LILIAN SAYURI TATIBANA FUJIMURA

**Avaliação da qualidade *in vitro* do concentrado de
hemácias felino colhido e armazenado em sistema
manufaturado**

São Paulo
2013

LILIAN SAYURI TATIBANA FUJIMURA

**Avaliação da qualidade *in vitro* do concentrado de
hemácias felino colhido e armazenado em sistema
manufaturado**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Denise Tabacchi Fantoni

São Paulo
2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2751
FMVZ

Fujimura, Lilian Sayuri Tatibana

Avaliação da qualidade *in vitro* do concentrado de hemácias felino colhido e armazenado em sistema manufaturado / Lilian Sayuri Tatibana Fujimura. -- 2013.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni.

1. Concentrado de hemácias felino. 2. Transfusão. 3. Gato. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Controle de qualidade e avaliação das lesões de armazenamento do sangue total felino armazenado pelo HOVET-FMVZ-USP", protocolado sob o nº 2309/2011, utilizando 30 (trinta) felinos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/9/2011.

We certify that the Research "Quality control and evaluation of the lesions of storage of whole blood stored feline at HOVET-FMVZ-USP", protocol number 2309/2011, utilizing 30 (thirty) cats, under the responsibility Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/21/2011.

São Paulo, 8 de novembro de 2011.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FUJIMURA, Lilian Sayuri Tatiabana.

Título: Avaliação da qualidade *in vitro* do concentrado de hemácias felino colhido e armazenado em sistema manufaturado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __ / __ / ____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação
ao meu amor Eduardo,
aos meus pais Carlos e Luiza,
ao meu querido irmão Marcelo
e aos meus filhos Passarinho e Nhoc.

AGRADECIMENTOS

À professora Doutora Denise Tabacchi Fantoni por ter aceito me orientar e me deixar fazer parte de sua equipe no Banco de Sangue. Agradeço muito pela oportunidade, pela confiança, esforço e motivação que sempre transmitiu.

A meus pais e a meu querido irmão por todo amor, sacrifício e incentivo que me dedicaram sempre.

Ao Eduardo, meu companheiro de todas as horas. Meu amor, meu amigo, agradeço por estar sempre ao meu lado com paciência, palavras de motivação e ânimo.

Agradeço imensamente à Bianca, minha grande amiga, por acreditar comigo sempre. Pelo auxílio em todos os momentos difíceis, pelas mensurações laboratoriais e principalmente pela vontade de ajudar, de alguma forma.

A Silvia, pela amizade, dedicação, carinho e incentivo sempre presentes.

À todos os professores, amigos e colegas da FMVZ-USP que apoiaram este estudo: Ludmila, Karin, Selene, Professora Simone, Terezinha, Renata, Vinícius, Luciana, Márcia, Miron, Samira, Zenaide, Gisele, Professora Aline, Clara, Elza Faquim.

Ao Zé (famoso “primo do Dú”) por tanta paciência, disponibilidade em meio à tantos afazeres, dedicação em ensinar e ajudar. Me salvou com o atp...

A todos os meus professores, que contribuíram para minha formação profissional e também pessoal. Professora Patrícia Mendes Pereira, por me apresentar a área de hemoterapia de forma tão fascinante. Admiro sua paixão pelo que faz, dedicação e amor aos animais e pelo espírito de equipe que motiva no banco de sangue. Professor Rubens Carneiro, Professor Júlio Cambraia, Professora Adriane (“Tia”), Doutora Gleidice. Carrego todos os ensinamentos. Vocês são constantemente lembrados por mim, com muita saudade.

À Mari, tio Satiro e Fernanda pelo apoio de sempre.

À Kelly, Natália, Maria Cristina, Bianca (de novo), Daniela por colaborarem com seus queridos gatos doadores.

Agradeço a Deus, por me iluminar e guiar sempre. Por ter conseguido, com a ajuda de todos vocês, realizar este estudo que considero muito importante.

RESUMO

FUJIMURA, L. S. T. **Avaliação da qualidade *in vitro* do concentrado de hemácias felino colhido e armazenado em sistema manufaturado.** [Evaluation of the *in vitro* quality of the feline packed red blood cells collected and stored in manufactured system]. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Esse estudo teve por objetivo avaliar a viabilidade e qualidade *in vitro* do concentrado de hemácias felino (CHF), colhido e armazenado em bolsas e produtos nacionais, remanufaturadas, pelo Laboratório de Hemoterapia do Serviço de Anestesia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, de acordo com normas definidas por órgãos regulamentadores como a ANVISA. Foram analisados parâmetros bioquímicos e hematológicos de 24 unidades de CHF nos dias 0, 14 e 21 de armazenamento. Utilizou-se sistema fechado para colheita e armazenamento do sangue com solução de anticoagulante-preservativa CPDA-1. A avaliação consistiu na mensuração de porcentagem de hematócrito, hemoglobina total, hemoglobina extracelular, porcentagem de hemólise, concentrações de potássio, lactato, glicose, ATP, pH, bicarbonato, pressão de CO₂ e O₂, inspeção visual da bolsa e cultura microbiológica aeróbia e anaeróbia. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio de testes paramétricos, sendo que as determinações de hematócrito, hemoglobina total não apresentaram variação significativa nos 21 dias de preservação, enquanto os de potássio, lactato, pO₂ aumentaram gradativamente de forma significativa. Os níveis de ATP, glicose, pH, bicarbonato e pCO₂ reduziram de forma significativa com o decorrer do tempo. Não houve alteração à inspeção visual das bolsas de sangue, nem crescimento de microorganismos nas culturas realizadas. Por meio destas avaliações constatou-se que o sistema remanufaturado com produtos nacionais pode ser empregado com segurança para obtenção de sangue felino tendo-se em vista que se manteve estéril, com eficiente conservação do concentrado de hemácias felino em CPDA-1 até o 21º dia de armazenamento.

Palavras-chave: Concentrado de hemácias felino. Transfusão. Gato.

ABSTRACT

FUJIMURA, L. S. T. **Evaluation of the *in vitro* quality of the feline packed red blood cells collected and stored in manufactured system.** [Avaliação da qualidade *in vitro* do concentrado de hemácias felino colhido e armazenado em sistema manufaturado]. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

This study aimed to evaluate the feasibility and quality of *in vitro* feline packed red blood cells (CHF), harvested and stored in bags and domestic products, manufactured, Hematology Laboratory at the Department of Anesthesia, Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo, according to standards set by regulatory bodies such as ANVISA. Were analyzed biochemical and hematological parameters 24 units of CHF on days 0, 14 and 21 of storage. We used a closed system for collection and storage of blood with preservative-anticoagulant solution CPDA-1. The evaluation consisted in measuring percentage of hematocrit, total hemoglobin, extracellular hemoglobin, percentage of hemolysis, potassium concentrations, lactate, glucose, ATP, pH, bicarbonate, CO₂ and O₂ pressure, visual inspection of the bag and aerobic and anaerobic microbiological culture. The results were statistically analyzed using parametric tests, and determinations of hematocrit, total hemoglobin showed no significant variation within 21 days of preservation, while potassium lactate, pO₂ gradually increased significantly. ATP levels, glucose, pH, pCO₂ and bicarbonate decreased significantly with time. There was no change to the visual inspection of blood bags, or growth of microorganisms in the cultures performed. Through these evaluations it was found that the system refilled with domestic products can be used safely for obtaining blood feline bearing in mind that remained sterile, efficient storage of red blood cells feline in CPDA-1 until the 21th days of storage.

Keyword: Feline packed red blood cells. Transfusion. Cat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Sistema remanufaturado para colheita e armazenamento de sangue felino.....	32
Figura 2 -	Separação dos componentes sanguíneos com auxílio de extrator de plasma.....	35
Figura 3 -	Bolsas de concentrado de hemácias felino.....	35
Figura 4 -	Sistema Hemobac Trifásico Pediátrico Aeróbio.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Determinações de hematócrito (%), São Paulo, 2012.....	45
Tabela 2 -	Determinações de hemoglobina total (g/dL), São Paulo, 2012.....	46
Tabela 3 -	Determinações de hemoglobina extracelular (g/dL), São Paulo, 2012.....	48
Tabela 4 -	Determinações da taxa de hemólise, São Paulo, 2012.....	49
Tabela 5 -	Determinações de glicose extracelular (mg/dL), São Paulo, 2012.....	51
Tabela 6 -	Determinações de ATP, São Paulo, 2012.....	52
Tabela 7 -	Determinações de lactato (mmol/L), São Paulo, 2012.....	53
Tabela 8 -	Determinações de potássio (mmol/L), São Paulo, 2012.....	54
Tabela 9 -	Determinações de PCO ₂ (mmHg), São Paulo, 2012.....	56
Tabela 10 -	Determinações de bicarbonato (mmol/L), São Paulo, 2012.....	57
Tabela 11 -	Determinações de pH, São Paulo, 2012.....	58
Tabela 12 -	Determinações de bicarbonato (mmol/L), São Paulo, 2012.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Reagentes utilizados para determinação de curva padrão de ATP.....	39
Quadro 2 -	Reagentes utilizados para determinação de ATP.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3 DPG	2,3 Difosfoglicerato
A ₁	Meio de reação – ATP
A ₂	Reação com adição de HK
AABB	American Association of Blood Banks
ACD	Solução aditiva contendo: adenina, citrato e dextrose
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina 5'trifosfato
CHF	Concentrado de hemácias felino
Cl ⁻	Ânion cloreto
CNH	Comissão Nacional de Hemoterapia
CPD	Solução aditiva contendo: citrato, fosfato e dextrose
CPDA-1	Solução aditiva contendo: citrato, fosfato, dextrose e adenina
DEHP	Plastificante dietilepil-ftalato
Dil.	Diluição
FDA	Food and drug administration
FeLV	Leucemia viral felina
FIV	Imunodeficiência viral felina
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
gHb	Gramas de Hemoglobina
Hb	Hemoglobina total
Hbe	Hemoglobina extracelular
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HK	Hexoquinase
Ht	Hematócrito
IL	Interleucina
Imid HCl	Tampão imidazol em ácido clorídrico
K ⁺	Potássio
K ₂ CO ₃	Carbonato de potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Na	Sódio
NADP	Nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato
PCO ₂	Pressão de dióxido de carbono
PO ₂	Pressão de oxigênio
PVC	Polivinil cloreto
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SAGM	Solução aditiva contendo: salina, adenina, glicose e manitol
SPS	Polianetol-sulfonato de sódio
V.F.	Volume final

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 HISTÓRICO DA DA HEMOTERAPIA.....	19
2.2 METABOLISMO DAS HEMÁCIAS E LESÕES DE ARMAZENAMENTO.....	20
2.2.1 Alterações na forma das hemácias.....	21
2.2.2 Transporte de oxigênio	22
2.2.3 Contaminação bacteriana.....	23
2.2.4 Acúmulo de citocinas	24
2.3 PRESERVAÇÃO DOS ERITRÓCITOS	25
2.3.1 Armazenamento das células sanguíneas.....	25
2.3.2 Anticoagulantes e preservativos	26
2.3.3 Sistemas de colheita e armazenamento de sangue felino	28
2.4 CONTROLE DE QUALIDADE NA HEMOTERAPIA.....	29
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 DOADORES	31
4.2 PREPARO DO SISTEMA PARA COLHEITA E ARMAZENAMENTO DE SANGUE FELINO.....	31
4.2.1 Procedimento técnico de preparo do sistema para colheita e armazenamento de sangue felino.....	31
4.2.2 Anticoagulante e preservante	32
4.2.3 Introdução do anticoagulante e preservante no kit de colheita.....	32
4.3 COLHEITA DE SANGUE.....	33
4.3.1 Exames pré-colhetia de sangue.....	33
4.3.2 Sedação	33
4.3.3 Procedimento de colheita de sangue.....	33
4.3.4 Volume de sangue colhido	34
4.3.5 Reposição volêmica do doador.....	34
4.4 SEPARAÇÃO DO SANGUE EMHEMOCOMPONENTE	34
4.5 ARMAZENAMENTO DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS	35
4.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS HEMÁCIAS <i>IN VITRO</i>	36

4.6.1 Inspeção visual do concentrado de hemácias	36
4.6.2 Determinação do hematócrito.....	36
4.6.3 Determinação da hemoglobina total	37
4.6.4 Determinação da hemoglobina extracelular.....	37
4.6.5 Porcentagem de hemólise	37
4.6.6 Determinação da glicose extracelular	38
4.6.7 Determinação do ATP	38
4.6.7.1 Preparo do extrato – Desproteínização do sangue.....	38
4.6.7.3 Determinação da curva padrão	38
4.6.7.3 Determinação da concentração de ATP.....	39
4.6.8 Determinação de lactato	41
4.6.9 Determinação do potássio do meio extracelular.....	41
4.6.10 Análise microbiológica.....	41
4.6.11 Hemogasometria	42
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Volume de sangue colhido	44
5.2 Volume dos concentrados de hemácias felino.....	44
5.3 Inspeção visual do concentrado de hemácias	44
5.4 Determinação do hematócrito.....	44
5.5 Determinação da concentração de hemoglobina total	46
5.6 Determinação da hemoglobina extracelular	47
5.7 Porcentagem de hemólise	48
5.8 Determinação da glicose extracelular.....	50
5.9 Determinação do ATP.	51
5.10 Determinação de lactato	53
5.11 Determinação do potássio do meio extracelular.....	54
5.12 Análise microbiológica.....	55
5.13 Hemogasometria.....	55
5.13.1 Concentração de PCO_2	55
5.13.2 Concentração de bicarbonato.....	56
5.13.3 Concentração de pH.....	57
5.13.4 Concentração de PO_2	59
6 DISCUSSÃO	60

7 CONCLUSÃO.....	70
8 REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

A população felina vem crescendo em uma velocidade significativa em diversos países do mundo, incluindo o Brasil (ANDERLINE, 2007). Este fato se deve, especialmente, à sua adaptação em apartamentos e casas pequenas. Nos Estados Unidos, 23% dos domicílios têm, ao menos, um gato. Em vários países da Europa, a quantidade de gatos aumentou em tamanha proporção que ultrapassou a população de cães (BEAVER, 2005).

Frente a esta situação, a qualidade dos serviços na Medicina Veterinária vem se desenvolvendo muito. Isso porque além do crescimento da população felina, nota-se um aumento da disposição desses proprietários com relação à busca de tratamento adequado e especializado para seus gatos (WEINGART; GIGER; KOHN, 2004).

