyte GPx activity is a better and more sensitive biomarker of erythrocyte antioxidant defenses against cigarette smoking than CAT and SOD [42]. As previous studies, the GPx activity was lower in the blood from smoker than non-smoker donors, probably being spent combating oxidative stress imposed by those toxic components from cigarette smoking [9,42,43]. In the other hand, protein thiol groups (although not statistically significant) and GST (P <0.001) were elevated in PRBCs from smokers. We suggest that increasing on glutathione levels in the PRBCs from smokers may be an attempt, albeit insufficient, to counteract excessive oxidant production after cigarette smoke exposure [44]. Glutathione S-transferases (GSTs) enzyme detoxify toxic compounds in tobacco smoke via glutathione-dependent mechanisms [45]. Increased non-thiol groups and GST levels in PRBCs from smokers seems a compensatory mechanism of antioxidant defense in protecting red cell from free radical damage induced by cigarette smoke [46]. These antioxidant defenses seems it working at least preventing to counteract erythrocyte membrane lipid peroxidation since we did not find differences in MDA levels between groups.

It is already known that cigarette smoking is a cause of lipid peroxidation and conversion of polyunsaturated fatty acids to hydroperoxides, endoperoxides, aldehydes (eg, malondialdehyde), and alkanes (eg, ethane and pentane) [47]. It is important to highlight that we analyzed some oxidative stress parameters in fresh samples, before storage. Thus, even if oxidative cell damage had been partially neutralized by antioxidant defenses, the glycolytic pathway and glutathione concentrations will decrease after PRBCs storage [48]. Under these circumstances, it is possible that superoxide radicals and water react with free iron or heme, undergoing Fenton transformation, and increasing hydroxyl radical that readily damage lipids and proteins [10]. As we could observe, the antioxidant defenses that we evaluated here were

impaired by cigarette smoking in PRBCs before its storage. Thus, we suggest that these RBCs from smokers could suffer a greater impact of lesions with over time storage.

Some strategies have been discussed as alternatives to improve PRBCs conditions against oxidative damage caused by biological and technical factors as blood processing and storage [7]. One strategy to prevent oxidative damage in bags stored would be provide additive compounds to better sustain the RBC metabolism, thereby ensuring the continuous recycling or the synthesis of endogenous antioxidants [49]. Another option might involve the addition of exogenous molecules that would increase the basal load of antioxidant protection, as vitamin C and N-acetylcysteine that promote the replenishment of glutathione, and even vitamin intake by donors before blood donation [50]. However, despite these efforts, the effectiveness of these additives is not yet well established.

Research in RBC transfusion medicine has significantly advanced in recent years and provides high-quality evidence to improve guidelines. To our knowledge, this is the first study exploring the effect of cigarette smoking as a donor biological characteristic on oxidative stress in the PRBCs. As seen here, smoking impairs the levels of antioxidant defenses in RBCs and its toxic potential deserves attention.

5. Conclusions

Our results showed that cigarette smoking was associated with lower serum vitamin C levels and changed endogenous antioxidant (GST and GPx) enzymes activities in PRBCs from smoker donors. These results demonstrate that PRBCs from smokers has a disturbance in the endogenous antioxidant system before the storage. We hypothesized that PRBCs from smoker donors may be more affected by oxidative damage throughout the storage time, further decreasing the rate of oxygen transference to tissues and compromising the efficacy of the transfusion. Additional studies need to be conducted to investigate the storage effect on

oxidative stress parameters and the consequences of RBC transfusion from smoker donor to the recipient.

Funding

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and Research Incentive Fund (FIPE) of HCPA.

Acknowledgments

The authors thank to the entire staff of Hospital de Clínicas Blood Bank and the Bruna Fukami, Kelly Brolo and Daniela Baglioni for their collaboration in the accomplishment of this study.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to disclose.

References

- [1] J.L. Carson, D.J. Triulzi, P.M. Ness, Indications for and Adverse Effects of Red-Cell Transfusion, *New England Journal of Medicine*. 377 (2017) 1261–1272. doi:10.1056/NEJMra1612789.
- [2] A. D'Alessandro, A.G. Kriebardis, S. Rinalducci, M.H. Antonelou, K.C. Hansen, I.S. Papassideri, L. Zolla, An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies: An omics update on RBC storage, *Transfusion*. 55 (2015) 205–219. doi:10.1111/trf.12804.
- [3] J.G. Mohanty, E. Nagababu, J.M. Rifkind, Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging, *Front Physiol*. 5 (2014). doi:10.3389/fphys.2014.00084.
- [4] K. Sanford, B.J. Fisher, E. Fowler, A.A. Fowler, R. Natarajan, Attenuation of Red Blood Cell Storage Lesions with Vitamin C, *Antioxidants (Basel)*. 6 (2017). doi:10.3390/antiox6030055.

