

JAIR DUARTE DA COSTA JÚNIOR

**AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS, HEMOGASOMÉTRICAS E
MORFOLÓGICAS DO SANGUE CANINO CONSERVADO
EM BOLSAS CPD/SAG-M E CPD/SAG-M ACRESCIDAS DE
FOSFATO DISSÓDICO**

Tese apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

JAIR DUARTE DA COSTA JÚNIOR

**AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS, HEMOGASOMÉTRICAS E
MORFOLÓGICAS DO SANGUE CANINO CONSERVADO
EM BOLSAS CPD/SAG-M E CPD/SAG-M ACRESCIDAS DE
FOSFATO DISSÓDICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27de maio de 2010.

Prof. José Dantas Ribeiro Filho
(Co-orientador)

Profa. Tânia Toledo de Oliveira
(Co-orientadora)

Prof. Rubens Antônio Carneiro

Profa. Izabel Regina dos Santos C.
Maldonado

Prof. Cláudio Cesar Fonseca
(Orientador)

“... Sei em quem pus minha confiança, e estou certo de que é assaz poderoso para guardar meu depósito até aquele dia.”

2 Timóteo 1, 12

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha essência e meu propósito. Dono de todas as “minhas” conquistas... Senhor, essa vitória é sua!

À minha família, Jair, Márcia e Felipe. Fonte de tanta força, mesmo em momentos tão insólitos. Amo todos vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio Cesar Fonseca, por aceitar esta difícil empreitada com tanta serenidade. Um exemplo de profissional.

Ao meu co-orientador professor José Dantas pelo apoio.

Aos amigos, Evandro Favarato, Lukiya Favarato e Napoleão Argolo Neto e tantos outros que sempre me apoiaram.

À Valquíria por todo carinho e paciência nesta fase final dos trabalhos.

Ao HEMOMINAS na pessoa do Dr. Fernando Coutinho do Hemocentro de Ponte Nova que de forma tão solícita e atenciosa nos recebeu para a centrifugação das bolsas de sangue.

À Juliana Valente, aluna incansável e dedicada que acompanhou com muito afinho e interesse os trabalhos

Aos técnicos e funcionários dos diversos laboratórios e departamentos da Universidade Federal de Viçosa que me ajudaram na tão exaustiva fase experimental do projeto.

Aos técnicos do laboratório de Patologia Clínica, Lucinda, Aécio e Luiz Márcio, pela paciência e atenção durante toda a fase experimental do projeto.

Aos professores e funcionários do setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública que tão pacientemente disponibilizaram a capela para a manipulação das amostras.

À Fresenius Kabi – Brasil pela doação das bolsas.

Aos laboratórios Roche do Brasil pelos apoios para a obtenção dos kits do 2,3-DPG.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Veterinária da UFV que direta ou indiretamente contribuíram com o estudo.

Aos animais, seres tão queridos e razão de todo esse empenho.

A Universidade Federal de Viçosa que possibilitou todo este estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMOGASOMÉTRICA DO SANGUE CANINO CONSERVADO EM BOLSAS CPD/SAG-M E CPD/SAG-M ACRESCIDAS DE FOSFATO DISSÓDICO	16
3.1 Introdução	16
3.2 Material e Métodos	18
3.2.1 Localização dos procedimentos	18
3.2.2 Coleta das Amostras	19
3.2.3 Dias das Avaliações laboratoriais	20
3.2.4 Avaliação Laboratorial	20
3.2.5 Análise Estatística	22
3.3 Resultados e Discussões	23
3.3.1 Proteína Plasmática Total	23
3.3.2 Glicose Plasmática	24
3.3.3 Potássio Plasmático	25
3.3.4 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG ou DPG)	28
3.3.5 pH	31
3.3.6 Pressão Parcial de Oxigênio (pO ₂)	33
3.3.7 Pressão Parcial de Dióxido de Carbono (pCO ₂)	34
3.3.8 Bicarbonato Plasmático (HCO ₃ ⁻)	36
3.3.9 Percentual de Hemólise (% hemólise) e Hematócrito (Ht)	37
3.3.10 Lactato	40
3.4 Conclusões	42

