FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

LUDMILA RODRIGUES MOROZ

Perfil bioquímico e hemogasométrico de concentrado de hemácias canino coletados em CPDA-1 e CPD/SAG-M, com e sem filtro de redução de leucócitos

São Paulo

2015

LUDMILA RODRIGUES MOROZ

Perfil bioquímico e hemogasométrico de concentrado de hemácias canino coletados em CPDA-1 e CPD/SAG-M, com e sem filtro de redução de leucócitos

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni

São Paulo

2015

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.3101
FMVZ

Moroz, Ludmila Rodrigues
Perfil bioquímico e hemogasométrico de concentrado de hemácias canino coletados em CPDA-1 e CPD/SAG-M, com e sem filtro de redução de leucócitos / Ludmila Rodrigues Moroz. -- 2015.
81 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni.

1. Lesões de armazenamento. 2. Medicina transfusional veterinária. 3. Leucorredução. 4. Hemogasometria. 5. Perfil bioquímico. 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 "Perfil bioquímico e hemogasométrico de concentração de hemácias canino coletados em CPDA-1 e CPD/SAG-M, com e sem filtro de redução de leucócitos", protocolado sob o nº 2504/2011, utilizando 10 (dez) cães, sob a responsabilidade da 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 15/2/2012.

São Paulo, 29 de janeiro de 2015.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MOROZ, Ludmila Rodrigues

Título: Perfil bioquímico e hemogasométrico de concentrado de hemácias canino coletados em CPDA-1 e CPD/SAG-M, com e sem filtro de redução de leucócitos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências.

Data: ___/___/_____.

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento _____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento _____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento _____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento _____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marina Rodrigues Moroz e Waldemar Moroz.

Aos meus tios Melania Moroz e Luiz Cláudio Menon.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a minha amiga Maira Calderaro Ferreira dos Santos, sempre presente, mesmo a distância. Obrigada por me mostrar com atitudes que nenhuma dificuldade é intransponível. E obrigada também por ter me reapresentado, ainda na época da graduação, Villa-Lobos. Apesar de já conhecer sua obra, foi contigo que aprendi a ouvi-lo. E amá-lo. Seus acordes me mantiveram atentas durante todas as fases da escrita desta tese. Salvem as Bachianas!

Aos meus pais e meus tios. Obrigada pela criação e ensinamentos. Agradeço, especialmente, minha mãe que me amou de forma incondicional, apesar do meu gênio "forte". E mesmo numa fase cheia de problemas, sempre esteve presente em minha vida, ainda que a distância.

Agradeço aos que me ajudaram na realização técnica do projeto, em especial a Viviane Ferreira Azevedo, Renata Ramos Rodrigues e Vinicius Peres. Este trabalho só foi possível graças a vocês. Obrigada pelas risadas e borbulhas de amor! Por acaso podemos fazer outro curso dia desses. Que tal quando vocês estiverem com muita coisa para fazer? E lembrem-se sempre: oxigênio faz um bem danado ao cérebro!

Miron, sua ajuda quebrando os galhos no dia-a-dia vampiresco sempre foi fundamental. Sem você seria muito difícil realizar o projeto e manter o banco funcionando.

Selene, você merece um parágrafo a parte. Obrigada seria pouco a dizer, mas não saberia o que dizer depois de tantos anos de parceria. Deixar o banco de sangue aperta meu coração, e uma parte deste aperto é por saber que nosso convívio não será mais rotineiro. Obrigada pela ajuda técnica, emocional, e pelas besteiras ditas e carregada vento. Desejo toda a felicidade do mundo a você e toda a família. Ps.: Ainda acho qu faltando um gato para alegrar mais sua vida...

Prof.a Aline Magalhães, sua forma energética de viver é algo que me encantou. Sempre altiva e pronta para uma gargalhada ou bronca. Sentirei falta disso. E desculpe se em algum momento me excedi ou causei transtornos, com certeza não foi intencional. Mas

talvez você por ser energética possa compreender outro ser humano elétrico e impulsivo como eu.

Prof.a Mitika, sua disciplina “Temas de hematologia clínica” mudou a minha forma de ver o mundo acadêmico e trouxe para minha vidas mais amigos que poderia esperar. Contigo aprendi a ver, mas sempre desconfiando, pesquisando, me assegurando. A pergunta que hoje em dia me acompanha e me ajuda a reduzir erros foi colocada em minha alma graças às discussões e mais discussões conduzida por ti. “-De onde você tirou isso?” ressoa na minha cabeça... SEMPRE!. Obrigada de verdade! Não sabe o bem que isso fez!

Tatiana Pavan, Renata Farinelli, João Fábio, Rebeca Weigel e Juliana Junqueira. Formamos a “Confraria da Mitika” em 20010, e cá estamos. Cada um num canto do país, mas com o mesmo companheirismo. Vocês fazem falta no meu dia-a-dia.

Simone Bopp, Sabrina Rodigheri, Alexandre Redson e Ana Amélia. Amigos que também foram espalhados pelo vento, mas que me mantiveram animada e estiveram sempre prontos para me escutar e aconselhar.

Agradeço às minhas “roomies”: Luciana Sartori e Raquel Campello. Obrigada pelo acolhimento, apoio e irmandade. Se tiver irmãs é isso que vivi com vocês, pela primeira vez achei ruim ser filha única.

Agradeço aos colegas da Universidade Metropolitana de Santos, especialmente ao prof. Angelo Sementilli, Tania Passeti e Alessandra Abreu. Trabalhar com vocês foi um privilégio à parte. Acordar às 5 da manhã para descer do trabalho foi muito prazeroso. Com vocês vivi o ditado: “Quem ama o que faz nunca vai trabalhar na vida”. Angelo, um ob
mais que especial. Você é um mestre que inspira a todos!

Aos alunos que passaram por minha vida. Ver seus olhos cheios de curiosidade, sono e espanto (às vezes tudo junto no mesmo dia) me viciou. Ainda não sei como ficarei longe da graduação, mas se tentei melhorar como profissional, fiz isso pensando em vocês. Afinal eu acredito que a vida de um docente se perpetua através de seus discípulos.

Aos colegas da pós, especialmente Lara Facó, Felipe Andrade, Maria Fernanda, Maria Teresa Souto. Vocês ajudaram de forma indireta na confecção do projeto e nos

trabalhos do banco. Estudamos juntos, realizamos projetos, viajamos pelas estradas e também “na maionese” em nome da pesquisa. Sem contar que tornamos a vida de nossos orientadores mais “divertida”, se é que posso utilizar adequadamente esta palavra... ☺

Robsmar (Walidi), nossos passos acabaram distanciando nossas vidas, e após muitos anos de convívio seria muito injusto de minha parte não dedicar um espaço para ti neste trabalho. Obrigado por me apoiar nos estudos e por estimular meu crescimento profissional. Desejo que Deus reserve muitas glórias em sua vida. “Alahu Ahkbar”.

Ao seu Antônio Carlos por permitir a colheita de sangue dos cães durante o projeto, mas também pelo suco gelado, estórias pitorescas e sorriso largo!

A dona Dagmar e seu Eduardo, com sua casa sempre aberta, mesa farta e corações escancarados. Mariana Saliola, nossa maior entusiasta. Aos canis da Guarda Civil Metropolitana de Itapevi e Santana de Parnaíba. Impossível lembrar o nome de todos os profissionais, tão pouco as insígnias, mas agradeço ao veterinário responsável, Eduardo, por abrir os portões das corporações.

Aos meus anjos de pelos, todos. Os vivos e os que já estão no canil/gatil do Senhor. Obrigada por fazerem companhia nas horas de isolamento. O amor que me deram sempre encheu a casa, vida e minha alma.

E por fim, minha eterna fada madrinha, Denise Tabacchi Fantoni. Depois de 9 anos de convívio e de investimento profissional de sua parte em minha pessoa, é muito difícil me despedir. O término deste projeto e tese sinaliza um vento que irá me afastar fisicamente dos arredores da FMVZ, mas deixo a cargo de Deus meu futuro profissional. E se for pelo melhor da medicina veterinária, que voltemos a trabalhar juntas. Reitero o que disse nos agradecimentos do mestrado: se me tornar metade do que ela, serei uma gigante.

“Vou ser como você quando eu crescer”.

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

RESUMO

MOROZ, L. R. **Perfil bioquímico e hemogasométrico de concentrado de hemácias canino coletados em CPDA-1 e CPD/SAG-M, com e sem filtro de redução de leucócitos.** [Biochemical and hemogasometric profile of canine packed red blood cells collected on CPDA-1 and CPD/SAG-M, with and without leucoreducer filter]. 2015. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2015.

A medicina transfusional utiliza o sangue como ferramenta terapêutica suporte para diversas doenças, e vários estudos justificam o uso de hemocomponentes em detrimento de sangue total. A estocagem e a manipulação do sangue podem acarretar alterações funcionais de seus subprodutos, e a transfusão de hemácias estocadas por longos períodos pode ocasionar danos ao receptor. Portanto, embora a manutenção do estoque de componentes eritrocitários seja necessária, o armazenamento sanguíneo pode reduzir a função das hemácias transfundidas e causar reações transfusionais indesejadas, fato que estimula o desenvolvimento de novas soluções e aditivos extras, culminando com hemocomponentes mais seguros e com maior tempo de validade. Este estudo teve o objetivo de avaliar as alterações na composição bioquímica e hemogasométrica que pudessem ser imputadas na ocorrência de lesões de armazenamento no concentrado de hemácias (CH) canino em decorrência do tipo de solução preservativa utilizada (citrato, fosfato, dextrose e adenina [CPDA-1] ou com o citrato, fosfato, dextrose com solução extra de adenina, glicose e manitol [CPD/SAG-M]). Um segundo objetivo foi avaliar se a redução de leucócitos do CH impactaria de forma decisiva a estocagem do CH. Para tanto foram comparados valores referentes à pressão de oxigênio (PO_2), pressão de dióxido de carbono (PCO_2), saturação de oxigênio (SO_2), pH, taxa de hemólise, glicose, sódio e potássio extracelulares. As bolsas foram analisadas a cada sete dias, iniciando 12 horas após a colheita até completar 42 dias (seis semanas de estocagem). Foram estudadas 23 bolsas divididas em quatro grupos, sendo o Grupo 1 de CH colhido em CPDA-1 (6 bolsas), Grupo 2 em CPDA-1 leucorreduzido (6 bolsas), Grupo 3 em CPD/SAG-M (6 bolsas) e Grupo 4 em CPD/SAG-M leucorreduzido (5 bolsas). Dentre os resultados, não foram observadas alterações significativas na taxa de hemólise que pudessem indicar qual anticoagulante foi mais eficaz, tão pouco se a leucorredução possuiu efeito preservante dos eritrócitos. Também não houve diferenças significativas na concentração de glicose e pH entre os grupos durante as semanas de estudo. Foram observadas diferenças na concentração de potássio extracelular, com menor concentração nas bolsas leucorreduzidas. A variação da PCO_2 não apresentou um comportamento padrão de aumento ou redução com diferenças

significativas claras. Contudo, foram observadas mudanças marcantes no comportamento da concentração de oxigênio ao se comparar a presença ou ausência dos leucócitos, independente do anticoagulante utilizado, com aumento marcante nos valores de PO_2 nos grupos leucorreduzidos a partir da segunda semana ($P<0,05$). A SO_2 apresentou diferença significativa entre os grupos que sofreram ou não leucorredução desde a semana zero ($P<0,05$), com valores maiores nos grupos leucorreduzidos, independente do anticoagulante utilizado nas semanas 1 até 5. Conclui-se analisando os dados que a solução preservativa CPD/SAG-M não ofereceu melhor meio para estocagem de CH canino quando comparado ao CPDA-1 no que tange a hemólise, mas que a redução de leucócitos (leucorredução) indicou efeito protetivo indireto da estrutura eritrocitária de CH canino em estocagem, independente do anticoagulante utilizado, observado pela menor concentração de potássio a partir de 35 dias de estocagem (quinta semana). Concluiu-se, também, que a leucorredução exerceu um impacto na concentração de oxigênio mensurado pela PO_2 e SO_2, indicando melhor função *in vitro* da hemoglobina, independente do anticoagulante utilizado.

Palavras-chave: Lesões de armazenamento. Medicina transfusional veterinária. Leucorredução. Hemogasometria. Perfil bioquímico.

ABSTRACT

MOROZ, L. R. **Biochemical and hemogasometric profile of canine packed red blood cells collected on CPDA-1 and CPD/SAG-M, with and without leucoreducer filter.** [Perfil bioquímico e hemogasométrico de concentrado de hemácias canino coletados em CPDA-1 e CPD/SAG-M, com e sem filtro de redução de leucócitos]. 2015. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2015.

The transfusional medicine use blood as a therapeutic support tool for various diseases, and many studies justify the use of blood products at the expense of whole blood. The storage and handling of blood can result in functional changes of these products, and the transfusion of long time storage erythrocytes may be harmful to the receiver. Therefore, while the maintaining the stock of red cell components is required, blood storage can reduce the function of transfused red blood cells and cause unwanted transfusion reactions, a fact that stimulates research in the field of development of new solutions and extra additives, culminating in safer blood products and with longer validity. This study aimed to evaluate variations in the biochemical and hemogasometric composition that could be changed in the event of storage lesions in canine packed red blood cells (PRBC) due to the type of used preservative solution (citrate, phosphate, dextrose and adenine [CPDA -1] or citrate, phosphate, dextrose solution with extra adenine, glucose and mannitol [CPD/SAG-M]). A second objective was to assess whether the reduction of CH leukocytes could impact decisively in the storage of PRBC. Therefore, we compared the values for oxygen pressure (PO_2), carbon dioxide pressure (PCO_2) and oxygen saturation (SO_2), pH hemolysis rate, glucose, extracellular sodium and potassium. The blood bags were analyzed every 7 days starting 12 hours after harvest and during 42 days (six weeks of storage). It were studied 23 bags divided into four study groups: Group 1 PRBC harvest in CPDA-1 (6 bags), Group 2 leukoreduced CPDA-1 (6 bags), Group 3 CPD/SAG-M (6 bags) and group 4 in CPD/SAG-M leukoreduced (5 bags). Among the results, there were no significant changes in hemolysis rate were observed which could indicate which anticoagulant was more effective, as little to leukoreduction owned preservative effect of erythrocytes. There were also no significant differences in glucose concentration and pH between the groups during the week study. Differences were observed in extracellular potassium concentration, with lower concentrations in leucorreduced bags. The variation of PCO_2 was wandering without formation of an increase or decrease in behavior clear differences. However, significant changes in the behavior of oxygen concentration when comparing the presence or absence of leukocytes were observed independent of the anticoagulant was used, with marked increase in

PO_2 values in leukorreuced groups from the second week (P <0.05). The SO_2 showed a significant difference between the groups that have suffered or not leukoreduction from week zero (P <0.05), with higher values in leukoreduced groups, independent of the anticoagulant used in weeks 1 to 5. We conclude by analyzing the data that preservative solution CPD / SAG-M offered no better way to canine CH storage when compared to the CPDA-1 with respect to hemolysis, but that leukocyte reduction (leukoreduction) indicated indirect protective effect of erythrocyte structure of CH canine in storage, independent of the anticoagulant used, observed by the lower concentration of potassium from 35 days of storage (fifth week). It was concluded also that leukoreduction exerted an impact on oxygen concentration measured by PO_2 and SO_2, indicating better function of hemoglobin *in vitro*, independent of the anticoagulant used.

Keywords: Storage lesions. Veterinary transfusion medicine. Leukoreduction. Hemogasometry. Biochemical profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático mostrando a organização das bolsas conforme os grupos.. 32

Figura 2 - Fotografais ilustrando a manipulação da tubulação em sistema fechado para análise hemogasométrica. 37

Figura 3 - Organograma demonstrativo das etapas de seleção das bolsas analisadas 39

Figura 4- Gráficos de barras ilustrando a variação médias da PCO2 (mmHg) nos grupos (1, 2, 3 e 4) durante as semanas de estocagem..... 45

Figura 5 - Gráficos de barras ilustrando a variação das médias da PO_2 (mmHg) nos grupos durante as semansa de estocagem. 47

Figura 6- Gráficos de barras ilustrando a variação médias da SO2 (%) nos grupos durante as semanas de estocagem. 50

Figura 7- Gráficos de barras ilustrando a variação médias da pH nos grupos durante as semansa de estocagem. 53

Figura 8 - Gráficos de barras ilustrando a variação de hemólise (%) nos grupos durante as semansa de estocagem. 56

Figura 9 - Gráficos de barras ilustrando a variação da concentração de potássio (µmol/L) nos grupos durante as semansa de estocagem. 59

Figura 10 - Gráficos de barras ilustrando a variação da concentração de sódio (µmol/L) nos grupos durante as semanas de estocagem. 62

Figura 11 - Gráficos de barras ilustrando a variação da concentração de glicose (mg/dL) nos grupos durante as semanas de estocagem. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de leucócitos em sangue total canino pré e pós redução de leucócitos por meio de filtro em linha 42

Tabela 2 - Valores individuais, médias e desvio padrão da pressão de gás carbônico (PCO2 mmHg) das 23 bolsas selecionadas para estudo 44

Tabela 3 - Valores individuais, médias e desvio padrão da pressão de oxigênio (mmHg) das 23 bolsas selecionadas para estudo 46

Tabela 4- Valores individuais, de médias e desvio padrão saturação de oxigênio (%) das 23 bolsas selecionadas para estudo 49

Tabela 5- Valores individuais, média e desvio padrão da saturação de oxigênio (%) das 23 bolsas selecionadas para estudo 52

Tabela 6 - Valores de porcentagem de hemólise das 23 bolsas selecionadas para estudo, divididos por grupo e por semanas de análise. 55

Tabela 7 - Valores individuais, médias e desvio padrão da concentração de potássio (µmol/L) das 23 bolsas selecionadas para estudo 58

Tabela 8 - Valores individuais, médias e desvio padrão da concentração de sódio (µmol/L) das 23 bolsas selecionadas para estudo 61

Tabela 9 - Valores individuais, médias e desvio padrão da concentração de glicose (mg/dL) das 23 bolsas selecionadas para estudo 63

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 19

2. **REVISÃO DE LITERATURA** 21

2.1 SOLUÇÕES ANTICOAGULANTES, ADITIVAS E PRESERVATIVAS 21

2.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE ERITROCITÁRIA E DETERMINAÇÃO DAS LESÕES DE ARMAZENAMENTO 24

2.3 EFEITO DA REDUÇÃO DE LEUCÓCITOS 25

3 **JUSTIFICATIVA** 27

4 **HIPÓTESES** 28

5 **OBJETIVO GERAL** 29

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29

6 **MATERIAL E MÉTODOS** 30

6.1 DOADORES 30

6.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL **30**

6.2.1 Critérios de exclusão **33**

6.3 ALIQUOTAGEM DAS AMOSTRAS 34

6.4 PARÂMETROS ANALISADOS 35

6.4.1 Contagem de leucócitos **35**

6.4.2 Determinação do volume globular, dosagem de hemoglobina e cálculo de da taxa de hemólise (%) **35**

6.4.3 Dosagem de glicose **36**

6.4.4 Dosagem de sódio e potássio **36**

6.4.5 Hemogasometria **36**

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 37

7 **RESULTADOS** 38

7.1 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS 41

7.2 ANÁLISE DE GASES SANGUÍNEOS (PCO2, PO2 E SO2) E PH 42

7.2.1 Pressão parcial de gás carbônico (PCO_2) 43

7.2.2 Pressão parcial de oxigênio (PO_2) 45

7.2.4 pH 51

7.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS 53

7.3.1 Porcentagem de hemólise 54

7.3.2 Concentração de sódio e potássio 56

7.3.3 Glicose 62

8 **DISCUSSÃO** 65

9 **CONCLUSÕES** 75

REFERÊNCIAS 76

1 INTRODUÇÃO

A medicina transfusional utiliza o sangue como ferramenta terapêutica suporte para diversas doenças, e vários estudos justificam o uso de hemocomponentes em detrimento de sangue total. Com o processamento do sangue e utilização de substâncias preservativas é possível aumentar o tempo de estocagem de alguns hemocomponentes, como plasma fresco congelado e plasma congelado, e oferecer o produto mais específico para cada enfermidade, permitindo uma abordagem individual de cada paciente. O armazenamento do sangue também minimiza as situações de emergência, pois além de manter estocados diversos componentes para pronto uso, permite a realização prévia de exames capazes de atestar que o produto possui baixo risco para o receptor, como por exemplo, o risco de transmissão de doenças. Entretanto a manipulação do sangue pode acarretar em alterações funcionais de seus subprodutos e a estocagem excessiva pode trazer danos ao receptor.