Atualmente, a transfusão sanguínea já é bem reconhecida como forma de terapia na Medicina Veterinária (WARDROP, 1995), no entanto, a medicina transfusional veterinária relacionada aos felinos não tem crescido tanto quanto à área voltada aos caninos no Brasil. Isso pode ser demonstrado pela dificuldade apresentada tanto para colheita, quanto armazenamento do sangue felino, visto que bolsas de sangue apropriadas para esta espécie não estão disponíveis comercialmente. Recentemente, foi realizada a implantação do primeiro hemocentro universitário para felinos, com fracionamento do sangue total, no hospital veterinário da Universidade de São Paulo, seguindo padrões de qualidade de forma semelhante aos modelos internacionais já existentes. Através do projeto de implantação do banco de sangue felino, foi padronizada a colheita de sangue realizada com bolsas humanas pediátricas importadas (com capacidade menor para colheita de sangue) remanufaturadas, com método semelhante ao utilizado pelo banco de sangue da Universidade da Pensilvânia (SPRINGER et al., 1998).

Visando a continuidade das pesquisas realizadas na medicina transfusional felina, o presente estudo objetivou avaliar a viabilidade e qualidade pré-transfusional do concentrado de hemácias felino, colhido e armazenado em bolsas e produtos nacionais, remanufaturadas por método semelhante ao utilizado pelo banco de sangue da Universidade da Pensilvânia, pelo Serviço de Banco de Sangue da Universidade de São Paulo, de acordo com normas definidas por órgãos regulamentadores como a ANVISA. Espera-se que com o desenvolvimento e aprimoramento deste sistema de colheita e armazenamento de sangue felino com materiais nacionais, ocorra um grande avanço na medicina transfusional veterinária felina no Brasil, com implantação de bancos de sangue para esta espécie e realização de mais pesquisas na área.

Com o aparecimento de bancos de sangue felino no país, assim como os cães, os felinos poderão receber tratamento hemoterápico mais adequado, com utilização de componentes sanguíneos como o concentrado de hemácias e o plasma fresco congelado. Além disso, através da colheita de sangue em sistema fechado, será possível aguardar resultados para testes de doenças infecciosas felinas, antes do uso do componente sanguíneo, reduzindo o risco de transmissão de agentes infecciosos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA HEMOTERAPIA

Os relatos a respeito da utilização do sangue como elemento de cura são conhecidos desde a Idade Média (HOSGOOD, 1990), contudo, o estabelecimento do que viria a ser a base da hemoterapia tem início no século XVII quando ocorrem as primeiras citações sobre transfusão sanguínea heteróloga visando alterar o comportamento do receptor (HOSGOOD, 1990).

Com a ocorrência da Primeira e Segunda Guerra Mundial houve maior desenvolvimento da área, com o aparecimento de bancos de sangue em larga escala, visto que nesta fase da história fez-se necessário possuir reservas de sangue para socorrer os pacientes em situação de emergência (LANEVSKI; WARDROP, 2001). Assim, ocorreu grande progresso científico com desenvolvimento de conhecimentos a respeito dos tipos sanguíneos, do fator Rh, do emprego de anticoagulantes, dos equipamentos adequados para colheita, processamento e transfusão do sangue, bem como das indicações e contra-indicações da hemoterapia (PACHECO, 2003). Atualmente, a terapia com componente sanguíneo adequado proporciona um tratamento mais eficaz e o uso mais completo dos produtos sanguíneos (HARMENING-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992).

Na Medicina Veterinária, a busca de informações anteriores ao século XVIII sobre transfusões sanguíneas entre animais são consideradas escassas (HOSGOOD, 1990). O primeiro banco de sangue veterinário criado foi o Animal Blood Bank, em 1950, especializado em felinos, dando início aos estudos realizados nos últimos 50 anos que mais contribuíram para servir de base à transfusão sanguínea entre animais (ULATA, 2005). Nas últimas décadas, a hemoterapia veterinária vem progredindo bastante, sendo a transfusão sanguínea correntemente utilizada (GRIOT-WENK; GIGER, 1995). No Brasil, destacam-se os bancos de sangue de instituições públicas, como o da Universidade de São Paulo, tendo seus trabalhos iniciados por Ulata e Gonçalves no ano de 2005, que realizaram a padronização do fracionamento sanguíneo canino; e o da Universidade Estadual de Londrina com o início de seus projetos em 1998 (PEREIRA et al., 2002).

A instituição de bancos de sangue veterinários é importante para garantir o padrão de qualidade dos hemocomponentes de forma que o clínico disponha de material seguro para hemoterapia quando houver necessidade. Para isto, os Bancos de Sangue Veterinários devem

seguir as recomendações de órgãos regulamentadores como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a American Association of Blood Banks (AABB)

2.2 METABOLISMO DAS HEMÁCIAS E LESÕES DE ARMAZENAMENTO

Três áreas do metabolismo do eritrócito são cruciais para a função e sobrevivência da hemácia normal: a membrana da hemácia, função e estrutura da hemoglobina e fontes de energia celulares (HARMENING-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992). Desta forma, qualquer alteração em um desses três elementos, pode comprometer a viabilidade, ou seja, a sobrevivência eritrocitária *in vivo* após a transfusão (HARMENING-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992).

Os padrões vigentes da Food and Drug Administration (FDA), um dos órgãos regulamentadores da medicina transfusional, requerem que ao final do período de armazenamento aprovado, uma média de pelo menos 75% das células permaneçam viáveis na circulação 24h após a infusão e que a hemólise seja inferior a 1% (ZIMRIN; HESS, 2009). Entretanto, existem muitas outras mudanças que ocorrem durante o armazenamento dos glóbulos vermelhos que, no passado, não eram utilizadas como condições de licenciamento do sistema de armazenamento do sangue (ZIMRIN; HESS, 2009). Após as primeiras horas de armazenamento de uma bolsa de sangue, já ocorrem alterações tais como redução do pH, aumento dos níveis de lactato e perda do potássio intracelular. Decorridos alguns dias, observam-se redução de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), diminuição das concentrações de ATP e deformabilidade dos eritrócitos. Esses fenômenos causados pela depleção de nutrientes e acúmulo de resíduos que ocorrem no sangue armazenado, são conhecidos coletivamente como lesões de armazenamento (LION et al., 2010).

Assim, sabe-se que à medida que aumenta o período de armazenamento do sangue, decresce a viabilidade dos eritrócitos. Como resultado, considerou-se sempre que o sangue armazenado poderia ser empregado até um período limitado e pré-determinado (HARMENING-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992). Entretanto, cada vez mais aumenta a controvérsia entre aqueles que buscam o maior tempo de armazenamento das células vermelhas por razões logísticas e aqueles que têm preocupações com a segurança e a eficácia do sangue armazenado (ZIMRIN; HESS, 2009). A diferença entre uma unidade de sangue mais antiga de uma mais fresca ainda é um assunto de debate, mas, basicamente, o

armazenamento dos eritrócitos pode causar diminuição da capacidade de oxigenação, liberação de componentes prejudiciais (como hemoglobina livre, que pode atuar como uma fonte na circulação de espécies reativas de oxigênio ou quimiocinas), prejuízo na capacidade de circulação (por adesão à superfície endotelial e propriedades pró-inflamatórias) e aumentar o risco de supercrescimento bacteriano (ZIMRIN; HESS, 2009; LION et al., 2010). Estudos recentes sugerem que as lesões de armazenamento das hemácias influenciam negativamente a eficácia das transfusões e são responsáveis por aumento da morbidade e mortalidade, pela maior permanência dos pacientes no hospital, efeitos pró-inflamatórios e imunomoduladores, aumento das infecções e falência sistêmica de múltiplos órgãos (SCOTT; LECAR; ACKER, 2005).

No sangue estocado, os níveis de amônia também se elevam e eventualmente podem ser tóxicos para o paciente, precipitando ou piorando o quadro clínico de animais com encefalopatia hepática (GOMES, 2008). Segundo Pereira e Reichmann (2002), o sangue total e a papa de hemácias estocada por mais de 14 dias podem conter concentrações de amônia inaceitáveis para pacientes com doença hepática grave.

Outra questão que vem sendo estudada é a hipótese de aumento no risco de infecção bacteriana associada à presença de ferro nos concentrados de hemácias armazenados. Isso porque no plasma de concentrados de hemácias armazenados há acúmulo de ferro, não ligado à transferrina, que proporciona uma quantidade acentuada de ferro, em curto período de tempo, para o sistema monócito-macrófago do receptor após uma transfusão (HOD; SPITALNIK, 2011).

2.2.1 Alterações na forma das hemácias

A membrana da hemácia é livremente permeável à água e ânions; com troca maciça dos ânions cloreto (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-) através de um grande número de canais de troca formados pela proteína integral da membrana. Em contraste, a membrana da hemácia é relativamente impermeável aos cátions, sendo principalmente através do controle das concentrações intracelulares de sódio e potássio que o eritrócito mantém adequado volume e homeostase da água. O influxo passivo de sódio e potássio é controlado por bombas de cátions, dependentes de ATP. De maneira semelhante, o cálcio também é ativamente bombeado do interior do

eritrócito através de uma bomba catiônica cálcio-ATPase dependente de energia (WILLER; RIEDESEL, 1985).

As propriedades de permeabilidade da membrana da hemácia, bem como o transporte ativo de cátions, são cruciais para evitar a hemólise coloidosmótica e controlar o volume do eritrócito. Nas células depletadas de ATP ocorre o acúmulo excessivo de sódio e cálcio intracelulares, seguido da perda de potássio e água, resultando em uma célula rígida e desidratada, com perda da elasticidade (HARMENING-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992). Com esta diminuição da deformabilidade, as células vermelhas armazenadas não são capazes de promover oxigenação tecidual, visto que não conseguem atravessar o capilar (PRITTIE, 2003) e são rapidamente removidas pelo sistema reticuloendotelial (WILLER; RIEDESEL, 1985).

Visto a importância do ATP para a manutenção da permeabilidade da membrana e consequentemente, a sobrevivência da hemácia, a concentração de ATP após a estocagem tem sido usada para prever a viabilidade das hemácias *in vivo*, isto é, sua habilidade para circular normalmente após a transfusão. Parte das lesões de armazenamento é reversível após a transfusão, porém as transformações na estrutura da membrana e a perda da conformação são irreversíveis (BEUTLER; WOOD, 1969; VALERI; HIRSHI, 1969; WARDROP; YOUNG; WILSON, 1994).

As concentrações de potássio extracelular aumentam lentamente durante o armazenamento de concentrados de hemácias, devido a dissociação da bomba sódio-potássio da membrana. Para humanos, há risco de hipercalemia transitória durante as transfusões maciças com sangue armazenado por maior tempo e hemolisado. Em cães e gatos que possuem pouco potássio intracelular são menores as chances de provocar hipercalemia (HOHENHAUS, 2007).

2.2.2 Transporte de oxigênio

A principal função da hemoglobina é o transporte gasoso (oxigênio e dióxido de carbono); liberação e distribuição de oxigênio para os tecidos e facilitação da excreção de dióxido de carbono. O principal responsável pelo controle da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, para humanos e cães, é o fosfato orgânico da hemácia 2,3- difosfoglicerato (2,3-DPG) (HARMNIG-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992).

Em 1954, descobriu-se que durante o armazenamento do sangue, os níveis de 2,3-DPG tendem a diminuir, levando ao aumento da afinidade hemoglobina-oxigênio com menor liberação de oxigênio pela hemoglobina aos tecidos (WILLER; RIEDESL, 1985). As concentrações elevadas de 2,3-DPG estabilizam a molécula da hemoglobina na forma denominada deoxigenada, reduzindo, desta forma, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (HARMENING-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992). Após a transfusão, a taxa de restauração da 2,3 – DPG leva aproximadamente 48 horas (SCOTT; LECAK; ACKER, 2005), sendo influenciada pelo estado ácido-básico do receptor, metabolismo do fósforo e pelo grau de anemia (HARMENING-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992). Vale lembrar que para pacientes em condições clínicas críticas, este período de afinidade alterada pelo oxigênio é significativo (SCOTT; LECAK; ACKER, 2005). Entretanto, em gatos, a função e a viabilidade das células sanguíneas dependem principalmente da habilidade de gerar ATP através da glicólise anaeróbica. (GRIOT-WENK; GIGER, 1995). As hemácias felinas possuem baixas concentrações de 2,3-DPG, não sendo necessário 2,3-DPG para liberação de oxigênio, diferentemente dos cães (GRIOT-WENK; GIGER, 1995; WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995).

2.2.3 Contaminação bacteriana

Cerca de 1 em cada 30000 unidades de sangue humano armazenadas apresentam contaminação bacteriana em algum momento, mesmo com realização de leucoredução e armazenamento sob refrigeração (ZIMRIN ; HESS, 2009). A taxa de contaminação bacteriana encontrada nos concentrados de plaqueta humano é maior quando comparado à de concentrado de hemácias, mas em ambos os casos, o risco é maior se as células transfundidas estiverem ao final da meia-vida (HOGMAN; ENGSTRAND, 1998; KESSLER et al., 2010). Apesar da incidência de presença de bactéria nos concentrados de hemácias e plaquetas, estima-se que o risco de séria complicação séptica causada por transfusão destes hemocomponentes no homem seja um evento raro (HOGMAN; ENGSTRAND, 1998).

A contaminação dos hemocomponentes pode ocorrer devido a vários fatores, como falha na antisepsia da pele durante a venopunção dos doadores, entrada de ar durante a colheita de sangue, existência de bacteremia assintomática no doador e armazenamento do sangue em local inadequado. O reaproveitamento da bolsa de sangue, período de administração de

hemocomponente superior a 4 horas e a utilização de banhos-maria para aquecimento das bolsas frequentemente acarretam em contaminação do sangue (ABRAMS-OGG, 2000).

As bactérias mais isoladas em componentes armazenados em temperatura ambiente (concentrados de plaquetas) são as gram-positivas (*Staphylococcus* e *Streptococcus*) (HOHENHAUS, 2000). A maior parte das bactérias não sobrevive ao armazenamento em baixas temperaturas, mas os microorganismos *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcesans* e espécies de *Aeromonas* podem sobreviver, com crescimento lento, e causar séria complicação séptica no receptor (ZIMRIN; HESS, 2009). Bactérias gram-negativas (*Pseudomonas*, *Citrobacter* e coliformes) também podem ser isoladas de componentes sob refrigeração. A multiplicação bacteriana na bolsa leva ao consumo de oxigênio, resultando em desnaturação da hemoglobina e hemólise, ocasionando mudança de coloração na bolsa e formação de coágulos (HOHENHAUS, 2000), que podem ser observados em procedimento de inspeção rotineiro do banco de sangue (ZIMRIN; HESS, 2009).