4 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO SANGUE CANINO CONSERVADO EM BOLSAS CPD/SAG-M E CPD/SAG-M ACRESCIDAS DE FOSFATO DISSÓDICO	43
4.1 Introdução	43
4.2 Material de Métodos	47
4.2.1 Localização dos procedimentos	47
4.2.2 Coleta das Amostras	48
4.2.3 Dias das Avaliações laboratoriais	49
4.2.4 Avaliações Laboratoriais	49
4.2.5 Análise Estatística	52
4.3 Resultados e Discussões	52
4.3.1 Potássio Plasmático.....	52
4.3.2 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG).....	54
4.3.3 pH.....	56
4.3.4 Percentual de Hemólise (% hemólise) e Hematócrito (Ht).....	57
4.3.4 Estudo Morfológico e Morfométrico	60
4.4 Conclusões	67
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das soluções aditivas (SAs) a serem acrescidos nas bolsas satélites, e determinação dos grupos de acordo com a concentração do Fosfato Dissódico (Na_2HPO_4).....	20
Tabela 2: Identificação das bolas e separação nos Grupos 1 e 2	20
Tabela 3: Valores médios e desvio padrão da proteína plasmática total	23
Tabela 4: Valores médios e desvio padrão da glicose plasmática	25
Tabela 5: Valores médios e desvio padrão do potássio plasmático	26
Tabela 6: Valores médios e desvio padrão do 2,3-difosfoglicerato.....	30
Tabela 7: Valores médios e desvio padrão do pH	32
Tabela 8: Valores médios e desvio padrão da pO_2	34
Tabela 9: Valores médios e desvio padrão da pCO_2	35
Tabela 10: Valores médios e desvio padrão do bicarbonato	37
Tabela 11: Valores médios e desvio padrão do percentual hemólise	38
Tabela 12: Valores médios e desvio padrão do hematócrito	39
Tabela 13: Valores médios e desvio padrão do lactato.....	40
Tabela 14: Composição das soluções aditivas (SAs) a serem acrescidos nas bolsas satélites, e determinação dos grupos de acordo com a concentração do Fosfato Dissódico (Na_2HPO_4)	49
Tabela 15: Identificação das bolas e separação nos Grupos 1 e 2	49
Tabela 16: Classificação das células eritrocitárias de acordo com a morfologia .	51
Tabela 17: Valores médios e desvio padrão do potássio plasmático	53
Tabela 18: Valores médios e desvio padrão do 2,3-difosfoglicerato.....	56
Tabela 19: Valores médios e desvio padrão do pH	57
Tabela 20: Valores médios e desvio padrão do percentual hemólise	59
Tabela 21: Valores médios e desvio padrão do hematócrito	59
Tabela 22: Valores médios e desvio padrão das variáveis morfológicas	62
Tabela 23: Correlação entre as variáveis morfológicas e bioquímicas no G1	65
Tabela 24: Correlação entre as variáveis morfológicas e bioquímicas no G2.....	65
Tabela 25: Valores médios e desvio padrão do diâmetro (μm) dos eritrócitos nas diferentes classificações morfológicas no G1 e G2	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via glicolítica (via de Embden-Meyerhof) e desvio de Rapoport-Leubering.....	9
Figura 2: Representação dos valores médios da proteína total.....	24
Figura 3: Representação dos valores médios da glicose plasmática	25
Figura 4: Representação dos valores médios do potássio plasmático	27
Figura 5: Representação da comparação do potássio em função do pH	27
Figura 6: Representação dos valores médios do 2,3-difosfoglicerato.	30
Figura 7: Representação da comparação do 2,3-difosfoglicerato em função do pH.....	31
Figura 8: Representação dos valores médios do pH.....	33
Figura 9: Representação dos valores médios da pO ₂	34
Figura 10: Representação dos valores médios da pCO ₂	36
Figura 11: Representação dos valores médios do bicarbonato.....	37
Figura 12: Representação dos valores médios do percentual de hemólise.....	39
Figura 13: Representação dos valores médios do hematócrito.....	39
Figura 14: Representação dos valores médios do lactato	41
Figura 15: Representação da comparação do lactato em função do pH.....	41
Figura 16: Representação dos valores médios do potássio plasmático	53
Figura 17: Representação da comparação do potássio em função do pH	54
Figura 18: Representação dos valores médios do 2,3-difosfoglicerato	56
Figura 19: Representação dos valores médios do pH.....	57
Figura 20: Representação dos valores médios do percentual de hemólise.....	59
Figura 21: Representação dos valores médios do hematócrito.....	60
Figura 22: Formação eritrocitária do sangue armazenado nas bolsas do G1 e G2 em diferentes momentos da conservação.....	61
Figura 23: Comparação entre o primeiro e último dia de conservação do sangue nos grupos G1 e G2.....	63
Figura 24: Comparação morfológica dos eritrócitos do G2 entre o primeiro e 60º dia do estudo	66

RESUMO

COSTA JÚNIOR., Jair Duarte da, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Maio de 2010. **Avaliações bioquímicas, hemogasométricas e morfológicas do sangue canino conservado em bolsas CPD/SAG-M e CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico** Orientador: Cláudio Cesar Fonseca. Co-orientadores: José Dantas Ribeiro Filho e Tânia Toledo de Oliveira.

Há muitas décadas estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de melhorar os parâmetros bioquímicos e hemogasométricos dos eritrócitos armazenados em bolsas de transfusão sanguínea. Embora ainda existam indicações para o uso do sangue total, atualmente as bolsas são centrifugadas e separando-se os hemoderivados para a obtenção principalmente do concentrado de eritrócitos (CE) e plasma. A viabilidade do CE conservado sob refrigeração está na dependência de diversos fatores dentre eles o anticoagulante e a solução conservadora adicionada ao CE. Estudos têm demonstrado que a adição do Fosfato Dissódico (FD) melhor conserva o pH, mantendo este em níveis mais elevados o que age diretamente na manutenção do Trifosfato de Adenosina (ATP), componente envolvido na preservação da membrana plasmática e consequente manutenção do formato normal da célula, e do 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG), substância responsável pela liberação do oxigênio aos tecidos pela hemoglobina. Foi Metodologia: Neste estudo foram observadas as alterações bioquímicas e hemogasométricas do CE conservado em bolsas CPD/SAG-M e CPD/SAG-M acrescidas do FD. As bolsas foram avaliadas por 60 dias. Resultados e Discussão: observado que as médias do potássio plasmático apresentaram menor crescimento no grupo tratado com o FD em comparação ao não tratado, inclusive demonstrando correlação inversamente proporcional ao comportamento do pH para o qual se observou médias sempre superiores no grupo acrescido do FD. Desta forma é possível constatar o melhor desempenho das bolsas acrescidas do FD na manutenção da membrana plasmática. Este dado é confirmado pelo menor percentual de hemólise sofrido pelo CE conservado nas bolsas contendo o FD ao longo de todo o estudo. Os níveis constantemente superiores do pH para as bolsas acrescidas do FD denotam maior taxa de recuperação do 2,3-DPG, que demonstrou médias superiores no grupo tratado com o FD. Entretanto, no primeiro dia de conservação as médias do 2,3-DPG estavam em zero, alcançando valores máximos ao 10º dia de conservação,

demonstrando a capacidade de produção do 2,3-DPG dos eritrócitos caninos mesmo durante o processo de conservação. Os eritrócitos conservados com o FD apresentaram menores alterações morfológicas em comparação ao grupo não tratado, inclusive demonstrando correlação significativa com as variáveis potássio e 2,3-DPG, permitindo presumir os valores médios destas variáveis bioquímicas a partir da avaliação morfológica dos eritrócitos armazenados. Os eritrócitos de ambos os grupos apresentaram aumento do diâmetro médio já no primeiro dia do estudo, inclusive com médias superiores às encontradas nas células *in vivo*. A partir de então passou a apresentar redução do diâmetro médio. É possível concluir que o acréscimo do FD às bolsas CPD/SAG-M aperfeiçoam a conservação dos eritrócitos em período máximo de até 60 dias de armazenamento.

ABSTRACT

COSTA JÚNIOR., Jair Duarte da, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, May 2010. **Biochemical, hemogasometric and morphological assessments of canine blood stored in bags CPD/SAG-M and CPD/SAG-M increased of disodium phosphate.** Advisor: Cláudio Cesar Fonseca. Co-advisors: José Dantas Ribeiro Filho and Tânia Toledo de Oliveira.