- [5] M. Franchini, G. Marano, C. Mengoli, S. Pupella, S. Vaglio, M. Muñoz, G.M. Liumbruno, Red blood cell transfusion policy: a critical literature review, *Blood Transfus.* 15 (2017) 307–317. doi:10.2450/2017.0059-17.
- [6] Ministério da Saúde, Guia para uso de Hemocomponentes, 2nd ed., Ministério da saúde, Brasília, DF, 2015. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_uso_hemocomponentes_2ed.pdf (accessed December 8, 2017).
- [7] M. Bardyn, J.-D. Tissot, M. Prudent, Oxidative stress and antioxidant defenses during blood processing and storage of erythrocyte concentrates, *Transfusion Clinique et Biologique.* 25 (2018) 96–100. doi:10.1016/j.tracli.2017.08.001.
- [8] A. Bocedi, R. Fabrini, O. Lai, L. Alfieri, C. Roncoroni, A. Noce, J.Z. Pedersen, G. Ricci, Erythrocyte glutathione transferase: a general probe for chemical contaminations in mammals, *Cell Death Discovery.* 2 (2016) 16029. doi:10.1038/cddiscovery.2016.29.
- [9] H. Orhan, C.T.A. Evelo, G. Sahin, Erythrocyte antioxidant defense response against cigarette smoking in humans--the glutathione S-transferase vulnerability, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19 (2005) 226–233. doi:10.1002/jbt.20088.
- [10] J.R. Hess, Red cell storage, *Journal of Proteomics.* 73 (2010) 368–373. doi:10.1016/j.jprote.2009.11.005.
- [11] M. Prudent, J.-D. Tissot, N. Lion, In vitro assays and clinical trials in red blood cell aging: Lost in translation, *Transfusion and Apheresis Science.* 52 (2015) 270–276. doi:10.1016/j.transci.2015.04.006.
- [12] M. García-Roa, M. del Carmen Vicente-Ayuso, A.M. Bobes, A.C. Pedraza, A. González-Fernández, M.P. Martín, I. Sáez, J. Seghatchian, L. Gutiérrez, Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives, *Blood Transfus.* 15 (2017) 222–231. doi:10.2450/2017.0345-16.
- [13] A. Attanzio, A. Frazzitta, S. Vasto, L. Tesoriere, A.M. Pintaudi, M.A. Livrea, A. Cilla, M. Allegra, Increased eryptosis in smokers is associated with the antioxidant status and C-reactive protein levels, *Toxicology.* 411 (2019) 43–48. doi:10.1016/j.tox.2018.10.019.
- [14] World Health Organization, WHO report on the global tobacco epidemic, 2017: monitoring tobacco use and prevention policies, (2017).
- [15] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, ed., Pesquisa nacional de saúde, 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas: Brasil, grandes regiões e unidades da Federação, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, Rio de Janeiro, 2014.
- [16] R.E. Boehm, B.D. Arbo, D. Leal, A.W. Hansen, R.R. Pulcinelli, F.V. Thiesen, A.M. Balsan, T.G.H. Onsten, R. Gomez, Smoking fewer than 20 cigarettes per day and remaining abstinent for more than 12 hours reduces carboxyhemoglobin levels in packed red blood cells for transfusion, *PLoS One.* 13 (2018). doi:10.1371/journal.pone.0204102.

- [17] American Association of Blood Banks, Technical Manual of the American Association of Blood Banks., Amer Assn of Blood Banks, Arlington, Va, 2011.
- [18] Ministério da Saúde, Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de Setembro de 2017. — 4ª Câmara - Meio Ambiente e Patrimônio Cultural, (2017). <http://www.mpf.mp.br/atuacao-tematica/ccr4/dados-da-atuacao/projetos/qualidade-da-agua/legislacao/portarias/portaria-de-consolidacao-no-5-de-28-de-setembro-de-2017-1> (accessed February 24, 2019).
- [19] E.K. Symvoulakis, C.I. Vardavas, P. Fountouli, A. Stavroulaki, K.M. Antoniou, G. Duijker, M.N. Tzatzarakis, K. Sfiridaki, E. Bolonaki, T. Alegakis, A.M. Tsatsakis, Time interval from cigarette smoke exposure to blood donation and markers of inflammation: should a smoking cut-off be designated?, *Xenobiotica*. 40 (2010) 613–620. doi:10.3109/00498254.2010.500745.
- [20] R. Cattaneo, A.P. Alegretti, F.R. Sagebin, C.M. de Abreu, G.O. Petersen, J.M. Chatkin, F.V. Thiesen, Validação do método para determinação de cotinina em urina por cromatografia líquida de alta eficiência, *Rev. bras. toxicol.* 19 (2006) 25–31.
- [21] M. Jaffe, Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins., *Zeitschrift Für Physiologische Chemie*. 10 (2009) 391–400. doi:10.1515/bchm1.1886.10.5.391.
- [22] M. Baierle, A. de Bairros, A.P. Moreira, R. Bulcão, M. Roehrs, F. de Freitas, J. Durgante, N. Brucker, M. Charão, S.C. Garcia, Quantificação sérica de vitamina C por CLAE-UV e estudo de estabilidade, *Química Nova*. 35 (2012) 403–407. doi:10.1590/S0100-40422012000200030.
- [23] D.E. Paglia, W.N. Valentine, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.* 70 (1967) 158–169.
- [24] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82 (1959) 70–77. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6.
- [25] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7130–7139.
- [26] D. Grotto, L.D. Santa Maria, S. Boeira, J. Valentini, M.F. Charão, A.M. Moro, P.C. Nascimento, V.J. Pomblum, S.C. Garcia, Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography–visible detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 43 (2007) 619–624. doi:10.1016/j.jpba.2006.07.030.
- [27] A.J. Martí-Carvajal, D. Simancas-Racines, B.S. Peña-González, Prolonged storage of packed red blood cells for blood transfusion, in: *The Cochrane Collaboration (Ed.), Cochrane Database of Systematic Reviews*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2015. doi:10.1002/14651858.CD009330.pub2.
- [28] J. Delobel, O. Rubin, M. Prudent, D. Crettaz, J.-D. Tissot, N. Lion, Biomarker Analysis of Stored Blood Products: Emphasis on Pre-Analytical Issues, *Int J Mol Sci*. 11 (2010) 4601–4617. doi:10.3390/ijms11114601.