Na medicina veterinária, as técnicas adequadas de assepsia são utilizadas bem como as de colheita, processamento e armazenamento dos hemocomponentes sanguíneos, entretanto, não há programas que avaliem levantamento de dados para se conhecer a porcentagem de contaminação bacteriana (KESSLER et al., 2010).

Em 1997, Hohenhaus, Drusin e Garvey relataram um surto de contaminação de 29 bolsas de sangue felino por *Serratia marcescens*. A bactéria foi identificada em um frasco de algodão embebido por álcool. Quinze unidades contaminadas foram administradas e quatro gatos foram a óbito.

2.2.4 Acúmulo de citocinas

Durante o armazenamento de unidades de sangue, há acúmulo de diversas substâncias bioativas, como lipídeos, fragmentos de membrana celular, citocinas pró-inflamatórias e outras substâncias imunomoduladoras (HO et al., 2003). Níveis elevados de IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa têm sido observados no plasma de hemocomponentes armazenados (WADHWA et al., 2000), e em algumas unidades, estes níveis são suficientemente elevados para causar uma resposta inflamatória sistêmica (HO et al., 2003).

Muitos estudos têm demonstrado que os leucócitos são parcialmente responsáveis pela geração de citocinas em hemocomponentes armazenados e que, à partir das primeiras 48 a 72

horas de armazenamento, já ocorre apoptose em granulócitos e linfócitos (CÔTÉ, 2002). A liberação do conteúdo interno dos glóbulos brancos pode estar relacionada com alguns efeitos adversos causados pela transfusão sanguínea, tais como reação febril não-hemolítica e à resposta imune em pacientes politransfundidos (CÔTÉ, 2002). Em suma, o mecanismo predominante para o efeito pró-inflamatório resultante da transfusão de hemocomponente armazenado reside na interação entre as substâncias bioativas presentes no sangue estocado e células do sistema imunológico do organismo (ESCOBAR et al., 2007).

Além dos efeitos adversos causados pela transfusão sanguínea, os glóbulos brancos presentes nos hemocomponentes armazenados também podem ter um efeito direto na integridade da hemácia. Leucorredução das células vermelhas pré-armazenamento demonstrou redução na hemólise e na liberação de potássio intracelular (BUTTNEROVA; BAUMLER; KERN, 2001).

2.3 PRESERVAÇÃO DOS ERITRÓCITOS

2.3.1 Armazenamento das células sanguíneas

Atualmente, o sangue é preferencialmente armazenado em bolsas plásticas de cloreto de polivinil (PVC) com o plastificante dietilepil-ftalato (DEHP), contendo soluções anticoagulantes-preservantes (HESS, 2010). Isto porque o armazenamento em bolsas plásticas facilita a preparação dos componentes, não quebra facilmente, e reduz indução da ativação das plaquetas e fatores de coagulação quando comparado ao armazenamento do sangue em seringas ou frascos de vidro (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995). Além disso, o armazenamento de sangue em bolsas plásticas, suficientemente permeáveis, permite troca de gases (liberação de dióxido de carbono e aumento da oxigenação), mantendo o pH mais elevado (HARMENING-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992). O DEHP migra pela superfície plástica da bolsa para o sangue armazenado e tem o efeito de estabilizar a membrana da célula sanguínea, reduzindo a taxa de hemólise (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995; HESS, 2006). Entretanto, o DEHP parece exibir propriedades carcinogênicas segundo testes laboratoriais com animais (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995). Assim,

pesquisas têm sido realizadas para desenvolvimento e comercialização de um novo tipo de bolsa plástica para sangue (HARMENING-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992).

É importante lembrar que as soluções anticoagulantes-preservantes não inibem o crescimento de contaminantes microbianos. Assim, a refrigeração dos hemocomponentes e o congelamento do plasma ajudam a inibir o crescimento bacteriano (FELDMAN & SINK, 2006).

2.3.2 Anticoagulantes e preservativos

O armazenamento de sangue para transfusão é feito com uso de soluções que proporcionam anticoagulação e preservação das células sanguíneas, visto que a transfusão sanguínea deve ser capaz de transferir sangue total ou hemocomponente viáveis que transportem de forma efetiva o oxigênio para os tecidos (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995).

Desta forma, todos os anticoagulantes-preservativos devem minimizar os efeitos causados pelo armazenamento das células sanguíneas e manter o delicado equilíbrio bioquímico das células (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995). Particularmente, deve-se ter atenção com a habilidade destes conservantes em manter as concentrações de ATP e do 2,3-DPG (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995).

As tentativas para encontrar um anticoagulante atóxico começaram em 1869, quando o fosfato de sódio foi utilizado como anticoagulante por HICKS. Entretanto, todos os seus pacientes morreram, aparentemente por intoxicação devido à grande quantidade de fosfato na solução (HOSGOOD, 1990). Somente em 1943, durante a II Guerra Mundial, quando foi necessário o armazenamento de grande volume de sangue, a fórmula do preservativo ácido-citrato-dextrose (ACD) foi introduzida, permitindo o armazenamento de sangue por 21 dias (HOSGOOD, 1990). Em 1957, uma solução preservativa mais aprimorada foi desenvolvida, o citrato-fosfato-dextrose (CPD), que mantém concentração de 2,3-DPG e pH mais elevados quando comparado ao ACD (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995). Com o uso do CPD, o sangue canino pode ser armazenado por um período de quatro semanas (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995). Em 1960, o sistema com bolsa plástica foi desenvolvido para armazenagem de sangue e em 1978, o anticoagulante-preservativo citrato-fosfato-dextrose-adenina (CPDA-1) foi aprovado para armazenamento das hemácias humanas por 35 dias (WARDROP;

YOUNG; WILSON, 1995). O acréscimo de adenina e dextrose no CPDA-1 fornece um substrato para que as hemácias produzam ATP, resultando na melhora da viabilidade das hemácias armazenadas quando comparado ao CPD (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995). Embora a maioria dos anticoagulante-preservativo tenha sido desenvolvida para uso humano, estes são utilizados de forma satisfatória na Medicina Veterinária. Entretanto, a meia-vida das células sanguíneas armazenadas varia conforme as diferentes espécies, não devendo se estender às células sanguíneas caninas e felinas a indicação da meia-vida das células sanguíneas humanas armazenadas (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995).

O CPDA-1 é o anticoagulante-preservante mais utilizado para armazenamento de sangue canino (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995). O tempo de armazenamento de concentrado de hemácias caninas com CPDA-1 varia de 20 dias, segundo Wardrop; Young e Wilson (1995) à 35 dias segundo Humphries (1994) e Feldman e Kristensen (1995). O sangue total também pode ser armazenado com CPDA-1 (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995). Segundo estudo realizado por Bucheler e Cotter em 1994, a viabilidade 24 horas pós-transfusão do sangue total armazenado durante 35 dias foi de aproximadamente 82% para os eritrócitos caninos e 85% para os eritrócitos felinos. Assim, se coletado em sistema fechado utilizando-se bolsas com CPDA-1, de forma asséptica, o sangue total felino pode ser armazenado em temperatura entre 1°C a 6°C, durante 35 dias (FELDMAN; KRISTENSEN, 1995; WARDROP, 1995). Se utilizado CPD ou ACD, o sangue felino pode ser armazenado por 3 a 4 semanas, respectivamente (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995).

Os anticoagulantes heparina e citrato de sódio, ainda utilizados para armazenamento de sangue em gatos, não possuem propriedades preservativas, sendo recomendados somente para uso imediato após coleta, não devendo ser armazenado (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995; BSAVA's SCIENTIFIC COMMITTEE, 2000).

À partir de 1980, soluções aditivas, utilizadas para prolongar a vida das hemácias começaram a ser desenvolvidas (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995). Essas soluções são usadas em conjunto com os anticoagulante-preservativos, devendo ser acrescentado às hemácias até 72 horas depois da colheita. Há três soluções aditivas disponíveis comercialmente: Adsol® (AS-1, Fenwal), Nutricel® (AS-3, Haemonetics) e Optisol® (AS-5, Terumo). Os componentes destas soluções aditivas variam, mas todas contêm dextrose, adenina e cloreto de sódio (FELDMAN; SINK, 2006). O Adsol® pode ser usado para armazenamento de concentrado de hemácias de cães aumentando a meia-vida da hemácia armazenada para aproximadamente 37 dias (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1995).

2.3.3 Sistemas de colheita e armazenamento de sangue felino

Em cães, as flebotomias podem ser realizadas em sistema fechado com a utilização de bolsas para colheita e armazenamento de sangue humano. O sistema fechado é definido como um sistema estéril, que não permite que o sangue seja exposto ao ar ou a elementos externos durante a colheita, o processamento ou o armazenamento (FELDMAN; SINK, 2006).

Entretanto, os sistemas utilizados para colheita de sangue em cães e humanos não são apropriados para colher sangue em felinos, pois o volume de anticoagulante usado na bolsa é planejado para uma coleta de 450 ml de sangue. Embora a quantidade de anticoagulante possa ser removida em sistema fechado, a fim de se obterem volumes menores de sangue, a agulha da colheita (calibre 16G) está integralmente incorporada ao sistema e é demasiadamente grande para a veia jugular felina (FELDMAN; SINK, 2006).

Bolsas menores para colheita de sangue de felinos em sistema fechado não estão disponíveis comercialmente no Brasil (SCHINEIDER, 1995). As bolsas para colheita de sangue felino estão disponíveis apenas em alguns bancos de sangue como o “Animal Blood Bank” e o banco de sangue veterinário da Universidade da Pensilvânia (WARDROP, K. J.; YOUNG, J.; WILSON, 1995).

A bolsa para colheita de sangue felino produzido pela Animal Blood Bank inclui uma bolsa com capacidade para 100 mL de sangue, uma seringa de 60 mL e um escalpe de calibre 19G, todos acoplados através de uma torneira de três vias de maneira estéril. O método utilizado pelo banco de sangue da Universidade da Pensilvânia consiste na coleta realizada com bolsas humanas pediátricas (com capacidade menor para coleta de sangue) e que são remanufaturadas com o auxílio de um aparelho que tem a função de conectar o espaguete da bolsa ao equipo com a agulha ou escalpe de tamanho desejado para a coleta (SPRINGER et al., 1998).

O sistema aberto permite que o sangue seja exposto ao ar ou a elementos externos em algum ponto durante a colheita, o processamento ou armazenamento. Nestes casos, o hemocomponente deve ser utilizado de forma obrigatória em até 4 horas após a colheita, se armazenado à temperatura ambiente, ou em até 24 horas, se armazenado entre 2 e 6°C (FELDMAN; SINK, 2006). Em gatos, a colheita pode ser feita do doador com uma seringa, com transferência, em seguida, para uma bolsa de sangue com anticoagulante. Entretanto, este sistema apresenta um potencial risco de contaminação bacteriana (GIGER; GRIOT-WENK, 1995).

2.4 CONTROLE DE QUALIDADE NA HEMOTERAPIA

A segurança e a qualidade do sangue e dos hemocomponentes devem ser asseguradas em todo o processo, desde a captação de doadores até a sua administração ao paciente. A transfusão de um hemocomponente pode ser considerada o ato final de um conjunto de atividades que constitui o processo hemoterápico, dividido em etapas ou subprocessos: captação de doadores, avaliação do doador, testes laboratoriais, colheita de sangue, processamento, armazenamento, controle de qualidade, transporte, e o uso de sangue e de seus hemocomponentes (ANVISA, 2010).

A hemovigilância insere-se nessa perspectiva como um sistema de avaliação e alerta, com o objetivo de recolher e avaliar informações sobre os efeitos indesejáveis da utilização de hemocomponentes, à fim de prevenir o aparecimento ou a recorrência desses efeitos. A ocorrência de reações transfusionais está associada a diferentes causas, entre as quais aquelas relacionadas a erros primários, uso de equipamentos descalibrados ou inadequados, uso de insumos inadequados e processos de trabalho equivocados (ANVISA, 2010).

Ao longo dos anos, a prática hemoterápica no Brasil tem sido alvo de constantes normatizações. Entretanto, desde a criação do primeiro banco de sangue no país, em 1942, até 1964, não existiam registros de leis nacionais referentes a sua regulamentação técnica. Somente na década de 60, com a criação da Comissão Nacional de Hemoterapia (CNH), surgem as primeiras regulamentações técnicas da prática hemoterápica no Brasil. A partir da década de 80, ocorrem grandes avanços nos procedimentos técnicos, caracterizados por medidas de precaução, com objetivo de promover a segurança dos procedimentos transfusionais. Desde então, a incorporação de novas tecnologias tem promovido constantes adequações nas regulamentações, haja vista as lacunas ainda existentes dentro do extenso universo da imuno-hematologia (ANVISA, 2010).

Devido ao risco inerente a prática transfusional, há necessidade de se conhecer os incidentes a ela relacionados e a sua incidência, a fim de que possam ser introduzidas medidas corretivas e preventivas que contribuam para aumentar a segurança transfusional (ANVISA, 2010).

A segurança do ato transfusional pode ser definida como uma série de processos executados para eliminar ou reduzir os riscos das transfusões. A disponibilização segura de sangue e hemocomponentes depende da colaboração de doadores de sangue voluntários, da existência de instituições produtoras bem organizadas e distribuídas, do controle de qualidade na testagem sorológica e imuno-hematológica, do uso racional de sangue e hemocomponentes e da vigilância de eventos adversos – hemovigilância (ANVISA, 2010).

3 OBJETIVOS

PRINCIPAL

- Avaliar a viabilidade e qualidade pré-transfusional do concentrado de hemácias felino, colhido e armazenado em bolsas e produtos nacionais, remanufaturadas.

ESPECÍFICOS

Para avaliação da viabilidade das hemácias felinas *in vitro* será necessária a mensuração dos seguintes parâmetros:

- Inspeção visual da bolsa de sangue;
- Taxa de hematócrito do concentrado de hemácias, concentração de hemoglobina total, hemoglobina sobrenadante e porcentagem de hemólise;
- Ph, gases sanguíneos, bicarbonato e saturação de oxigênio;
- Concentração de potássio extracelular, de glicose e de adenosinatrifosfato (ATP) nas hemácias;
- Cultura bacteriana do sangue aeróbia e anaeróbia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo em reunião de 21/9/2011 (2309/2011).