As hemácias dos mamíferos são células anucleadas cujo metabolismo e função de transporte de gases se mantém durante o período de estocagem. Mesmo em temperaturas baixas (entre 2 e 6 ºC) as hemácias continuam a produzir ácido lático como metabólito, reduzindo o pH e consequentemente seu tempo de validade (WARDROP et al., 1997; COSTA JUNIOR et al., 2008; KISIELEWICZ; SELF, 2014). Além de alterar a membrana eritrocitária, o pH reduzido dificulta a recomposição do 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG), molécula responsável pelo controle da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Esta redução do pH resulta em redução da liberação de oxigênio para os tecidos pelas hemácias transfundidas (COSTA JUNIOR et al., 2008;), situação que poderá ser revertida em até 48 horas pós-transfusão. A lesão da membrana celular pode causar extravasamento de potássio, resultando num hemocomponente com alto teor deste íon (GANEM et al., 1995; COSTA JUNIOR et al., 2008), que se infundido rapidamente e em grandes volumes pode resultar em arritmias cardíacas.

As mudanças de membrana, além de resultarem em alterações eletrolíticas, cursam com formações de vesículas contendo substâncias pró-inflamatórias, como lipídeos de baixa densidade. Essas vesículas estimulam paralelamente a fagocitose precoce das hemácias transfundidas e também a resposta inflamatória inata do receptor. O ferro fagocitado durante a hemocaterese das hemácias transfundidas estimula a produção de citocinas, podendo piorar o

quadro de pacientes que já estejam em síndrome de resposta inflamatória sistêmica. O grau de destruição de hemácias transfundidas é diretamente proporcional ao tempo de estocagem e as características das soluções preservantes utilizadas (COSTA JUNIOR et al., 2008; HOD et al. 2008, 2010). A fim de reduzir ou mesmo neutralizar os efeitos negativos que ocorrem durante a estocagem, novas soluções preservativas tem sido desenvolvidas.

Portanto, embora a manutenção do estoque de componentes eritrocitários seja necessária, o armazenamento sanguíneo pode reduzir a função das hemácias transfundidas e causar reações transfusionais indesejadas, fato que estimula pesquisas no campo de desenvolvimento de novas soluções e aditivos extras, culminando com hemocomponentes mais seguros e com maior tempo de validade.

Assim, este estudo teve o objetivo de avaliar as alterações na composição bioquímica e hemogasométrica que pudessem ser imputadas na ocorrência de lesões de armazenamento no concentrado de hemácias (CH) canino em decorrência do tipo de solução preservativa utilizada. Para tanto comparou-se a solução de citrato, fosfato, dextrose e adenina (CPDA-1) com o citrato, fosfato, dextrose com solução extra de adenina, glicose e manitol (CPD/SAG-M). Um segundo objetivo foi avaliar se a redução de leucócitos do CH impactou de forma decisiva na estocagem do CH.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A seguir será apresentada revisão de literatura abordando as soluções preservantes, lesões de estocagem e interações inflamatórias dos hemocomponentes eritrocitários.

2.1 SOLUÇÕES ANTICOAGULANTES, ADITIVAS E PRESERVATIVAS

A existência de bancos de sangue só foi possível mediante o desenvolvimento de soluções anticoagulantes com substâncias nutritivas capazes de manter as hemácias viáveis por longos períodos. Os estudos visando a criação de soluções que fossem eficazes em evitar hemólise e manter a função eritrocitária iniciaram-se ha 100 anos, quando Rousand e Turner conseguiram publicar em 1916 o primeiro relato de estocagem de hemácias de coelho de forma bem sucedida utilizando citrato de glicose (HESS, 2010). Desde então, muitas fórmulas foram testadas, sendo que atualmente é possível estocar bolsas de concentrado de hemácias (CH) humanas por até 42 dias (HOGMAN, 1998; HESS; GREENWALT, 2002; HESS, 2006, 2010; ZUBAIR, 2010).

Várias substâncias são utilizadas para aumentar o tempo de preservação dos hemocomponentes, sendo que a formulação de soluções enriquecidas com elementos capazes de fornecer nutrientes para as células interfere na viabilidade e nos parâmetros bioquímicos do sangue, bem como minimizam situações de emergência por permitirem estoque de hemocomponentes para uso imediato. Essa possibilidade de armazenamento reduziu também a prevalência de transmissão de doenças por meio da transfusão, pois permite que diversos exames sejam realizados a fim de detectar doenças ou deteriorações dos hemocomponentes durante sua manipulação.

Inicialmente o sangue começou a ser estocado unicamente com um produto anticoagulante, o citrato de sódio. Contudo, foram observadas deteriorações eritrocitárias graves que permitiam o uso em poucas horas após a coleta. Em seguida foram desenvolvidas soluções preservativas compostas pelo mesmo citrato, mas acrescidas de nutrientes, como a solução de citrato com dextrose (CD) ou citrato, fosfato e dextrose (CPD), permitindo a estocagem de CH humano por 21 dias. Atualmente as soluções mais utilizadas são as que contêm citrato, fosfato, dextrose e adenina (CPDA) que permite estocagem do sangue humano por até 35 dias (GIBSON et al., 1968; HESS, 2006). Entretanto, novos sistemas de coleta incluem uma bolsa extra com o intuito de fornecer maior quantidade de dextrose e adenina, além de manitol e outros nutrientes com efeito antioxidante. Esses nutrientes acrescidos ao CH chegam a aumentar o tempo de validade para 42 dias, como no caso do CPD/SAG-M (HESS, 2006).

A dextrose tem o intuito de fornecer glicose para a manutenção da produção energética eritrocitária (por glicólise). O fosfato e adenina são utilizados para produção de trifosfato de adenosina (ATP) e reestruturação de 2,3 difosfoglicerol (2,3-DPG), um componente que interfere diretamente na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Portanto, estes dois nutrientes têm o intuito de manter a integridade de membrana e função a celular. O quadro 1 descreve as características das principais soluções anticoagulantes e preservativas encontradas para uso comercial no Brasil.

Quadro 1- Soluções anticoagulantes e preservativas humanas utilizadas em medicina veterinária no Brasil.

SIGLA	CARACTERÍSTICAS	TEMPO DE ARMAZENAMENTO DE CH CANINO
CPD	Citrato, fosfato de sódio monobásico, dextrose e ácido cítrico. Concentrado de hemácias – VG entre 65-80%	21 dias
CPDA-1	Citrato, fosfato de sódio dibásico, dextrose e adenina. Concentrado de hemácias – VG 65-80%.	21 dias 28 dias
CPD/SAG-M	Citrato, fosfato de sódio dibásico e dextrose. Após separação de CH há diluição com solução fisiológica com glicose e manitol. Concentrado de hemácias diluído, VG – 45 – 65%.	35 dias

Fonte: (LACERDA et al., 2014 adaptado por MOROZ, 2015).

Legenda: VG – volume globular.

Ao avaliar as diferenças de tempo de estocagem entre cães e seres humanos, verifica-se que o CH coletado com CPDA-1 permite a estocagem para o cão por 21 dias e de 35 dias com solução aditiva contendo fosfato e dextrose extras, sendo que em humanos essas mesmas soluções permitem estocagem de CH por 35 e 42 dias, respectivamente (WARDROP et al., 1997), indicando que estudos espécie específicos são necessários sempre que nova técnica for transportada da medicina para a veterinária.

2.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE ERITROCITÁRIA E DETERMINAÇÃO DAS LESÕES DE ARMAZENAMENTO

Apesar do sangue colhido em bolsas ser mantido com soluções preservativas, a quantidade de nutrientes é restrita, ocasionando perda da função eritrocitária durante a estocagem. É considerado um hemocomponente eritrocitário adequado é aquele durante estocagem apresenta menos de 1% de hemólise e que após 24 horas da transfusão mantenha, pelo menos, 90% das hemácias transfundidas viáveis na circulação (HAMASAKI, YAMAMOTO, 2000).

As lesões de armazenamento eritrocitário incluem a redução da concentração de ATP, redução de 2,3-DPG, redução da deformabilidade associada com perda de constituintes de membrana e de hemoglobina, e o acúmulo de reagentes biológicos ativos liberados por hemácias e leucócitos (HESS; GREENWALT, 2002; HOGMAN et al., 2002; GULLIKSSON; VAN DER MEER, 2009; ANTONELOU et al. , 2012).

Dentro da bolsa a hemácia se mantém viva, produzindo ácido lático a partir da glicólise. A queda do pH causa maior atividade da enzima fosfatase-3, causando depleção do 2,3 DPG. Essa redução causa maior afinidade da hemoglobina ao oxigênio, podendo resultar em menor oferta deste elemento aos tecidos logo após a transfusão (HESS; GREENWALT, 2002; HOGMAN et al., 2002; ZUBAIR 2010). Entretanto, a queda de 2,3 DPG pode não afetar de forma importante o paciente receptor, pois este se regenera na circulação após 24 horas, sem contar que o pH é regulado pelo organismo de forma constante (ZUBAIR, 2010). Outro ponto a ser levantado é o fato da oferta de oxigênio depender mais da manutenção da viscosidade sanguínea e da densidade de capilares funcionais do que da capacidade de transporte de oxigênio pelas hemácias (TSAI et al,. 2010). Contudo, essa falha transitória na capacidade de liberar oxigênio aos tecidos pode ser uma situação complexa em casos particulares, como o que ocorre em pacientes com trauma crânio encefálico (TCE) (LEAL-NOVAL et al., 2008). Essa observação de restrição de sangue “velho” a pacientes com TCE já sinaliza a necessidade de avaliação da indicação de hemocomponentes com menor risco de lesões de armazenamentos para determinados casos, como no caso de pacientes com insuficiência hepática grave, onde há contraindicação de transfusão de hemácias com mais de

15 dias de estocagem a fim de evitar desencadeamento ou piora de encefalopatia hepática (HARRELL, 1997).

A membrana eritrocitária também sofre alterações em morfologia e função. Três eventos diferentes afetarão a membrana (MURADOR; DEFFUNE, 2007; HESS, 2010; ZUBAIR, 2010; ANTONELOU et al., 2012; LAND, 2013).

- Redução de ATP, com consequente redução da deformabilidade. Isso poderá culminar com menor oferta de oxigênio à periferia, uma vez que as hemácias não conseguirão passar pelos capilares mais delgados. A redução da deformabilidade também ocasiona maior fragilidade eritrocitária, cursando com hemólise.
- Adesão de moléculas de Ig-G na membrana eritrocitária que ocorre pela própria oxidação de proteínas estruturais ocasiona desestruturação lipídica. Essa adesão de Ig-G causará acelerada remoção de eritrócitos transfundidos, além de aumentar a fragilidade da hemácia e hemólise.
- Formação de vesículas e reorganização do citoesqueleto formando espículas (hemácia com forma de equinócitos). As vesículas ativarão o sistema fagocítico mononuclear ocasionando remoção destas estruturas e perda de 20% da superfície eritrocitária.

Esses efeitos eritrocitários podem ocasionar alterações pulmonares, aumento de leucócitos do receptor e aumento da remoção eritrocitária, mesmo quando realizadas transfusões homólogas, indicando que a resposta inflamatória ocasionada pela transfusão de sangue “velho” independe do reconhecimento de antígenos eritrocitários (WEISKOPF et al., 2012; CALLAN et al., 2013). Estes dados indicam que a estocagem ocasiona efeitos deletérios diretos ao receptor.

2.3 EFEITO DA REDUÇÃO DE LEUCÓCITOS

O uso de filtros capazes de reduzir a quantidade de leucócitos tem se tornado mais frequente. O intuito principal é reduzir a ocorrência de reações transfusionais, especialmente

reações febris não hemolíticas, aloimunização, modulação imune relacionada à transfusão e transmissão de doenças virais (HOGMAN, 1998; ZUBAIR, 2010).

Ademais, melhorando a qualidade do hemocomponentes eritrocitário, haverá menos resposta inflamatória do paciente. Esses efeitos podem ser relacionados à redução da produção de mediadores inflamatórios, manutenção da membrana eritrocitária mais estável, menor hemólise e menor resposta de hemocaterese das hemácias danificadas (HOGMAN, 1998; HESS et al., 2009; BLUMBERG et al., 2010; ANTONELOU et al. 2012).

Desta forma há fortes indícios que a redução de leucócitos no sangue total, minimizando o tempo hábil para produção de mediadores inflamatórios, é benéfico para as hemácias, e consequentemente para o receptor.

3 JUSTIFICATIVA

Uma vez que há evidencias que as soluções preservativas e a remoção de leucócitos possam interferir na qualidade do hemocomponente, este estudo avaliou parâmetros de qualidade de concentrado de hemácias canino coletado com duas diferentes soluções preservativas, CPDA-1 e CPD/SAG-M, além de determinar se a leucorredução poderia impactar no desenvolvimento de lesões de armazenamento.

4 HIPÓTESES

As hipóteses formadas para a elaboração da pesquisa foram:

- Que as hemácias mantidas em estocagem com soluções preservativas aditivas (CPD/SAG-M) sofram menor efeito das lesões de armazenamento quando comparadas às estocadas com CPDA-1;
- Menor efeito das lesões de armazenamento nos CH que sofreram o processo de remoção de leucócitos, independente das soluções preservativas.

5 OBJETIVO GERAL

Este estudo visou avaliar mudanças, durante a estocagem, do CH canino colhido com CPDA-1 e CPD/SAG-M. Além do efeito do efeito preservativo da solução, se houve mudanças ao se retirar os leucócitos destes hemocomponentes quanto a alterações bioquímicas e hemogasométricas.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram comparadas as diferenças, durante 6 semanas de estocagem de:

- Parâmetros bioquímicos: porcentagem de hemólise, pH, glicose, sódio e potássio.
- Gases sanguíneos mensurados por aparelho de hemogasometria: PCO2, PO2, SO2.

6 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais na Pesquisa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, protocolado sob o número 2504/2011, em 15 de fevereiro de 2012.

6.1 DOADORES

Foram selecionados 19 cães doadores de sangue recorrentes do Laboratório de Hemoterapia do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, da raça Boxer, com idade entre 2 e 8 anos, cujos exames físicos e laboratoriais (hemograma, creatinina, ALT e FA) estivessem dentro dos valores de normalidade, e cujos testes sorológicos para detecção de *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania* sp,, *Trypanossoma* sp fossem negativas. Foram realizadas, ainda, pesquisas em esfregaço sanguíneo para piroplasmas.

Todos os cães pertenciam ao mesmo canil comercial e de exposição, com as mesmas condições de manejo ambiental, sanitário e alimentar. Entre cada colheita de sangue houve no mínimo 60 dias de intervalo, sendo que foram realizadas seis colheitas no período de dois anos.

6.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram colhidas 42 bolsas de sangue total de doadores caninos recorrentes cujos históricos clínicos pudessem ser acompanhados durante estudo. De cada doador foram

colhidos 375 (± 50 mL) de sangue total acondicionados em bolsas de sangue de acordo com o grupo sorteado.

Foram utilizadas quatro diferentes bolsas de colheita, sendo realizado o sorteio da bolsa a ser utilizada no momento da colheita de sangue do doador. Os grupos foram formados de acordo com a bolsa[1] a ser utilizada, e a presença ou ausência de filtro:

- Grupo 1- bolsas contendo anticoagulante citrato com fosfato, dextrose e adenina (CPDA-1);
- Grupo 2- bolsa de CPDA-1, com filtro de remoção de leucócitos;
- Grupo 3- bolsa contendo anticoagulante citrato com fosfato, dextrose, com solução fisiológica extra de adenina, glicose e manitol (CPD/SAG-M);
- Grupo 4- bolsa CPD/SAG-M com filtro de remoção de leucócitos.

Para o Grupo II, uma vez que não há comercialmente disponíveis bolsas de CPDA-1 com filtro de remoção de leucócitos, foram anexados filtros provenientes das bolsas do Grupo 4. Tal mudança foi realizada por meio de conector estéril de tubos[2], incluindo o filtro no mesmo ponto do Grupo 4, isto é, entre a bolsa principal e as bolsas satélites, de forma a realizar nos grupos 2 e 4 a filtragem do sangue total antes da primeira centrifugação.

As bolsas colhidas e selecionadas foram identificadas e imediatamente acondicionadas em recipiente isotérmico e ao abrigo de sol e trepidações. Entre a colheita da primeira bolsa e o término de processamento não foram excedidos mais de 8 horas da primeira bolsa colhida.

As bolsas após inspeção visual eram homogeneizadas e dos grupos G2 e G4 foram retirados pequenos volumes (2mL) de sangue total pré-filtragem a fim de realizar a contagem de leucócitos. O mesmo procedimento foi realizado após filtragem para assegurar a redução de mais de 99,9% de leucócitos.

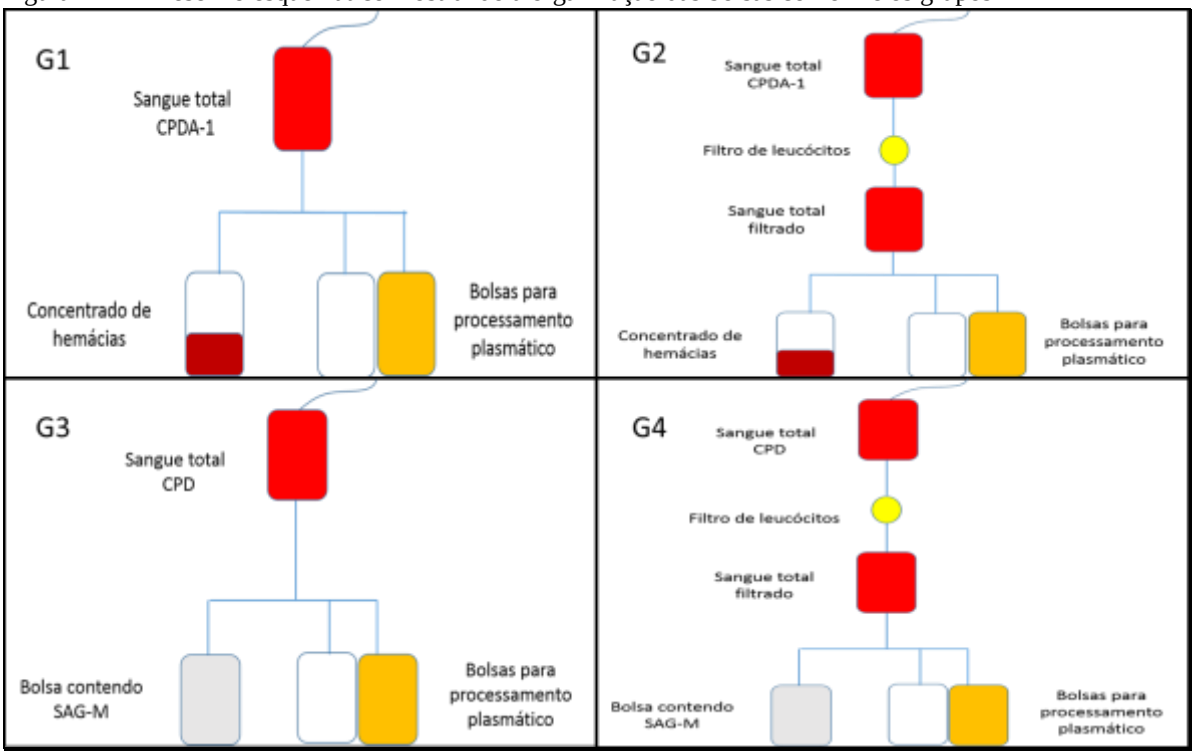
As bolsas dos grupos 1 e 3 foram mantidas em recipiente isotérmico enquanto as bolsas dos grupos 2 e 4 passaram pelo processo de filtragem de leucócitos (Figura 1).