For many decades, studies have been developed in order to improve the biochemical and hemogasometric parameters of erythrocytes stored in bags of blood transfusion. Although there are still indications for the use of total blood, nowadays the bags are centrifuged and the blood components are separated to obtain the erythrocytes concentrations (EC) and plasma. The viability of EC preserved by refrigeration is dependent on several factors. Among them the anticoagulant and the preservative solution added to the EC. Studies have shown that the addition of disodium phosphate (DP) preserves the pH in the best way, keeping it at higher levels which acts directly on the maintenance of adenosine triphosphate (ATP), a component involved in the preservation of the plasma membrane and thereby maintaining the normal shape of the cell and 2,3-DPG (2,3-DPG), a substance responsible for the release of oxygen to the tissues by hemoglobin. Methodology: In this study it was observed the biochemical and blood gas EC stored in CPD/SAG-M bags and CPD/SAG-M's added from DP. The bags were evaluated for 60 days. Results and Discussion: It was observed that the mediums of plasma potassium showed lower growth in the group treated with DP compared to the untreated group, even showing inversely proportional correlation to the behavior of pH in which it was observed averages always higher in the group added with the DP. Thus the best performance of the bags increased with DP in the maintenance of plasma membrane can be noticed. This finding is confirmed by a lower percentage of hemolysis suffered by the EC retained the bags containing the DP throughout the entire study. The consistently higher pH levels for the bags added with the DP show a higher rate of 2,3-DPG recovery, which showed higher average in the group treated with the DP. However, in the first day of the storage, the averages of 2,3-DPG were at zero, reaching maximum values at the 10th day of storage, demonstrating the capacity of producing 2,3-DPG in the canine erythrocytes even during the conservation process. The red cells preserved with DP showed lower morphological changes

compared to the untreated group, also demonstrating a significant correlation with the potassium and 2,3-DPG variables, allowing to assume the average values of these biochemical variables from the morphological evaluation of stored erythrocytes. The erythrocytes of both groups showed an increase of the average diameter in the first day of the study, also with higher averages than those found in in vivo cells. From then it began to show reduction of the average diameter. It was concluded that the addition of DP to the CPD/SAG-M bags enhanced the preservation of erythrocyte up to the maximum period of 60 days of storage.

1. INTRODUÇÃO

Desde o desenvolvimento das técnicas de conservação e de administração dos componentes sanguíneos em humanos já a partir de 1950, a terapia transfusional tem se mostrado componente chave na recuperação de pacientes com déficit de oxigenação, hemorragia maciça, anemia aguda ou carência de alguns dos componentes da coagulação (LION, 2009, HESS, 2009).

Com o conhecimento das formas de separação dos hemoderivados, a terapia com sangue total deixou de ser a melhor escolha para dar lugar ao uso dos hemocomponentes, particularmente o concentrado de eritrócitos (CE). Com estes procedimentos pode-se contemplar mais de um indivíduo a partir da mesma unidade, onde pacientes com distúrbios de coagulação ou falhas na oxigenação receberão apenas os hemoderivados necessários ao seu tratamento (CHIARAMONTE, 2004).

Com a coleta e centrifugação, o CE é separado do plasma e ressuspendido em soluções que preservem as células com todos os seus componentes. A estes compostos dá-se o nome de soluções aditivas (SA). A estocagem nestas soluções objetiva manter a viabilidade e função de cada constituinte sanguíneo, prevenir alterações físicas prejudiciais aos eritrócitos, manter a morfologia e consequente capacidade de transitar pelos vasos capilares e carrear oxigênio aos tecidos (AUTHEMENT et al., 1987).

A viabilidade do sangue armazenado está na dependência do anticoagulante, da temperatura de conservação, dos parâmetros bioquímicos, hemogasométricos e, inclusive, da frequência de homogeneização durante o armazenamento, além da técnica de coleta (WILLER & RIEDESEL, 1985; AUTHEMENT et al., 1987; LOPES et al., 1995; HÖGMAN et al, 2002). Ao conjunto de alterações metabólicas e morfológicas sofridas pelas células durante o processo de conservação dá-se o nome de lesões de conservação (LC), e é hoje o foco dos estudos que visam o perfeito armazenamento do sangue em bolsas de transfusão (HESS e BEYER, 2007).

No mercado atual existe uma série de SAs, dentre as quais no meio veterinário as mais utilizadas são à base de soluções contendo citrato, fosfato, dextrose e adenina (CPDA-1), que promovem a conservação do sangue canino por até 35 dias sob refrigeração (WARDROP, 1997). No entanto, estudos *in vitro*

têm demonstrado que a conservação do sangue canino em soluções contendo citrato, fosfato e dextrose em solução salina de glicose, adenina e manitol (CPD/SAG-M) conservam melhor as características de transporte de oxigênio e manutenção da membrana plasmática dos eritrócitos de cães por até 41 dias sob refrigeração (COSTA JUNIOR et al., 2008). Estas características também foram encontradas em sangue humano conservado sob os mesmos parâmetros (LION et al., 2009).

Com o envelhecimento dos eritrócitos durante a conservação, ocorre diminuição dos níveis intracitoplasmáticos do 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e da trifosfato de adenosina (ATP). A capacidade do sangue de liberar oxigênio está relacionada ao 2,3-DPG contido na hemácia de humanos e de cães (BUNN, 1971). O decréscimo do 2,3-DPG é acompanhado pelo aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Conseqüentemente, irá ocorrer uma menor oferta deste gás para os tecidos. O principal fator envolvido na redução dos níveis do 2,3-DPG é a queda do pH que ocorre durante o armazenamento. Esta redução do pH está intimamente relacionada com a temperatura, pois nestas condições haverá redução da produção de metabólitos na forma de sais pela célula com melhor manutenção dos níveis do 2,3-DPG (HESS et al., 2002).