4.1 DOADORES

Foram utilizados gatos, com peso mínimo de 4 Kg, machos ou fêmeas, com idade entre um e oito anos, sem raça definida, provenientes da cidade de São Paulo, de proprietários voluntários. Os animais foram avaliados quanto à sua condição de higiene por meio da realização de exame físico, hemograma completo e exames bioquímicos (creatinina, ALT e proteínas totais) sendo incluídos apenas aqueles sem quaisquer alterações. Realizou-se ainda teste sorológico para leucemia viral felina (FeLV) e imunodeficiência viral felina (FIV) (Diagnóstico Snap® Combo Fiv/FelV, IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA).

Os gatos que não atenderam as especificações acima mencionadas ou que fossem portadores de doenças infecciosas foram excluídos do estudo.

4.2 PREPARO DO SISTEMA PARA COLHEITA E ARMAZENAMENTO DE SANGUE FELINO

4.2.1 Procedimento técnico de preparo do sistema para colheita e armazenamento de sangue felino

Para o presente estudo, foi realizada montagem de sistema fechado remanufaturado com produtos nacionais. Foram utilizados os seguintes materiais: seringa de 60 ml com bico luer lock (Injex®, Ourinhos, Brasil), bolsa quádrupla pediátrica de transferência para volume entre 75 a 100ml (JP® - Indústria Farmacêutica S.A., São Paulo, Brasil), escalpe 19G (KDL®) e torneira de três vias (Descarpack® Descartáveis do Brasil, São Paulo, Brasil). A bolsa

quádrupla pediátrica de transferência foi acoplada através de seu adaptador luer lock à torneira de três vias, que por sua vez, foi também conectada ao escalpe e à seringa de 60ml (Figura 1). Após sua montagem, os kits foram esterilizados por óxido de etileno por empresa especializada (Acecil ® – Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA, Campinas, Brasil).

Figura 1 – Sistema remanufaturado para colheita e armazenamento de sangue felino

4.2.2 Anticoagulante e preservante

O CPDA-1 é a solução anticoagulante preservativa presente nas bolsas múltiplas disponíveis comercialmente e que foram utilizadas neste estudo. A razão geralmente utilizada é de 1mL de CPDA-1 para cada 9 mL de sangue (WARDROP, 1995).

4.2.3 Introdução do anticoagulante e preservante no kit de coleta

A introdução da solução de CPDA-1 foi realizada imediatamente antes da colheita de sangue, através de aparelho específico (Soldador de tubo para conexão estéril - TSCD - Terumo®, São Paulo, Brasil) em conectar tubos de forma estéril. A conexão foi feita entre o segmento da

bolsa com CPDA-1 simples ao kit remanufaturado, especificamente no segmento localizado entre as bolsas pediátricas de transferência e o restante do sistema com seringa, sendo esta última parte a acoplada com a bolsa simples. Após esta conexão, colocou-se o volume necessário de CPDA-1 na seringa de 60 ml, retirada da bolsa simples. Neste momento, a reconexão entre parte do kit remanufaturado com as bolsas pediátricas de transferência e a parte com seringa, escalpe e a torneira de três vias foi refeita, com o aparelho conector de tubos.

Dessa forma, a colheita ocorreu de forma completamente estéril, viabilizando o sistema fechado desejado.

4.3 COLHEITA DE SANGUE

Imediatamente antes da colheita de sangue foram realizados novamente alguns exames e sedação do doador. Após a doação foi realizada reposição volêmica com solução fisiológica.

4.3.1 Exames pré-colheita de sangue

Imediatamente antes da colheita de sangue, foram realizados novamente: exame físico completo e mensuração do hematócrito. O valor mínimo de hematócrito adotado foi de 35% (SCHNEIDER, 1995).

4.3.2 Sedação

Para a colheita de sangue, os animais foram sedados utilizando-se butorfanol (0,2 mg/kg), diazepam (0,5 mg/kg) e quetamina (4 mg/kg), associados na mesma seringa e administrados por via intramuscular (LANEVSKI; WARDROP, 2001).

4.3.3 Procedimento de colheita de sangue

No local da punção foi realizada tricotomia e antissepsia local com clorexidina 0,5% e álcool 70%. O animal foi mantido em decúbito lateral, sendo realizado o garrote da veia jugular, seguido de venopunção. Simultaneamente a aspiração do sangue, no momento de sua colheita, realizou-se sua homogenização com o CPDA-1 por meio de movimento da seringa. Após o término da colheita do sangue, a comunicação da seringa com o escalpe foi ocluída e a comunicação com a bolsa aberta. Neste momento, soltou-se o garrote e foi retirado o escalpe da veia jugular, sendo feita compressão manual, no local, com auxílio de uma gaze estéril por cinco minutos. O sangue foi direcionado suavemente para dentro de uma das bolsas, enquanto as outras mantiveram-se ocluídas através de clamp.

4.3.4 Volume de sangue colhido

O volume de sangue doado foi de 11 mL/kg (FELDMAN; SINK, 2006).

4.3.5 Reposição volêmica do doador

Como medida preventiva para hipotensão foi administrado duas vezes o volume de sangue doado de solução fisiológica, por via intravenosa, com início no momento da doação. A fluidoterapia foi realizada em torno de 15-20 minutos, segundo recomendações de ABRAMS-OGG (2000).

4.4 SEPARAÇÃO DO SANGUE EM HEMOCOMPONENTES

O sangue total foi centrifugado em temperatura estabelecida entre 20 - 24°C por cinco minutos a 2500 x g, caracterizando a centrifugação leve (Centrífuga refrigerada, modelo RC-3BP SORVALL, USA, Kendro Laboratory Products-L.P). A separação das unidades de sangue total em concentrado de hemácias e plasma rico em plaquetas foi realizada com Extrator Manual de Plasma (Extrator de plasma Fanem®, São Paulo, Brasil) (Figura 2).

Figura 2 - Separação dos componentes sanguíneos com auxílio de extrator de plasma

4.5 ARMAZENAMENTO DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS

Os concentrados de hemácias foram preservados em refrigerador exclusivo para tal finalidade, com temperatura controlada através de termômetro de máxima e mínima, variando entre 2-6°C (Figura 3) (ANVISA, 2010).

Figura 3 - Bolsas de concentrado de hemácias felino.

4.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS HEMÁCIAS *IN VITRO*

Realizou-se avaliação da viabilidade das hemácias *in vitro* nos dias 0, 14 e 21 de armazenamento.

A retirada das amostras para realização dos exames foi feita nos momentos determinados após transferência de 6ml de concentrado de hemácias para uma das bolsas satélites interligadas em sistema fechado. As bolsas satélites com a amostra para análise foram seladas (TermoClamp–Fresenius Hemocare®, São Paulo, Brasil) e desconectadas do sistema de forma estéril.

Para todas as amostras colhidas foram realizadas as seguintes análises: inspeção visual da bolsa, avaliação morfológica (microscopia), hematócrito, hemoglobina total, hemoglobina extracelular, taxa de hemólise, dosagem de ATP, lactato, potássio, glicose, pH, gases sanguíneos, bicarbonato, saturação de oxigênio, cultura aeróbia e aneróbia.

4.6.1 Inspeção visual concentrado de hemácias e avaliação morfológica eritrocitária

A inspeção visual da bolsa de sangue consistiu em avaliação da coloração do sangue, presença de coágulos ou gás no interior da bolsa (ANVISA, 2010). A avaliação morfológica das hemácias foi realizada por meio de esfregaço sanguíneo, observando-se alteração de tamanho das células e presença de hemácias crenadas.

4.6.2 Determinação do hematócrito

Foi realizada em centrífuga de micro-hematócrito (Modelo E - Lab EV:024®, Londrina, PR, Brasil) a 6000 rpm, durante um minuto.

4.6.3 Determinação da hemoglobina total

A determinação da concentração total de hemoglobina à partir de amostra de concentrado de hemácias felino, por reação colorimétrica. Para a mensuração utilizou-se reagentes específicos (Labtest® Diagnostica AS, Lagoa Santa, MG, Brasil) em aparelho analisador bioquímico semi-automático (BioPlus® - modelo BIO-2000, São Paulo, Brasil).

4.6.4 Determinação da hemoglobina extracelular

Foi realizada à partir de amostra de plasma obtido após centrifugação do concentrado de hemácias felino, em centrífuga de tubos (TDL 80-2B, Centribio®), por reação colorimétrica.

4.6.5 Porcentagem de hemólise

A determinação do percentual de hemólise nas unidades de CHF foi realizada pela aplicação de fórmula matemática que emprega o hematócrito, hemoglobina extracelular e hemoglobina total do hemocomponente. Segue a fórmula (WARDROP, K. J. TUCKER, R. L.; MUGNAI, 1997):

$$\text{Porcentagem de hemólise} = 100 - \text{Ht} \times \text{Hbe} / \text{Hb}$$

Onde,

Ht = hematócrito (%)

Hbe = hemoglobina extracelular (g/dl)

Hb = hemoglobina total (g/dl)

4.6.6 Determinação da glicose extracelular

A dosagem de glicose plasmática foi realizada por método cinético em aparelho próprio de análise (BioPlus® - modelo BIO-2000, São Paulo, Brasil). Para sua mensuração, foi utilizada amostra de plasma obtido após centrifugação do concentrado de hemácias felino, em centrífuga de tubos (TDL 80-2B, Centribio®).

4.6.7 Determinação do ATP

A determinação da concentração de ATP foi realizada pelo método de Beutler (1984), por espectrofotometria.

4.6.7.1 Preparo do extrato – Desproteinização do sangue

Em alíquota de 0,5 ml, obtida de uma unidade eritrocitária, foi adicionado 0,25 ml de solução de ácido perclórico 20% (Merck). Homogeneizou-se e centrifugou-se a 8000 x g durante 10 minutos. Transferiu-se 1ml do sobrenadante para um eppendorf. As amostras desproteinizadas foram armazenadas a -80°C até sua mensuração.

4.6.7.2 Determinação da curva padrão

Para determinação da curva padrão de ATP, utilizou-se os reagentes indicados no quadro abaixo, sendo o volume final (v.f.) do meio de reação 800µl.

Quadro 1 – Reagentes utilizados para determinação de curva padrão de ATP

REAGENTES [inicial]	(μ l)	[final]
Imid HCl 50mM, pH 7,0	623	38,9mM
	613	38,3mM
	593	37,1mM
MgCl ₂ 500mM	16	10mM
NADP 5mM	64	0,4mM
ATP 2mM	10	0,025 μ mol / ml (80x)
	20	0,05 μ mol / ml (40x)
	40	0,1 μ mol / ml (20x)
G6PDH 200U / ml (LEUCO)(dil)	3	0,75U / ml
GLICOSE 500mM	80	50mM
Ler imediatamente $\rightarrow$ A ₁		
Hexoquinase (HK) 1080U / ml (dil)	4	5,2U / ml
Ler A até A cte (15min) $\rightarrow$ A ₂		

A leitura das reações foi realizada em placa de Elisa (Beckman Coluter modelo DU800). Antes do uso, o aparelho foi calibrado com água destilada. O meio de reação (A₁) foi utilizado como branco. A reação (A₂) foi iniciada com a adição de HK nas cubetas de amostra e branco, e monitoradas espectrofotometricamente a 340 nm e a 37°C.

Para o cálculo do resultado de ATP padrão utilizou-se as seguintes fórmulas:

$$A_2 - A_1 = \Delta A_{ATP}$$

$$\mu\text{mol ATP / ml} = \Delta A_{ATP} \times \text{dil} / 6,22$$

Onde: $\Delta A_{ATP} = A_2 - A_1$

Dil. = diluição de ácido perclórico

6,22 = coeficiente extinção molar de NADPH

4.6.7.3 Determinação da concentração de ATP

Após descongelamento das amostras desproteinizadas em eppendorf, realizou-se a neutralização com 3 moles/l de K_2CO_3 para ajuste do pH 3,5 – 4,5. A solução neutralizada foi decantada sob gelo por 10 min. Para mensuração, foi utilizado o sobrenadante.

Os reagentes utilizados para determinação de ATP das amostras estão indicados no quadro 2, sendo o volume final (v.f.) do meio de reação 250 μ l.

O meio de reação (A_1) foi utilizado como branco. A reação (A_2) foi iniciada com a adição de HK nas cubetas de amostra e branco, e monitoradas espectrofotometricamente a 340 nm e a 37°C.

Quadro 2 – Reagentes utilizados para determinação de ATP

REAGENTES [inicial]	(μ l)	[final]
Imid HCl 50mM, pH 7,0	167	47,6mM
MgCl ₂ 500mM	5	10mM
NADP 5mM	40	0,8mM
AMOSTRA	10	ATP-25x
G6PDH (LEUCO - dil) 200U / ml	1	0,8U / ml
Glicose 500mM	25	50mM
Ler imediatamente $\rightarrow A_1$		
HK 1080 U /ml(dil)	2	8,6U /ml
Ler A até A cte $\rightarrow A_2$		

Para o cálculo do valor de ATP das amostras utilizou-se as seguintes fórmulas:

$$A_2 - A_1 = \Delta A_{ATP}$$

$$\mu\text{mol ATP / g Hb} = \Delta A_{ATP} \times \text{diluição total} / 6,22 \times 0,65$$

Onde: A_2 = reação com adição de HK

A_1 = meio de reação sem adição de enzima HK

Diluição total = diluição de ácido perclórico + diluição de neutralização + diluição do ensaio

6,22 = coeficiente extinção molar de NADPH

0,65 = distância percorrida pela luz na solução

4.6.8 Determinação de lactato

A determinação de lactato foi realizada por meio do aparelho Accutrend® Plus – Roche, com uma gota da amostra de concentrado de hemácia felino.

4.6.9 Determinação de potássio do meio extracelular

O potássio do meio extracelular foi mensurado por meio da técnica de fotometria de reflectância (Reflotron Plus® Roche Diagnostics, São Paulo, Brasil).

4.6.10 Análise microbiológica

Foram realizadas hemoculturas aeróbias e anaeróbias por meio do sistema semi-automatizado destinado à realização de culturas de sangue e seus componentes (Sistema Hemobac Trifásico Pediátrico - Probac do Brasil, Produtos Bacteriológicos LTDA®, São Paulo, Brasil).

O sistema é composto por um laminocultivo com duas faces acoplado à parte superior de um recipiente plástico contendo caldo suplementado com extrato de levedura e polianetol-sulfonato de sódio (SPS) (Figura 4). O caldo suplementado promove o crescimento de microorganismos, devido à riqueza de nutrientes, sendo o SPS responsável pelo efeito anticoagulante. As duas faces do laminocultivo são compostas por meios de cultura sólidos que permitem o crescimento das bactérias (Ágar Chocolate, Ágar MacConkey) e fungos (Ágar Sabouraud) produtores de bacteremia.