---

[1]Bolsas plásticas triplas para coleta de sangue CPDA-1, CPD/SAG-M e CPD/SAG-M com filtro “in line” para remoção de leucócitos, FreseniusHemocare, Itapecerica da Serra, São Paulo-SP.
[2] Aparelho conector de tubos PVC, TerumoSterileConnectingDevice, TSCD/TERUMO, Terumo Medical do Brasil, São Paulo – SP.

O sangue total homogeneizado após filtrado foi mantido em na bolsa plástica secundária, sendo que o conjunto de bolsa e o filtro foram separados por meio de selagem térmica. Apenas depois da realização da filtragem das bolsas G2 e G4 que ocorreu o processo de centrifugação de todos os quatro grupos simultaneamente.

Figura 1 - Desenho esquemático mostrando a organização das bolsas conforme os grupos



Fonte: (MOROZ, 2015.)

Todas as bolsas foram processadas no mesmo período, de acordo com padronização de produção de hemocomponentes humanos com adaptação para cães desenvolvido anteriormente (GONÇALVES, 2006; BRASIL, 2010). Nas bolsas de concentrado de hemácias dos G3 e G4 foi retirado o plasma sobrenadante e adicionada a solução preservativa extra composta de solução fisiológica, adenina, glicose e manitol (SAG-M), resultando em um concentrado de hemácias diluídos, conforme instruções do fabricante.

Após término do processamento, as bolsas foram acondicionadas em geladeira sob temperatura variando entre 4-6°C por 12 horas para coleta da primeira análise (Semana zero). Este cuidado foi incluído a fim de reduzir diferenças entre valores de lactato observados no estudo piloto, onde as primeiras bolsas possuíam valor de lactato maior que as últimas bolsas

colhidas no dia. Ao atrasar 12 horas as primeiras análises, mantendo bolsas em refrigeração, esta diferença foi insignificante.

Após a primeira análise, foram retirados 10 mL de hemocomponentes de cada bolsa a cada 7 dias até completar 6 semanas (42 dias).Ao final da sexta semana de análises todas as bolsas foram enviadas para cultura de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos[3].

6.2.1 Critérios de exclusão

Antes do processamento das bolsas contendo sangue total, foi realizada análise visual e pesagem individual. Foram descartadas quaisquer bolsas fora do padrão que pudessem interferir na qualidade do hemocomponentes estocado (padrão: volume de sangue total coletado: 375 ± 50 mL, volume globular da bolsa de sangue total acima de 38%). Foram consideradas também observações relatadas pelo responsável da colheita. Desta forma foram excluídas na abordagem inicial bolsas onde:

- A colheita ocorreu de forma aberta (duas punções ou entrada de ar no sistema);
- O doador se agitou, necessitando de reposicionamento da agulha ou com interrupção de fluxo, situações que pudessem ocasionar formação de coágulos pequenos de difícil visualização;
- Apresentassem volume fora da média estabelecida:
- Fossem observados coágulos.

Também foram excluídas bolsas que tivessem entrada de ar no sistema durante manipulação ou que apresentassem, durante as semanas de análise, hemólise excessiva, não condizente com média do grupo a que pertenciam (hemólise 30% acima da média semanal). Este cuidado foi tomado pois a hemólise interfere com a mensuração bioquímica e de eletrólitos, além de indicar problemas no manuseio, especialmente contaminação bacteriana. Todas as bolsas com hemólise foram encaminhadas para cultura bacteriana.

[3] Sistema de cultivo e cultura antimicrobiano aeróbico e anaeróbico Hemobac.

6.3 ALIQUOTAGEM DAS AMOSTRAS

Após 12 horas em refrigeração as bolsas foram retiradas duas a duas da geladeira, delicadamente homogeneizadas por 5 minutos. A tubulação, que foi mantida o mais longa possível, era ordenhada em sentido retrógrado a fim de homogeinizar o sangue da tubulação com o sangue da bolsa. Esse movimento era repetido 3 vezes. Em seguida a ponta mais distante da bolsa era cortada, e cerca de 10 mL de sangue era desprezado a fim de lavar a tubulação com o sangue de dentro da bolsa. Em seguida procedia-se com a separação de 10 a 12 mL de hemocomponente, com selagem da tubulação na porção mais distante da bolsa. Uma nova selagem era realizada 3 a5 cm mais próximo da bolsa, a fim de manter uma pequena porção de sangue sem contato direto como ar dentro da tubulação a ser enviado para hemogasometria. Todo o procedimento era realizado sem entrada de ar.

Ao completar a aliquotagem, as bolsas eram rapidamente repostas em refrigeração, não excedendo 10 minutos em temperatura ambiente. Estes procedimentos foram repetidos semanalmente. A cada semana de análises as bolsas eram embaralhadas, de forma que as duplas retiradas para avaliação fossem sempre diferentes, não mantendo a mesma sequência de manipulação.

Da amostragem de cerca de 10 mL, uma amostra de 0,5 mL era separado para realizar a dosagem de hemoglobina total e volume globular. Os 9,5mL restantes foram centrifugados [4] e o sobrenadante dividido em quatro partes: duas para realização de análises bioquímicas (uma teste e uma reserva) e duas para dosagem futura de citocinas (uma teste e uma reserva).

As alíquotas para dosagem de citocinas e uma alíquota de bioquímicos foram armazenadas em freezer de ultra baixa temperatura[5] (-80°C) até envio para análise em laboratório.

---

[4]Centríguga refrigerada, Eppendorff.
[5]UltraLow Freezer, Sanyo

6.4 PARÂMETROS ANALISADOS

Todos os parâmetros descritos foram realizados em todas as bolsas, e ao longo das seis semanas de estocagem.

6.4.1 Contagem de leucócitos

A determinação do número de leucócitos foi realizada no sangue total antes e após filtração. A contagem foi realizada por meio de contagem manual (em duplicatas) em câmara de Neubauer utilizando líquido de Turkey e diluição 1:50.

6.4.2 Determinação do volume globular, dosagem de hemoglobina e cálculo de da taxa de hemólise (%)

A determinação do volume globular (VG) foi realizada pela técnica do micro hematócrito, e realizado em duplicata.

A hemoglobina total e sobrenadante foram mensuradas através de espectofotometria[6], método colorimétrico (diluente cianeto de hemoglobina), conforme orientações do fabricante[7].

Para o cálculo da taxa de hemólise utilizou-se fórmula, na qual era necessário o valor do volume globular (VG) da bolsa, concentração de hemoglobina total do hemocomponente homogeneizado e concentração de hemoglobina do plasma Sowemimo-Coker (2002):

[6]Espectofotômetro semi automático, marca Bioplus, modelo Bio 200-F, São Paulo-SP, Brasil.
[7] Reagente para dosagem de hemoglobina, marca Labtest, Lagoa Santa- MG, Brasil.

$$\text{Porcentagem de Hemólise} = (100 - Ht) \times \frac{HbP}{Hb}$$

Onde: Ht= hematócrito em %; Hb P= Concentração de hemoglobina plasmática (em g/dL); Hb= Concentração de hemoglobina total (g/dL).

6.4.3 Dosagem de glicose

A glicose foi mensurada do plasma sobrenadante por meio de reação colorimétrica lida em espectofotômetro, conforme recomendações do fabricante[8].

6.4.4 Dosagem de sódio e potássio

As dosagens de sódio e potássio foram realizadas por meio de leitor seletivo de íons[9].

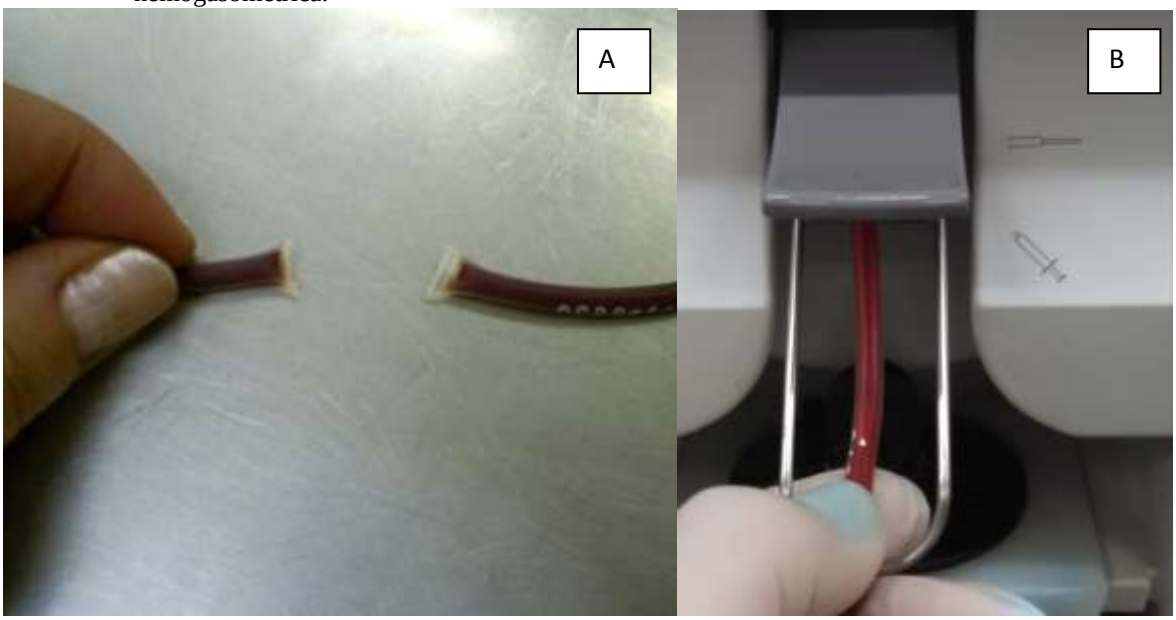
6.4.5 Hemogasometria

Para a dosagem de gases[10] foi utilizada uma alíquota de hemocomponente contido dentro da tubulação. Uma das pontas era cortada no momento da passagem da amostra no aparelho, colocando a ponta do aspirador próximo da ponta lacrada (Figura 2).

---

[8] Reagente para dosagem de glicose (Glicose Liquiform), marca Labtest, Lagoa Santa- MG, Brasil.
[9] APARELHO DO DOUGLAS

Figura 2 - Fotografais ilustrando a manipulação da tubulação em sistema fechado para análise hemogasométrica.



Fonte: (MOROZ, 2015).
A- Separação de porção distal da tubulação após aliquotagem de hemocomponente para análises bioquímicas e de mediadores inflamatórios. B- Posicionamento do aspirador de amostra na tubulação.

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio de programa estatístico GraphPad Instat 3. As amostras foram analisadas inicialmente quanto à distribuição normal pelo teste de Kolmorov- Smirnoff (KS). As variáveis que passaram no teste KS foram analisadas por teste ANOVA com post-teste de Tukey, caso fossem observados valores de $p<0,05$. As variáveis que não passaram no teste KS foram analisadas pelo teste de Dunn como post-teste, se $P<0,05$.

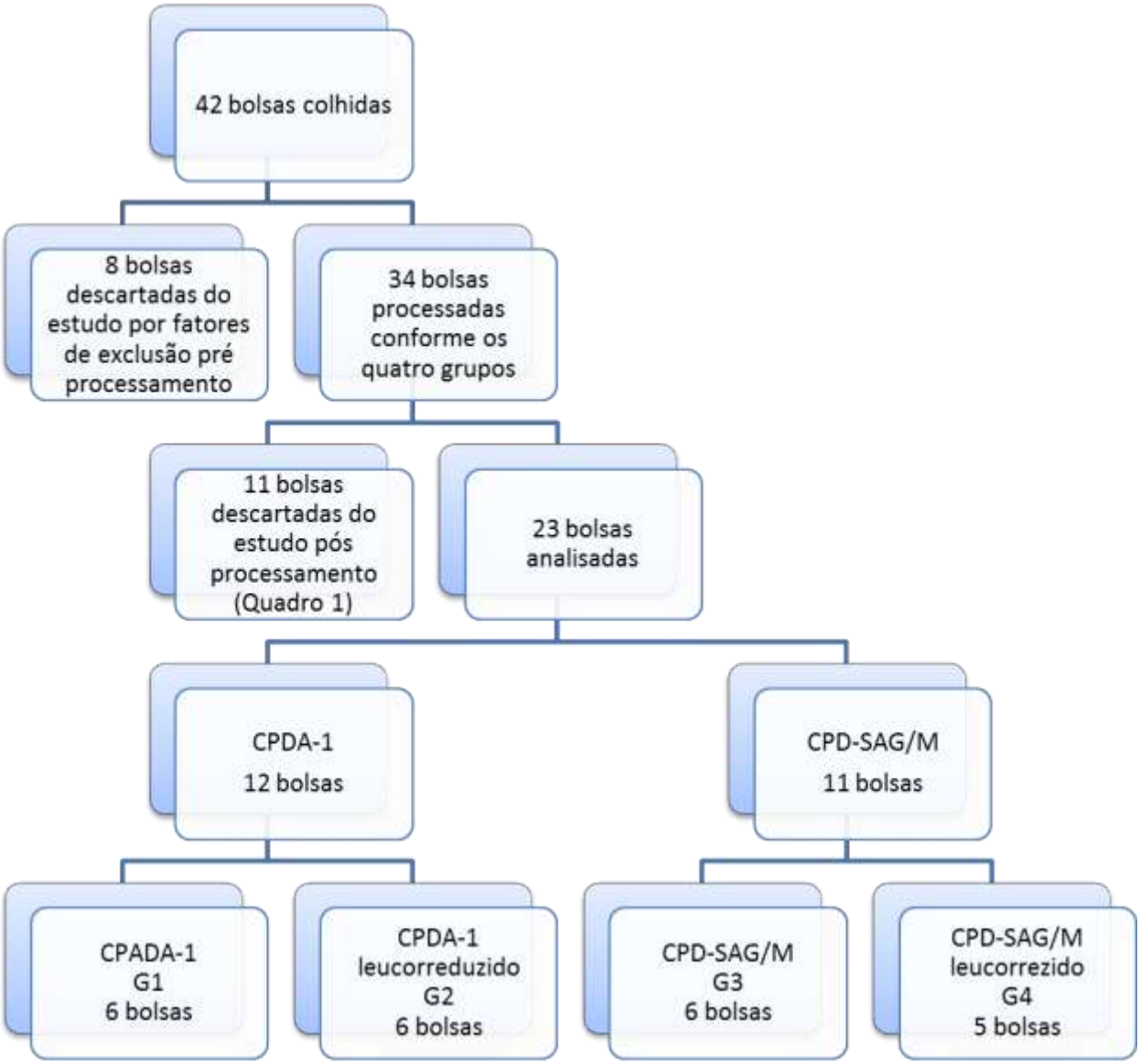
Os resultados foram expressos em forma de média e desvio padrão, comparando-se dentro de um mesmo grupo todas as semanas entre si com a finalidade de se apontar exatamente o momento no qual as bolsas se tornaram inaptas para uso. Já na comparação entre grupos, procedeu-se a comparação entre as mesmas semanas.

[10]Analisador automatico de gases, ABL 5, Radiometer Copenhagen, Alemanha.

7. RESULTADOS

Ao total foram colhidas 42 bolsas em um período de 18 meses. Destas, sete foram descartadas inicialmente na análise visual por conterem coágulos em seu interior. Das 34 bolsas selecionadas e analisadas 11 foram descartadas durante o estudo por apresentarem-se fora dos padrões estabelecidos para análise, sendo três bolsas nos grupos 1, 2 e 3, e duas bolsas no grupo 4 (Figura 3). A distribuição de grupos, bem como motivos de descarte das bolsas estão descritos nos quadros 2 e 3.Os motivos de descarte estão apresentados no quadro 2. Desta forma estão apresentados apenas os parâmetros das 23 bolsas. O único dado que apresentado com a análise das 35 bolsas é o referente à contagem de leucócitos, uma vez que as bolsas foram descartadas entre a terceira e quarta semana de análise.

Figura 3 - Organograma demonstrativo das etapas de seleção das bolsas analisadas



Fonte: (MOROZ, 2015).

Quadro 2 - Distribuição dos doadores de acordo com grupos sorteados

DOADOR	GRUPO
Caesar	G1 / G2 / G4
Charlie	G2 / G3 /
Dara	G1
Dolly	G1
Happy	G2 / G3
Janis	G1
Lola	G3
Misty	G2
Olimpo	G2 / G3
Pam	G3
Paty	G2 / G4
Phanton	G1 / G2 / G3
Queen	G1 / G4
Raíssa	G3 / G4
Sally	G3
Sol	G1 / G3 / G4
Taty	G3 / G4
Tracy	G2
Xmen	G1

Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda: G= grupo.

Quadro 3 - Distribuição das bolsas descartadas de acordo com grupo ao qual pertenceram, e motivos do descarte

Grupo	Doador	Observações
G1	Janis	Descartada por hemólise excessiva. (>30%). Retirada do estudo por ir a óbito após complicações obstétricas.
G1	Dara	Descartada por hemólise excessiva (>30%)
G1	Dolly	Descartada por hemólise excessiva (>30%)
G2	Charlie	Descartada por hemólise excessiva (>30%)
G2	Olimpo	Descartada por hemólise excessiva. (>30%)
G2	Paty	Descartada por hemólise excessiva (>30%). Doadora retirada do estudo por apresentar arritmia cardíaca durante coleta.
G3	Sally	Descartada por hemólise excessiva. (>30%)
G3	Happy	Descartada por hemólise excessiva (>30%)
G3	Pam	Descartada por hemólise excessiva (>30%). Retirada do estudo por apresentar arritmia cardíaca durante coleta
G4	Queen	Descartada por hemólise excessiva (>30%).
G4	Caesar	Bolsa descartada por VG fora do padrão

Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda: G= grupo.

Todas as bolsas descartadas foram enviadas para análise bacteriana, sendo que não houve crescimento de nenhum agente, nem em meio aeróbico, tão pouco em anaerobiose.

7.1 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

A contagem de leucócitos no sangue total pré e pós filtragem de leucócitos resultou em redução de 99,91% no geral, sendo de 99,92% no grupo 2 e de 99,91% no grupo 4, conforme ilustrado na Tabela 2. Não houve diferença significativa na contagem de leucócitos entre os grupo 2 e grupo 4 pré e pós filtragem, com P=0.4529 e P=0.7717, respectivamente.

O tempo médio de filtragem foi de 25, aproximadamente minutos. Não houve diferença no grau de hemólise entre os grupos filtrados e não filtrados na semana zero, indicando que a passagem das hemácias pelo filtro não ocasionou fragilidade eritrocitária (após 12 horas do término do processamento). Os valores de leucócito pré e pós filtragem estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Número de leucócitos em sangue total canino pré e pós redução de leucócitos por meio de filtro em linha

Animal		Leucócitos pré	Leucócitos pós
Charlie	G2	6300	0
Olimpo	G2	11500	0
Paty	G2	10300	25
Phanton	G2	12200	0
Caesar	G2	11250	0
Charlie	G2	12350	25
Tracy	G2	12200	0
Happy	G2	13625	0
Misty	G2	8350	25
Desvio padrão		2275,2	12,5
Média		10897,2	8,3
Queen	G4	8500	0
Sol	G4	12600	25
Raissa	G4	11600	0
Raissa	G4	12650	0
Paty	G4	11500	0
Taty	G4	12500	50
Caesar	G4	12300	0
Desvio padrão		1471,6	19,6
Médias		11664,3	10,7

Fonte: (MOROZ, 2015).

7.2. ANÁLISE DE GASES SANGUÍNEOS (PCO_2, PO_2 E SO_2) E PH

A seguir seguem os resultados obtidos do estudo hemogasométrico das 23 bolsas selecionadas para o estudo. Os dados foram divididos entre PCO_2, PO_2, SO_2, pH conforme as semanas de estudo.

7.2.1 Pressão parcial de gás carbônico (PCO_2)

Todos os valores referentes a PCO_2 de todos os grupos, em todas as semanas, passaram no teste de normalidade. A variação de PCO_2 não respeitou uma tendência homogênea, com aumentos nas primeiras semanas e queda nas semanas seguintes.