- [29] U. Ou, O. Bsa, A. Og, O. Pe, I. Ee, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2 (2011) 9.
- [30] J.M. Norton, P.W. Rand, Decreased deformability of erythrocytes from smokers, *Blood*. 57 (1981) 671–674.
- [31] R.E. Boehm, B.D. Arbo, D. Leal, A.W. Hansen, R.R. Pulcinelli, F.V. Thiesen, A.M. Balsan, T.G.H. Onsten, R. Gomez, Smoking fewer than 20 cigarettes per day and remaining abstinent for more than 12 hours reduces carboxyhemoglobin levels in packed red blood cells for transfusion, *PLoS ONE*. 13 (2018) e0204102. doi:10.1371/journal.pone.0204102.
- [32] C.R. Cohen, F. Bonacina, R.E. Boehm, J. Farinon, L. Sekine, Perfil dos doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: Análise de 2005 a 2015, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 39 (2017) 309.
- [33] A.J. Alberg, The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients, *Toxicology*. 180 (2002) 121–137. doi:10.1016/S0300-483X(02)00386-4.
- [34] R. Talhout, T. Schulz, E. Florek, J. van Benthem, P. Wester, A. Opperhuizen, Hazardous Compounds in Tobacco Smoke, *Int J Environ Res Public Health*. 8 (2011) 613–628. doi:10.3390/ijerph8020613.
- [35] B.M. Fischer, J.A. Voynow, A.J. Ghio, COPD: balancing oxidants and antioxidants, *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 10 (2015) 261–276. doi:10.2147/COPD.S42414.
- [36] D.F. Church, W.A. Pryor, Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications., *Environ Health Perspect*. 64 (1985) 111–126.
- [37] M.A. Wall, J. Johnson, P. Jacob, N.L. Benowitz, Cotinine in the serum, saliva, and urine of nonsmokers, passive smokers, and active smokers., *Am J Public Health*. 78 (1988) 699–701.
- [38] S. Kim, A. Jung, Optimum cutoff value of urinary cotinine distinguishing South Korean adult smokers from nonsmokers using data from the KNHANES (2008-2010), *Nicotine Tob. Res*. 15 (2013) 1608–1616. doi:10.1093/ntr/ntt027.
- [39] B. Halliwell, Antioxidants in human health and disease, *Annu. Rev. Nutr*. 16 (1996) 33–50. doi:10.1146/annurev.nu.16.070196.000341.
- [40] G.G. Duthie, J.R. Arthur, W.P. James, Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status, *Am. J. Clin. Nutr*. 53 (1991) 1061S-1063S. doi:10.1093/ajcn/53.4.1061S.
- [41] C.A. Northrop-Clewes, D.I. Thurnham, Monitoring micronutrients in cigarette smokers, *Clinica Chimica Acta*. 377 (2007) 14–38. doi:10.1016/j.cca.2006.08.028.
- [42] S. Metta, D.R. Basalingappa, S. Uppala, G. Mitta, Erythrocyte Antioxidant Defenses Against Cigarette Smoking in Ischemic Heart Disease, *J Clin Diagn Res*. 9 (2015) BC08-BC11. doi:10.7860/JCDR/2015/12237.6128.

- [43] Z.A. Solak, C. Kabaroğlu, G. Cok, Z. Parildar, U. Bayindir, D. Ozmen, O. Bayindir, Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people, *Clin. Exp. Med.* 5 (2005) 99–105. doi:10.1007/s10238-005-0072-5.
- [44] X.Y. Li, K. Donaldson, I. Rahman, W. MacNee, An investigation of the role of glutathione in increased epithelial permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149 (1994) 1518–1525. doi:10.1164/ajrccm.149.6.8004308.
- [45] T. Harju, W. Mazur, H. Merikallio, Y. Soini, V.L. Kinnula, Glutathione-S-transferases in lung and sputum specimens, effects of smoking and COPD severity, *Respir Res.* 9 (2008) 80. doi:10.1186/1465-9921-9-80.
- [46] P. Pannuru, D.R. Vaddi, R.R. Kindinti, N. Varadacharyulu, Increased erythrocyte antioxidant status protects against smoking induced hemolysis in moderate smokers, *Hum Exp Toxicol.* 30 (2011) 1475–1481. doi:10.1177/09603271110396527.
- [47] J.D. Morrow, B. Frei, A.W. Longmire, J.M. Gaziano, S.M. Lynch, Y. Shyr, W.E. Strauss, J.A. Oates, L.J. Roberts, Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage, *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 1198–1203. doi:10.1056/NEJM199505043321804.
- [48] U.J. Dumaswala, M.J. Wilson, Y.L. Wu, J. Wykle, L. Zhuo, L.M. Douglass, D.L. Daleke, Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage, *Free Radic. Res.* 33 (2000) 517–529.
- [49] J.R. Hess, An update on solutions for red cell storage, *Vox Sanguinis.* 91 (2006) 13–19. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00778.x.
- [50] V. Pallotta, F. Gevi, A. D'alessandro, L. Zolla, Storing red blood cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative stress-related lesions: a metabolomics overview, *Blood Transfus.* 12 (2014) 376–387. doi:10.2450/2014.0266-13.

5 CONCLUSÕES

O tabagismo entre doadores de sangue prejudica a qualidade e segurança do CH a medida que está associado com níveis elevados de COHb (14 vezes maior que em não fumantes), carreamento de elementos tóxicos como Cd e Pb, diminuição global de elementos essenciais e desbalanço de antioxidantes eritrocitários (GPx e GST) neste hemocomponente. Esses resultados indicam um risco potencial aos receptores, cuja saúde já é comprometida, especialmente recém-nascidos e crianças, quando órgãos e sistemas ainda estão em desenvolvimento, sendo os pacientes que mais recebem transfusão de CH entre todas as classes.

Os resultados obtidos nesta tese indicam a necessidade de investigação sobre o hábito de fumar entre doadores de sangue no momento da triagem e possivelmente adequações na conduta transfusional. O estabelecimento de um período de abstinência mínima de 12 horas entre os fumantes é capaz de reduzir cerca de 60% da a concentração de COHb. Implantando esta medida, o efeito prejudicial do CO à oxigenação tecidual, principal indicação da transfusão de hemácias, seria potencialmente reduzido. Outra medida relevante, seria implantar o teste de COHb como um teste toxicológico de triagem pré-transfusional. Porém, a COHb não demonstrou boa correlação com os níveis de metais tóxicos, não sendo, portanto, um bom biomarcador para estes elementos. Considerando que o Brasil é um país em desenvolvimento e os recursos investidos na saúde pública são escassos, uma outra alternativa menos onerosa e de fácil aplicação seria a rotulagem das bolsas de CH proveniente de doadores fumantes e sua reserva para pacientes com menor comprometimento clínico.