Além do caldo suplementado e das duas faces para laminocultivo, o sistema possui um indicador. A viragem de cor para rosa forte ou vermelho ocorre quando há presença de CO₂ produzido pelo microrganismo.

O procedimento de inoculação da amostra e montagem do sistema de cultivo foi realizado em fluxo laminar, seguindo todas as instruções do fabricante. Conforme recomendado, utilizou-se 0,5 ml de amostra para cultivo.

As hemoculturas foram incubadas em estufa com temperatura controlada de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante sete dias. Os frascos foram observados, no mínimo duas vezes ao dia, para verificação de aparecimento de colônias e/ou mudança do indicador, e inversão do sistema para banhar as faces do laminocultivo com o caldo. Após os sete dias em estufa, os frascos foram mantidos em temperatura ambiente até o 15º dia, para controle microbiológico.

Para pesquisa de bactérias anaeróbias foi utilizado o mesmo sistema (Sistema Hemobac Trifásico Pediátrico da Probac do Brasil®) (Figura 5) com complementação de gerador e indicador de anaerobiose, envelope e clamp. Sua montagem e preparo também apresentaram algumas diferenças do procedimento de uso do sistema para pesquisa de bactérias aeróbias. O período de incubação e avaliação de positividade do hemocultivo foi realizado da mesma maneira.

Figura 4 - Sistema Hemobac Trifásico Pediátrico Aeróbio

4.6.11 Hemogasometria

Para a análise dos gases sanguíneos, bicarbonato e saturação de oxigênio foi realizada a hemogasometria das amostras de concentrado de hemácias felino utilizando-se aparelho analisador de gases (ABL-5 Radiometer, Radion Copenhagen®, Diamond, EUA) de amostras obtidas anaerobicamente.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram analisadas individualmente através da observação dos valores mínimos e máximos, dos cálculos de média e desvio-padrão e mediana.

A avaliação das variáveis no decorrer do tempo foi feita através de análise de variância com medidas repetidas (ANOVA), seguida do teste de Tukey.

A análise estatística foi realizada em programa operacional GraphPad InStat 3, sendo considerados resultados estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Para obtenção das 24 bolsas de concentrados de hemácias analisadas neste estudo foram colhidas 29 bolsas. Entretanto, em cinco destas 29 doações de sangue a colheita foi interrompida antes do término. Em duas delas houve perda do acesso e em outras três colheitas, o animal não permitiu prosseguir com o procedimento, levando à formação de coágulos.

5.1 Volume de sangue colhido

O volume de sangue total das unidades colhidas para este trabalho variou de 42 a 52ml, sendo o volume médio de 48,04ml. O volume de sangue doado pré-determinado para o estudo foi de 11ml/Kg, entretanto, ao final do trabalho obteve-se a média de 10,6 ml/Kg de sangue colhido.

5.2 Volume dos concentrados de hemácias felino

Os volumes dos concentrados de hemácias felino variaram de 25 a 32 ml, sendo o volume médio de 29,08 ml.

5.3 Inspeção visual do concentrado de hemácias

Não foram observadas alterações em coloração do sangue, presença de coágulos ou gás no interior da bolsa.

5.4 Determinação do hematócrito

Os resultados obtidos das determinações de hematócrito (%) das 24 unidades de CHF nos dias 0, 14 e 21 de armazenamento estão demonstradas da tabela 1. Analizou-se também o valor médio para os diferentes tempos de estocagem das 24 unidades, bem como o desvio padrão, mediana e os valores mínimo e máximo.

Tabela 1 - Determinações de hematócrito (%) - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	73	71	69
2	71	70	71
3	70	71	70
4	70	72	71
5	72	73	70
6	69	65	65
7	68	68	69
8	67	64	68
9	67	70	66
10	71	68	67
11	69	66	67
12	69	70	69
13	67	66	66
14	70	67	65
15	68	70	69
16	71	68	70
17	65	66	68
18	67	69	70
19	68	66	67
20	71	70	69
21	65	66	68
22	68	68	68
23	72	70	71
24	70	66	66
Média	69	68	68
Desvio padrão	2,14	2,38	1,85
Máxima	73	73	71
Mínima	65	64	65
Mediana	69	68	68,5

Os resultados indicam que não há diferença significativa nos valores de hematócrito durante o armazenamento, sendo $P > 0.05$.

5.5 Determinação da concentração de hemoglobina total

Os resultados obtidos das determinações de hemoglobina total (g/dL) das 24 unidades de CHF nos dias 0, 14 e 21 de armazenamento estão demonstradas da tabela 2. Analizou-se também o valor médio para os diferentes tempos de estocagem das 24 unidades, bem como o desvio padrão, mediana e os valores mínimo e máximo.

Tabela 2 - Determinações de hemoglobina total (g/dL) - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	23,04	22,84	22,55
2	22,53	21,78	21,67
3	21,38	22,17	21,99
4	21,07	22,05	19,99
5	22,35	23,67	22,98
6	21,66	19,44	19,07
7	20,04	20,32	19,40
8	20,11	19,32	20,87
9	19,69	20,04	19,94
10	21,55	20,69	20,02
11	21,42	20,07	20,55
12	21,05	21,18	20,94
13	20,04	19,69	19,89
14	20,18	19,95	19,65
15	21,05	20,42	20,68
16	21,11	20,55	21,02
17	19,99	19,04	20,10
18	20,40	21,54	20,78
19	20,76	20,87	20,74
20	21,74	21,93	21,04
21	20,19	20,21	20,02
22	20,99	20,46	20,55
23	21,02	21,90	21,86
24	21,21	20,19	19,65
Média	21,02	20,84	20,66
Desvio padrão	0,86	1,16	0,98
Máxima	23,04	23,67	22,98
Mínima	19,69	19,04	19,07
Mediana	21,05	20,50	20,61

Os resultados indicam que não há diferença significativa na concentração de hemoglobina durante o armazenamento, visto que $P > 0.05$.

5.6 Determinação da hemoglobina extracelular

Os resultados obtidos das determinações de hemoglobina extracelular (g/dL) das 24 unidades de CHF nos dias 0, 14 e 21 de armazenamento estão demonstradas da tabela 3. Verificou-se aumento dos valores de hemoglobina extracelular no dia 21 armazenamento, sendo significativamente superior quando comparados os valores obtidos no 21º dia com os valores observados nos dias 0 e 14, com $P < 0,001$.

Tabela 3 - Determinações de hemoglobina extracelular (g/dL) - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	0,14	0,29	0,52
2	0,08	0,08	0,15
3	0,08	0,14	0,16
4	0,01	0,08	0,09
5	0,04	0,01	0,07
6	0,04	0,11	0,21
7	0,04	0,04	0,21
8	0,14	0,11	0,62
9	0,11	0,04	0,2
10	0,06	0,08	0,36
11	0,11	0,16	0,22
12	0,04	0,41	0,16
13	0,04	0,04	0,19
14	0,04	0,04	0,09
15	0,08	0,08	0,1
16	0,12	0,03	0,15
17	0,13	0,17	0,2
18	0,01	0,08	0,12
19	0,01	0,01	0,18
20	0,06	0,06	0,21
21	0,04	0,02	0,12
22	0,06	0,04	0,41
23	0,08	0,1	0,1
24	0,08	0,14	0,14
Média	0,06	0,09	0,20
Desvio padrão	0,04	0,09	0,13
Máxima	0,14	0,41	0,62
Mínima	0,01	0,01	0,07
Mediana	0,14	0,41	0,62

5.7 Porcentagem de hemólise

Os resultados obtidos das determinações de hemólise (%) das 24 unidades de CHF nos dias 0, 14 e 21 de armazenamento estão demonstradas da tabela 4.

Tabela 4 - Determinações da taxa de hemólise - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	0,16	0,36	0,71
2	0,10	0,11	0,20
3	0,11	0,18	0,21
4	0,01	0,10	0,13
5	0,05	0,01	0,09
6	0,05	0,19	0,38
7	0,06	0,04	0,33
8	0,22	0,20	0,95
9	0,16	0,05	0,34
10	0,08	0,12	0,59
11	0,15	0,27	0,35
12	0,05	0,58	0,23
13	0,06	0,06	0,31
14	0,05	0,06	0,16
15	0,12	0,11	0,14
16	0,16	0,04	0,21
17	0,22	0,30	0,31
18	0,01	0,11	0,17
19	0,01	0,01	0,28
20	0,08	0,08	0,30
21	0,06	0,03	0,19
22	0,09	0,06	0,63
23	0,10	0,13	0,13
24	0,11	0,23	0,24
Média	0,09	0,14	0,31
Desvio padrão	0,06	0,13	0,20
Máxima	0,22	0,58	0,95
Mínima	0,01	0,01	0,09
Mediana	0,08	0,11	0,26

A porcentagem de hemólise aumentou gradativamente durante a preservação dos eritrócitos, sendo que os valores obtidos no dia 21 diferiram de forma significativa dos resultados obtidos nos dias 0 e 14, com $P < 0,001$ (Figura 6).

Figura 5- Hemólise em CHF durante o armazenamento

O ponto experimental é a média da dosagem em 24 unidades de CHF.

5.8 Determinação da glicose extracelular

Os resultados obtidos das determinações de glicose extracelular (mg/dL) das 24 unidades de CHF nos dias 0, 14 e 21 de armazenamento estão demonstradas da tabela 5. Verificou-se redução dos valores de glicose extracelular durante os 21 dias de armazenamento, sendo a diferença estatisticamente significativa entre todos os diferentes tempos de avaliação, com $P < 0,001$.

Tabela 5 - Determinações de glicose extracelular (mg/dL) - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	471,2	225,2	112,5
2	457,8	263,9	145,2
3	446,7	266,7	198,7
4	429,9	312,4	278,4
5	446,8	322,1	303,9
6	496,1	309,8	245,5
7	469,8	298,6	254,8
8	458,4	396,8	296,8
9	607,9	354,4	310,7
10	442,8	355,8	331,5
11	505,7	297,9	276,9
12	527,1	410,2	382,2
13	609,7	405,9	276,1
14	568,7	389,6	281,2
15	569,7	366,7	262,1
16	528,4	230,5	188,4
17	618,9	365,8	275,7
18	502,8	411,2	296,5
19	608,6	401,9	365,9
20	472,1	315,7	299,8
21	570,4	386,5	325,1
22	553,8	445	388,6
23	588,9	407,4	376,1
24	502,8	378,8	314
Média	518,9	346,6	282,7
Desvio padrão	61,7	61,2	69,2
Máxima	618,9	445	388,6
Mínima	429,9	225,2	112,5
Mediana	504,2	360,80	288,8

5.9 Determinação ATP

Os resultados obtidos das determinações de ATP (μ moles ATP/gHb) das 24 unidades de CHF nos dias 0, 14 e 21 de armazenamento estão demonstradas da tabela 6. O valor de ATP

reduziu 80% durante os 21 dias de armazenamento, sendo que os valores obtidos no dia 0 diferiram de forma significativa dos resultados obtidos nos dias 14 e 21, com $P < 0,01$.

Tabela 6 - Determinações de ATP ($\mu\text{mol atp/ml}$ de hemácias) - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	0,32	0,29	0,28
2	0,78	0,47	0,35
3	0,54	0,27	0,15
4	1,37	0,1	0,05
5	0,88	0,35	0,25
6	1,34	0,45	0,21
7	1,61	0,46	0,1
8	1,45	0,51	0,31
9	0,68	0,24	0,08
10	3,05	0,2	0,11
11	1,29	0,41	0,23
12	0,87	0,18	0,06
13	1,23	0,51	0,31
14	1,07	0,32	0,07
15	0,42	0,34	0,1
16	0,8	0,44	0,22
17	0,87	0,42	0,05
18	0,51	0,44	0,42
19	0,56	0,37	0,13
20	1,1	0,42	0,28
21	0,21	0,05	0,05
22	1,61	0,46	0,1
23	0,56	0,45	0,42
24	0,7	0,41	0,36
Média	1,02	0,35	0,2
Desvio padrão	0,64	0,12	0,12
Máxima	3,05	0,51	0,42
Mínima	0,21	0,05	0,05
Mediana	0,87	0,41	0,18

5.10 Determinação de lactato

Os resultados obtidos através da mensuração de lactato das 24 unidades de concentrados de hemácias felino, nos tempos 0, 14 e 21 dias estão demonstrados na tabela 7. Houve aumento dos valores durante os 21 dias de armazenamento, sendo a diferença estatisticamente significativa entre todos os diferentes tempos de avaliação, com $P < 0,001$.

Tabela 7 - Determinações de lactato (mmol/L) - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	1,1	3,3	17
2	2,5	2,3	7,3
3	2,8	1,3	5,2
4	1,6	1,5	4,7
5	2,4	4,1	6,6
6	1,8	6,9	5,6
7	2,5	6,4	5,9
8	1,5	8,9	5,8
9	2,2	6,9	5,1
10	1,5	6,2	6,2
11	2,5	9,3	4,1
12	1,8	6,0	2,9
13	2,2	8,8	7,8
14	2,4	8,9	6,0
15	2,9	13,7	12,0
16	2,5	6,1	6,2
17	1,8	9,7	10,2
18	2,5	5,2	8,6
19	1,8	6,8	10,0
20	2,8	7,1	14,3
21	2,5	5,2	13,3
22	1,9	5,2	12,0
23	1,8	4,7	7,7
24	2,8	4,5	10,8
Média	2,1	6,2	8,1
Desvio padrão	0,49	2,82	3,57
Máxima	2,9	13,7	17,0
Mínima	1,1	1,3	2,9
Mediana	2,3	6,1	6,9

5.11 Determinação de potássio do meio extracelular

Os resultados obtidos através da mensuração de potássio extracelular das 24 unidades de concentrados de hemácias felino, nos tempos 0, 14 e 21 dias estão demonstrados na tabela 8. O teor de íons potássio variou de 2,1 a 5,1 mmol/L durante o período de armazenamento, sendo a diferença estatisticamente significativa entre todos os diferentes tempos de avaliação, com $P < 0,001$.