O grupo 1 apresentou variação apenas nas semanas 2 e 6 ($P<0,05$), quando comparadas com a semana zero. O grupo 2 apresentou diferenças entre a semana zero e semana 6 e entre semana 2 e 5, ambas com $P<0,05$.

O grupo 3 apresentou diferenças significativas entre a semana zero comparada com a semana 2 ($P<0,05$) e semana 3 ($P<0,01$). Houve, ainda, diferença entre a semana 1 e a 6 ($P<0,05$), semana 2 com 6 ($P<0,01$) e semanas 3 e 4 comparadas com a semana 6 ($P<0,01$) .O grupo 4 não apresentou diferenças significativas entre as semanas.

Os dados estão representados na tabela 2.

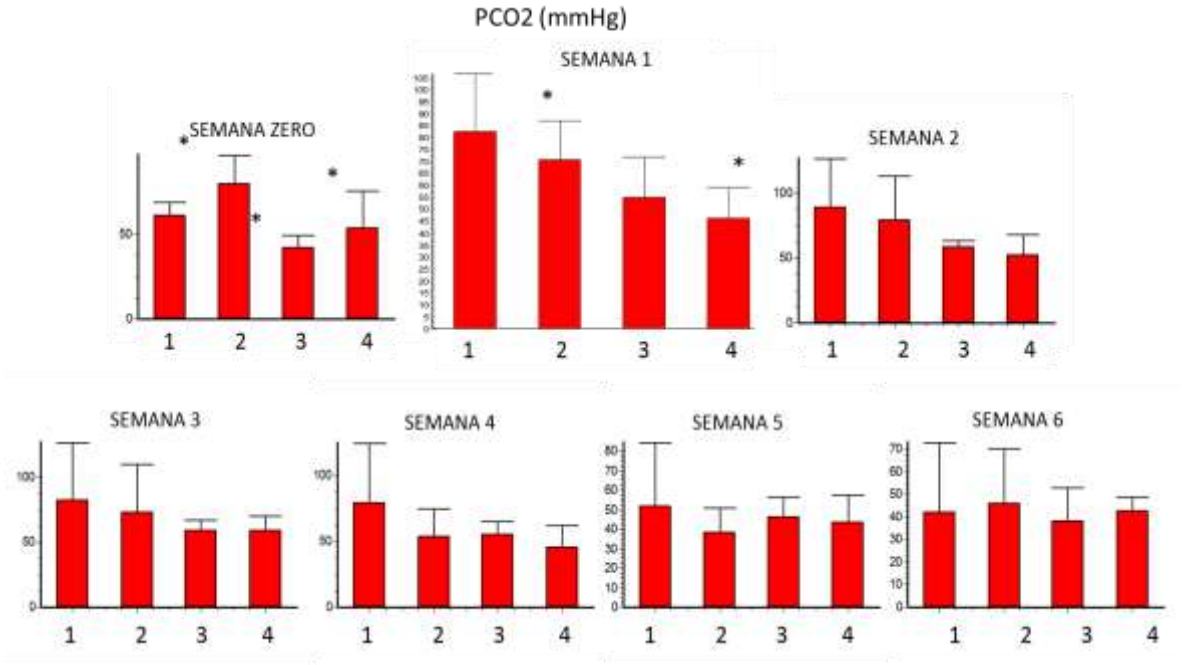
Tabela 2 - Valores individuais, médias e desvio padrão da pressão de gás carbônico (PCO2 mmHg) das 23 bolsas selecionadas para estudo

	SEMANAS						
PCO_2	Zero	1	2	3	4	5	6
G1	65	130	163	165	120	98	74
G1	53	62	64	57	60	30	17
G1	66	78	72	45	88	22	14
G1	70	79	75	55	40	21	13
G1	50	69	80	92	31	78	76
G1	61	77	83	77	142	62	59
Médias	60,8	82,5	89,5[Ł]	81,8	80,2	51,8	42,2[Ł]
Desvio padrão	7,8	24,2	36,6	44,1	44,5	32,4	30,7
G2	77	77	78	67	51	42	37
G2	80	80	133	133	54	53	92
G2	95	95	39	39	24	19	34
G2	50	50	102	102	39	33	51
G2	95	64	56	42	85	49	38
G2	81	59	66	53	70	34	26
Médias	79,7[Ła]	70,8[Łb]	79	72,7	53,8	38,3[Łab]	46,3
Desvio padrão	16,5	16,3	33,9	37,4	21,7	12,4	23,8
G3	56	49	63	67	58	54	41
G3	39	49	52	47	40	34	26
G3	40	48	58	58	51	39	21
G3	35	48	57	57	52	38	32
G3	40	48	57	56	63	53	58
G3	42	89	65	69	69	59	52
Médias	42[Ła]	55,2[Łb]	58,7[Łac]	59[Ład]	55,5[Łe]	46,2	38,3[Łbcde]
Desvio padrão	7,2	16,6	4,7	8	10,2	10,4	14,6
G4	88	58	66	66	60	58	48
G4	50	62	71	67	64	55	51
G4	54	42	45	58	24	23	39
G4	28	35	39	64	40	40	37
G4	48	35	39	41	40	41	39
Médias	53,6	46,4	52	59,2	45,6	43,4	42,8
Desvio padrão	21,7	12,8	15,4	10,8	16,4	14	6,3

Fonte: (MOROZ, 2015).
Ł – Diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo; letras minúsculas indicam os pares com diferenças significantes.

Ao analisar os dados durante as semanas, observou-se diferença estatística entre o Grupo 2 quando comparado ao grupo 3 ($P<0,01$) e ao grupo 4 ($P<0,05$) na semana Zero. Na semana 1 apenas o grupo 1 e 4 divergiram ($P<0,05$). Nas semanas 2, 3, 4, 5 e 6 não houve diferença entre os grupos. Os dados das médias estão representados na Figura 4.

Figura 4- Gráficos de barras ilustrando a variação médias da PCO2 (mmHg) nos grupos (1, 2, 3 e 4) durante as semanas de estocagem.



Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda: * Difere estatisticamente da semana Zero. Legenda eixo x: 1 – G1; 2 – G2; 3 – G3; 4 – G4.

7.2.2 Pressão parcial de oxigênio (PO_2)

Os valores referentes a PO_2 dos grupos durante as semanas, passaram no teste de normalidade KS, exceto os valores do grupo 1 na semana 4 e grupo 3 semanas zero e 1. Os valores de PO_2 em todos os grupos apresentaram crescimento gradual, entretanto observa-se um crescimento exacerbado nos grupos leucorreduzidos. Os dados estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - Valores individuais, médias e desvio padrão da pressão de oxigênio (mmHg) das 23 bolsas selecionadas para estudo

	SEMANAS						
PO_2	Zero	1	2	3	4	5	6
G1	35	67	70	56	43	41	43
G1	42	52	54	64	191	154	191
G1	35	39	42	48	39	97	183
G1	33	35	38	43	53	120	172
G1	34	40	41	41	59	38	36
G1	30	35	36	27	78	42	43
Média	34,8 $^{Ł a}$	44,7	46,8	46,5	77,2$^{Ł a}$	82	111,3$^{Ł a}$
Desvio padrão	4	12,6	13	12,8	57,4	49,1	77,7
G2	109	109	158	251	314	279	261
G2	108	108	105	105	48	48	169
G2	113	113	190	190	157	159	242
G2	32	32	174	174	167	191	174
G2	70	43	72	120	173	137	199
G2	95	56	48	137	263	195	216
Média	87,8$^{Ł a}$	76,8$^{Ł b}$	124,5$^{Ł c}$	162,8$^{Ł b}$	187$^{Ł ab}$	168,2$^{Ł b}$	210,2$^{Ł abc}$
Desvio padrão	31,5	37,2	58,1	53,8	92,4	76,2	36,8
G3	78	44	39	39	39	42	60
G3	36	40	44	52	71	74	157
G3	38	40	42	45	49	78	96
G3	40	43	44	50	48	58	114
G3	32	38	40	44	43	39	51
G3	30	70	34	49	34	35	40
Média	42,3$^{Ł a}$	45,8	40,5	46,5	47,3	54,3	86,3$^{Ł a}$
Desvio padrão	17,9	12	3,8	4,8	12,9	18,5	44,6
G4	75	140	253	275	302	263	251
G4	42	108	190	257	232	246	235
G4	35	108	110	237	139	129	224
G4	38	54	69	61	113	173	180
G4	82	54	77	157	113	195	178
Média	54,4$^{Ł a}$	92,8$^{Ł b}$	139,8$^{Ł a}$	197,4$^{Ł ab}$	179,8$^{Ł ab}$	201,2$^{Ł ab}$	213,6$^{Ł ab}$
Desvio padrão	22,3	37,7	79,3	88,6	84	54,5	33,

Fonte: (MOROZ, 2015).

Legenda: Ł – Diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo; letras minúsculas indicam os pares com diferenças significantes.

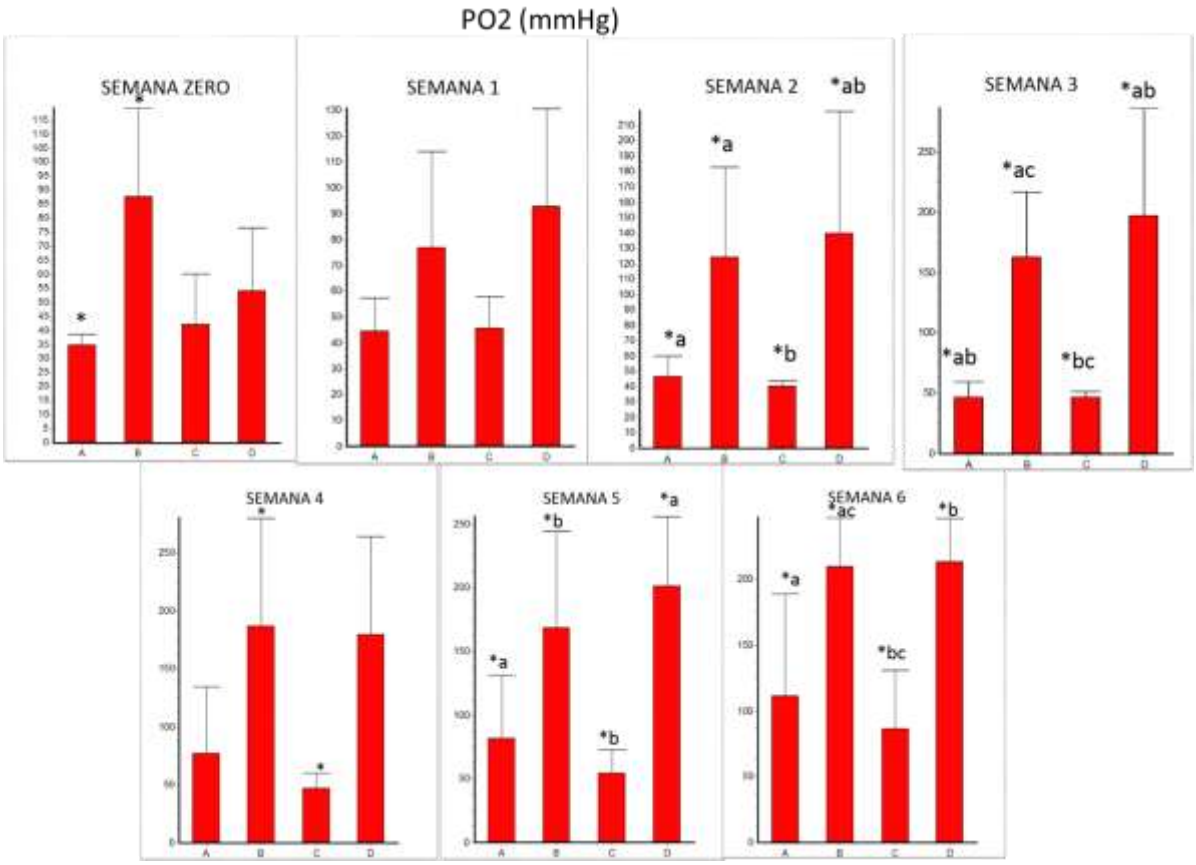
Ao analisar os dados entre as semanas, observou-se diferença estatística apenas do Grupo 1 quando comparado ao Grupo 2 ($P<0,05$) na semana Zero. Na semana 1 não houve diferenças entre os grupos. Na semana 2 inicia-se a diferença entre a PO_2 nos grupos com redução de leucócitos, com o grupo 1 divergindo de grupos 2 ($P<0,05$) e 4 ($P<0,05$) e o grupo

3 divergindo do grupo 4 (P<0,05). Não houve diferenças ao se analisar os grupos 1 e 3, tão pouco entre os grupos 2 e 4.

A diferença entre os grupos com leucócitos e leucorreduzidos se tornou ainda mais marcante na semana 3, com o grupo 1 divergindo do grupo 2 (P<0,01), e o grupo 3 diferente do grupo 4 (P<0,001). No grupo 1 e 4 as diferenças foram marcantes, com P<0,001, assim como os grupos 2 e 3 (P<0,01). Não houve diferença entre os grupos 1 e 3, nem com os grupos 2 e 4.

Na semana 4 essa diferença se tornou menos proeminente, onde houve diferença apenas entre grupos 2 e 3 (P<0,05). Na semana 5 apenas entre grupo 1 e 4 (P<0,01), grupos 2 e 3 (P<0,01) e entre os grupos 3 e 4 (P<0,01). Na semana 6 a diferença volta a ser bem marcada, com grupo 1 diferente de grupo 2 (P<005), grupo 3 de grupo 4 (P<0,01), não havendo diferenças entre grupos 1 e 3, nem entre grupo 2 e 4. Grupo 2 divergiu de grupo 3 (P<0,01). A figura 5 ilustra as diferenças entre os grupos durante as semanas de estocagem.

Figura 5 - Gráficos de barras ilustrando a variação das médias da PO_2 (mmHg) nos grupos durante as semansa de estocagem.



Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda eixo X: A – G1; B – G2; C – G3; D – G4.

7.2.3 Saturação de oxigênio (SO_2)

Os valores referentes a SO_2 que passaram no teste de normalidade foram dos grupos 1 e 3 (todas as semanas), grupo 2 as semanas 1, 2 e 6; no grupo 4 as semanas zero, 1, 2 e 4. A saturação de oxigênio apresentou comportamento diferente entre os grupos leucorreduzidos mais evidentes. Os dados estão representados na tabela 4.

Tabela 4- Valores individuais, de médias e desvio padrão saturação de oxigênio (%) das 23 bolsas selecionadas para estudo

	SEMANAS						
	Zero	1	2	3	4	5	6
G1	71	60	45	23	14	14	13
G1	80	84	77	82	94	97	98
G1	76	57	49	55	46	88	98
G1	60	51	47	48	59	95	98
G1	78	76	68	59	61	39	31
G1	66	66	58	30	50	52	49
Média	71,8	65,7	57,3	49,5	54	64,2	64,5
Desvio padrão	7,7	12,4	12,9	21,3	25,9	34,3	38,4
G2	88	88	89	98	99	98	97
G2	86	86	82	82	89	89	94
G2	79	79	99	99	99	99	98
G2	85	85	96	96	99	99	95
G2	73	81	94	98	95	98	99
G2	85	90	79	98	99	99	99
Média	82,7[Łab]	84,8	89,8	95,2	96,7[Łab]	97[Łab]	97
Desvio padrão	5,6	4,2	8	6,5	4,1	3,9	2,1
G3	82	79	58	48	43	40	67
G3	73	70	67	73	86	87	98
G3	78	71	63	60	60	86	97
G3	81	75	67	68	59	71	94
G3	74	74	72	74	67	55	70
G3	68	64	52	72	37	35	40
Média	76	72,7	63,2	65,8	58,7	62,3	77,7
Desvio padrão	5,3	5,1	7,2	10,1	17,5	22,5	23
G4	88	96	99	99	99	98	98
G4	85	90	97	99	98	98	98
G4	88	95	97	98	99	98	98
G4	86	92	94	97	97	99	99
G4	87	92	96	99	97	99	99
Média	86,8[Łabcd]	93	96,6	98,4[Łabcd]	98[Łabcd]	98,4[Łabcd]	98,4[Łabcd]
Desvio padrão	1,3	2,5	1,8	0,9	1	0,5	0,5

Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda: Ł – Diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo; letras minúsculas indicam os pares com diferenças significantes.

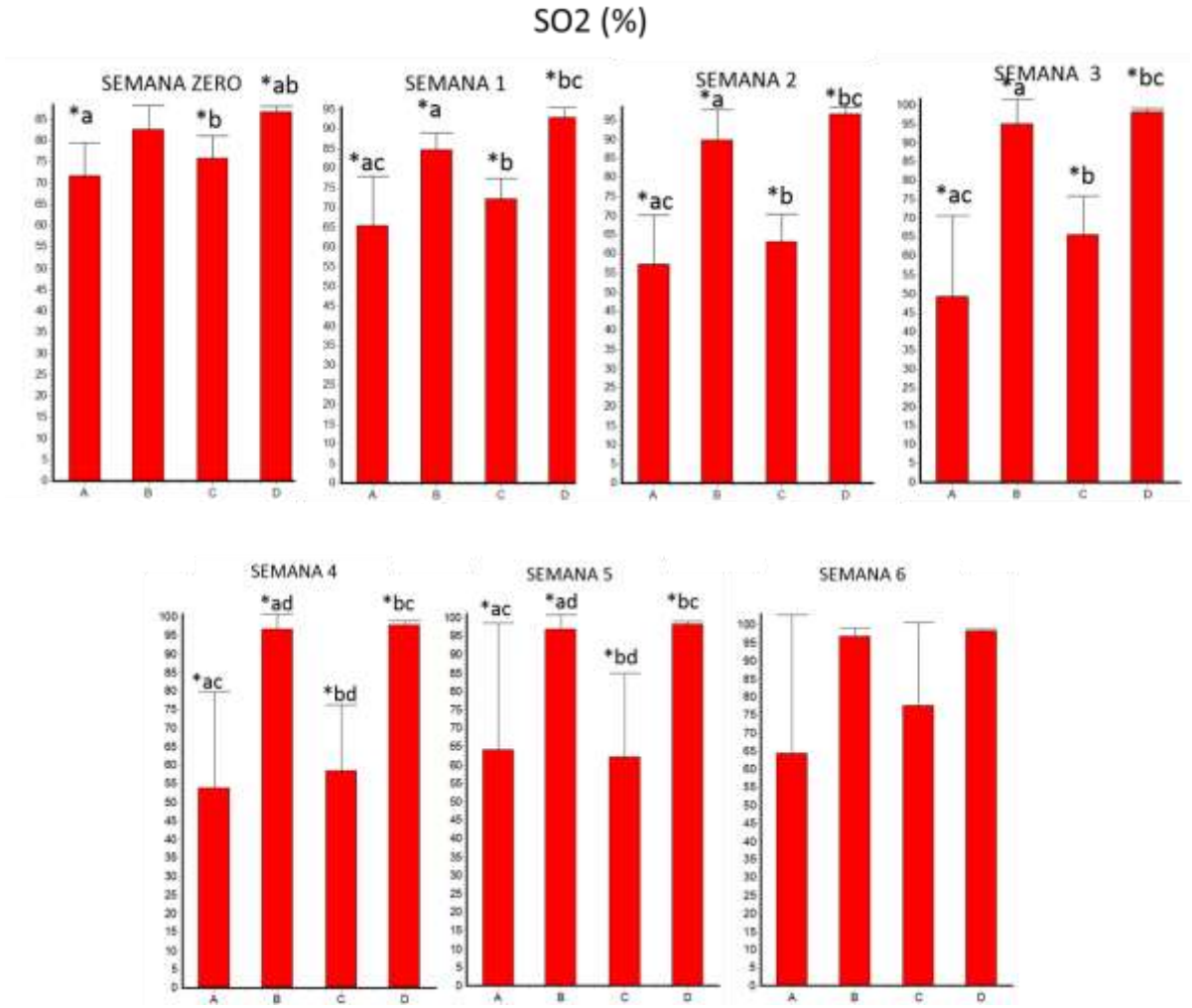
Ao analisar os dados nos grupos durante as semanas, não houve diferenças entre os valores de SO_2 nos grupos 1 e 3 durante as semanas de estocagem. No grupo 2 houve diferença significativa apenas entre a semana zero comparadas com as semanas 4 e 5. No grupo 4 houve diferença significativa entre a semana zero quando comparadas entre semanas 3, 4, 5 e 6.