O ATP é um nucleotídeo presente na célula. Este é necessário no controle do balanço eletrolítico pela bomba de sódio e potássio, na manutenção da forma celular e além de possuir particular importância na disponibilização de energia (SCOTT et al., 2005). Com a depleção nos seus níveis, ocorrerão alterações como perda do formato normal e aumento da fragilidade da membrana, ocasionando maior grau de hemólise, tanto durante a conservação como após a sua administração no paciente (EISENBRANT e SMITH, 1973; GUYTON e HALL, 1997; HÖGMAN et al., 2002; KURUP et al., 2003).

Segundo diversos trabalhos na área humana, a otimização dos níveis do pH durante o processo de conservação é crucial na manutenção das características eritrocitárias. O fosfato dissódico (FD) acrescido às SAs tem demonstrado bons resultados, especialmente no que se refere à conservação do 2,3-DPG e a manutenção do ATP (HESS et al., 2002; BREMNER et al., 2002; HOLME, 2005).

Com a redução do pH, ocorrerão alterações que culminarão com a redução da glicólise, e conseqüente diminuição da produção de ATP, além de

danos oxidativos que lesarão diretamente a membrana eritrocitária promovendo formação de esferoequinócitos e posteriormente hemólise. Embora estes defeitos sejam reversíveis após a transfusão no paciente, os níveis do ATP e principalmente do 2,3-DPG, serão totalmente recuperados somente 6 a 24 horas após transfusão. Este período adicional de espera é contraindicado em pacientes críticos (HESS, 2009).

Estudos realizados por Kock et al. (2008) concluíram que pacientes humanos submetidos à cirurgias cardiovasculares e que receberam sangue conservado há 20 dias, apresentaram maiores índices de reações pós-transfusão e menores taxas de sobrevivência após a cirurgia.

Tendo em vista as dificuldades em manter os estoques de um banco de sangue veterinário e os raros estudos direcionados à conservação do sangue canino, é imperativo o desenvolvimento de novas técnicas de preservação do sangue de cães sem comprometer a manutenção de seus parâmetros bioquímicos e morfológicos. Além de prolongar o tempo de conservação, é necessária a preservação dos componentes eritrocitários a fim de oferecer um hemoderivado que exerça prontamente a sua função orgânica mantendo a conformação celular, carreando oxigênio aos tecidos e com o mínimo de reação pós-transfusão.

Este estudo propõe o controle dos níveis do pH pela adição do FD às soluções aditivas do sangue canino centrifugado a fim de corrigir os déficits metabólicos otimizando a regeneração do 2,3-DPG e melhorando os níveis de ATP, afim de preservar as características funcionais dos eritrócitos, bem como manter as suas condições morfológicas possibilitando o oferecimento de um material prontamente funcional ao organismo do receptor minimizando os riscos das complicações pós-transfusão sanguínea. Desta forma objetiva-se a observação do comportamento das variáveis bioquímicas, hemogasométricas e morfológicas do concentrado de eritrócitos conservado sob refrigeração em bolsas contendo citrato, fosfato, dextrose em solução salina de adenina, glicose e manitol acrescidas do fosfato dissódico, bem como traçar uma relação entre as variáveis bioquímicas e morfológicas de tal forma a se estimar os valores bioquímicos pelo estudo morfológico dos eritrócitos conservados.

É possível extrapolar os dados obtidos na conservação do sangue canino para melhorias no estudo da conservação do sangue humano devido às semelhanças das tecnologias de armazenamento sanguíneo observadas na

medicina humana e medicina veterinária. Com isto, aperfeiçoar os protocolos de conservação dos bancos de sangue humano e veterinário.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Transfusão é a introdução de sangue total ou de componentes sanguíneos na corrente circulatória de um receptor (FRIEL, 1981). Considerada componente chave na moderna terapia intensiva, a hemoterapia dá suporte às mais diversas situações clínicas que necessitem da reposição de componentes hematológicos e da melhoria no transporte de oxigênio aos tecidos (HESS, 2009).

A transfusão de sangue é uma forma de transplantação (NUSBACHER, 1994) ou, segundo Brooks (1992), é um transplante tecidual temporário. O sangue, com todos os seus componentes, é transferido de um doador para um receptor para corrigir uma deficiência ou uma disfunção (KRISTENSEN e FELDMAN, 1995). A transfusão de sangue pode ser útil em várias doenças hematológicas, inclusive na perda aguda de sangue (LUBAS, 1996).

O valor terapêutico da transfusão sanguínea para várias enfermidades é amplamente reconhecido. De fato, transfusões sanguíneas têm a mesma importância dos agentes antimicrobianos, técnicas cirúrgicas, oxigenioterapia, anestesia e outros, como um grande fator na redução da mortalidade dos animais domésticos (THORNTON, 1968).

A administração de sangue total tem sido a terapia básica na clínica médica de pequenos animais. Ela restaura e mantém níveis fisiológicos da volemia, corrigindo a oferta de oxigênio aos tecidos e, em determinadas situações, restaura a hemostasia (PISCIOTTO, 1989; MORAIS et al., 2003). Para Kristensen e Feldman (1997) a principal indicação do tratamento com sangue total é para aqueles pacientes que tenham perdido grande quantidade de sangue e que tiveram a sua volemia reduzida em 25%. Desta forma, é empregada em caráter de emergência, como medida para manter a vida do paciente. Os cães com perda aguda de 30 a 40% do volume sanguíneo poderão exibir sinais de choque hipovolêmico como taquicardia, hipotensão, tempo de enchimento capilar aumentado e hipóxia tecidual (FELDMAN, 1981).

O uso dos componentes sanguíneos separadamente, entretanto, já possui seus conceitos e técnicas bem conhecidos na medicina veterinária. Suas indicações vão desde a resolução de processos anêmicos, anestesia, restabelecimento do transporte de oxigênio em pacientes cardiopatas além de

reposição de componentes da coagulação (CHIARAMONTE, 2004; LUCAS, 2004; MORAIS et al., 2003).

Um estudo retrospectivo a respeito do uso de plasma fresco congelado em cães detectou múltiplas indicações para sua administração, inclusive na reposição dos fatores de coagulação, α_2 -macroglobulina, imunoglobulina e da albumina, embora neste último caso exista a recomendação de que não se deve utilizar plasma fresco congelado como fonte desta proteína na expansão plasmática ou no suporte nutricional, pois cálculos sugerem que seriam necessários 45 ml de plasma/kg para elevar em apenas 1g/dl a concentração de albumina plasmática (HOHENHAUS, 2007).