O desbalanço de antioxidantes no CH proveniente de doadores fumantes ainda antes de seu armazenamento também é preocupante. As hemácias são totalmente dependentes do seu sistema de defesa antioxidante durante toda sua vida útil e não têm a capacidade de ressintetizá-lo durante o período de armazenamento, em condições não fisiológicas, até a transfusão. Estes resultados sugerem que o conteúdo destas bolsas é mais suscetível a sofrer lesões de estocagem e, conseqüentemente, acúmulo de lesões oxidativas, afetando a recuperação celular pós transfusão e promovendo redução da eficácia transfusional.

O estresse oxidativo está relacionado com reações transfusionais graves como lesão pulmonar aguda (TRALI) e outros efeitos indesejáveis trombóticos inflamatórios. Toda esta carga de elementos tóxicos e oxidantes transferida para o paciente em uma transfusão de CH pode representar aumento desses riscos ao receptor.

A restrição de doação por qualquer causa, exige cautela, pois a manutenção do estoque de sangue em quantidade suficiente para atender à demanda é desafiadora. Nossos resultados são de caráter exploratório, não sendo possível estimar o risco real que a transfusão de CH proveniente de doador fumante pode gerar ao paciente. Portanto, no momento, nosso foco não é indicar a restrição de doação por tabagista, mas sim, alertar sobre a necessidade de alterações na triagem clínica de doadores com inclusão da pergunta sobre o hábito de fumar e gerenciamento transfusional (rotulagem, reserva e redirecionamento). Seguindo esta perspectiva, estudos adicionais devem ser realizados para investigar se o CH de fumantes sofre maior prejuízo por lesões de estoque, culminando em alterações estruturais nas hemácias e em elevados níveis de mediadores inflamatórios nas bolsas com o tempo de armazenamento.

Adicionalmente, a condução de estudos clínicos seria importante para verificar os efeitos da transfusão de CH proveniente de fumantes nos receptores, contudo, tais estudos esbarram em questões éticas que devem ser melhor discutidas futuramente.

Nosso trabalho, já mostrou aplicabilidade na medida em que modificou o protocolo de triagem do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Essa pergunta, incluída no início do estudo do nosso grupo, é de rotina no protocolo de triagem desse Banco de Sangue. De nosso conhecimento, é o único Serviço de Hemoterapia no país que investiga hábito de fumar entre doadores e seus efeitos nos hemocomponentes.

Além disso, os resultados desse e de futuros estudos toxicológicos em hemoterapia poderão nortear políticas para inclusão dessa pergunta em toda a rede hemoterápica, bem como o estabelecimento de novos protocolos, gerando um conjunto de atitudes que poderá contribuir para redução de risco transfusional e aumento do cuidado à saúde humana.

6 PERSPECTIVAS

Tendo em vista que o sangue se enquadra na categoria dos medicamentos, observamos um vasto campo a ser explorado em hemoterapia: a aplicabilidade da toxicologia como uma ferramenta para o aumento da segurança transfusional.

Como perspectiva imediata, além de investigar as lesões de estoque, alterações estruturais e marcadores inflamatórios no CH proveniente de fumantes, parâmetros que devido aos poucos recursos e limitações encontradas durante a realização desta tese ainda não foram explorados, planejamos um novo estudo onde pretendemos acompanhar a transfusão das bolsas de CH e os possíveis efeitos adversos para o receptor.

Nós esperamos que os nossos resultados sejam inspiradores para futuras pesquisas que investiguem o potencial de carreamento de substâncias tóxicas pelo sangue a partir da exposição do doador a outros tipos de xenobióticos.

Prover à saúde pública com sangue seguro e de qualidade é fundamento básico ditado pela Organização Mundial da Saúde para todos os Serviços de Saúde do mundo. A inclusão das análises toxicológicas nos testes de triagem transfusional é uma prática inovadora que pode contribuir com a hemoterapia na busca da garantia da qualidade além dos métodos tradicionais, diminuindo assim, os riscos de efeitos adversos aos pacientes que precisam de transfusão.

REFERÊNCIAS

AABB. **Technical Manual**. 19th. ed. USA: Mark K. Fung, 2017.

ÅBERG, A.-M. et al. Carbon monoxide concentration in donated blood: relation to cigarette smoking and other sources. **Transfusion**, v. 49, n. 2, p. 347–353, 1 fev. 2009.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **ATSDR - Toxicological Profile: Lead**. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=96&tid=22>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **ATSDR - Toxicological Profile: Cadmium**. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=48&tid=15>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

ALBERG, A. J. The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients. **Toxicology**, v. 180, n. 2, p. 121–137, 15 nov. 2002.

ALVAREZ-ORTEGA, N.; CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J. Low blood lead levels impair intellectual and hematological function in children from Cartagena, Caribbean coast of Colombia. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 44, p. 233–240, dez. 2017.

ASHRAF, M. W. Levels of Heavy Metals in Popular Cigarette Brands and Exposure to These Metals via Smoking. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–5, 2012.

ATTANZIO, A. et al. Increased eryptosis in smokers is associated with the antioxidant status and C-reactive protein levels. **Toxicology**, v. 411, p. 43–48, jan. 2019.

BARDYN, M.; TISSOT, J.-D.; PRUDENT, M. Oxidative stress and antioxidant defenses during blood processing and storage of erythrocyte concentrates. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 25, n. 1, p. 96–100, fev. 2018.

BENOWITZ, N. L.; BURBANK, A. D. Cardiovascular Toxicity of Nicotine: Implications for Electronic Cigarette Use. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 26, n. 6, p. 515–523, ago. 2016.

BETTS, K. S. CDC Updates Guidelines for Children’s Lead Exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 7, p. a268, jul. 2012.

BOEHM, R. E. et al. Smoking fewer than 20 cigarettes per day and remaining abstinent for more than 12 hours reduces carboxyhemoglobin levels in packed red blood cells for transfusion. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, 26 set. 2018.

CARSON, J. L. et al. Clinical Practice Guidelines From the AABB: Red Blood Cell Transfusion Thresholds and Storage. **JAMA**, v. 316, n. 19, p. 2025, 15 nov. 2016.