Ao analisarmos as semanas entre os grupos observa-se uma diferença discreta na semana zero (p<0,035) entre grupo 1 e grupo 4, e entre grupo 3 e grupo 4. Nas semanas 1, 2 e 3as diferenças foram de P<0,001, P<0,001 e P<0,006, com diferenças entre grupo 1 e 2, grupo 3 e 4, além de diferença entre grupo 1 e grupo 4. Não houve diferença entre os grupos não filtrados e filtrados.

Nas semanas 4 e 5 mantiveram-se os mesmos padrões das semanas 1 a 3 (P<0,001 e P<0,0012, respectivamente), mas com diferenças entre grupo 2 e 3 também.

Na semana 6, com o aumento de valores médios de SO_2 nos grupos não filtrados, não houve diferença entre os grupos (P=0,0629). A figura 6 demostra os gráficos das semanas, indicando onde houve diferenças.

Figura 6- Gráficos de barras ilustrando a variação médias da SO2 (%) nos grupos durante as semanas de estocagem.



Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda eixo x : A- G1; B – G2; C – G3; D – G4.

7.2.4 pH

Os valores referentes ao pH dos grupos 1 passaram no teste de normalidade em todas as semanas. Os valores do grupo 2 passaram no teste de normalidade, exceto as semanas zero e 5. Nos grupos 3e 4 as únicas semanas que não passaram no teste foram as semanas 2 e semanas 5, respectivamente.

Ao analisar os dados de pH, todos os grupos tiveram queda de pH significativa durante as semanas de estocagem. O grupo 1 apresentou queda significativa da semana zero com todas as seguintes, sendo que a semana 1 também diferiu das demais. A semana 2 diferiu das semanas 4, 5 e 6. A partir da segunda semana a variação de pH não foi significativa.

Os grupos 2 e 4 tiveram o mesmo padrão de queda de pH, onde não houve redução semanal significativa, havendo diferença apenas entre a semana zero comparada com semana 5 e 6, e comparando a semana 1 com a semana 6.

O grupo 3 também não apresentou queda significativa semana a semana, apresentando diferenças quando comparada a semana zero com as semanas 4, 5 e 6, bem como a semana 1 com as semanas 5 e 6, e a semana 2 comparada com a semana 6.

Os valores de pH estão descritos na tabela 5.

Tabela 5- Valores individuais, média e desvio padrão da saturação de oxigênio (%) das 23 bolsas selecionadas para estudo

	SEMANAS						
pH	Zero	1	2	3	4	5	6
G1	6,87	6,67	6,43	6,34	6,36	6,37	6,43
G1	6,83	6,69	6,5	6,4	6,22	6,2	6,16
G1	6,96	6,53	6,36	6,28	6,41	6,05	6,01
G1	6,75	6,58	6,43	6,32	6,23	6,16	6,1
G1	6,99	6,8	6,65	6,52	6,12	6,34	6,26
G1	6,92	6,77	6,55	6,56	6,37	6,4	6,32
Médias	6,9^{IX}	6,7^{IX}	6,5^{Ia}	6,4^{Ib}	6,3^{Ia}	6,2^{Ia}	6,2^{Iab}
Desvio padrão	0,09	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
G2	6,82	6,65	6,27	6,4	6,29	6,19	6,12
G2	6,82	6,65	6,56	6,56	6,65	6,6	6,42
G2	6,9	6,38	6,62	6,62	6,59	6,53	6,34
G2	6,8	6,88	6,54	6,54	6,64	6,5	6,43
G2	6,93	6,82	6,71	6,69	6,49	6,51	6,47
G2	6,81	6,82	6,69	6,64	6,5	6,57	6,58
Médias	6,8^{Ia}	6,7^{Ib}	6,6	6,6	6,5	6,5^{Iab}	6,4^{Iab}
Desvio padrão	0,05	0,2	0,2	0,1	0,1	0,15	0,15
G3	6,84	6,75	6,53	6,41	6,34	6,23	6,19
G3	6,84	6,67	6,54	6,45	6,39	6,34	6,31
G3	6,87	6,69	6,53	6,42	6,33	6,27	6,25
G3	6,89	6,7	6,54	6,42	6,34	6,28	6,22
G3	6,97	6,81	6,72	6,65	6,56	6,51	6,43
G3	6,95	6,66	6,51	6,51	6,41	6,35	6,28
Médias	6,9^{Ia}	6,7^{Ib}	6,6^{Ic}	6,5	6,4^{Ia}	6,33^{ab}	6,3^{Iabc}
Desvio padrão	0,05	0,06	0,08	0,09	0,09	0,1	0,08
G4	6,87	6,77	6,62	6,51	6,41	6,32	6,27
G4	6,84	6,73	6,59	6,52	6,43	6,38	6,33
G4	6,89	6,78	6,64	6,51	6,61	6,57	6,41
G4	7,03	6,9	6,76	6,61	6,63	6,58	6,5
G4	6,92	6,93	6,79	6,72	6,63	6,57	6,52
Médias	6,9^{Ia}	6,8^{Ib}	6,7	6,6	6,5	6,5^{Ia}	6,4^{Iab}
Desvio padrão	0,07	0,09	0,09	0,09	0,1	0,1	0,1

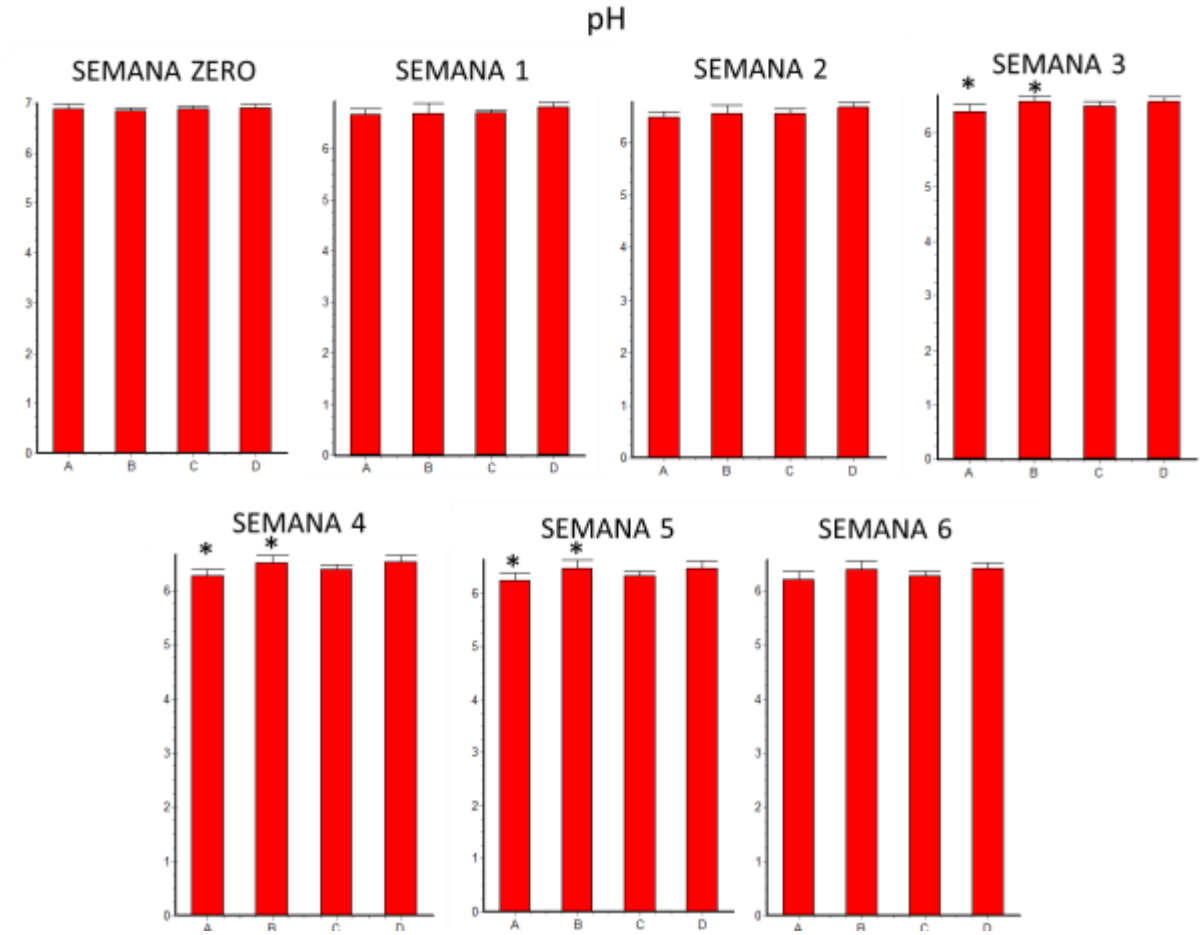
Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda: I – Diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo; letras minúsculas indicam os pares com diferenças significantes. X = diferença entre todas as semanas.

Ao analisarmos as semanas entre os grupos observou-se que não houve diferença entre os grupos nas semanas zero, 1, 2 e 6.

Houve diferença entre grupos na semana 3, entre grupos 1 e 2 ($P<0,05$). Na semana 4 a diferença entre grupo 1 e 2 se tornou mais marcante ($P<0,01$), além de diferir de grupo 4

também (P<0,01). Na semana 5 essas diferenças se mantiveram, mas com menos intensidade (ambos com P<0,05). Na semana 6, como já dito, as diferenças não foram significativas. A figura 7 ilustra as diferenças semanais entre os grupos.

Figura 7- Gráficos de barras ilustrando a variação médias da pH nos grupos durante as semansa de estocagem.



Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda eixo x: A – G1; B – G2; C – G3; D – G4.

7.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Abaixo seguem os resultados obtidos do estudo bioquímico das 23 bolsas selecionadas, com avaliação da: porcentagem de hemólise, glicose, sódio e potássio.

7.3.1 Porcentagem de hemólise

Os valores de hemólise dos grupos 1, 3 e 4 passaram no teste de normalidade. No grupo 2 apenas a semana 4 não passou no teste. Houve aumento de hemólise em todos os grupos, mas não houve diferenças entre os grupos 1 e 4 e grupos 2 e 4 (leucorreduzidos), apesar de ocorrer uma tendência na porcentagem de hemólise ser menor no grupo leucorreduzido.

O aumento da hemólise observado no grupo 1 foi estatisticamente diferente da semana zero apenas nas semanas 5 e 6, com $P<0,05$ e 0,001, respectivamente. Houve diferenças ainda nas semanas 1 e 4 quando comparadas com a semana 6, sendo $P<0,05$. No grupo 2 houve diferença da semana zero com as semanas 5 e 6, com $P<0,05$ e $P<0,001$. O mesmo ocorreu com a semana 1. A semana 2 diferiu da semana 6 ($P<0,01$), e a semana 3 diferiu das semanas 5 e 6 ($P<0,05$ e $P<0,001$). Não houve diferenças entre as semanas 4, 5 e 6.

No grupo 3 a hemólise foi diferente apenas na semana 6, comparado com todas as outras semanas anteriores. No grupo 4 as semanas zero e 1 diferiram das semanas 5 e 6, sempre com $P<0,001$. A semana 2 diferiu das semanas 5 e 6 com $P<0,01$ e $P<0,001$. A semana 3 diferiu das semanas 5 e 6, ambos com $P<0,001$; a semana 4 diferiu apenas da semana 6 ($P<0,001$), e não houve diferença entre semanas 5 e 6.Os valores de hemólise (%) estão descritos na tabela 6.

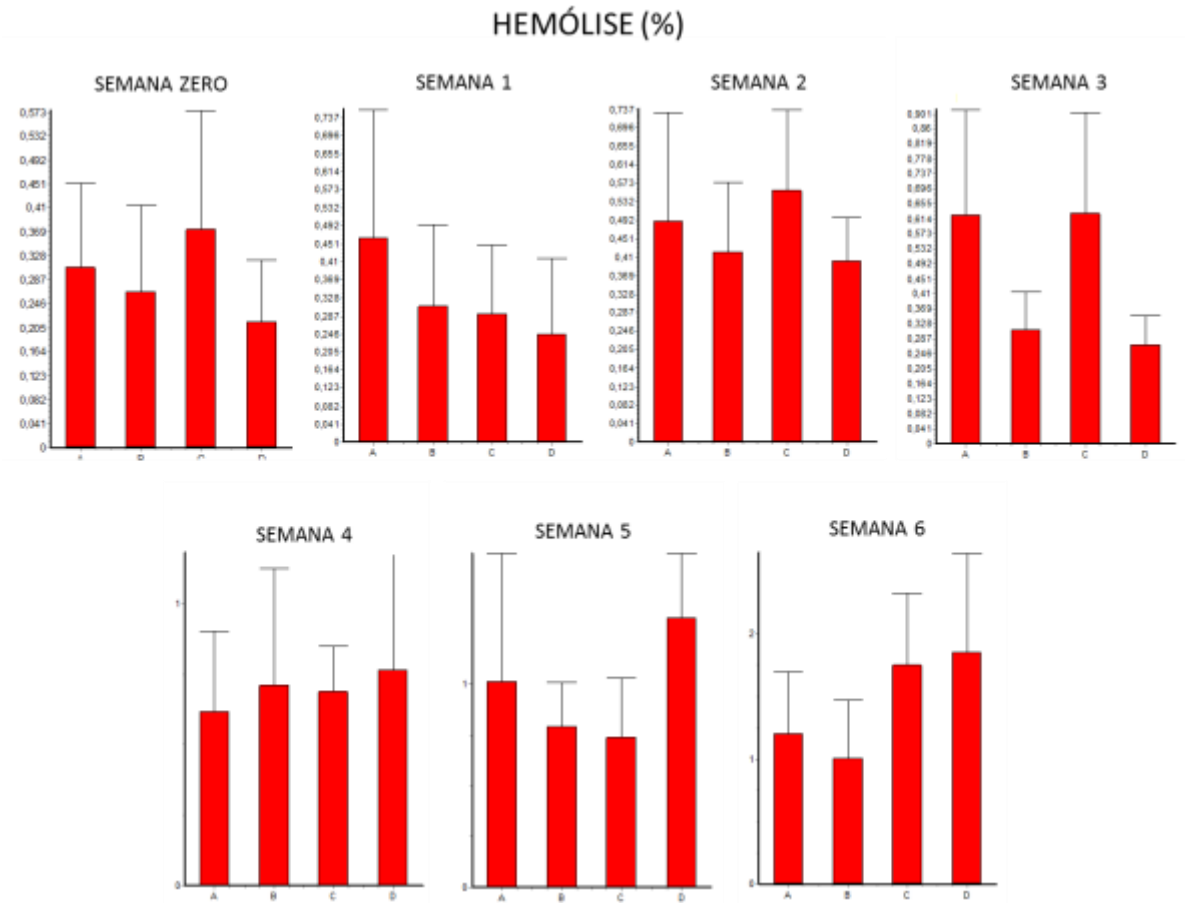
Tabela 6 - Valores de porcentagem de hemólise das 23 bolsas selecionadas para estudo, divididos por grupo e por semanas de análise.

	SEMANAS						
	Zero	1	2	3	4	5	6
G1	0,216	0,721	0,923	0,673	0,776	1,225	1,087
G1	0,129	0,129	0,346	0,159	0,304	0,543	0,775
G1	0,273	0,128	0,308	0,419	0,364	1,665	1,964
G1	0,304	0,784	0,568	0,950	1,053	1,456	1,970
G1	0,386	0,622	0,505	0,831	0,726	0,456	0,940
G1	0,542	0,404	0,292	0,707	0,476	0,455	0,799
Média	0,31[Ł a]	0,46[Ł b]	0,49[Ł c]	0,62[Ł d]	0,62[Ł e]	0,97[Ł a]	1,26[Ł abcde]
Desvio padrão	0,14	0,29	0,24	0,29	0,29	0,55	0,56
G2	0,363	0,363	0,366	0,330	1,417	1,000	1,857
G2	0,423	0,410	0,455	0,457	0,513	0,594	0,704
G2	0,144	0,144	0,304	0,265	0,485	0,705	1,087
G2	0,336	0,601	0,642	0,338	0,408	0,651	0,539
G2	0,033	0,120	0,542	0,143	0,429	0,681	0,856
G2	0,298	0,214	0,222	0,334	1,013	1,129	1,037
Média	0,27[Ł a]	0,31[Ł b]	0,42[Ł c]	0,31[Ł d]	0,71	0,8[Ł abd]	1,01[Ł abcd]
Desvio padrão	0,15	0,18	0,16	0,1	0,41	0,22	0,46
G3	0,121	0,103	0,343	0,108	0,464	1,228	2,502
G3	0,284	0,200	0,382	0,585	0,585	0,463	0,964
G3	0,258	0,277	0,582	0,680	0,629	0,767	2,298
G3	0,352	0,275	0,521	0,707	0,857	0,655	1,638
G3	0,668	0,329	0,768	0,863	0,736	0,435	1,347
G3	0,555	0,567	0,750	0,834	0,867	0,878	1,784
Média	0,37[Ł a]	0,29[Ł b]	0,56[Ł c]	0,63[Ł d]	0,69[Ł e]	0,74[Ł f]	1,7[Ł abcdef]
Desvio padrão	0,2	0,16	0,18	0,27	0,16	0,29	0,58
G4	0,202	0,202	0,263	0,289	0,857	0,825	1,702
G4	0,380	0,501	0,510	0,347	1,020	1,651	2,883
G4	0,243	0,331	0,456	0,193	1,267	1,292	2,459
G4	0,129	0,105	0,350	0,185	0,326	1,546	1,199
G4	0,119	0,087	0,428	0,343	0,360	1,326	1,030
Média	0,21[Ł a]	0,2[Ł b]	0,4[Ł c]	0,27[Ł d]	0,77[Ł e]	1,33[Ł abcd]	1,8[Ł abcde]
Desvio padrão	0,11	0,17	0,1	0,08	0,41	0,32	0,8

Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda: Ł – Diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo; letras minúsculas indicam os pares com diferenças significantes.

Ao analisarmos as semanas entre os grupos observou-se que não houve diferença entre os grupos em nenhuma semana. A figura 8 ilustra os valores de hemólise entre as semanas.

Figura 8 - Gráficos de barras ilustrando a variação de hemólise (%) nos grupos durante as semansa de estocagem.



Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda eixo x: A – G1; B – G2; C – G3; D – G4.

7.3.2 Concentração de sódio e potássio

Todos os valores de potássio dos grupos 1, 2 e 4 passaram no teste de normalidade KS. No grupo 3 apenas a semana 5 não passou no teste. Houve aumento progressivo do potássio em todos os grupos. Não foi possível comprar os grupos 1 e 2 com grupos 3 e 4, pois há diferenças na concentração de potássio das soluções, o que ocasionou menor concentração entre os grupos dom CPDA-1 e grupos CPD/SAG-M

Ao se avaliar o efeito da remoção dos leucócitos, houve diferenças significativas entre os grupos leucorreduzidos (2 e 4) quando comparadas aos grupos simples (1 e 3), a partir da semana 5.

Ao avaliar os grupos com CPDA-1, observou-se que o aumento de potássio no grupo 1 foi significativo em todas as semanas, com $p<0,01$ entre zero e semana 1 e $P<0,001$ nas outras semanas. Não houve diferença entre semana 1 com 2, semanas 2 com 3, semanas 3 com 4 e semanas 5 com 6. No grupo 2 houve diferença entre semana zero com todas as outras semanas, com $P<0,001$. Nas semanas seguintes não houve diferenças entre semana 1 com 2, semanas 2 com 3, semanas 3 com 4, semanas 4 com 5, tão pouco entre semanas 5 e 6.