O sangue ou seus componentes podem ser usados logo após a coleta ou conservados entre 1 e 6°C, sendo que as plaquetas, em sangue total, não sobrevivem à refrigeração, tornando-se inviáveis 6 horas após a coleta (CHIARAMONTE, 2004). Quando o sangue que foi conservado é transfundido, supõe-se que os eritrócitos estejam viáveis, ou seja, sem alterações funcionais, morfológicas e bioquímicas (OU et al., 1975). Com isto, espera-se que os eritrócitos desempenhem adequadamente as suas funções (EISENBRANDT e SMITH, 1973).

A coleta em soluções anticoagulantes objetiva manter a viabilidade e função de cada constituinte sangüíneo; prevenir alterações físicas prejudiciais aos seus componentes e evitar a proliferação bacteriana (AUTHEMENT et al., 1987). A viabilidade do sangue estocado está na dependência do anticoagulante, da temperatura de conservação, dos parâmetros bioquímicos e, inclusive, da frequência de homogeneização durante o armazenamento, além da técnica de coleta (WILLER e RIEDESEL, 1985; AUTHEMENT et al., 1987; LOPES et al., 1995; HÖGMAN et al., 2002).

O primeiro relato da tentativa de conservar o sangue *in vitro* data de 1915, quando Rous e Turner conseguiram preservar as células vermelhas do sangue humano por um período de quatro semanas utilizando uma solução anticoagulante contendo citrato e glicose. Porém, esta solução não passou pelo processo de esterilização, pois este causava a aglutinação dos carboidratos contidos na solução após a autoclavagem, inviabilizando seu uso para a conservação do sangue. Somente em 1943, Louit e colaboradores, adicionando ácido cítrico ao composto de citrato e dextrose (ACD) contido nos frascos de

vidro, reduziram o pH da solução permitindo a autoclavagem da solução sem danos estruturais aos carboidratos, possibilitando o seu uso na preservação do sangue por 3 semanas com hemólise mínima.

Posteriormente foi acrescida uma solução de fosfato para equilibrar o pH, e solução de adenina na tentativa de fornecer substrato para a renovação do trifosfato de adenosina (ATP). Somente na década de 1960, entretanto houve substituição dos frascos de vidro pelas bolsas de plástico e aprimoramento dos compostos anticoagulantes chegando à solução de citrato, fosfato, dextrose e adenina (CPDA-1) (HESS e BEYER, 2007). Atualmente este é o composto mais utilizado para a coleta e conservação de sangue canino nos bancos de sangue veterinários (FELDMAN e SINK, 2007).

Subseqüentemente, na área médica, muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de desenvolver meios para manter a integridade e a capacidade funcional do sangue estocado por longos períodos. As soluções aditivas (SAs) são compostos que devem ser adicionados ao sangue total ou após a centrifugação e remoção do plasma. As SAs evitam perda de nutrientes e permitem extensão do tempo de conservação dos componentes celulares (HOLME, 2005).

Na tentativa de desenvolver melhores meios de conservação do concentrado de eritrócitos (CE), foi desenvolvido o sistema triplo, onde a bolsa que receberá o sangue total está presente o citrato, como anticoagulante, fosfato e dextrose para controle do pH e energia respectivamente (CPD). Posteriormente a bolsa contendo o sangue total coletado é centrifugada obtendo-se o concentrado de eritrócitos o qual será transferido à bolsa secundária contendo a solução aditiva de glicose, adenina e manitol em solução salina. O citrato, além do efeito anticoagulante e de ser facilmente metabolizado no organismo do receptor, serve como um estabilizador da membrana eritrocitária, efeito semelhante ao desempenhado pelo manitol. O fosfato serve principalmente para o controle do pH e de outros compostos intracelulares e a adenina fornece substrato para a fabricação de novo ATP (HESS e BEYER, 2007). Esta formulação é denominada CPD/SAG-M na Europa, enquanto que nos Estados Unidos recebe as denominações de AS-1 a AS-5, dependendo da proporção de cada componente (HESS, 2009).

O sangue humano pode ser conservado por até 35 dias em bolsas CPDA-1 (CHIN-YEE et al., 1997). Em adição Hess e Beyer (2007), afirmaram que, a depender da SA acrescida ao sangue de humanos, este pode ser conservado por até 49 dias.

Wardrop et al. (1994), relataram que o sangue canino armazenado em bolsas CPDA-1, pode ser conservado sob refrigeração por um período de até 35 dias. Em estudo comparativo, foi observado melhor desempenho das bolsas CPD/SAG-M em relação às bolsas CPDA-1 na conservação do sangue total de cães, mantido refrigerado por até 41 dias (COSTA JUNIOR et al., 2008).

Adicionalmente à criação de novas SAs, houve o desenvolvimento de novos recipientes onde o sangue é armazenado. Atualmente o sangue é depositado em bolsas plásticas constituídas por cloreto de polivinil (PVC) recobertas com o plástico 2-diethylhexyl phthalate (DEHP) para evitar a hemólise pelo contato direto dos eritrócitos com o PVC. Este sistema, conhecido como PL 146, tem demonstrado ser efetivo na redução da hemólise e nas perdas dos componentes citoplasmáticos pela membrana durante a estocagem (HESS e GREENWALT, 2002; SCOTT et al., 2005). Além disto, o sistema possui propriedades especiais de permeabilidade ao dióxido de carbono (CO₂). Durante armazenamento do sangue, a glicose consumida para produzir ATP gera uma série de metabólitos, dentre eles o lactato e prótons (Figura 1). Pela presença da anidrase carbônica (AC) dos eritrócitos, os ácidos produzidos pelas reações celulares são convertidos em água e CO₂. Este gás difunde-se para fora da bolsa prevenindo a reversão da reação (HESS e GREENWALT, 2002). Segundo Högman et al. (2002), o plástico das bolsas é permeável apenas ao CO₂, sendo pouco atravessado por outros gases o que torna-se benéfico às células sanguíneas pois, segundo Lion et al. (2009), o excesso de oxigênio intracelular gera estresse oxidativo altamente danoso ao citoesqueleto celular, afetando diretamente a flexibilidade do eritrócito.