CARSON, J. L.; TRIULZI, D. J.; NESS, P. M. Indications for and Adverse Effects of Red-Cell Transfusion. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 13, p. 1261–1272, 28 set. 2017.

CARUSO, R. et al. Toxic Metal Concentrations in Cigarettes Obtained from U.S. Smokers in 2009: Results from the International Tobacco Control (ITC) United States Survey Cohort. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 1, p. 202–217, 20 dez. 2013.

D'ALESSANDRO, A. et al. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies: An omics update on RBC storage. **Transfusion**, v. 55, n. 1, p. 205–219, jan. 2015.

EHLERS, M. et al. Alarming Levels of Carboxyhemoglobin in Banked Blood. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 23, n. 3, p. 336–338, 1 jun. 2009.

EHLERS, M.; MCCLOSKEY, D.; DEVEJIAN, N. S. Alarming Levels of Carboxyhemoglobin in a Unit of Banked Blood. **Anesthesia & Analgesia**, v. 97, n. 1, p. 289, jul. 2003.

FDA, C. FOR B. E. AND. **Blood Safety & Availability - Keeping Blood Transfusions Safe: FDA's Multi-layered Protections for Donated Blood**. WebContent. Disponível em: <<https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/BloodSafety/ucm095522.htm>>. Acesso em: 9 dez. 2017.

FDA, C. FOR T. **Blood & Blood Products**. WebContent. Disponível em: <<https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/default.htm>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

FRANCHINI, M. et al. Red blood cell transfusion policy: a critical literature review. **Blood Transfusion**, v. 15, n. 4, p. 307–317, jul. 2017.

GEISS, O.; KOTZIAS, D. Tobacco, cigarettes and cigarette smoke. **Luxembourg: Institute for Health and Consumer Protection, Directorate-General Joint Research Centre**, p. 4–11, 2007.

GIRELLI, G. et al. Recommendations for transfusion therapy in neonatology. **Blood Transfusion**, v. 13, n. 3, p. 484, 2015.

GRANDJEAN, P.; LANDRIGAN, P. J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. **The Lancet**, v. 368, n. 9553, p. 2167–2178, 16 dez. 2006.

HESS, J. R. An update on solutions for red cell storage. **Vox Sanguinis**, v. 91, n. 1, p. 13–19, 2006.

HESS, J. R. Red cell storage. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 3, p. 368–373, jan. 2010.

HOLBROOK, B. D. The effects of nicotine on human fetal development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 108, n. 2, p. 181–192, 2016.

IARC, I. A. FOR R. IN C.; WHO, W. H. O. **Agents Classified by the IARC Monographs**, Volumes 1–120, 27 out. 2017. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php>. Acesso em: 9 dez. 2017

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (ED.). **Pesquisa nacional de saúde, 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas: Brasil, grandes regiões e unidades da Federação**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2014.

MALTA, D. C. et al. Risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey in capitals of Brazil, Vigitel 2014. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 238–255, 2015.

MARTÍ-CARVAJAL, A. J.; SIMANCAS-RACINES, D.; PEÑA-GONZÁLEZ, B. S. Prolonged storage of packed red blood cells for blood transfusion. In: THE COCHRANE COLLABORATION (Ed.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

MCROBB, C. et al. Carboxyhemoglobinemia in a pediatric cardiopulmonary bypass patient derived from a contaminated unit of allogenic blood. **Perfusion**, v. 26, n. 4, p. 302–307, jul. 2011.

METTA, S. et al. Impact of smoking on erythrocyte indices and oxidative stress in acute myocardial infarction. **Journal of Dr. NTR University of Health Sciences**, v. 4, n. 3, p. 159, 2015.

MIMICA, A. F. M. A. et al. A very strict guideline reduces the number of erythrocyte transfusions in preterm infants. **Vox Sanguinis**, v. 95, n. 2, p. 106–111, ago. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Caderno de Informação: Sangue e Hemoderivados**. Brasília, DF: Ministério da saúde, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para uso de Hemocomponentes**. 2. ed. Brasília, DF: Ministério da saúde, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de Setembro de 2017. — 4ª Câmara - Meio Ambiente e Patrimônio Cultural**. Arquivo. Disponível em: <<http://www.mpf.mp.br/atuacao-tematica/ccr4/dados-da-atuacao/projetos/qualidade-da-agua/legislacao/portarias/portaria-de-consolidacao-no-5-de-28-de-setembro-de-2017-1>>. Acesso em: 24 fev. 2019.

MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E.; RIFKIND, J. M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 28 fev. 2014.

NATIONAL CENTER FOR CHRONIC DISEASE PREVENTION AND HEALTH PROMOTION (US) OFFICE ON SMOKING AND HEALTH. **The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General**. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US), 2014.

NORTHROP-CLEWES, C. A.; THURNHAM, D. I. Monitoring micronutrients in cigarette smokers. **Clinica Chimica Acta**, v. 377, n. 1–2, p. 14–38, fev. 2007.

ONOR, I. O. et al. Clinical Effects of Cigarette Smoking: Epidemiologic Impact and Review of Pharmacotherapy Options. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 10, out. 2017.

ORHAN, H.; EVELO, C. T. A.; SAHIN, G. Erythrocyte antioxidant defense response against cigarette smoking in humans--the glutathione S-transferase vulnerability. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 19, n. 4, p. 226–233, 2005.

PAONE, G. et al. Transfusion of 1 and 2 units of red blood cells is associated with increased morbidity and mortality. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 97, n. 1, p. 87–93; discussion 93-94, jan. 2014.

R. C. DARLING, F. J. W. R. **THE EFFECT OF CARBON MONOXIDE ON THE OXYHEMOGLOBIN DISSOCIATION CURVE | American Journal of Physiology-Legacy Content**. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajplegacy.1944.141.1.17>>. Acesso em: 17 mar. 2019.

REDSANG-SIBRATEC, R. DE S. T. PARA SANGUE E HEMODERIVADOS. **Manual para controle de qualidade do sangue total e hemocomponentes**. 1. ed. São Paulo: [s.n.].