Nos grupos com CPD/SAG-M observou-se no grupo 3 o mesmo padrão, com semana zero diferindo de todas as outras semanas, com $P<0,001$. Não houve diferença entre semana 1 com 2, semanas 2 com 3, semanas 3 com 4, semana 4 com 5 e semanas 5 com 6. No grupo 4 houve diferença entre semana zero com todas as semanas seguintes, com $P<0,001$. Houve diferença, ainda, entre semana 1 comparada com 2. Não houve diferença entre semanas 2 com 3, semanas 3 com 4, semanas 4 com 5 e semanas 5 com 6.

Os valores de potássio (µmol/L) estão descritos na tabela 7.

Tabela 7 - Valores individuais, médias e desvio padrão da concentração de potássio (µmol/L) das 23 bolsas selecionadas para estudo

	SEMANAS						
Potássio	Zero	1	2	3	4	5	6
G1	3,1	4,8	5,4	5,9	7,2	8,5	9
G1	3,1	5,3	6,1	7	7,5	7,5	8,1
G1	3,3	5,6	6	7,2	8,3	11,2	12
G1	3,3	5,4	5,9	5,9	6,9	9,4	9,6
G1	3	4,5	4,6	4,8	5,5	7,4	7,4
G1	2,8	2,8	4,6	4,6	5,5	6,9	7,2
Média	3,1[Ł a]	4,7[Ł ab]	5,4[Ł ac]	5,9[Ł ad]	6,8[Ł abce]	8,5[Ł abcde]	8,9[Ł abcde]
Desvio padrão	0,2	1	0,7	1,1	1,1	1,6	1,8
G2	2,5	4,1	6	6,1	6,4	6,5	6
G2	4,1	6	6,6	5,8	5,9	6	6,6
G2	3,5	5,3	5,8	5,8	5,6	6,2	6,2
G2	4,1	5,5	5,3	5,7	6,5	7,1	5,8
G2	4,2	5,6	6,3	6,4	6,9	6,3	6,1
G2	3,3	4,2	5,9	6,9	6,9	6,9	7,2
Média	3,6[Ł a]	5,2[Ł ab]	6[Ł a]	6,1[Ł ab]	6,4[Ł ab]	6,5[Ł ab]	6,3[Ł ab]
Desvio padrão	0,7	0,8	0,	0,5	0,5	0,4	0,5
G3	1,5	3	3,8	4,3	4,2	4,4	4,8
G3	1,5	2,6	3,1	4,2	3,9	4,6	4,6
G3	1,7	2,7	3,3	3,7	4,3	4,9	5,1
G3	1,6	3,3	3,8	3,6	3,6	6	5,6
G3	1,9	3,2	3,5	3,8	4	4,7	5
G3	1,8	3,1	3,5	4	4,3	4,9	4,2
Média	1,7[Ł a]	2,983[Ł ab]	3,5[Ł ac]	3,9[Ł abd]	4[Ł abe]	4,9[Ł abcde]	4,8[Ł abcde]
Desvio padrão	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6	0,7
G4	1,6	2,4	2,800	3,800	4,3	3,7	4,3
G4	1,9	2,6	3,100	3,500	3,9	3,4	3,7
G4	1,9	2,4	3,4	3,5	3,4	3,3	3,3
G4	1,3	2,6	3,3	3,6	3,5	3,5	3,8
G4	1,2	2,3	2,9	3,2	3,1	3,1	3,5
Média	1,6[Ł a]	2,5[Ł ab]	3,1[Ł abc]	3,5[Ł ab]	3,6[Ł abc]	3,4[Ł ab]	3,7[Ł abc]
Desvio padrão	0,3	0,1	0,2	0,2	0,5	0,2	0,4

Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda: Ł – Diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo; letras minúsculas indicam os pares com diferenças significantes.

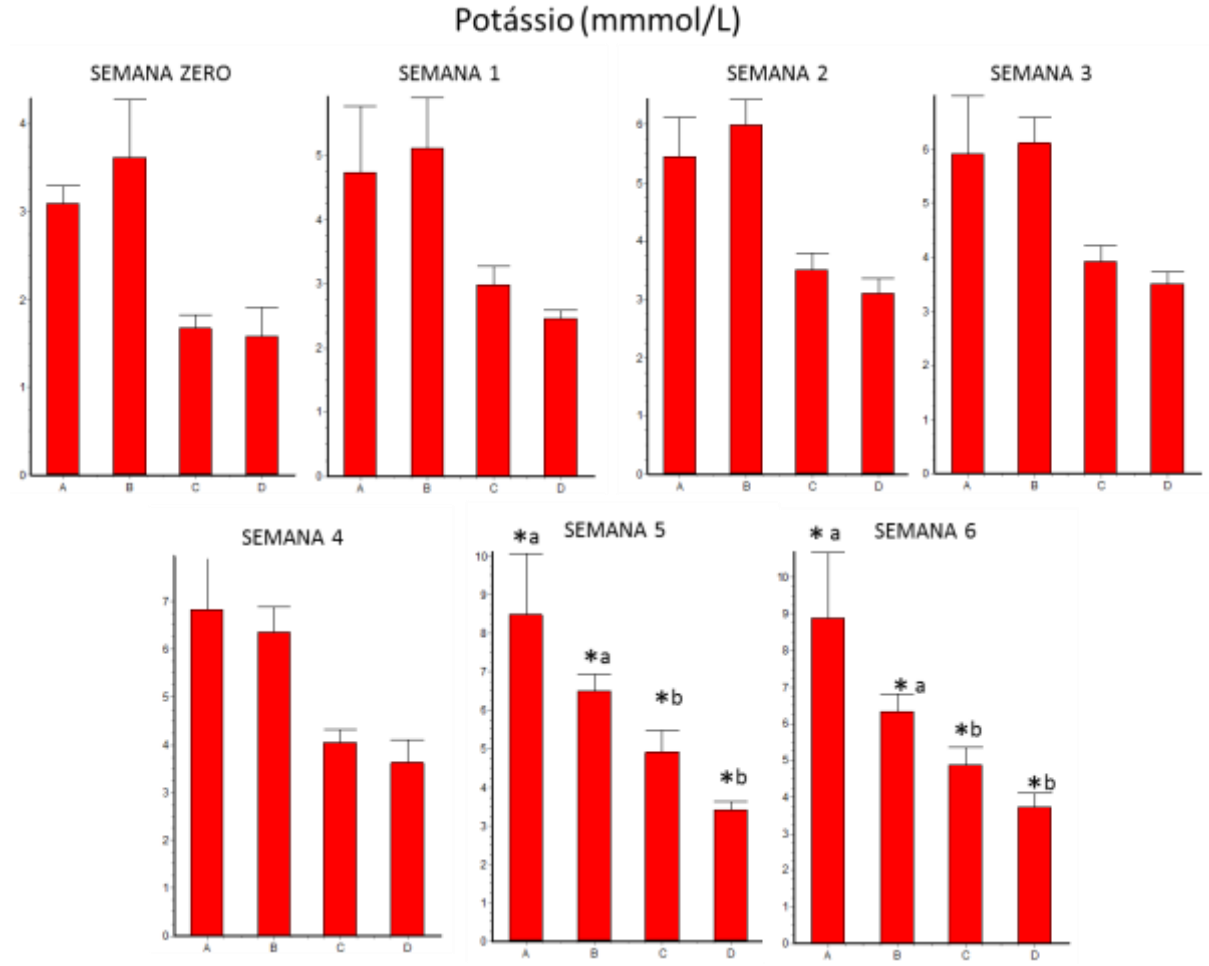
Ao se analisar os grupos semana a semana não houve diferença entre os grupos 1 e 2 e grupos 3 e 4 nas semanas zero, 1, 2, 3 e 4. Houve diferença quanto ao tipo de anticoagulante, com os grupos 1 e 2 diferindo dos grupos 3 e 4 ($P<0,001$), sendo que os grupos com CPDA-1 tiveram valores de potássio significativamente mais altos.

Na semana 5 esse mesmo padrão se manteve, entretanto com grupo 1 diferindo de grupo 3 com menor significância (P<0,05), e grupo 1 diferindo de grupo 4 com extrema significância (P<0,001).

Na semana 6 houve diferença entre grupo 1 e 2 (P<0,01), mas não entre grupo 3 e 4. As diferenças entre grupos 1 e 3, assim como os grupos 2 e 4 se mantiveram altas (P<0,001).

A análise semanal dos grupos está representada na figura 9.

Figura 9 - Gráficos de barras ilustrando a variação da concentração de potássio (µmol/L) nos grupos durante as semansa de estocagem.



Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda: Letras iguais indicam os grupos que diferiram de acordo com anticoagulante. Legenda eixo x: A – G1; B – G2; C – G3; D – G4.

Todos s valores de sódio dos grupos 1 e 4 passaram no teste ne normalidade. No grupo 2 apenas a semana 3 não passou no teste. No grupo 3 as semanas 4 e 6 não passaram no teste. Não houve diferenças entre os grupos quanto à concentração de sódio.

Ao avaliar os grupos com CPDA-1, observou-se que o aumento de sódio no grupo 1 foi significativo comparando semana zero com semanas 2 a 6. Não houve diferenças entre semana zero e 1, semanas 1 e 2, semanas 2 e 3, semanas 3 e 4 e semanas 5 e 6. Houve diferenças entre semana 4 quando comparada a 5 ($P<0,01$). No grupo 2 não houve diferença entre nenhuma semana.

Nos grupos com CPD/SAG-M observou-se que no grupo 3 houve diferenças entre a semana zero e a semana 5 ($P<0,05$). Houve ainda diferenças entre semana 1 comparada com semanas 5 e 6 ($P<0,01$ e $P<0,05$, respectivamente). No grupo 4 houve diferença entre a semana zero comparada com semanas 4 ($P<0,01$), 5 ($P<0,001$) e 6 ($P<0,001$). Houve, ainda, diferença entre semana 1 com semanas 4, 5 e 6, semana 2 com 5 e semana 3 com 5.

Os valores de sódio (µmol/L) estão descritos na tabela 8.

Tabela 8 - Valores individuais, médias e desvio padrão da concentração de sódio (µmol/L) das 23 bolsas selecionadas para estudo

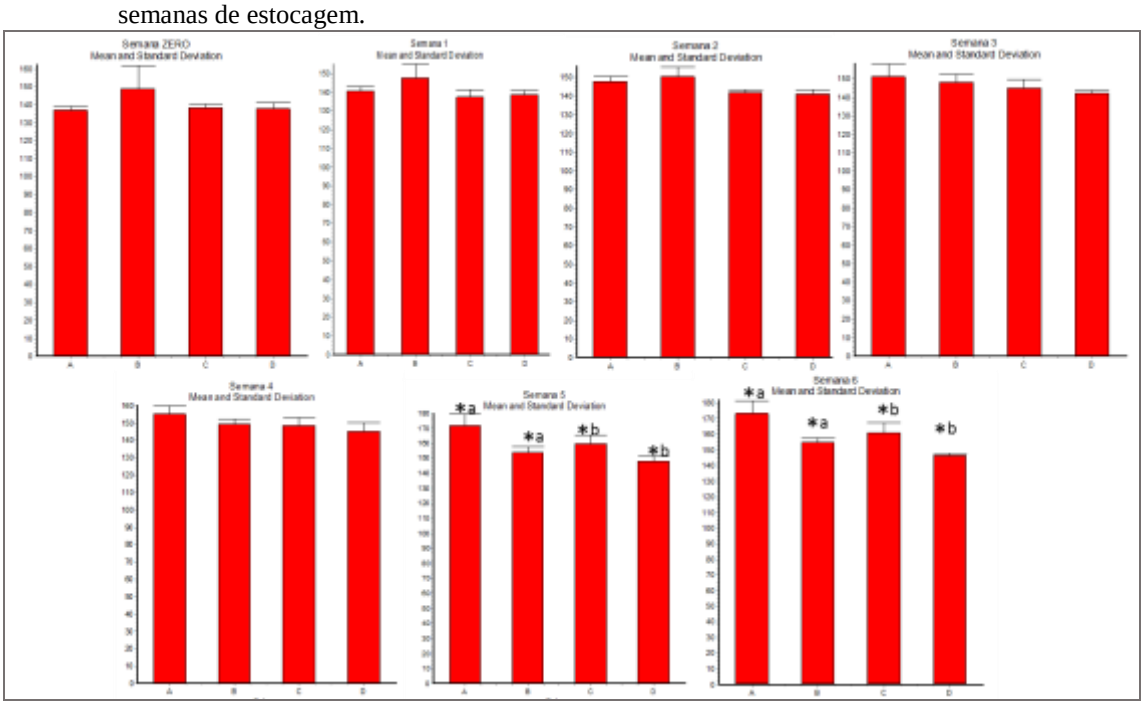
	SEMANA						
Sódio	Zero	1	2	3	4	5	6
G1	139	139	148	151	153	172	173
G1	140	145	151	156	155	158	163
G1	135	141	147	159	163	182	187
G1	137	141	147	155	158	171	177
G1	135	139	150	142	152	176	170
G1	137	138	144	144	149	172	170
Média	137,2 Ła	140,5 Łb	147,8 Łac	151,2 Łabd	155 Łbae	171,8 Łabcde	173,3 Łabcde
Desvio padrão	2,04	2,51	2,48	6,85	4,94	7,91	8,12
G2	135	138	150	144	150	154	154
G2	162	150	160	148	150	155	156
G2	136	146	145	144	146	153	151
G2	162	151	152	16	154	161	159
G2	158	143	148	148	148	150	154
G2	140	158	146	148	149	150	154
Média	148,8	147,7	150,2	148	149,5	153,8	154,7
Desvio padrão	13,15	6,95	5,46	4,38	2,66	4,07	2,66
G3	136	132	140	140	146	148	150
G3	139	136	144	151	147	164	162
G3	136	134	142	151	148	161	162
G3	139	143	142	144	158	163	163
G3	139	138	139	141	144	159	168
G3	141	140	143	143	148	163	163
Média	138,33 Ła	137,17 Łb	141,67	145	148,5	159,67 Łab	161,33 Łb
Desvio padrão	1,97	4	1,86	4,86	4,89	5,99	5,95
G4	133	135	140	142	146	148	145
G4	136	137	145	142	153	153	148
G4	136	139	139	144	140	148	145
G4	142	140	141	140	145	147	147
G4	141	141	140	143	143	145	147
Média	137,6 Ła	138,4 Łb	141,0 Łc	142,2 Łd	145,4 Łab	148,2 Łabcd	146,4 Łab
Desvio padrão	3,78	2,41	2,35	1,48	4,83	2,95	1,34

Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda: Ł – Diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo; letras minúsculas indicam os pares com diferenças significantes.

Ao se analisar os grupos semana a semana, houve diferença apenas entre os grupo 1 e 2 na semana zero, com $P<0,05$.Nas semanas 1, 2, 3 e 4 não houve diferenças entre estes grupos.

Nas semanas 5 e 6 houve diferença entre os grupos G1 e G2, e também entre G3 e G4, com P<0,001 e P<0,05, respectivamente. Na semana 6 a diferença aumentou mais um pouco entre os grupos com e sem leucócitos, com P<0,001 entre G1 e G2, e P<0,01 entre G3 e G4, como ilustra a figura 10.

Figura 10 - Gráficos de barras ilustrando a variação da concentração de sódio (µmol/L) nos grupos durante as semanas de estocagem.



Legenda: Letras iguais indicam os grupos que diferiram de acordo com anticoagulante. Legenda eixo x: A – G1; B – G2; C – G3; D – G4.
Fonte: (MOROZ, 2015).

7.3.3 Glicose

Os valores de glicose de todos os grupos passaram no teste de normalidade. Ao se analisar o comportamento da glicose por grupo, observou-se queda de glicose nos Grupos 1 e 2 a partir da semana 4, mantendo essa redução em um patamar estável nas semanas 5 e 6 (todos com P<0,05). No Grupo 3 houve um comportamento flutuante, com queda de glicose na semana 3 (P<0,01) e semana 4 (P<0,05), aumento nas semanas 5 e 6, sem diferença

significativa. No Grupo 4 a variação se manteve, com semana zero diferindo apenas de semana 6, e semana 2 com semana 6. A tabela 9 ilustra os valores e o comportamento da variação da glicose entre os grupos durante as semanas.

Tabela 9 - Valores individuais, médias e desvio padrão da concentração de glicose (mg/dL) das 23 bolsas selecionadas para estudo

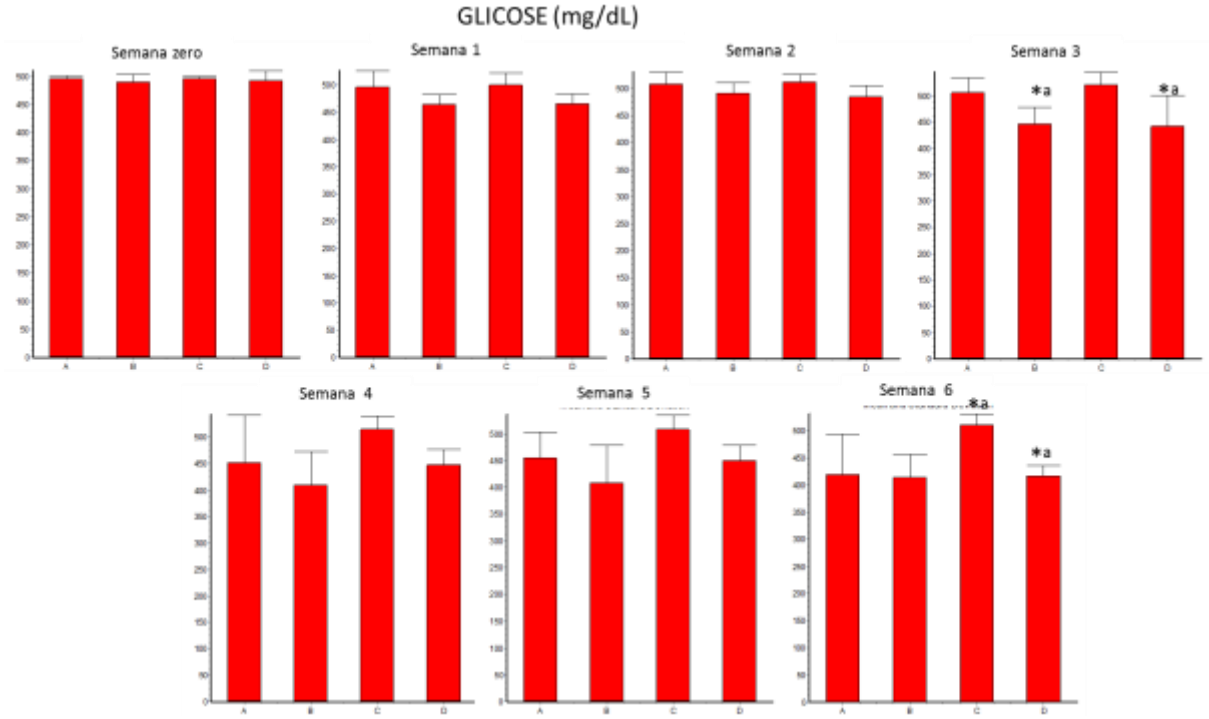
	SEMANAS						
	Zero	1	2	3	4	5	6
G1	492	470,6	472,3	472,3	470,2	457,6	452,4
G1	494	449,2	491,3	468,9	438,2	401,8	319
G1	492	513,4	522,1	524,7	281,8	472,5	456,6
G1	493,8	519,7	525,8	533,3	524,7	507,5	490,4
G1	502,6	517,9	516,6	506,6	481,9	391,3	329,1
G1	500,8	509,8	522,1	527,5	517,1	495,2	468,2
Média	495,87[Ła]	496,77	508,37	505,55	452,32[Ła]	454,32[Ła]	419,28[Ła]
Desvio padrão	4,63	29,55	21,64	28,525	89,34	48,105	75,01
G2	512	493,8	473,7	423,4	419,7	333,4	356,2
G2	472	441,6	486,1	391,3	283,5	466,7	371,6
G2	480	456,1	512,8	465,3	432,7	474,1	460,7
G2	490	477,2	513,6	464,4	442,9	308,8	450,8
G2	488,9	466,4	467,4	470,5	451,6	444	426,4
G2	495,2	453,1	490,5	464,6	428,2	420	422,5
Média	489,68[Ła]	464,7	490,68	446,58	409,77[Ła]	407,83[Ła]	414,7[Ła]
Desvio padrão	13,68	18,7	19,32	32,12	62,86	70,23	42,18
G3	490,6	455,4	483,6	472,8	462,4	456,6	476,4
G3	493,8	508,9	518,4	531,4	531,3	530,4	533,9
G3	499	509,8	520,2	533,2	528,5	520,9	518,6
G3	497,2	509,8	518,4	534,2	523,7	517,1	516
G3	498,1	507,1	513,8	522,8	515,2	504,6	508,4
G3	498,1	510,7	518,4	531,4	524,7	517,1	515,9
Média	496,13[Łab]	500,28[Łc]	512,13	520,97[Łac]	514,3[Łab]	507,78	511,53
Desvio padrão	3,26	22,02	14,14	23,94	26,01	26,41	19,15
G4	520	491,2	472,3	388,1	414,9	410	412,9
G4	490	478,4	467	420,2	413,6	472,9	412,6
G4	470	454,4	518	397,3	461,6	428	406
G4	488,9	450,7	483,7	472,8	471,6	472,4	450
G4	489	455,4	485,3	530	474	466	404
Média	491,58[Ła]	466,02[Łb]	485,26	441,68	447,14	449,86	417,1[Łab]
Desvio padrão	17,96	17,82	19,85	59,31	30,39	29,01	18,81

Fonte: (MOROZ, 2015).