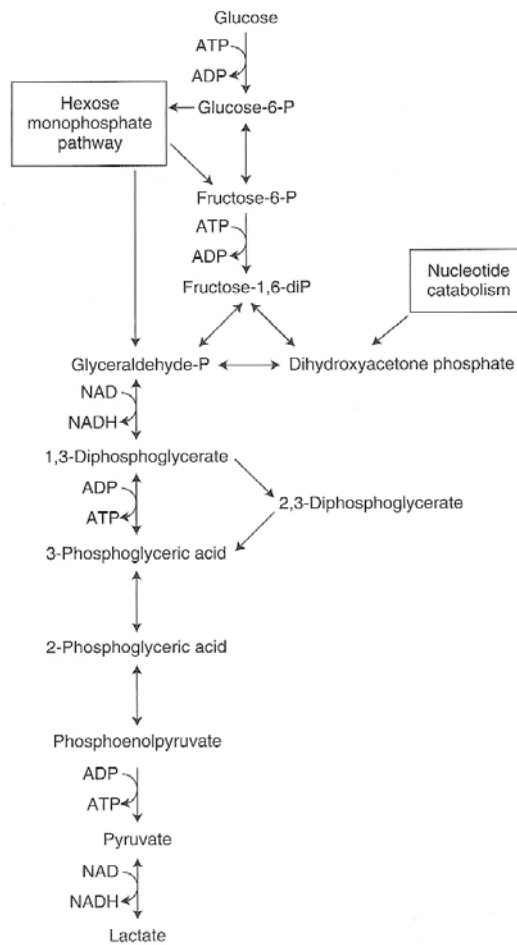


Figura 1: Via glicolítica (via de Embden-Meyerhof) e desvio de Rapoport-Leubering. Este último responsável pela produção do 2,3-DPG (Adaptado de HESS e BEYER, 2007).

A viabilidade dos eritrócitos é fator limitante, influenciada pelo processo de conservação do sangue e de uma variedade de alterações físicas e bioquímicas ocorridas no interior da bolsa, o qual são denominadas lesões da conservação (LC) do sangue ou lesões de armazenamento. Estas LCs incluem redução do 2,3-DPG, que aumentará a afinidade ao oxigênio pela hemoglobina, do ATP, culminando na mudança no formato celular passando de eritrócitos bicôncavos à esferoequinócitos, perda da integridade da membrana por rearranjo dos carboidratos e/ou injúrias oxidativas da membrana lipídica, que aumentará a aderência eritrocitária ao endotélio vascular após a transfusão. Todas estas características afetam a viabilidade e função dos eritrócitos, contribuindo para a diminuição do tempo de sobrevivência após a transfusão (WARDROP et al., 1994; HESS, 2009).

A capacidade do sangue em liberar oxigênio está relacionada ao 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) contido na hemácia de humanos e cães (BUNN,

1971) e produzido pelo desvio Rapoport-Leubering da via glicolítica (Figura 1) (HESS e BEYER, 2007). O decréscimo do 2,3-DPG é acompanhado pelo aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Conseqüentemente, irá ocorrer menor oferta de oxigênio para os tecidos. O principal fator envolvido na redução dos níveis do 2,3-DPG é a queda do pH que ocorre durante o processo de armazenamento do sangue (HÖGMAN et al., 2002; KURUP et al., 2003) e pelo aumento na taxa de degradação do 2,3-DPG no interior das células (CHO et al., 2008). Este processo é minimizado com o aumento dos níveis do fosfato intracelular (Pi), pois existe forte relação entre o Pi e o 2,3-DPG onde o Pi aumentaria a concentração de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma vez que o Pi eleva a concentração do 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG), considerado o precursor do 2,3-DPG (BREMNER, 2002). Em contrapartida, concentrações menores de Pi ou aumento nos níveis de prótons (íons H⁺) oriundos do metabolismo das células armazenadas inibem a produção do 2,3-DPG (HESS e BEYER, 2007), inclusive por bloquearem a via Rapoport-Leubering (Figura 1), através da qual é produzido o 2,3-DPG (HESS e BEYER, 2007).

Em estudos com sangue humano, Hess et al. (2002) observaram que a adição de fosfato dissódico (FD) às SAs propicia melhor manutenção do pH se comparado ao fosfato monossódico (FM), potencializando a conservação de diferentes compostos intracelulares, reduzindo os danos sofridos pelos eritrócitos e permitindo ampliação do período de conservação do sangue armazenado. Os compostos contendo FD já possuem permissão para uso em soluções conservadoras para bancos de sangue nos Estados Unidos e Europa (HESS et al, 2000).

Com o decréscimo do pH durante a estocagem do sangue causado pelo aumento das concentrações do ácido láctico e acúmulo de CO₂ (HOLME, 2005), associado a natural redução da glicólise pelas baixas temperaturas, ocorrerá falha na manutenção do ATP. Com isto existe menor disponibilidade de energia para a reciclagem do 2,3-DPG (LION et al., 2009). Além disto, Cho et al. (2008) demonstraram que, embora o mecanismo ainda não tenha sido esclarecido, a 2,3-DPG fosfatase, a enzima responsável pela degradação do 2,3-DPG, continua ativa em baixas temperaturas, sendo uma das causas da redução deste

componente no interior das bolsas durante o processo de armazenamento do sangue.

Em humanos, o pH de 7,35 é tido como ótimo para a produção do 2,3-DPG no organismo (KURUP et al., 2003; HESS e BEYER, 2007). Hess e Greenwalt (2002) afirmaram que o pH de 6,2 representa o limite mínimo em que a célula continua a metabolizar o 2,3-DPG no sangue estocado. Segundo D'Almeida et al. (2000), em estudos realizados com sangue humano e de ratos, os níveis do 2,3-DPG declinam cerca de 17% e 18% respectivamente, já na primeira semana de armazenamento em bolsas CPDA-1. Em um estudo comparativo de conservação de sangue canino em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M, entretanto, observou-se que, a despeito do pH inferior a 7, houve produção do 2,3-DPG ao fim de sete dias de armazenamento, decaindo seus níveis a partir deste período (COSTA JUNIOR et al., 2008).