Tabela 8 - Determinações de potássio (mmol/L) - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	2,11	4,89	7,01
2	2,14	3,65	3,67
3	2,71	3,74	3,86
4	2	3,69	3,89
5	2,4	3,88	4,1
6	2,26	4,96	6,68
7	2,29	3,9	4,12
8	2,42	4,83	6,02
9	2	4,7	6,85
10	2,26	4,91	6,2
11	2,06	4,82	6,12
12	2	4,17	4,24
13	2,71	4,11	6,52
14	2	3,05	6,02
15	2,06	3,72	3,78
16	2	3,71	3,81
17	2,17	4,85	5,28
18	2,11	4,63	5,65
19	2,4	4,17	4,99
20	2	4,01	4,78
21	2,02	4,33	5,88
22	2,26	3,26	6,31
23	2	3,01	3,21
24	2	3,22	3,45
Média	2,1	4,09	5,1
Desvio padrão	0,21	0,62	1,23
Máxima	2,71	4,96	7,01
Mínima	2,0	3,010	3,21
Mediana	2,11	4,06	5,13

5.12 Análise microbiológica

Não houve crescimento de microorganismos em nenhuma das amostras analisadas por meio de hemocultura aeróbia e anaeróbia.

5.13 Hemogasometria

5.13.1 Concentração de PCO_2

Os resultados obtidos através da mensuração de PCO_2 das 24 unidades de concentrados de hemácias felino, nos tempos 0, 14 e 21 dias estão demonstrados na tabela 9. Houve diminuição significativa dos valores de PCO_2 durante a preservação de eritrócitos nas unidades de CHF em todos os tempos de avaliação, sendo $P < 0,001$.

Tabela 9 - Determinações de PCO₂ (mmHg) - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	66	47	13
2	58	65	36
3	54	53	29
4	49	31	27
5	40	22	28
6	75	22	16
7	63	49	15
8	42	32	25
9	60	36	22
10	96	48	20
11	62	35	17
12	96	43	23
13	66	42	25
14	81	23	11
15	69	29	20
16	67	20	15
17	81	43	11
18	63	31	20
19	55	51	40
20	76	54	19
21	57	48	32
22	57	50	38
23	66	48	33
24	72	46	34
Média	65,4	40,3	23,7
Desvio padrão	14	12	8,6
Máxima	96	65	40
Mínima	40	20	11
Mediana	64,5	43	22,5

5.13.2 Concentração de bicarbonato

Os resultados obtidos através da mensuração de bicarbonato (mmol/L) das 24 unidades de concentrados de hemácias felino, nos tempos 0, 14 e 21 dias estão demonstrados na tabela 10. Houve redução significativa dos valores de bicarbonato durante a preservação de eritrócitos em unidades de CHF em todos os tempos avaliados, com $P < 0,001$.

Tabela 10 - Determinações de bicarbonato (mmol/L) - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	11	2	1
2	11	8	5
3	11	5	3
4	11	7	5
5	10	3	3
6	6	3	1
7	10	5	3
8	7	5	1
9	9	5	1
10	9	5	2
11	7	3	1
12	7	4	3
13	8	5	2
14	7	4	3
15	6	2	2
16	10	5	3
17	10	6	1
18	8	3	1
19	12	7	5
20	10	6	2
21	11	5	4
22	9	7	3
23	12	7	5
24	12	8	5
Média	9,3	5	2,7
Desvio padrão	1,92	1,76	1,48
Máxima	12	8	5
Mínima	6	2	1
Mediana	10	5	3

5.14 Concentração de pH

Os resultados obtidos através da mensuração de pH das 24 unidades de concentrados de hemácias felino, nos tempos 0, 14 e 21 dias estão demonstrados na tabela 11. O valor de pH

reduziu gradativamente durante a preservação dos eritrócitos, sendo que os valores obtidos no dia 0 diferiram de forma significativa dos resultados obtidos nos dias 14 e 21, com $P < 0,01$.

Tabela 11 – Determinações de pH - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	6,86	6,16	6,04
2	6,91	6,7	6,71
3	6,93	6,55	6,51
4	6,96	6,87	6,81
5	7	6,81	6,71
6	6,54	6,62	6,69
7	6,84	6,76	6,87
8	6,83	6,7	6,73
9	6,79	6,68	6,52
10	6,81	6,7	6,67
11	6,71	6,63	6,58
12	6,64	6,6	6,72
13	6,61	6,6	6,6
14	6,67	6,73	6,73
15	6,57	6,53	6,51
16	6,73	7,01	6,96
17	6,83	6,68	6,46
18	6,81	6,78	6,7
19	6,83	6,79	6,71
20	6,9	6,44	6,28
21	6,91	6,68	6,63
22	6,87	6,79	6,54
23	6,84	6,82	6,82
24	6,91	6,86	6,84
Média	6,8	6,68	6,63
Desvio padrão	0,12	0,16	0,19
Máxima	7	7,01	6,96
Mínima	1,1	1,3	4,7

5.15 Concentração de PO₂

Os resultados obtidos através da mensuração de PO₂ das 24 unidades de concentrados de hemácias felino, nos tempos 0, 14 e 21 dias estão demonstrados na tabela 12. Houve aumento significativo dos valores de PO₂ durante a preservação de eritrócitos em unidades de CHF em todos os tempos avaliados, com $P < 0,001$.

Tabela 12 - Determinações de PO₂ (mmHg) - São Paulo - 2012

Concentrado de hemácias felino	Dia 0	Dia 14	Dia 21
1	139	305	401
2	99	218	331
3	86	256	382
4	86	212	340
5	134	210	336
6	82	247	284
7	153	293	387
8	98	263	295
9	137	284	316
10	131	218	274
11	107	210	283
12	145	212	284
13	103	325	340
14	94	307	386
15	94	369	398
16	82	243	276
17	76	324	365
18	147	294	324
19	68	287	311
20	152	338	340
21	84	296	311
22	83	263	335
23	76	293	325
24	74	284	310
Média	105,41	272,95	330,58
Desvio padrão	28,45	45,02	39,24
Máxima	153	369	401
Mínima	68	210	274
Mediana	96	284	328

6 DISCUSSÃO

Os parâmetros ora analisados, permitiu confirmar que os procedimentos adotados no Laboratório de Hematologia, no que concerne a obtenção, processamento e armazenamento de sangue felino estão de acordo com a normatização estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e AABB.

Na medicina veterinária não existem órgãos regulamentadores que fiscalizem e controlem os Bancos de Sangue Veterinários, como na medicina humana. A (ANVISA) elabora periodicamente resoluções que estabelecem normas e diretrizes para os bancos de sangue humano no país. Assim, são bem definidos os parâmetros hematológicos e bioquímicos de referência que devem ser cumpridos para que o sangue humano e seus componentes apresentem qualidade. Da mesma forma, a American Association of Blood Banks (AABB) estabelece padrões de qualidade internacionalmente para bancos de sangue. Entretanto, como não há parâmetros hematológicos e bioquímicos de referência bem estabelecidos para cada espécie animal, alguns estudos tem utilizado parâmetros humanos para avaliar a qualidade do sangue animal armazenado (ABRAMS-OGG et al., 1993; ULATA, 2005).

Para este trabalho foram avaliados parâmetros utilizados para controle de qualidade por bancos de sangue humano (TOMCZAK et al., 2010), sendo adotado valor de referência humano sempre que viável, como valor de hematócrito para concentrado de hemácias e percentagem de hemólise permitida ao final do armazenamento. Os valores de referência para hemoterapia humana não adaptáveis para a espécie felina foram desconsiderados, sendo os resultados obtidos comparados com estudos em felinos, realizados anteriormente.

Para bancos de sangue humano, a ANVISA (2004) recomenda que o volume de sangue total colhido seja de 450 ml $\pm$ 50 ml. Para felinos, a recomendação é que o doador tenha peso mínimo de 3,64 Kg (SCHNEIDER, 1995), mas idealmente acima de 4,5 Kg, sendo o volume de sangue doado de 10-15ml/Kg (LANEVSKI; WARDROP, 2001; FELDMAN; SINK, 2006), resultando em aproximadamente 50 ml de sangue colhido por bolsa. Entretanto, não existe uma padronização para gatos acerca do volume mínimo de sangue total colhido por bolsa. Para humanos esta padronização é feita porque a bolsa utilizada para colheita e armazenamento do sangue possui o volume padrão com 63 ml de CPDA-1. Assim, para este volume de CPDA-1 já determinado, deve-se colher no mínimo 300 ml de sangue para que não haja risco de intoxicação por excesso de citrato pelo receptor. Como não há uma bolsa para colheita e armazenamento de sangue felino padronizada e disponível comercialmente com

volume de anticoagulante-preservante determinado, deve-se seguir a proporção de 1 ml de CPDA-1 para 7 a 9 ml de sangue (LANEVSKI; WARDROP, 2001).

Neste estudo, o volume de sangue total colhido variou de 42 a 52 ml. O peso mínimo adotado para o estudo foi de 4 Kg, frente à dificuldade de captação de doadores felinos com porte maior, como normalmente recomenda a literatura internacional. Vale lembrar que o porte padrão dos gatos no Brasil é inferior ao padrão observado em países da Europa e Estados Unidos. O volume de sangue doado pré-determinado para o estudo foi de 11ml/Kg, entretanto, ao final do trabalho obteve-se a média de 10,6 ml/Kg de sangue colhido. Isto porque em cinco doações a colheita foi interrompida antes do término. Em duas delas houve perda do acesso e em outras três colheitas, o animal não permitiu prosseguir com o procedimento.

As determinações de hematócrito não apresentaram variações detectáveis durante os 21 dias de armazenamento. Os valores obtidos atenderam a recomendação da ANVISA (2004) de que concentrados de hemácias devem ter hematócrito entre 65% a 80%, nas bolsas cuja solução preservativa seja o CPDA-1.

Pelo fato de não ter sido observada variação da concentração de hemoglobina durante a preservação, do tempo zero até o 21º dia conclui-se que houve uniformidade no preparo dos CHF, bem como a estabilidade da hemoglobina durante a preservação. Trabalhos semelhantes em humanos e felinos obtiveram resultados para hemoglobina total que também não apresentaram variação com o decorrer do tempo (TOMCZAK, 2008; BERTOLLETI, 2011).

Na avaliação da concentração de hemoglobina extracelular foi observado aumento significativo no decorrer do tempo de preservação (dias 14 e 21 em relação ao dia 0), de forma semelhante ao verificado por outros estudos de avaliação da qualidade do sangue (TOMCZAK, 2008; BERTOLLETI, 2011). O aumento nos níveis de hemoglobina extracelular demonstra ruptura das hemácias ou liberação da hemoglobina presente em microvesículas situadas na membrana, resultado de injúrias físicas à membrana celular eritrocitária, decorrente da diminuição na produção de ATP (HESS; GREENWALT, 2002).

As porcentagens de hemólise foram calculadas a partir da hemoglobina extracelular, hematócrito e concentração de hemoglobina total. Os resultados obtidos para a porcentagem de hemólise ficaram dentro dos limites preconizados pela legislação brasileira e por padrões internacionais de até 1% durante a preservação (HEATON et al., 1981). Nos países da União Européia esse parâmetro é mais rígido, não podendo ultrapassar 0,8% ao final do armazenamento (KORTE; VERHOEVEN, 2004). A taxa de hemólise é um marcador de

falhas na estocagem. Ela pode se dar por ruptura da célula por completo ou pela liberação da hemoglobina contida nas microvesículas. Assim como a mensuração de hemoglobina extracelular, a de hemólise é considerada um marcador fundamental da qualidade da preservação (HEATON et al., 1981; HÖGMAN; MERYMAN, 2006). Os resultados obtidos ao final do 21º dia de preservação demonstram que se as unidades de CHF fossem armazenadas por período maior, provavelmente haveria bolsas com porcentagem de hemólise superior ao recomendado.

A infusão de unidades de concentrados de hemácias hemolisadas podem causar reações que se assemelham a reação transfusional hemolítica imunomediada aguda. Normalmente, estes casos são menos graves, pois não ocorre a ativação do complemento, mas podem estar associados com insuficiência renal aguda ou morte súbita por hipercalemia em humanos. Tais reações são mais frequentemente associadas às unidades armazenadas há mais tempo, visto que tais concentrados estiveram por mais tempo susceptíveis aos problemas decorrentes do armazenamento (ZIMRIN; HESS, 2009).

A glicose também tem sido utilizada como um importante marcador da qualidade do sangue humano armazenado (TOMCZACK, 2008). Trata-se de um substrato utilizado para produção de energia através da glicólise, sendo que no início do período de conservação observam-se elevados valores decorrentes da presença de glicose na solução preservativa (LEE et al., 1999). Entretanto, os níveis deste carboidrato tendem a diminuir durante o armazenamento, devido à sua utilização como fonte energética para produção de ATP (LEE et al., 1999). Em estudos para avaliação de sangue total felino realizados por Bertolleti (2011) e Aubert et al. (2011), os valores médios de glicose observados no dia 0 foram de 452,67 mg/dL e 646,84 mg/dL respectivamente sendo a colheita de sangue realizada por método convencional de venopunção da jugular, e de 745,94 mg/dL quando a colheita ocorreu por acesso vascular porta. Esta variação entre um estudo e outro provavelmente ocorreu por causa da proporção de anticoagulante-preservante e sangue utilizado em cada trabalho, que foi de 1 ml de CPDA-1:9 ml de sangue (BERTOLLETI, 2011) e 1 ml CPDA-1: 6,7 ml de sangue por colheita de sangue realizada por método convencional de venopunção da jugular e por acesso vascular porta (AUBERT et al., 2011). Neste estudo, utilizou-se a mesma proporção de anticoagulante-preservante e sangue adotados por Bertolleti (2011), sendo observado valor médio inicial semelhante, de 518,95 mg/dL de glicose nas unidades de CHF. Durante os 21 dias de armazenamento a redução de glicose foi de cerca de 50% dos valores iniciais. No estudo realizado por Bertolleti (2011) não houve variação significativa dos valores de glicose durante

os 28 dias de armazenamento avaliados, sendo a variação dos resultados com o decorrer do tempo do presente estudo mais semelhantes aos observados por Tomczak et al. (2010) e Aubert et al. (2011), que realizaram pesquisa do controle de qualidade de bolsas de sangue humanas. Ao final do período de conservação o valor médio foi de 282 mg/dL, bem acima do limite mínimo recomendado para o sangue humano e que é superior a 50mg/dL ao final de 35 dias de armazenamento em CPDA-1 (TOMCZACK, 2008). É esperado valor médio superior da glicose em unidades de CHF visto que o tempo de armazenamento foi menor (21 dias) e também porque a taxa de consumo de glicose pelos eritrócitos humanos é maior ($1,48 \pm 1,1 \mu\text{mmol/h/mL}$) quando comparado com outros mamíferos.