Legenda: Ł – Diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo; letras minúsculas indicam os pares com diferenças significantes.

Ao analisar os grupos semana a semana, não houve diferença estatística entre os grupos nas semanas zero, 1 e 2. Houve diferença entre G1 e G2 (P<0,05) e entre G3 e G4. Nas semanas 4 e 5 não houve diferença entre os grupos com mesmo anticoagulante, ficando a diferença restrita a este item. Na semana 6 houve diferença entre grupo G3 e G4, com P<0,01. A figura 11 ilustra as variações semanais entre os grupos.

Figura 11 - Gráficos de barras ilustrando a variação da concentração de glicose (mg/dL) nos grupos durante as semanas de estocagem.



Fonte: (MOROZ, 2015).
Legenda: Letras iguais indicam os grupos que diferiram de acordo com anticoagulante. Legenda eixo x: A – G1; B – G2; C – G3; D – G4.

8 DISCUSSÃO

Em meio aos dados observados no presente estudo, a presença de hemólise excessiva em 11 das 34 bolsas, ocasionando necessidade de descarte, pode ser resultado de contaminação bacteriana durante a manipulação, ou mesmo em decorrência de bacteremia assintomática do doador (HILLYER et al., 2003). Aventando a hipótese de contaminação bacteriana como principal causa de hemólise, podem-se supor três ocorrências: primeiro que a contaminação tenha ocorrido por bactérias do gênero *Streptococcus* sp; segundo que a quantidade de bactérias no concentrado de hemácias não tenha alcançado número suficiente para formação de colônias; e terceiro seria a união dos dois fatos anteriores.

Dentre as principais bactérias imputadas na contaminação de hemocomponentes humanos, podem-se citar (HILLYER et al., 2003; US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2011): *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Staphylococcus epidemidis, Morganella morgani, Streptococcus viridans, Streptocuccus pneumoniae, Staphylococcus warneri, Klebsiella pneumoniae, Yersínia enterocolitica, Pseudomonas fluorescens* e *Serratia marcescens*. Destas bactérias, as três últimas conseguem se multiplicar em baixas temperaturas.

A possibilidade de contaminação por bactérias do gênero *Streptococcus* pode ocasionar destruição eritrocitária pela produção de hemolisinas, mesmo que em quantidade bacteriana abaixo do limite de detecção do meio de cultivo (SOWEMIMO-COKER, 2002). Os principais microrganismos cutâneos residentes no cão são o *Micrococcus sp*, estreptococos A hemolítico, estafilococos coagulase negativo e *Acinetobacter sp* (CONCEIÇÃO et al., 1998). Tais contaminantes provavelmente vieram da coleta, sendo que não há relatos de estudos sistemáticos que apontem a frequencia de contaminação de hemocomponetes em bancos de sangue canino.

O risco de contaminação bacteriana é bem descrito em humanos, especialmente com concentrado de plaquetas, com uma frequência de uma plaqueta contaminada para cada 2000-3000 produzidas. A contaminação dos hemocompoentes por bactérias é a segunda maior causa de morte por reações transfusionais nos Estados Unidos, com uma taxa de mortalidade estimada de 1 paciente a cada 20000-85000 transfusões (HILLYER et al., 2003). Métodos

mais acurados de diagnóstico de contaminação em hemocomponetes permitiu uma detecção precoce, especialmente ao se utilizar métodos diagnósticos baseados em biologia molecular. A pesquisa de DNA ou RNA bacteriano por meio de PCR (polymerase chain reaction) é utilizada em humanos e em alguns centros de hemoterapia veterinária avançados evitando o risco de transfusão de hemocomponetes contaminados, entretando há acrescimo no valor de custos de produção (DREIER et al., 2007; PATTERSON et al., 2011).

Outras possibilidades de hemólise sem contaminação bacteriana seriam por estocagem inadequada e refrigeração excessiva, mas essa hipótese é pouco provável, pois as bolsas hemolisadas ocorreram em todos os grupos de estudo, e em momentos de colheitas diferentes. Além disso, todas as bolsas analisadas por fase de colheita eram armazenadas nas mesmas condições, com controle de temperatura periódico. Se ocorresse frio extremo (abaixo de 1°C) ou mesmo congelamento, todas as bolsas do lote de análises seriam descartadas.

Defeitos hereditários eritrocitários podem ocasionar fragilidade das hemácias e anemias hemolíticas, entretanto esta hipótese é improvável, pois os doadores que tiveram as bolsas descartadas por hemólise doaram em diferentes grupos do projeto, e eram doadores recorrentes, sendo os descartes eventos únicos em seu histórico interno (OWEN; HARVEY, 2012).

Outra possibilidade de hemólise não bacteriana seria por manipulação inadequada do CH. No que tange a traumas mecânicos, não houve nenhuma forma de manipulação diferenciada das bolsas. A manipulação inadequada estaria relacionada a possível contaminação bacteriana, pois, apesar de respeitar procedimentos de redução de riscos de contaminação, o manuseio das bolsas não foi realizado em capela.

Portanto, a principal suspeita recai sobre a contaminação bacteriana, apesar desta não ter sido confirmada nas culturas realizadas. A utilização de técnicas mais apuradas de detecção bacteriana, como os testes moleculares (PCR), poderia sanar estas dúvidas.

As alterações morfológicas e bioquímicas que podem ser observadas durante a estocagem dos hemocomponentes eritrocitários são chamadas de lesões de armazenamento. Ocorrem por consumo dos nutrientes presentes na solução preservativa, alterações na conformação da membrana eritrocitária e acúmulo de resíduos (HESS; GREENWALT, 2002; HESS, 2006; COSTA JUNIOR et al., 2008; PIETERSZ, 2011). Essas lesões reduzem a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos por diminuir a capacidade de

deformação da membrana e pelo aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio por redução do 2,3-DPG (HESS; GREENWALT, 2002; ZUBAIR, 2010; KISIELEWICZ; SELF, 2014). Ocorre ainda menor porcentagem de hemácias viáveis pós-transfusão por fagocitose acelerada no receptor e lise precoce (RUBIN et al., 2008). Parte das lesões (como a redução de ATP e 2,3 DPG) são reversíveis, no entanto as alterações de membrana não. Isso quer dizer que a afinidade pelo oxigênio poderá ser reestabelecida, mas as microvesículas e projeções que se formaram serão retiradas depois da transfusão por ação do sistema monocítico fagocitário. Essa retirada parcial de fragmentos de membrana cursará com mudanças irreversíveis com fragilidade eritrocitária (e tendências à hemólise), além de ocasionar fagocitose eritrocitária (HOGMAN, 1998; RUBIN et al., 2008; HESS, 2010; ANTONELOU et al., 2012).

Formas indiretas de avaliar a manutenção da membrana eritrocitária incluem a determinação da concentração de potássio e ATP, enquanto que análises diretas da avaliação da membrana incluem determinação da taxa de hemólise, fragilidade eritrocitária e avaliação da microcirculação (número de capilares funcionais e fluxo sanguíneo) de receptores pós-transfusão (TOMCZAK et al., 2010). Neste estudo oram realizadas uma análise direta (taxa de hemólise) e uma indireta (concentração de potássio).

Há diversas soluções preservativas utilizadas para armazenamento de sangue, e estudos anteriores realizados comparando o CPDA-1 com o CPD/SAG-M já indicam melhor eficácia deste último na manutenção eritrocitária após 21 dias de estocagem Wardrop et al. (1997). Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a hemólise em todos os grupos se manteve abaixo de 1%, conforme recomendado pelas normas de hemoterapia humana, deixando de ser adequado para uso a partir da sexta semana (BRASIL, 2010; TOMCZAK et al., 2010). A possibilidade de se ampliar o emprego do CH para 42 dias é muito interessante visto que há grande demanda deste hemocomponente. Contudo, a baixa viabilidade de estoque não permite realizar coletas de muitas bolsas, pois há grande risco destas serem descartadas. Aumentar o tempo de estocagem permitirá uma melhor logística dentro da rotina transfusional, desde que não haja prejuízo para o receptor.

A porcentagem de hemólise não sofreu variação significativa entre os grupos que sofreram ou não remoção de leucócitos, conflitando com estudos anteriores que observaram menor efeito da estocagem em hemocomponentes leucorreduzidos (BROWNLEE et al., 2000; EKİZ et al., 2012; CALLAN et al., 2013). A variação inconsistente da porcentagem de

hemólise observada entre os grupos durante as semanas, aliado ao desvio padrão alto, podem ser algumas causas dessa falha em detectar melhor preservação de hemácias leucorreduzidas. A baixa concentração de hemoglobina livre aliado ao fato do desvio padrão ser alto, indicam necessidade de aumento no número de bolsas por grupo a fim de diluir as variações.

Ao se analisar uma variável indireta de alteração de membrana, a concentração de potássio se elevou na quarta semana nos grupos que utilizaram CPDA-1 (G1 e G2), enquanto que a elevação se iniciou na quinta semana nos grupos que utilizaram CPD/SAG-M (G3 e G4). Ao se comparar os grupos com mesmo anticoagulante, a leucorredução resultou em menor concentração de potássio na quarta semana, sendo que esta mudança se tornou significante apenas na quinta semana. Desta forma, foram observados apenas impactos indiretos (dosagem de potássio) e diretos (hemólise) quando comparadas as soluções preservativas.

Um melhor desemprenho das hemácias mantidas com soluções CPD/SAG-M frente ao CPDA-1 já foi demonstrado em diversos estudos em hemocomponentes humanos e animais (KURUP et al., 2003; COSTA JUNIOR et al., 2008; BERTOLETTI; RAISER, 2011). Contudo, o efeito da leucorredução teve um impacto na preservação apenas indireto, como foi possível observar na menor concentração de potássio sobrenadante nos grupos com mesmo anticoagulante. Uma vez que a concentração interna de potássio é mantida levemente mais elevada no meio intra-eritrocitário por meio da bomba de sódio e potássio, a liberação para o plasma indica falha da manutenção de membrana. Isso pode ser ocasionado por menor concentração de ATP, ou menor efeito de mediadores inflamatórios (EKIZ et al., 2012).

O aumento da concentração de potássio em hemocomponentes eritrocitários caninos não é uma preocupação clínica tão importante quanto é em humanos. Uma vez que a concentração intraeritrocitária canina de potássio gira em torno de 7 mmol/L, com exceção de algumas raças orientais, e a hemácia humana possui cerca de 245 mmol/L, espera-se que ocorra uma piora clínica em pessoas recebendo sangue com taxas de hemólise acima de 1% (FUJISE et al., 1997; HESS et al., 2009). A hiperpotassemia dos hemocomponentes é capaz de resultar em alterações hemodinâmicas graves no paciente que receber este sangue, especialmente hipertensão e arritmias cardíacas (HESS, 2010). Em CH humanos e suínos os níveis de potássio podem chegar a valores de 45 mmol/L, e em estudos em cão os valores não excedem 5,5 mmol/L (COSTA JUNIOR et al., 2008; PATEL et al., 2013). Uma vez que concentrações séricas acima de 6 mmol podem iniciar alterações hemodinâmicas, há pouca

probabilidade do potássio livre presente em CH canino resultar em alterações clínicas. Há apenas um relato de possível alteração hemodinâmica ocasionada por transfusão de CH em cão, sendo que neste relato não foi realizada a dosagem de potássio da bolsa, nem se levou em consideração outras causas de hiperpotassemia, como lesão muscular aguda (MANEY; QUANDT, 2012; CALLAN et al., 2013).

Não é possível comparar a concentração de potássio entre os grupos com diferentes anticoagulantes, uma vez que a solução de SAG-M não possui potássio, o que ocasionou diluição do mesmo, explicando a média muito mais baixa dos grupos 3 e 4 comparadas com os grupos 1 e 2 (metade da concentração). O mesmo não pode ser dito da dosagem de sódio, pois a solução de SAG-M possui níveis de sódio próximos ao do plasma canino (150 mmol/L), o que justifica os valores semelhantes entre os grupos com diferentes anticoagulantes. Também houve diferença na concentração de sódio ao se comparar grupos com mesma solução e que sofreram remoção dos leucócitos, fato observado a partir da quinta semana de estudo entre grupos com e sem leucócitos. O sódio não é utilizado como forma de avaliar a manutenção eritrocitária como ocorre com o potássio, pois ele é o principal mantenedor da osmolalidade do meio extracelular. Portanto, seu aumento ou redução está mais relacionado a perda ou ganho de água pelas células (COSTA JUNIOR et al. 2008). Desta forma quanto menor a concentração de sódio no sobrenadante, maior a perda de água intracelular, e quanto maior a concentração de sódio, maior o ganho de água. No presente estudo verificou-se há aumento do sódio durante as semanas de estocagem, o que pode sugerir engurgitamento eritrocitário durante a estocagem. Estudos com hemácias humanas já observaram aumento do volume celular médio (VCM) com redução proporcional da concentração de hemoglobina celular média (CHCM) (LEONART, 1994). As variações hídricas intraeritrocitárias podem ser revertidas na circulação do receptor, conforme houver reposição de ATP e 2,3-DPG.

A leucorredução é um procedimento que tem o intuito de reduzir 99,9% dos leucócitos (BRASIL, 2010). O tempo de filtração observado (25 minutos, em média) foi maior que o descrito para humanos, mas próximo dos valores encontrados em estudos caninos (BROWNLEE, 2000; ANTONOLLOU, 2014; LACERDA 2014). O filtro analisado foi eficaz quanto à essa meta, uma vez que mais de 99,9% dos leucócitos foram retirados. Esse dado conflita com estudos semelhantes em cão que avaliaram outras marcas comerciais de bolsas de sangue com filtro “in line” (BROWNLEE et al., 2000; LACERDA et al., 2014). Nestes estudos a redução de leucócitos pós-transfusional variou de 88,9 a 98,14%. Cada marca

comercial possui características físico-químicas particulares, incluindo eletronegatividade do material e tamanho dos poros. Desta forma, os filtros utilizados no presente estudo foram efetivos na redução leucocitária, mas também reduziram plaquetas, efeito descrito pelo fabricante. Portanto, o processamento descrito neste trabalho inviabiliza a utilização do sangue colhido para produção de concentrado de plaquetas. De forma geral, além da impossibilidade de produção de hemocomponentes plaquetários ao utilizar a filtragem de leucócitos de sangue total, deve-se salientar o custo elevado da bolsa com filtro. As bolsas estudadas com CPD/SAG-M com filtro têm valor médio de 90 reais, e as sem filtro com mesma solução custa 32 reais da bolsa sem filtro com mesma solução. Esse aumento pode impactar a viabilidade de um banco de sangue, especialmente se não forem observadas justificativas de melhor armazenamento ou melhor impacto clínico do paciente.

O aumento de mediadores inflamatórios em bolsas de sangue com e sem leucócitos já foi estudada *in vitro* em cães em dois estudos, sendo que houve menor concentração de IL-8 e "monocyte chemoattractant protein-1" (MCP-1), sem aumento de IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α em hemocomponentes eritrocitários estocados há mais de 21 dias (CALLAN et al., 2013; CORSI et al., 2014). Um estudo experimental *in vivo* em cães saudáveis avaliando o efeito da remoção leucocitária pós-transfusional utilizando sangue autólogo mostrou que há aumento de leucócitos por neutrofilia 24 horas após a transfusão de sangue estocado não-leucorreduzido por 21 dias enquanto que no grupo leucorreduzido não houve aumento de leucócitos (MCMICHAEL et al., 2010). Outro estudo experimental *in vivo*, também utilizando cães saudáveis que receberam sangue autólogo, não observou aumento de IL-8 e MCP-1 em cães no período pós-transfusional de 12 horas ao comparar sangue estocado por mais de 28 dias entre grupos com bolsas com e sem leucócitos (CALLAN et al., 2013). Interessante ressaltar que neste estudo houve maior efeito inflamatório de bolsas "velhas" (28 dias de estocagem) quando comparadas com bolsas "novas" (sete dias de estocagem), fato observado pelo aumento de leucócitos e queda de plaquetas.

O aumento de IL-8 que ocorre em bolsas com leucócitos resulta em migração de neutrófilos da reserva da medula óssea para a circulação, apesar de não ocasionar efeitos inflamatórios sistêmicos diretos, como febre. Entretanto esse aumento neutrofílico pode ocasionar resposta inflamatória mais acelerada em pacientes que já estejam com algum processo inflamatório (PURDY et al., 1997; VAMVASKAS; CARVEN, 1999).

Um estudo experimental *in vitro* utilizando cultivo de células endoteliais comparou os efeitos da estocagem de hemácias aliado ao efeito da leucorredução (LUK et al., 2003). Este estudo demonstrou que as hemácias se aderem mais ao endotélio vascular quando estocadas por mais de 28 dias, sendo que a remoção dos leucócitos reduz este efeito. Desta forma há diversos estudos que demonstram que a estocagem, assim como a leucorredução têm efeitos diretos na viabilidade eritrocitária pós-transfusional, e no estado inflamatório do receptor.

Os valores de glicose apresentaram queda discreta, corroborando estudos veterinários que indicam que as hemácias de cães e porcos não utilizam a dextrose ou glicose da solução durante a estocagem da mesma forma que as hemácias humanas (PATEL et al., 2013; LACERDA et al., 2014). Uma das hipóteses para essa redução é o fato da acidose inibir a glicólise, sendo uma das justificativas para depleção de ATP que ocorre de forma acelerada nas hemácias estocadas animais. Foi observada, ainda, uma tendência a menor concentração de glicose nos hemocomponentes leucorreduzidos, tendência esta que só foi significativa na sexta semana, e apenas entre os grupos 3 e 4. O aumento do consumo da glicose nos grupos cujos leucócitos foram retirados pode indicar uma melhor eficiência no uso da glicose e justificar maiores valores de ATP encontrado em estudos com hemácias caninas leucorreduzidas.

O pH apresentou queda gradual em todos os grupos, com tendência a ser um pouco mais elevado nos grupos leucorreduzidos com bolsas de CPDA-1, uma vez que em três das seis semanas estudadas o grupo sem leucócitos (G2) teve pH mais alto. A queda do pH é descrita como decorrência do acúmulo de ácido lático proveniente da glicólise promovida pelas hemácias e é bem descrita em estudos humanos que têm quedas variando de 7,2 para próximo de 6,2 (PATEL et al., 2013). Estudos em animais com cães e porcos mostram que o pH dentro da bolsa varia pouco, com um comportamento de queda discreto, como o encontrado neste estudo (COSTA JUNIOR et al., 2008; PATEL et al., 2013). Outros produtos ácidos são acumulados dentro da bolsa, como o ácido carbônico, uma vez que a bolsa é porosa para gases e há acúmulo de CO_2. Entretanto o acúmulo de CO_2 observado foi crescente até a terceira semana, com queda sequencial que não acompanhou os valores de pH, não apresentando correlação. Uma teoria que pode ser levantada é a saturação das hemácias pelo oxigênio.