Após serem infundidos no paciente, os eritrócitos que foram mantidos em soluções conservadoras têm a capacidade de retornar a síntese do 2,3-DPG. Esta recuperação acontece em até 50% entre a primeira e a quinta hora após a transfusão (SCOTT et al., 2005; LION et al., 2009). Entretanto, para que haja recuperação total dos níveis do 2,3-DPG, são necessárias 24 a 48 horas após a infusão sangüínea no receptor (LION et al., 2009). Por isso, o uso de sangue armazenado por muito tempo em pacientes críticos deve ser repensado, pois este material não transportará adequadamente oxigênio para os tecidos, sendo necessárias múltiplas transfusões (WARDROP et al., 1994; SCOTT et al., 2005). Além disto, segundo Kristensen e Feldman (1997), em pacientes enfermos o tempo de recuperação do 2,3-DPG é superior ao período mencionado de 24 a 48 horas.

Lion et al. (2009), relataram que pacientes humanos que receberam concentrado de eritrócitos com baixos níveis de 2,3-DPG, ATP e maiores índices percentuais de hemólise, apresentaram menor taxa de sobrevivência ou maiores reações pós-transfusão.

Para Althement e colaboradores (1986), o sangue canino pode ser armazenado por até 35 dias em bolsas CPDA-1 e até 21 dias em bolsas contendo ácido cítrico, citrato e dextrose (ACD). Esta informação não é totalmente confirmada por Wardrop e colaboradores (1994), quando explicaram que após o período de 21 dias, os níveis do 2,3-DPG reduzem. Mesmo sendo as células

capazes de renovar o 2,3-DPG após transfusão no paciente, este processo levaria em torno de 24 horas, o que impossibilita seu uso em pacientes críticos que necessitam de imediata melhora na taxa de oxigenação. Por esta razão, Kristensen e Feldman (1997) recomendaram o uso de sangue canino armazenado por até 14 a 21 dias ou sangue fresco.

O trifosfato de adenosina (ATP) é um nucleotídeo presente na célula. Este é necessário no controle do balanço eletrolítico pela bomba de sódio e potássio, na manutenção da forma celular e além de possuir particular importância na disponibilização de energia (SCOTT et al., 2005). Com a depleção nos seus níveis, ocorrerão alterações como perda do formato normal e aumento da fragilidade da membrana, ocasionando maior grau de hemólise, tanto durante a conservação como após a sua administração no paciente (EISENBRANT e SMITH, 1973; GUYTON e HALL, 1997; HÖGMAN et al., 2002; KURUP et al., 2003).

Considera-se que a integração pH e ATP está intimamente relacionada com a manutenção do 2,3-DPG, pois a célula necessita de energia para a manutenção dos seus níveis normais, de tal forma que existe um consumo basal para a manutenção do 2,3-DPG (SCOTT et al., 2005). Entretanto, com a redução do pH causado pela produção de ácido láctico e CO_2 , haverá redução da glicólise e consequente diminuição da produção de ATP, particularmente pela inativação das enzimas hexoquinase e a fosfofrutoquinase, substâncias que participam da via glicolítica e que geram energia na forma de ATP (HÖGMAN et al., 2002; HOLME, 2005). Além disto, a própria redução do pH leva ao bloqueio da via Rapoport-Leubering, responsável pela produção do 2,3-DPG (HESS e BEYER, 2007).

Concentrações excessivas de CO_2 devem ser controladas, pois este gás compete com o 2,3-DPG pelo sítio de ligação na hemoglobina. Quando o 2,3-DPG não está ligado a esta proteína, fica sujeito à degradação (HÖGMAN et al., 2002).

A avaliação do lactato, normalmente produzido em condições de hipóxia, também é relevante referência para a observação da taxa de glicólise. Esse fenômeno promove redução do pH, consequentemente reduzindo a capacidade de regeneração do 2,3-DPG (HESS et al., 2002).

O potássio é um íon presente principalmente no líquido intracelular (FIC). No organismo, apenas 2% do potássio orgânico está presente no líquido extracelular (FEC). Já o sódio apresenta maiores concentrações no FEC. Este equilíbrio é mantido principalmente pela “bomba de sódio-potássio” da membrana plasmática que é diretamente afetada pela redução do pH, levando a migração do potássio contido no FIC para o FEC (MEYER et al., 1995; BUSH, 2004). Em baixas temperaturas a bomba de sódio e potássio apresenta considerável redução na sua função levando ao decréscimo dos níveis citosólicos de potássio enquanto aumenta o influxo de sódio, o que em humanos leva a um crescimento nas taxas do potássio extracelular de 1 mEq/l/dia (LION et al., 2009). Entretanto, Kerr (2003) e Korte e Verhoeven (2004), afirmaram que em cães os níveis intracelulares do potássio são menores quando comparado com outras espécies. Por isso, Costa Junior et al. (2008) não encontraram valores do potássio plasmático superiores a duas vezes aos níveis iniciais no fim de 41 dias de conservação do sangue total canino conservado em bolsas CPD/SAG-M. Isto representa que o sangue canino armazenado possui menores índices eritrocitários de potássio quando comparado à outras espécies, representando um produto menos danoso ao organismo, especialmente sob o ponto de vista eletrolítico.

Após a transfusão do sangue no paciente humano, as células são capazes de restaurar o gradiente de concentração dos íons potássio e sódio (KORTE e VERHOEVEN, 2004), embora Lion et al. (2009) tenham afirmado que as alterações na membrana celular de humanos são melhor revertidas se o concentrado de eritrócitos não ultrapassar 14 dias de conservação.

Um eritrócito canino normal, que possui diâmetro médio de 7µm, exerce a função básica de transporte de oxigênio aos tecidos. Para tal é necessário manutenção ideal das características de forma e flexibilidade da célula. Isto influi na preservação das proteínas de membrana e do citoesqueleto (THRALL, 2007).

A mais notável alteração morfológica percebida nos eritrócitos armazenados é a formação de esferócitos e equinócitos já nos primeiros momentos do processo de conservação do sangue (HESS e GREENWALT, 2002). Como muitas células apresentam ambas as características, estas podem ser denominadas de esferoequinócitos. Em muitos casos, estas alterações são reversíveis apenas com a ressuspensão destas células em plasma fresco, com concomitante recuperação do ATP e do 2,3-DPG (BAIN, 2006; HESS, 2009).