Assim como a hemoglobina extracelular e a porcentagem de hemólise, o aumento da concentração de potássio extracelular indica um dos primeiros eventos que se relacionam com a redução da qualidade das hemácias (TOMCZAK, 2008). O aumento gradativo da concentração de potássio no meio extracelular ocorre devido à sua saída do interior dos eritrócitos e indica a falha no funcionamento da bomba de sódio e potássio encontrada na membrana plasmática (HÖGMAN; MERYMAN, 1999). Isto ocorre porque ao longo do período de armazenamento há diminuição das concentrações de ATP e queda do pH, que influenciam diretamente o funcionamento da bomba Na/K (HÖGMAN; MERYMAN, 1999). Elevados valores de potássio no sangue armazenado dependem também das concentrações de potássio no interior do eritrócito entre as diferentes espécies, sendo encontradas elevadas concentrações nas hemácias de humanos ($102 \pm 3,9 \text{ mmol/L}$), equinos ($120 \pm 1,1 \text{ mmol/L}$), suínos ($105,9 \pm 12,7$), caprinos ($76,1 \text{ mmol/L}$) e bovinos ($22 \pm 2,5 \text{ mmol/L}$) e baixos valores para cães ($5,7 \pm 1 \text{ mmol/L}$) e gatos ($5,9 \pm 1,9 \text{ mmol/L}$), de acordo com Harvey (2010). Com relação aos caninos há ainda variações entre as espécies, existindo exemplares de raças orientais como Akitas, Shibas e Shar-Peis cuja concentração eritrocitária de potássio é semelhante à humana (CONRADO et al., 2008). O sangue armazenado e hemolisado de humanos, que possuem altos valores de potássio eritrocitário, possui maiores chances de provocar hipercalemia, enquanto o sangue armazenado de cães e gatos, que possuem pouco potássio intracelular tem menores chances de provocar hipercalemia, mas podem agravar quadros de pacientes com problemas renais ou pacientes que recebam grandes volumes transfusionais (HOHENHAUS, 2007). Desta forma, as concentrações de potássio do sangue felino armazenado, não podem ser comparadas com as concentrações do sangue humano, mesmo levando em consideração o mesmo tempo de armazenamento e o grau de hemólise. Para a espécie humana são aceitáveis níveis menores que 100 mmol/L (TOMCZAK, 2008) de potássio ao final do período de armazenamento de concentrado de hemácias. Como esse valor

não pode ser estendido a espécie felina são necessários mais estudos para padronização do valor máximo recomendado. No trabalho realizado por Bertolleti (2011), os níveis de potássio atingiram o valor médio de 4,28 mmol/L ao final de 21 dias de armazenamento, enquanto estudo de Aubert et al. (2012) observou valor médio de 4,9 mmol/L após 21 dias de preservação. No presente estudo, o valor médio de potássio no 21º dia foi de 5,1 mmol/L. Estas variações observadas entre as pesquisas podem ser explicadas pelo fato de terem sido avaliadas bolsas de sangue com diferentes hematócritos: 26%, 52% e 68%, respectivamente, no 21º dia de preservação. Sabe-se que os concentrados de hemácias, de forma geral, apresentam mais alterações do que o sangue total, armazenados sob as mesmas condições (MUKHERJEE et al., 2010).

Quanto aos níveis de lactato, observou-se aumento significativo estatisticamente no decorrer dos 21 dias de armazenamento. Como o lactato é o produto final da glicólise anaeróbia, seu consumo está diretamente relacionado com o aumento no consumo da glicose no meio, que ocorre para a formação de ATP. Desta forma, o aumento do lactato indica um aumento no metabolismo aneróbio, provocando uma acidificação do meio (HÖGMAN; MERYMAN, 1999). O valor médio de lactato no 21º dia de preservação observado neste estudo foi de 8,1 mmol/L, semelhante ao verificado por Bertolleti (2011), que foi de 8,37 mmol/L.

O pH sanguíneo dos animais está próximo da neutralidade com tendência à alcalinidade (AUTHEMENT; WOLFSHEIMER; CATCHINGS, 1986). Nos felinos e nas diferentes espécies observa-se a redução do pH logo no primeiro dia de armazenamento do sangue, decorrente da presença de ácido cítrico na solução conservadora, sendo que este pH tende a decrescer ainda mais ao longo do tempo, devido ao metabolismo anaeróbico das hemácias em que a glicose é metabolizada a lactato, levando ao acúmulo de íons H^+ (RIBEIRO FILHO et al., 1994). A variação de pH influencia diretamente a captação e liberação de oxigênio pela hemoglobina, mediadas pelo 2,3 DPG. Quando o pH é menor que 7,0 há degeneração do DPG aumentando a afinidade da hemoglobina pelo O_2 , enquanto pH acima de 7,0 promove regeneração do DPG e menor afinidade da hemoglobina pelo O_2 (HARMENING-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992). Não é bem estabelecido o pH em que as células sanguíneas podem ser submetidas e continuam a metabolizar, mas Hess e Greenwalt (2002) em trabalho com sangue humano sugeriram que o pH de 6,2 deva ser o mínimo. No estudo realizado houve redução significativa nos valores de pH entre o dia 0 e o dia 14, sendo o valor médio de pH ao final dos 21 dias de 6,63. Segundo Hess (2010), o valor do pH depende de vários fatores, como a concentração de hemoglobina total, o volume de sangue doado e pode

sofrer influência ainda da presença de hiper ou hipoventilação do doador no momento da colheita de sangue.

Houve aumento da pressão de O_2 com o decorrer do tempo de armazenamento. Este dado corrobora os resultados encontrados por Ribeiro Filho et al. (1994) e Costa Júnior; Viana; Ribeiro Filho. (2008), os quais, em estudos com sangue bovino e canino, respectivamente, em bolsas CPDA-1, relataram que o plástico das bolsas é permeável ao O_2 o que contribui para o aumento da concentração deste gás no seu interior.

Segundo Hogman; Meryman (1999), a pCO_2 é influenciada pelo tipo de armazenamento utilizado. Quando o sangue é armazenado em um frasco de vidro ou em bolsa plástica não permeável, o pCO_2 se eleva durante as primeiras 4 semanas e depois reduzido a baixos valores devido à redução do metabolismo celular. O aumento inicial da pCO_2 é resultado da neutralização do ácido láctico. Caso a bolsa de armazenamento do sangue seja permeável ao gás, o dióxido de carbono tende a sair da bolsa com redução dos seus valores. A redução da pCO_2 é benéfica visto que o CO_2 produzido durante a glicólise compete com o 2,3-DPG, no sítio de ligação da hemoglobina, deixando o 2,3-DPG livre sujeito à degradação (HESS, 2006).

Assim, neste estudo, pode-se pressupor que os baixos valores de CO_2 observados ao longo do período de armazenamento podem estar relacionados à redução do metabolismo e à permeabilidade da bolsa.

Segundo Randall; Burggren; French (2008), o metabolismo anaeróbico das hemácias produz ácidos, entre eles o ácido láctico, que é neutralizado pela ação do bicarbonato plasmático, que tem papel tamponante no meio extracelular. Por isso, a redução nos valores sanguíneos do HCO_3^- pode ser explicada por um consumo deste íon no controle da acidez, reduzindo os seus níveis na mesma proporção em que há a produção de ácidos metabólicos no interior das bolsas. Este declínio do bicarbonato também foi encontrado por Ribeiro Filho et al. (1994), em estudo com sangue bovino conservado em bolsas CPDA-1 e por Costa Júnior; Viana; Ribeiro Filho (2008), em estudo com sangue total canino preservado em CPDA-1 e CPD/SAG-M.

A concentração de ATP e 2,3 DPG é considerada um dos marcadores mais importantes a ser empregada no estudo da preservação de componentes sanguíneos (HESS, 2006), entretanto, suas determinações não constam no RDC 57/2010 e não é um exame realizado rotineiramente em nosso país. A técnica para determinação laboratorial de ATP é bem estabelecida (BEUTLER, 1984), mas provavelmente devido à necessidade de equipamentos específicos e

por apresentar certa complexidade e onerosidade é pouco realizada (HOGMAN; ENGSTRAND, 1998). As concentrações de 2,3 DPG não foram mensuradas neste estudo visto que felinos diferentemente das outras espécies animais, inclusive o homem apresentam quantidades menores e até indetectáveis de 2,3-DPG, sendo este mediador menos importante para essas espécies devido a mecanismos adaptativos que permitem a esses animais terem liberação rápida de oxigênio aos tecidos (BUNN, 1981). Esta rápida liberação de oxigênio aos tecidos, realizada pelos gatos é decorrente da baixa afinidade entre hemoglobina e oxigênio, de forma que não há resposta à adição de 2,3 DPG (BUNN, 1981).

O valor de ATP em eritrócitos de felinos saudáveis descrito por Mauk; Whelan; Taketa (1974) é de $0,36 \pm 0,04$ μ moles por ml de hemácia e $1,21 \pm 0,16$ μ moles por grama de hemoglobina, entretanto não há estudos que avaliem a variação dos valores de ATP durante o período de armazenamento do sangue felino. Durante a preservação das unidades de CHF neste estudo, houve redução dos níveis de ATP, com perdas de 80% até o 21º dia. Sem dúvida, esta redução dos níveis de ATP causou a falha na manutenção do gradiente iônica pela bomba de Na^+/K^+ (HESS; GREENWALT, 2002) fato verificado pelo aumento significativo dos valores de K^+ . Em estudo realizado em cães (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1994), em que foram avaliadas unidades de concentrado de hemácia preservadas em CPDA-1, houve redução de 45% dos valores de ATP após 35 dias. No trabalho de Tomczak (2008) realizado com concentrados de hemácias humano, verificou-se redução de 70% dos valores de ATP após 42 dias de armazenamento em solução SAGM.

A redução da concentração de ATP durante o armazenamento é responsável principalmente pelas lesões de armazenamento ligadas a membrana celular dos eritrócitos, que acarretam e, alterações das propriedades de permeabilidade da membrana da hemácia, resultando em uma célula rígida e desidratada, com perda da elasticidade (HARMENING-PITTIGLIO; HARRISON; WRIGHT, 1992).

A avaliação microbiológica nos bancos de sangue humano é um parâmetro de avaliação obrigatória pela legislação brasileira (ANVISA, 2010) e deve ser realizado em, pelo menos, 1% da produção, ou ao menos 10 unidades por mês. Neste estudo foram realizadas hemoculturas aeróbia e anaeróbia das 24 unidades de CHF, obtendo-se resultado negativo para todas as amostras avaliadas. Desta forma, este parâmetro apresentou conformidade com as normas da ANVISA (2010), que determina resultado negativo para avaliação microbiológica de no mínimo 99,5%. O não crescimento de microorganismos no estudo demonstra adequada assepsia no momento da colheita, esterilidade do sistema remanufaturado

para colheita do sangue e da conexão entre tubos realizada por aparelho específico. Porém, o controle de qualidade deve ser um processo constante, sendo os resultados periodicamente analisados e revisados.

Atualmente, se discute a relevância de aspectos clínicos, especialmente quando o receptor dos eritrócitos transfundidos se encontra em condições mais críticas (TRIULZI; YAZER, 2010). Os efeitos da duração do armazenamento dos eritrócitos têm sido ressaltados por meio de estudos que demonstram maiores riscos para os receptores que receberam concentrados de hemácias mantidos por períodos superiores a 14 dias nas condições usuais (TRIULZI; YAZER, 2010). Os concentrados de hemácias felinos são considerados adequados para transfusão por um período de armazenamento máximo de 35 dias, quando preservados com solução aditiva, mas não há estudos sobre a qualidade das hemácias durante esse período de preservação (AUBERT et al., 2011). A viabilidade *in vivo* do concentrado de hemácias preservado com CPDA-1 é menos satisfatória, sendo recomendado armazenamento por período de aproximadamente 3 semanas (WARDROP; YOUNG; WILSON, 1994). Neste estudo a avaliação dos parâmetros foi realizada nos dias 0, 14 e 21 de armazenamento, não sendo realizada em outros tempos por causa do pequeno volume das unidades de concentrado de hemácias para a espécie felina. Ademais os tempos avaliados foram considerados os mais importantes, visto o tempo de armazenamento sugerido para concentrados de hemácias preservados em CPDA-1 (WARDROP; YOUNG; WILSON; 1994), e das alterações significantes à partir de 14 dias relatadas na literatura (TRIULZI; YAZER, 2010). Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o concentrado de hemácia felino deve ser utilizado até o tempo máximo de 21 dias de preservação com CPDA-1, visto as alterações de hemólise que se apresentam no limite máximo recomendado.

Em relação ao desenvolvimento do conhecimento na área da preservação de eritrócitos para hemoterapia, os avanços nas últimas décadas foram importantes. A ANVISA RDC 157/2010 foi cuidadosamente elaborada e apresenta normas importantes a serem cumpridas para se manter a qualidade nos serviços de hemoterapia em nosso país. Na medicina veterinária ainda não existem órgãos que regularizem e fiscalizem os bancos de sangue de cães e gatos, sendo necessário estabelecer valores de referência para parâmetros que avaliem a qualidade do sangue e seus componentes. Os resultados para os parâmetros avaliados com o sistema manufaturado com produtos nacionais para colheita e armazenamento de sangue felino demonstraram que os procedimentos foram realizados de forma adequada, uma vez que não houve crescimento de bactérias. As análises realizadas são de grande importância para o

conhecimento do metabolismo dos eritrócitos felinos e seu envelhecimento *in vitro*. Nesse sentido, o monitoramento dos níveis de ATP pode informar com precisão a respeito da viabilidade e do estado funcional dos eritrócitos, mas o estudo demonstra que os valores de hemólise, potássio e lactato podem ser marcadores alternativos ou mesmo somatórios para avaliar a viabilidade e estado funcional do eritrócito, sendo a dosagem menos complexa e de mais fácil acesso.

Vale lembrar que todas as leis, normas e resoluções tendem a ser aperfeiçoadas a médio e longo prazo, baseados em pesquisas que devem ser feitas de forma contínua. Propostas de aperfeiçoamento de qualquer sistema podem ser bem-vindas se contribuírem para determinar benefícios. A transfusão sanguínea nunca será considerada isenta de riscos, visto que uma grande variedade de fatores influencia na segurança e qualidade do sangue e seu procedimento de infusão. Entretanto, a classe veterinária deve também buscar o máximo de aprimoramento possível para seus pacientes.