Uma das alterações mais marcantes foi a mudança no comportamento da concentração de gases ao se comparar a presença ou ausência dos leucócitos, especialmente sobre o oxigênio. O aumento na concentração de PO_2 e SO_2 nos grupos leucorreduzidos não foi um evento hipotetizado, e uma vez que não há estudos anteriores comparando os parâmetros hemogasométricos de hemocompoentes com e sem remoção de leucócitos, desta forma é possível apenas conjecturar sobre possíveis causas deste fenômeno.

A leitura dos gases oxigênio e dióxido de carbono é realizada pelos aparelho de gasometria com resultados expressos de acordo com a pressão de dissociação desses gases em um meio líquido (plasma ou sobrenadante) em: PO_2 e PCO_2. Já a determinação da saturação da hemoglobina com oxigênio é mensurada por meio de direfenças na reflexão da fotometria entre a hemoglobina carregando oxigênio (oxihemoglobina) e da hemoglobina carregando gás carbônico (desoxihemoglobina). Desta forma a análise conjunta de ambas variantesfornece noção da capacidade da hemoglobina em se ligar e de se desprender do oxigênio (STOCKHAN; SCOTT, 2011).

Como a saturação de oxigênio, e sua consequente liberação, está relacionada com o quanto de oxigênio é inspirado (fração inspirada), capacidade funcional alveolar e sistema circulatório, quaisquer problemas que impeçam a chegada de oxigênio aos pulmões, que bloqueiem a dissolução dos gases no alvéolo, incapacidade da ligação dos gases na hemoglobina ou falência no sistema circulatório se refletirá em alterações nos parâmetros hemogasométricos (STOCKHAN; SCOTT, 2011). No presente estudo, todas essas variáveis são excluídas por se tratar de um estudo *in vitro*, tendo apenas a capacidade de ligação e dissolução do oxigênio pela hemoglobina um fator preponderante nas alterações hemogasométricas observadas.

Ao se analisar apenas a afinidade da hemoglobina em se ligar aos gases, em situações de função de hemoglobina normal, a SO_2 e a PO_2 estão interligadas por relação direta, onde o aumento da PO_2 se reflete em aumento da SO_2. Ao se abordar alterações na hemoglobina, há situações nas quais podem ocorrer aumentos de afinidade (aumento de SO_2), sem liberação (menor PO_2 relativa ou absoluta), como o que ocorre na intoxicação por monóxido de carbono e formação de carboxihemoglobina. Nesta situação a hemoglobina estará com oxigênio ligado em 3 dos quatro locais (um deles está ocupado pela molécula de monóxido de carbono), mas esse oxigênio não será facilmente dissolvido no plasma, cursando com SO_2 elevada e PO_2 relativamente baixa. Um outro exemplo de hemoglobina com função defeituosa é a formação

de metahemoglobina. Esta é uma hemoglobina onde um ou mais grupos heme teve sua molécula de ferro oxidada, mudando da forma ferrosa (Fe^{2+}) para a forma férrica (Fe^{3+}). Nesta situação haverá menor ligação de oxigênio pois um dos sítios heme está comprometido. Com apenas três sítios disponíveis, haverá uma maior afinidade ao oxigênio, menor dissolução no plasma, ocasionando PO_2 normal ou levemente reduzida, mas com alteração inconsistente da SO_2 pela mudança na coloração do sangue, impossibilitando leitura adequada pelo leitor. Esse detalhamento do comportamento da hemoglobina é importante para tentar elucidar a mudança no comportamento dos hemocompoentes eritrocitários.

A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio depende de fatores diversos, dentre eles pH, concentraçao de 2,3-DPG, formação de metahemoglobina e acúmulo de monóxido de carbono. Uma vez que a variação de pH não acompanhou as alterações de PO_2 e SO_2, este não deve ser um fator preponderante, assim como a presença de monóxido de carbono também não, pois este é formado em processos de queima incompleta (incêndios, gases de escapamentos, fumaça industrial, entre outros). Portanto, o comportamento diferenciado que as hemácias apresentaram quanto a presença ou ausência de leucócitos pode ser explicada pela redução de 2,3-DPG ou formação de metahemoglobina.

O aumento da SO_2 nos hemocomponentes leucorreduzidos poderia se refletir em maior afinidade e redução da capacidade de dissolução, mas o aumento proporcional da PO_2 indica que a hemoglobina, além de poder captar mais O_2, está liberando-a para a solução aquosa. Esse fato pode indicar uma melhor efetividade das hemácias leucorreduzidas, devendo este efeito também ser estudado *in vivo* em estudos futuros. Os hemocomponentes não leucorreduzidos apresentaram queda da SO_2, mesmo com aumento de PO_2 ao longo das semanas. Pode-se supor que a leucorredução manteve a concentração de 2,3-DPG mais estável, ou resultou em menor formação de metahemoglobina.

Dentre as limitações deste estudo que impediram na conclusão da alterações do comportamento da hemoglobina frente ao oxigênio entre os hemocomponentes com e sem leucócitos, pode-se citar a falta da determinação da concentração de metahemoglobina e o estudo da afinidade de gases entre os grupo. Uma vez que os resultados só foram analisados ao final do experimento, não foi sequer aventada a hipótese de realizar a dosagem de metahemoglobina no material e métodos. Quanto ao estudo da afinidade ao oxigênio e gás carbônico, foram realizadas tentativas de mensurações seriadas de PO_2, PCO_2, pH e SO_2 das hemácias estocadas e borbulhadas com diferentes concentração de gases (O_2 a 100%, O_2/N_2

50%, CO_2/N_2 50% e CO_2 100%), conforme realizado em estudos anteriores em parceira com a Faculdade de Farmácia da USP. Entretanto, como houve sequenciais paralizações do aparelho de hemogasometria, foi optado não prosseguir com esta parte do estudo.

Em relação ao número reduzido de bolsas analisadas por grupo, foi realizado uma metodologia a fim de evitar variações quanto aos doadores, procurando trabalhar com a mesma raça, sob mesmo padrão de manejo e acompanhados clinicamente por mais de dois anos, fatos que associados à perda de bolsas por fatores pré e pós processamento culminaram com o numero de bolsas apresentado.

9 CONCLUSÕES

A solução preservativa CPD/SAG-M não ofereceu melhor meio para estocagem de CH canino quando comparado ao CPDA-1 no que tange a porcentagem de hemólise. Contudo, observou-se que a manutenção de uma taxa de hemólise menor de 1% nas bolsas com CPDA-1 até a quinta semana (35 dias), sinaliza que futuramente o período de estocagem que varia de 21 a 28 dias descrito na literatura pode ser estendido.

A redução de leucócitos (leucorredução) ofereceu efeito protetivo da estrutura eritrocitária de CH canino em estocagem, independente do anticoagulante utilizado, observado pela menor concentração de potássio com 35 dias de estocagem (quinta semana).

A leucorredução exerceu um impacto positivo na concentração de oxigênio mensurado pela PO_2 e SO_2, indicando melhor função da hemoglobina, independente do anticoagulante utilizado.

REFERÊNCIAS

ANTONELOU, M. H.; TZOUNAKAS, V. L.; VELENTZAS, A. D.; STAMOULIS, KONSTANTINOS; KRIEBARDIS, ANASTASIOS G.; PAPASSIDERI, ISSIDORA S. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling : A time-course evaluation from shape to proteome. **Journal of Proteomics**, v. 76, p. 220–238, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.06.032>. Acesso em 29 jan 2015.

BERTOLETTI, B.; RAISER, A. G. **Peroxidação lipídica e parâmetros bioquímicos do sangue total felino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD / SAG-M**, 2011. Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em: http://cascavel.ufsm.br/tede/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=3840. Acesso em 29 jan 2015.

BLUMBERG, N.; HEAL, J. M.; GETTINGS, K. F.; PHIPPS, R. P.; MASEL, D.; REFAAI, M. A.; KIRKLEY, S. A.; Fialkow, L. B.. An association between decreased cardiopulmonary complications (transfusion-related acute lung injury and transfusion-associated circulatory overload) and implementation of unive. **Transfusion**, v. 50, n. 12, p. 2738–2744, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. RESOLUÇÃO - RDC N° 57 , DE 16 DE DEZEMBRO DE 2010. , 2010.

BROWNLEE, L.; WARDROP, K. J.; SELLON, R. K.; MEYERS, K. M. Use of a prestorage leukoreduction filter effectively removes leukocytes from canine whole blood while preserving red blood cell viability. **Journal of veterinary internal medicine American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 4, p. 412–417, 2000. Disponível em: < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02249.x/pdf>. Acesso em 29 jan 2015.

CALLAN, M. B.; PATEL, R. T.; RUX, A. H.; BANDYOPADHYAY, S.; SIRECI, ANTHONY N.; O'DONNELL, PATRICIA A.; RUANE, THERESE; SIKORA, TRACEY; MARRYOTT, KIMBERLY; SACHAIS, BRUCE S.; HOD, ELDAD. A transfusion of 28 day-old leukoreduced or non-leukoreduced stored red blood cells induces an inflammatory response in healthy dogs. **Vox Sanguinis**, v. 105, n. 4, p. 319–327, 2013.

CONCEIÇÃO, L. G.; FIGUEIREDO, C.; FABRIS, V. E.; FRANCO, S. R. S. V. Identification of bacterial flora and antimicrobial staphylococcal sensitivity from canine pyoderma in Brazil. **Advances in Veterinary Dermatology**, v. 3, p. 546–547, 1998.

CORSI, R.; MCMICHAEL, M. A.; SMITH, S. A.; O'BRIEN, M.; HERRING, J.; NGWENYAMA, T. R.; GALLIGAN, A.; BELOSHAPKA, A.N.; DENG, P.; SWANSON, K.Y. S. Cytokine concentration in stored canine erythrocyte concentrates. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 24, n. 3, p. 259–63, 2014. Disponível em: < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vec.12160/pdf >. Acesso em 29 jan 2015.

COSTA JUNIOR, J.; VIANA, J. A.; RIBEIRO FILHO, J. D.; FAVARATO, E. S.; MATA, L. C.; ARGÔLO NETO, N. Parâmetros bioquímicos e hemogasométricos do sangue total canino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD / SAG-M. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 2, p. 378–383, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n2/a13v38n2.pdf>. Acesso em 29 jan 2015.

DREIER, J.; STÖRMER, M.; KLEESIEK, K. Real-time polymerase chain reaction in transfusion medicine: applications for detection of bacterial contamination in blood products. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 21, n. 3, p. 237–254, 2007.

EKİZ, E. E.; ARSLAN, M.; AKYAZI, İ.; UYGUR, E. E. The effects of prestorage leukoreduction and storage duration on the in vitro quality of canine packed red blood cells. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 36, n. 6, p. 711–717, 2012.

FUJISE, H.; HIGA, K.; NAKAYAMA, T.; WADA, K; OCHIAI, H; TANABE, Y. Incidence of dogs possessing red blood cells with high K in Japan and East Asia. **The Journal of Veterinary Science**, v. 59, n. 6, p. 495–497, 1997. Disponível em: < https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/59/6/59_6_495/_pdf >. Acesso em 29 jan 2015.

GIBSON, J. G.; KEVY, S.; PENNELL, R. Citrate-phosphate-dextrose: an improved anticoagulant preservative solution for human blood. **Bibliotheca Haematologica**, v. 29, p. 758–763, 1968.

GONÇALVES, S. **Reações transfusionais após a administração de concentrado de plaquetas em cães**, 2006. Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10137/tde-23042007-164841/pt-br.php>. Acesso em 29 jan 2015.

GULLIKSSON, H.; VAN DER MEER, P. F. Storage of whole blood overnight in different blood bags preceding preparation of blood components: in vitro effects on red blood cells. **Blood Transfusion**, v. 7, n. 3, p. 210–215, 2009. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2719273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em 24 mai 2013.

HAMASAKI, N.; YAMAMOTO, M. Red blood cell function and blood storage. **Vox Sanguinis**, v. 79, p. 191–197, 2000.

HARRELL, K. Canine transfusion reactions. Part I. causes and consequences. **The Compendium**, v. 19, n. 2, p. 181-201, 1997.

HESS, J. R. An update on solutions for red cell storage. **Vox Sanguinis**, v. 91, n. 1, p. 13–19, 2006. Disponível em: < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1423-0410.2006.00778.x/pdf >. Acesso em 29 jan 2015.

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

HESS, J. R.; GREENWALT, T. G. Storage of red blood cells: new approaches. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 16, n. 4, p. 283–95, 2002.

HESS, J. R.; SPARROW, R. L.; VAN DER MEER, P. F.; ACKER, J. P.; CARDIGAN, R. A.; DEVINE, D. V. Red blood cell hemolysis during blood bank storage: using national quality management data to answer basic scientific questions. **Transfusion**, v. 49, n. 12, p. 2599–2603., 2009.

HILLYER, C. D.; JOSEPHSON, C.; BLAJCHMAN, M. A.; VOSTAL, J.V. G.; EPSTEIN, J. S.; GOODMAN, J. Bacterial contamination of blood componentes: risks, strategies, and regulation. Joint ASH and AABB Educational Session in Transfusion Medicine. **Haematology**, v. 1, p. 575–589, 2003.

HOGMAN, C. F. Preparation and preservation of red blood cells. **Vox Sanguinis**, v. 74, n. Supply 2, p. 177–178, 1998.

HOGMAN, C. F.; KNUTSON, F.; LÖÖF, H.; PAYRAT, J. M. Improved maintenance of 2,3 DPG and ATP in RBC's stored in a modified additive solution. **Transfusion**, v. 42, p. 824–829, 2002.

KISIELEWICZ, C.; SELF, I. A. Canine and feline blood transfusions: controversies and recent advances in administration practices. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 41, n. 3, p. 233–42, 2014. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vaa.12135/pdf >. Acesso em 29 jan 2015.

KURUP, P. A.; ARUN, P.; GAYATHRI, N. S.; DHANYA, C. R.; INDU, A. R. Modified formulation of CPDA for storage of whole blood, and of SAGM for storage of red blood cells, to maintain the concentration of 2,3-diphosphoglycerate. **Vox sanguinis**, v. 85, n. 4, p. 253–261, 2003. Disponível em: < http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0042-9007.2003.00366.x/pdf >. Acesso em 29 jan 2015.

LACERDA, L. A.; HLAVAC, N. R. C.; TERRA, S. R; BACK, F. P.; WARDROP, K J.; GONZ, H. D. . Effects of four additive solutions on canine leukoreduced red cell concentrate quality during storage. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 3, p. 362–370, 2014.

LAND, W. G. Transfusion-related acute lung injury: the work of DAMPs. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 3–13, 2013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3636009/pdf/tmh-0040-0003.pdf >. Acesso em 29 jan 2015.

LEAL-NOVAL, S. R.; MUNOZ-GMOEZ, M.; ARELLANO-ORDEN, V.; MARÍN-CABALLOS, A.; AMAYA-VILLAR, R.; MARÍN, A.; PUPPO-MORENO, A.; FERRÁNDIZ-MILLÓN, C.; FLORES-CORDEIRO, J.M; MURILLO-CABEZAS, F. Impact of age of transfused blood on cerebral oxygenation in male patients with severe traumatic brain injury. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 4, p. 1240–1296, 2008.

LEONART, M. S. S. **Estudos sobre a preservação de eritrócitos**, 1994. Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=169750&indexSearch=ID>. Acesso em 29 jan 2015.

LUK, C. S.; GRAY-STATCHUCK, L. A.; CEPINKAS, G.; CHIN-YEE, I. H. WBC reduction reduces storage-associated RBC adhesion to human vascular endothelial cells under conditions of continuous flow in vitro. **Transfusion**, v. 43, n. February, p. 151–156, 2003.

MANEY, J. K.; QUANDT, J. E. Anesthesia case of the month. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 241, n. 5, p. 562–5, 2012.

MCMICHAEL, M. A.; SMITH, S. A.; GALLIGAN, A.; SWANSON, K. S.; FAN, T. M. Effect of leukoreduction on transfusion-induced inflammation in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 1131–1137, 2010.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 168–178, 2007.

OWEN, J. L.; HARVEY, J. W. Hemolytic anemia in dogs and cats due to erythrocyte enzyme deficiencies. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 42, n. 1, p. 74–84, 2012. Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0195561611001665/1-s2.0-S0195561611001665-main.pdf?_tid=7f2bf25c-a7be-11e4-a6b9-00000aab0f6c&acdnat=1422539914_d3f21ff260bcc060751284137f7f9dce>. Acesso em 29 jan 2015.

PATEL, N. N.; LIN, H.; JONES, C.; WALKDEN, G.; RAY, P.; SLEENMAN, P.; P. A A.; ANGELINI, G. D.; MURPHY, G.J. . Interactions of cardiopulmonary bypass and erythrocyte transfusion in the pathogenesis of pulmonary dysfunction in swine. **Anesthesiology**, v. 119, n. 2, p. 365–378, 2013.

PATTERSON, J.; ROUSSEAU, A.; KESSLER, R. J.; GIGER, U. In vitro lysis and acute transfusion reactions with hemolysis caused by inappropriate storage of canine red blood cell products. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 4, p. 997–1003, 2011.

PIETERSZ, R. N. I. Storage of whole blood for up to 24 hours at ambient temperature before component preparation: implementation in the Netherlands. **Transfusion**, v. 51. January, p. 3S–6S, 2011, Supply 1

PURDY, F. R.; TWEEDDALE, M. G.; MERRICK, P. M. Association of mortality with age of blood transfused in septic ICU patients. **Canadian Journal of Anaesthesia = Journal Canadien d'Anesthesie**, v. 44, n. April 1997, p. 1256–1261, 1997.

RUBIN, O.; CRETTAZ, D.; CANELLINI, G.; TISSOT, J.-D.; LION, N. Microparticles in stored red blood cells: an approach using flow cytometry and proteomic tools. **Vox Sanguinis**, v. 95, n. 4, p. 288–97, 2008. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1423-0410.2008.01101.x/pdf>. Acesso em 29 jan 2015.

SOWEMIMO-COKER, S. O. Red blood cell hemolysis during processing. **Transfusion Medicine Reviewsedicine Reviews**, v. 16, n. 1, p. 46–60, 2002.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos em patologia clínica veterinária**. 2ª ed. Guanabara-Koogan, 2011.

TOMCZAK, A. C. T. Q.; GRILO, 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**, v. 32, n. 3, p. 209–214, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v32n3/aop76010.pdf >. Acesso em 29 jan 2015.

TSAI, A. G.; HOFMANN, A.; CABRALES, P.; INTAGLIETTA, M. Perfusion vs. oxygen delivery in transfusion with "fresh" and "old" red blood cells: the experimental evidence. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 43, n. 1, p. 69–78, 2010.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Fatalities reported to FDA following blood collection and transfusion**. Annual summary ofor fiscal year 2011, 12 páginas. Disponível em: , http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/UCM300764.pdf>. Acesso em 29 jan 2015.

VAMVAKAS, E. C.; CARVEN, J. H. Transfusion and postoperative pneumonia in coronary artery bypass graft surgery: effect of the length of storage of transfused red cells. **Transfusion**, v. 39, p. 701–710, 1999.

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, n. 1, p. 5–8, 1997. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1997.tb00065.x/pdf>. Acesso em 29 jan 2015.

WEISKOPF, R. B.; FEINER, J.; TOY, P.; TWIFORD, J.; SHIMABUKURO, D.; LIEBERMAN, J.; LOONEY, M. R; LOWELL, C. A.; GROPPER, M. A. Fresh and stored red blood cells transfusion equivalently induce subclinical pulmonary gas exchange defcit in normal human. **Anesthesia and Analgesia**, v. 114, p. 511–519, 2012.

ZUBAIR, A. C. Clinical impact of blood storage lesions. **American Journal of Hematology**, v. 85, n. 2, p. 117–122, 2010. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.21599/pdf>. Acesso em 29 jan 2015.