SANFORD, K. et al. Attenuation of Red Blood Cell Storage Lesions with Vitamin C. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, 12 jul. 2017.

SOLAK, Z. A. et al. Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 5, n. 3, p. 99–105, out. 2005.

SURJU PATEL, K. B. Neurologic complications of carbon monoxide intoxication. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 120, p. 971–979, 1 jan. 2014.

TALHOUT, R. et al. Hazardous Compounds in Tobacco Smoke. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 2, p. 613–628, fev. 2011.

TANTAWY, H. et al. Association of red blood cell transfusion and short- and longer-term mortality after coronary artery bypass graft surgery. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 32, n. 3, p. 1225–1232, 2018.

UEZIMA, C. L. et al. Redução da exposição a doadores de sangue em prematuros submetidos a transfusões de hemácias com uso de bolsas de transferência pediátricas. **Rev Paul Pediatr**, v. 31, n. 3, p. 285–92, 2013.

UGUREL, E. et al. Blood storage alters mechanical stress responses of erythrocytes. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 66, n. 2, p. 143–155, 2017.

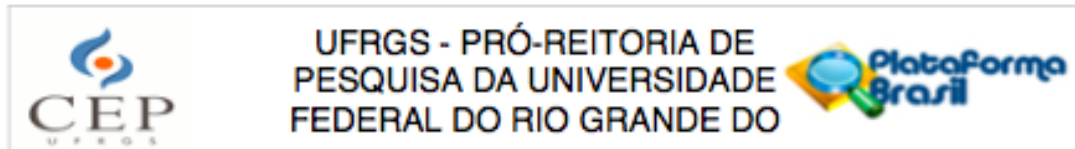
WANG, T. et al. The effects of heavy metals and their interactions with polycyclic aromatic hydrocarbons on the oxidative stress among coke-oven workers. **Environmental Research**, v. 140, p. 405–413, jul. 2015.

WHO, W. H. O. **WHO | 10 facts on blood transfusion**. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/blood_transfusion/en/>. Acesso em: 13 mar. 2019.

WHO, W. H. O. **Tobacco**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>>. Acesso em: 16 mar. 2019.

YOUSEF, S. et al. Learning disorder and blood concentration of heavy metals in the United Arab Emirates. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 6, n. 5, p. 394–400, out. 2013.

ANEXO A– PARECER DE PROJETO DE PESQUISA ENCAMINHADO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação toxicológica da qualidade do concentrado de hemácias proveniente de doadores tabagistas

Pesquisador: Rosane Gomez

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55786016.0.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.913.998

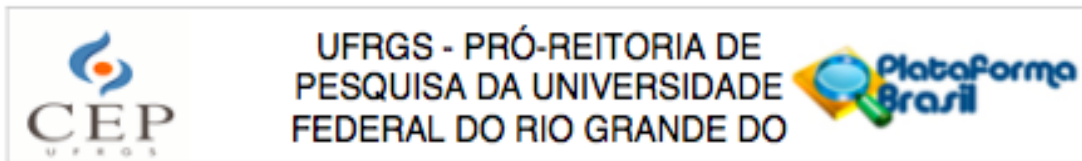
Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa que tem como pesquisador responsável Rosane Gomez, intitulado "Avaliação toxicológica da qualidade do concentrado de hemácias proveniente de doadores tabagistas" a ser executado de 03/2016 a 05/2019 e que pretende Avaliar os efeitos do ato de fumar sobre a qualidade do concentrado de hemácias entre doadores tabagistas do Bando de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob um ponto de vista toxicológico.

Como hipótese, os pesquisadores informam que "a bolsa de concentrado de hemácias de doadores fumantes apresenta maior concentração de metais pesados, marcadores de estresse oxidativo e inflamatórios do que bolsas oriundas de doadores não fumantes. Também, nas bolsas de doadores fumantes há um maior percentual de alterações morfológicas na hemácia quando comparadas aquelas de bolsas de não fumantes, comprometendo sua viabilidade e capacidade de transferência de oxigênio."

Foi apresentada uma fundamentação teórica bem estruturada, considerando aspectos relativos à qualidade dos insumos hemoterápicos, tabagismo e aspectos toxicológicos.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.913.998

Todo o projeto foi mantido idêntico à versão já aprovada por este CEP e tramita agora para emenda assim justificada pelo pesquisador: "Solicitamos autorização para coleta de urina dos pacientes participantes deste estudo. Essa alteração se faz necessária, pois não foi possível padronizar no laboratório parceiro a determinação da cotinina no concentrado de hemácias, como planejado no projeto original, estando já padronizada a determinação na urina. A análise da cotinina é importante, pois como um metabólito da nicotina, utilizado como biomarcador do consumo, será possível estabelecer correlação matemática entre concentração de cotinina na urina e de carboxihemoglobina no concentrado de hemácias, respaldando nossa hipótese de que há necessidade de intervalo mínimo de abstinência para doação de sangue por fumantes."

Para a coleta de urina, os pesquisadores informam que "após a entrevista, durante o tempo de espera para a doação, será ofertado um frasco descartável para coleta de urina para que o doador colete cerca de 20 mL. Deste frasco será transferida uma alíquota de 4 mL de urina para tubo falcon, armazenada em Freezer - 20° para posterior análise de cotinina."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para esta tramitação, foi apresentado projeto modificado, carta de justificativa para emenda, TCLE modificado.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais. Lembramos que cabe ao pesquisador adequação às normas do HCPA para posterior avaliação daquele CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda ao projeto de pesquisa encontra-se em condições de aprovação, de acordo com os aspectos éticos (CNS Resolução 466/12).