O presente estudo demonstrou de forma clara, que os procedimentos e materiais adotados para obtenção e armazenamento de sangue felino apresentaram resultados semelhantes aos preconizados para bancos de sangue humanos. Os equipamentos empregados embora possuam custo elevado foram imprescindíveis para o processamento dos hemocomponentes de forma adequada. Entretanto, a despeito das dificuldades encontradas em relação a obtenção de doadores ideais, e a necessidade de estabelecimento de diretrizes específicas para a certificação dos hemocomponentes, é importante e necessário assegurar que os pacientes felinos tenham à sua disposição bolsas de sangue adequadas, assim como o homem e os cães já possuem. São inúmeras as situações críticas em que o paciente felino não pode aguardar todo o processo de seleção de um doador, o procedimento de colheita e os resultados dos exames para doenças infecciosas. Somente por meio da instituição de bancos de sangue para felinos que trabalhem com sistema fechado de colheita e armazenamento de sangue, os felinos terão componentes sanguíneos prontamente disponíveis quando necessário.

As limitações deste estudo incluem a dificuldade em obtenção de doadores com maior peso, pequeno volume de amostra, poucos estudos semelhantes em felinos para que os resultados sejam comparados e confrontados, além da ausência de valores de referência estabelecidos como normais para os parâmetros avaliados.

A hemoterapia veterinária felina é uma área recente no país, que abrange grande campo de pesquisa ainda pouco estudado. A eficácia e os riscos para os receptores de CHF com maior

tempo de armazenamento, principalmente em pacientes em condições mais críticas, deve ser investigada por meio de estudos clínicos.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos concluiu-se que:

- O armazenamento produz alterações graduais na qualidade do sangue, sendo necessários estudos para avaliação de sua eficácia pós-transfusão;
- O sistema remanufaturado com produtos nacionais pode ser empregado com segurança para obtenção de sangue felino tendo-se em vista que manteve-se estéril, com eficiente conservação do concentrado de hemácias felino em CPDA-1 até o 21º dia de armazenamento.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS-OGG, A. *Practical Blood Transfusion*. In: DAY, M. J.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J. D. **BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine**. England: British Small Animal Association, 2000. cap.11, p. 263-307.
- ABRAMS-OGG, A.; KRUTH, A.S.; CARTER, R.F.; VALLI, V.E.; KAMEL-REID, S.; DUBÉ, I.D. Preparation and transfusion of canine platelet concentrates. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 4, p. 635-642, 1993.
- ANDERLINE, G.P.O.S.; ANDERLINE, G. A. Benefícios do envolvimento do animal de companhia (cão e gato), na terapia, na socialização e bem estar das pessoas e o papel do médico veterinário. **Revista CFMV Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Ano 13, n. 41, p. 70-75, 2007.
- ANVISA. Resolução RDC nº. 153, de 14 de junho de 2004. **Determina o regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea**. (Eletronic Publication). Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=11662&word=>>. Acesso em: 06 ago. 2012.
- ANVISA. Resolução RDC nº 57, de 16 de dezembro de 2010. **Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais**. (Eletronic Publication). Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/fd337280474597529fcbdf3fbc4c6735/RDC_n%C2%BA_57.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 10 nov. 2012.
- AUBERT, I.; ABRAMS-OGG, A.C.; SYLVESTRE, A.M.; DYSON, D.H.; ALLEN, D.G.; JOHNSTONE, I.B. The use of vascular access ports for blood collection in feline blood donors. *Canadian Journal of Veterinary Research*, vol. 75, n. 1, p. 25-34, 2011.
- AUTHEMENT, J. M.; WOLFSHEIMER, K. J.; CATCHINGS, S. Canine blood component therapy: product preparation, storage and administration. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 23, p. 483-493, 1986.
- BEAVER, B. V. **Comportamento felino: um guia para veterinários**. São Paulo: Roca, 2005. 372 p.
- BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods**. 3. ed. Orlando: Grune & Stratton, 1984.
- BERTOLLETI, B. **Peroxidação lipídica e parâmetros bioquímicos do sangue total felino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M**. 2011. 42 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

BEUTLER, E.; WOOD, L. The *in vivo* regeneration of red cell 2,3-diphosphoglyceric acid after transfusion of stored blood. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. 74, p. 300, 1969.

BSAVA's Scientific Committee. British Small Animal Veterinary Association. Blood transfusions. **Journal Small Animal Practice**, vol. 41, n. 9, p. 431-434, 2000.

BUCHELER, J.; COTTER, S. M. Storage of feline and canine whole blood in CPDA-1 and determination of the post-transfusion viability. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 8, p. 172, 1994.

BUNN, H. F. Evolution of mammalian hemoglobin function. **Blood**, v. 58 p. 189-197, 1981.

BUTTNEROVA, I.; BAUMLER, H.; KERN, F. Release of WEB-derived IL-1 receptor antagonist into supernatants of RBCs: Influence of storage time and filtration. **Transfusion**, vol. 41, p. 67-73, 2001.

CONRADO, F. O.; LACERDA, L. A. O.; HLAVAC, S.T.; PEDRALLI, N.R.C. Hipercalemia em cães da raça Akita : achados clínicos, nutricionais e laboratoriais. Salão de Iniciação Científica. Livro de resumos. Porto Alegre : UFRGS, 2008. p. 20-24.

COSTA JÚNIOR, J.; VIANA, J. A.; RIBEIRO FILHO, J. D.;, descrever os demais autores Parâmetros bioquímicos e hemogasométricos do sangue total canino armazenado em bolsas plásticas contendo. CPDA-1 e CPD/SAG-M. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 378-383, 2008.

CÔTÉ, S. An overview of apoptosis in blood transfusion. **Vox sanguinis**, v. 83, n. 1, p. 371-374, 2002.

ESCOBAR, G.A.; CHENG, A.M.; MOORE, E.E.; JOHNSON, J.L.; TANNAHILL, C.; BAKER, H.V.; MOLDAWER, L.L.; BANERJEE, A. Stored packed red blood cell transfusion up-regulates inflammatory gene expression in circulating leukocytes. **Annals of Surgery**, vol. 246, p. 129-134, 2007.

FELDMAN, B.; KRISTENSEN, A.T. Modern veterinary blood banking practices and their applications in companion animal practice- review. **Vet Clin Nor Am: small animal practice**, v. 25, n. 6, p. 1231-1243, 1995.

FELDMAN, B. F.; SINK, C. A. **Practical transfusion medicine for the small animal practitioner**. Teton New Media, United States of America, 2006.

GOMES, S. G. R.; Hemocomponentes e Principais Aplicações na Terapia Intensiva Veterinária. In: SANTOS, M. M.; FRAGATA, F. S. **Emergência e Terapia Intensiva Veterinária em Pequenos Animais**. 1ª edição. São Paulo, ROCA, 2008. cap. 16, p. 191-207.

GRIOT-WENK, M. E.; GIGER, U. Feline Transfusion Medicine: review. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 25, n. 6, p. 1305-1322, 1995.

HARMENING-PITTIGLIO, D.; HARRISON, C. R.; WRIGHT, N. E. Preservação do sangue: aspectos históricos, revisão do metabolismo e perspectivas atuais. In: falta autor do livro.

Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1992. p. 1-21, 1992.

HARVEY, J. W. The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals.** 6. ed. San Diego: Academic Press, 2010. p. 175–240.

HEATON, A.; MIRIPOL, J.; GRAPKA, B.; DEHART, D.; SEEGER, C.; RZAD, L.; ASTER, R. Improved storage of high hematocrit cell concentrates using a mannitol, adenine, saline, glucose solution. **Transfusion**, v. 21, p. 600-601, 1981.

HESS, J. R. Na updat on solutions for red cell storage. **Vox sanguinis**, v. 91, p. 13-19, 2006.

HESS, J. R. Red cell storage. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 368-373, 2010.

HESS, J. R.; GREENWALT, T. J. Storage of blood cells: new approaches. **Transfusion Medicine Review**, v. 16, p. 283-295, 2002.

HO, J.; SIBBALD, W.J.; CHIN-YEE, I. H. Effects of storage on efficacy of red cell transfusion: when is it not safe? **Critical Care Medicine**, vol. 31, n. 12, p. 687-697, 2003.

HOGMAN, C. F.; ENGSTRAND, L. Serious bacterial complications from blood components--how do they occur? **Transfusion Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-3, 1998.

HÖGMAN, C. F.; MERYMAN, H. T. Red blood cells intended for transfusion: quality criteria revisited. **Transfusion**, v. 46, n. 1, p. 137–142, 2006.

HOHENHAUS, A. E. Transfusion reactions. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Schalm's Veterinary Hematology. 5. ed. New York: Lippincott, p. 864 – 868, 2000.

HOHENHAUS, A. F. **Transfusão e substitutos do sangue.** In: DIBARTOLA, S. P. **Anormalidades de fluidos, eletrólitos e equilíbrio ácido-básico na clínica de pequenos animais.** São Paulo: Roca, 2007. p. 549–565.

HOHENHAUS, A. F.; DRUSIN, L. M.; GARVEY, M. S. Serratia marcescens contamination of feline whole blood in a hospital blood bank. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 6, p. 794-798, 1997.

HOD, E.A.; SPITALNIK, S.L. Harmful effects of transfusion of older stored red blood cells: iron and inflammation. **Transfusion**, vol. 51, n. 4, p 881-5, 2011.

HOSGOOD, G. Blood transfusion: a historical review. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 197, n. 8, p. 998–1000, 1990.

HUMPHRIES, J. E. Transfusion therapy in acquired coagulopathies. **Hematology Oncology Clinics of North America**, v. 8, n. 6, p. 1181-201. 1994.

KESSLER, R. J.; RANKIN, S.; YOUNG, S.; O'SHEA, K.; CALABRESE, M.; GULDIN, A.; LIPSON, N.; OAKLEY, D. A.; GIGER, U. Pseudomonas fluorescens contamination of a feline packed red blood cell unit and studies of canine units. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 1, p. 29-38, 2010.

KORTE, D.; VERHOEVEN, A. J. Quality determinants of erythrocyte destined for transfusion. **Cell and Molecular Biology**, v. 50, p. 187-195, 2004.

LANEVSKI, A.; WARDROP, K. J. Principles of transfusion medicine in small animals. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 447-454, 2001.

LEE, R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.; RODGERS, G. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 196-217, 1999.

LION, N.; CRETTEZ, D.; RUBIN, O.; TISSOT, J-D. Stored red blood cells: A changing universe waiting for its maps. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 374-385, 2010.

MAUK, A.G.; WHELAN, H.T.; TAKETA, G.R.P.F. Anemia in domestic cats: Effect on hemoglobin components and whole blood oxygenation. **Science**, v. 185, p. 447-449, 1974.

MUKHERJEE, S.; MARWAHA, N.; PRASAD, R.; SHRARMA, R. R.; THAKRAL, B. Avaliação seriada de parâmetros bioquímicos das preparações de eritrócitos para avaliar a segurança de transfusões neonatais. **Indian Journal of Medical Research**, v. 132, n. 6, p. 715-720, 2010.

PACHECO, F. C. Crise e risco na história da transfusão de sangue. **ABO – Revista de Medicina Transfusional**, n. 16, p. 12-23, 2003.

PEREIRA, P. M. ; MOROZ, L. ; SILVA, T. S. ; LUNDSTEDT, L. P. . Resultados obtidos após implantação do Banco de Sangue de Pequenos Animais no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina. In: XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET), 2002, Gramado. **Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET)**. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, p. 65-65, 2002.

PEREIRA, P. M.; REICHMANN, P. **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 491-501.

PRITTIE, J. E. Triggers for use, optimal dosing, and problems associated with red cell transfusions. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** v. 33, n. 6, p. 1261-1275, 2003.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptações**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 453-460.

RIBEIRO FILHO, J. D.; ALMEIDA, C. T.; GONÇALVES, R. C.; KOHAYAGAWA, A.; CURY, P. R. Alterações hemogasométricas de sangue bovino durante a conservação em

frascos de vidro com ACD e bolsas plásticas com CPDA-1, por 35 dias. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 6, p. 77-84, 1994.

SCOTT, K. L.; LECAR, J.; ACKER, J. P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 19, n. 2, p. 127-142, 2005.

SCHNEIDER, A. Transfusion medicine. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1995. p. 1245-1261.

SPRINGER, T.; HATCHETT, W. L.; OAKLEY, D. A.; NIGGEMEIR, A.; GIGER, U. Feline Blood storage and component therapy using a closed collection system. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, p. 248, 1998.

TOMCZACK, A. C. T. Q. **Estudos sobre o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias**. 2008. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.

TOMCZAK, A. N. Q.; GRILLO, K. T.M.; CASTRO, J.M.; MACHADO, A.M.B.; LEONART, M.S.S.; NASCIMENTO, A.J. Estudo de métodos laboratoriais para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar), Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, vol.32 no.3, São Paulo, 2010.

TRIULZI, D. J.; YAZER, M. H. Clinical studies of the effect of blood storage on patient outcomes. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 43, n. 1, p. 95–106, 2010.

ULATA, S. K. **Determinação *in vitro* da atividade do fator de necrose tumoral (TNF) em concentrados de plaquetas de cães. Fracionamento do sangue total. Banco de sangue veterinário**. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

VALERI, C. R.; HIRSH, N M. Restoration *in vivo* of erythrocyte adenosine triphosphate, 2,3-diphosphoglycerate, potassium ion and sodium ion concentrations following the transfusion of acid-citrate-dextrose-stored human red blood cells. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** , v. 73, p. 722, 1969.

WARDROP, K. J.; YOUNG, J.; WILSON, E. An in vitro evaluation of storage media for the preservation of canine packed red blood cells. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 23, p. 84-86, 1994.

WARDROP, K. J. Selection of anticoagulant-preservatives for canine and feline blood storage. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 25, n. 6, p. 1263-1275, 1995.

WARDROP, K. J. TUCKER, R. L.; MUGNAI, K. Evaluation of canine red blood cells stored in a saline, adenine, and glucose solution for 35 days. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, p. 5-8, 1997.

WEINGART, C.; GIGER, U.; KOHN, B. Whole blood transfusion in 91 cats: a clinical evaluation. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. , n. 6, p. 139–148, 2004.

WILLER, R. L.; RIEDESEL, D. H. Transfusion therapy and blood banking in the dog and cat. **Iowa State University Veterinarian**, v. 47, n. 2, p. 102-109, 1985.

ZIMRIN, B.; HESS, J. R. Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. **Vox Sanguinis**, v. 96, p. 93–103, 2009.