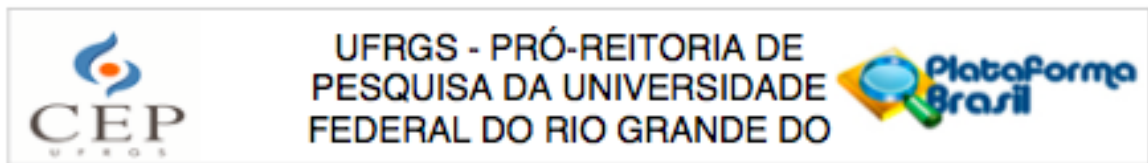
Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--------------------------------------|---------------------|---------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_772580 E1.pdf | 28/12/2016 14:27:42 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projetoemenda281216.docx | 28/12/2016 12:50:58 | Renata Eliane Boehm | Aceito |

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.913.998

| | | | | |
|---|-----------------------|------------------------|------------------------|--------|
| Outros | CartaEmenda281216.pdf | 28/12/2016 12:48:40 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEemenda281216.pdf | 28/12/2016 12:47:27 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| Outros | questionario.docx | 03/05/2016 23:43:21 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | DeclaracaoHCPA.pdf | 03/05/2016 23:40:51 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx | 03/05/2016 23:38:52 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| Outros | parecerppgft.pdf | 03/05/2016 23:36:49 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projeto.docx | 03/05/2016 23:35:19 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaderosto.pdf | 03/05/2016 23:26:45 | Renata Eliane Boehm | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 09 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Farrroupilha CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br

ANEXO B– PARECER DE PROJETO DE PESQUISA ENCAMINHADO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – HCPA

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação toxicológica da qualidade do concentrado de hemácias proveniente de doadores tabagistas

Pesquisador: Rosane Gomez

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55786016.0.3001.5327

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.942.052

Apresentação do Projeto:

Emenda submetida em 28/12/2016 visa alterar a metodologia.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da presente emenda é alterar a metodologia de análise da cotinina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A presente emenda não altera a avaliação de riscos e benefícios anteriormente realizada para este projeto. Apresenta o adicional desconforto informado no TCLE pela coleta de urina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Alterações propostas pela emenda:

"Solicitamos autorização para coleta de urina dos pacientes participantes deste estudo. Essa alteração se faz necessária, pois não foi possível padronizar no laboratório parceiro a determinação da cotinina no concentrado de hemácias, como planejado no projeto original, estando já padronizada a determinação na urina. A análise da cotinina é importante, pois como um metabólito da nicotina, utilizado como biomarcador do consumo, será possível estabelecer correlação matemática entre concentração de cotinina na urina e de carboxihemoglobina no

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

Bairro: Bom Fim

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL**



Continuação do Parecer: 1.842.052

concentrado de hemácias, respaldando nossa hipótese de que há necessidade de intervalo mínimo de abstinência para doação de sangue por fumantes.

Portanto, solicito apreciação do Comitê de Ética e replicação à Instituição Coparticipante da nova versão do Projeto de Pesquisa e Termo de Consentimento Livre Esclarecido apontando necessidade de coleta de urina dos participantes. As mudanças no texto estão destacadas em vermelho (pg 12 e 13 do projeto).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram adicionados os seguintes documentos:

Nova versão do projeto (28/12/2016)

Nova versão do TCLE (28/12/2016).

Carta de apresentação da emenda.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda submetida em 28/12/2016, aprova nova versão do projeto (28/12/2016 e TCLE (28/12/2016).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--------------------------------------|------------------------|---------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_772580_E1.pdf | 28/12/2016 14:27:42 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projetoemenda281216.docx | 28/12/2016 12:50:58 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| Outros | CartaEmenda281216.pdf | 28/12/2016 12:48:40 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEemenda281216.pdf | 28/12/2016 12:47:27 | Renata Eliane Boehm | Aceito |

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

Bairro: Bom Fim

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL**



Continuação do Parecer: 1.842.052

| | | | | |
|--|--------------------|------------------------|------------------------|--------|
| Outros | questionario.docx | 03/05/2016 23:43:21 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | DeclaracaoHCPA.pdf | 03/05/2016 23:40:51 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx | 03/05/2016 23:38:52 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| Outros | parecerppgft.pdf | 03/05/2016 23:36:49 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projeto.docx | 03/05/2016 23:35:19 | Renata Eliane Boehm | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaderosto.pdf | 03/05/2016 23:26:45 | Renata Eliane Boehm | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 16 de Fevereiro de 2017

**Assinado por:
José Roberto Goldim
(Coordenador)**

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cephcpa@hcpa.edu.br

ANEXO C– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar da Pesquisa “**Avaliação toxicológica da qualidade do concentrado de hemácias proveniente de doadores tabagistas**” sob responsabilidade dos pesquisadores MSc. Renata Eliane Boehm, Dra. Rosane Gomez e Dr. Tor Gunnar Hugo Onsten.

1. Por que realizar esse estudo e qual o objetivo dele?

Atualmente, pouco se sabe sobre o hábito de fumar e as consequências sobre a qualidade do sangue doado. Este trabalho tem como objetivo realizar alguns testes para observar se fumar pode alterar a qualidade do sangue doado. Vamos avaliar as substâncias que estão presentes no sangue doado para avaliar se poderiam causar algum prejuízo a pacientes que recebem transfusão.

2. Qual o procedimento que será utilizado?

Ao aceitar participar dessa pesquisa, será feita uma entrevista incluindo perguntas sobre sua escolaridade, exposição ao cigarro e hábito de fumar, a ser respondido enquanto o Sr. (a) aguarda para realizar a doação de sangue. Isso não tomará mais do que dez minutos do seu tempo. Além disso, será solicitada uma amostra de urina (20 mL, o que corresponde até metade de um frasco de coleta de urina). Não é necessária nenhuma preparação para a coleta de urina. Quando chegar a sua vez de doar, uma pessoa treinada realizará o procedimento normal de coleta de sangue para doação. Será coletado um tubo a mais (cerca de 5 mL) de sangue juntamente com os outros tubos rotineiramente coletados durante a sua doação. Da sua bolsa de sangue será retirada uma pequena amostra para realização de testes toxicológicos. As amostras neste estudo serão identificadas somente com os números de sua doação, sendo os seus dados de identificação mantidos em sigilo.

3. O que acontecerá com a bolsa de sangue que doe e com as amostras coletadas?

Após a retirada da amostra da bolsa de sangue que você doou, sua bolsa de sangue será processada assim como as demais e será usada para transfusão como qualquer outra bolsa de sangue doado. Aquela pequena amostra de sangue que separamos, nós vamos guardar para avaliarmos os constituintes do sangue. Após o término do estudo, as amostras coletadas serão descartadas.

4. O que acontecerá com os dados por mim fornecidos a partir da entrevista?

Os dados fornecidos serão usados para correlacionar as informações com os

resultados obtidos nos exames do sangue, pois informações como a idade, tempo de tabagismo e número de cigarros fumados por dia são importantes informações no momento de avaliar essas medidas. Sua amostra será identificada apenas por um número, permitindo o cruzamento dos dados fornecidos com os resultados dos testes no sangue doado. Este documento ficará arquivado por cinco anos em poder dos pesquisadores responsáveis, garantindo ao participante completa confidencialidade.

5. Quais os riscos em participar?

Não são previstos riscos adicionais, uma vez que, como doador voluntário, já lhe foi descrito quais os riscos de qualquer doação de sangue rotineira. O que vamos fazer é somente coletar uma pequena porção do sangue da sua doação. Poderá haver desconforto com a coleta de urina, no entanto será fornecido material descartável para realizar a coleta.

6. Quais os meus benefícios ao participar deste estudo?

A partir desta pesquisa, pretendemos saber se o ato de fumar poderia interferir sobre a qualidade do sangue doado. Nunca se sabe quem ou quando alguém precisará receber uma doação de sangue, portanto, como o objetivo deste trabalho é aumentar a segurança/qualidade transfusional esta pesquisa poderá trazer benefícios futuros para todos os usuários da saúde pública inclusive para o próprio participante.

7. Com quem posso esclarecer minhas dúvidas?

Você ficará com uma via desse Termo de Consentimento e toda a dúvida que você venha a ter a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para o médico responsável pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Dr. Tor Gunnar Hugo Onsten, colaborador desse estudo no HCPA, pelo telefone (51) 3359-7650 ou Dra. Rosane Gomez, pesquisadora responsável pelo estudo na UFRGS (51)33083121. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA (51) 3359-7640, 2o andar, sala 2227 e/ ou CEP da UFRGS (51) 3308-3738, Sala 317 Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro das 8 às 17 horas.

8. Quais são os meus direitos?

A sua participação nesta pesquisa é voluntária. Caso você decida não participar, isto não afetará o tratamento normal que você tem direito como doador. Além disso, você tem liberdade para abandonar a pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo, devendo apenas contatar os responsáveis pelo estudo. Será garantido o anonimato de seus registros médicos e eles serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo serão usados para fins científicos e você não será identificado pelo nome, ou qualquer outro dado

que comprometa sua privacidade. Você não terá nenhum gasto e igualmente, nenhum tipo de pagamento pela sua participação nesta pesquisa.

Com base no que me foi informado acima, declaro que estou ciente dos objetivos dessa pesquisa de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito do procedimento e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa. A pesquisadora responsável certificou-me de que todos os dados deste estudo serão confidenciais, bem como o meu tratamento como doador não será modificado caso eu me recuse de participar dessa pesquisa.

Declaro ainda que recebi cópia do presente termo de consentimento.

Nome do Participante _____ Assinatura _____

Nome do Pesquisador _____ Assinatura _____

Local e Data _____

**ANEXO D- QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DOADORES
FUMANTES E NÃO FUMANTES DO BANCO DE SANGUE DO HCPA**

- 1) Idade: _____
- 2) Peso: _____ N.Doador/ bolsa: _____
- 3) Altura: _____
- 4) Qual cidade você mora _____
- 5) Qual o seu grau de escolaridade?
 Ensino fundamental incompleto (antigo 1ª a 8ª série)
 Ensino fundamental completo
 Ensino médio incompleto (antigo 2º grau)
 Ensino médio completo
 Ensino superior incompleto
 Ensino superior completo
- 6) Sexo : Feminino Masculino
- 7) Estado Civil: Solteiro Casado Separado Viúvo
- 8) Qual sua ocupação (emprego/ trabalho)? _____
- 9) Nesse local de trabalho, você convive com poluentes ambientais como fumaça do cigarro, de máquinas, da queima de lenha/carvão, de automóveis ou outros?
 Não Sim = sublinhe a opção acima ou descreva quais:

- 10) Qual seu regime de trabalho?
 tempo integral (40h/semana ou mais) tempo parcial (20-30h/semana)
 sou autônomo e trabalho em média _____ horas dia ou _____ dias por semana
- 11) Faz atividade física regular? sim não/ Qual? _____
- 12) Toma chimarrão? sim não / Frequência _____
- 13) Toma suplementos vitamínicos? sim/ não/ Qual? _____
- 14) Você fuma?
 Sim Não = caso selecione a opção “não”, vá para a questão 21
- 15) Há quanto tempo você fuma? _____
- 16) Você fuma: Ocasionalmente Diariamente

17) Se fuma diariamente, quantos cigarros você costuma fumar por dia?

- 1 a 10
 11 a 20
 21 a 30
 31 a 40
 Mais de duas carteiras

18) Qual é a marca do cigarro que você geralmente fuma

- Derby Hollywood Dunhill Carlton Marlboro
 Lucky Strike Hilton L&M Free
 Ritz Gudang Outra _____

19) Quanto tempo faz que você fumou o último cigarro?

- Menos de meia hora
 1 hora
 2 horas
 3 horas
 12 horas
 Mais que doze horas

20) Você já tentou parar de fumar?

- Sim Não

21) Convive com /outro fumante?

- Sim Não

22) Quantas vezes você já doou sangue?

- Esta foi a primeira vez
 Até três vezes
 Mais que três vezes

23) Se você já doou sangue, lembra-se de ter se sentido mal enquanto doava ou depois de doar sangue?

- Não
 Sim /enquanto doava O que você sentiu? _____
 Sim / depois de doar O que você sentiu? _____