Sparrow et al. (2007) relataram não haver diferenças morfológicas no decorrer do período de estocagem dos eritrócitos. Desta forma, as alterações morfológicas observadas nos primeiros dias de estocagem são numericamente semelhantes às observadas ao fim de 41 dias de armazenamento. Entretanto, Lion et al. (2009) observaram aumento significativo na formação de projeções da membrana plasmática, denominadas microvesículas, dos eritrócitos armazenados no mesmo período.

Diversos fatores levam às alterações morfológicas da célula. Para Lion et al. (2009) mudanças na membrana por danos oxidativos à própria hemoglobina, influxo de cálcio, pH e a redução do ATP são grandes responsáveis pela mudança na conformação e deterioração, algumas vezes irreversível, da membrana plasmática. Já Bain (2006) acrescentam que, com a ação das enzimas inflamatórias liberadas pelos leucócitos e plaquetas presentes no interior das bolsas, ocorrerão lesões da membrana plasmática com conseqüente exposição de componentes internos da membrana bilipídica, possibilitando a ligação a imunoglobulinas que culminarão em alterações na conformação e elasticidade normal dos eritrócitos.

Lang et al. (2003) afirmaram que uma das primeiras alterações sofridas pela célula é a perda da capacidade de regulação dos canais iônicos, com conseqüente entrada de íons cálcio (Ca^+) no interior da célula. Isto se dá por uma série de substâncias liberadas no interior das bolsas, algumas delas oriundas de prostaglandinas ativadas que levam a liberação do fator de ativação plaquetário gerando uma série de reações que irão culminar na desorganização da membrana plasmática, aumentando a expressão da fosfatidilserina e permitindo o influxo excessivo de Ca^+ . Esse irá ativar a calpaina, enzima que degrada a espectrina e conseqüentemente o citoesqueleto. Além disto, o excesso de Ca^+ aumenta diretamente a atividade da transglutaminase 2 (TG2) que, por reação cruzada, degrada o citoesqueleto. A combinação da ação da calpaina e da TG2 são grandes responsáveis pela redução da elasticidade do citoesqueleto e deformidade celular (LANG et al. 2003; BAIN, 2006; Lion et al., 2009).

Os eritrócitos estão constantemente expostos ao estresse oxidativo. Com o influxo de oxigênio (O_2), há a formação de metahemoglobina (met-Hb) que em condições normais é reciclada em hemoglobina pela metahemoglobina reductase. Porém, este mecanismo necessita de energia na forma de ATP, sendo assim,

situações com baixos níveis de ATP culminarão na formação de hemoglobina desnaturada que se ligará às proteínas internas da membrana plasmática e à espectrina, formando hemicromos que alteram o citoesqueleto aumentando a rigidez celular e formando estruturas espiculares (equinócitos) e microvesículas (BAIN, 2006; KRIEBARDIS et al., 2006; HESS, 2009; LION, et al., 2009).

Durante o período de conservação ocorre o rompimento destas espículas ou microvesículas promovendo a liberação de material citosólico e hemoglobina (HESS, 2009). Com a ruptura das microvesículas, ocorre também a exposição da fosfatidilserina que normalmente se localiza na face interna da membrana. A expressão excessiva deste componente expõe a célula à ação de imunoglobulinas que causarão danos à membrana promovendo a perda de fragmentos desta e saída de maiores quantidades de material citoplasmático (BAIN, 2006; HESS, 2009). No paciente, este mecanismo tem levado a reações inflamatórias e trombóticas (LION et al., 2009).

Korte e Verhoeven (2004) relataram que as soluções presentes nas bolsas são capazes de promover edemaciação das células, com conseqüente aumento em seu volume. Esta afirmação é confirmada por Lion et al. (2009), quando afirmaram que em baixas temperaturas a bomba de sódio e potássio apresenta redução na sua função permitindo a saída de potássio e entrada de sódio. Desta forma é plausível pensar que, a princípio, haja maior influxo de água na célula, promovendo o aumento do diâmetro eritrocitário. Entretanto, com o transcorrer do período de conservação ocorrerá a formação das estruturas espiculares e microvesículas que serão rompidas liberando material citoplasmático o que poderia explicar a redução do diâmetro sofrido pelos eritrócitos ao fim da conservação (BAIN, 2006; HESS, 2009).

A manutenção das características morfológicas é importante, pois eritrócitos desnaturados, com perda do formato normal ou com redução de sua elasticidade serão rapidamente removidos da circulação pelo sistema monocítico fagocitário (SMF), representado principalmente pelos macrófagos do organismo receptor, além de desencadear reações trombogênicas importantes (GREENWALT, 2006).

3. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E HEMOGASOMÉTRICA DO SANGUE CANINO CONSERVADO EM BOLSAS CPD/SAG-M CPD/SAG-M ACRESCIDAS DE FOSFATO DISSÓDICO

3.1 Introdução

O primeiro relato da tentativa de conservar o sangue *in vitro* data de 1915, quando Rous e Turner conseguiram preservar as células vermelhas do sangue humano, por um período de quatro semanas, utilizando uma solução anticoagulante de citrato e glicose. Porém somente em 1943, Louit e colaboradores, adicionando ácido cítrico ao composto de citrato e dextrose (ACD) contido nos frascos de vidro, reduziram o pH da solução permitindo que esta pudesse ser autoclavada sem danos estruturais aos carboidratos, possibilitando o seu uso na preservação do sangue por 3 semanas com hemólise mínima.

Na década de 60 do século passado foi criado o sistema que é utilizado até os dias atuais, que consiste de recipientes plásticos compostos por cloreto de polivinil (PVC) recobertos com o plástico 2-diethylhexyl phthalate (DEHP) (HESS e GREENWALT, 2002; SCOTT et al., 2005)

Como constituinte das bolsas de transfusão podem-se encontrar inúmeras formulações, mas os principais exemplos são as soluções de citrato como anticoagulante, um tampão a base de fosfato, dextrose e adenina (CPDA-1) (FELDMAN e SINK, 2007); ou bolsas primárias contendo citrato, fosfato e dextrose onde após centrifugação o concentrado de eritrócitos (CE) será transferido para a bolsa satélite contendo solução aditiva (SA) composta de adenina, glicose e manitol. Esta formulação é chamada de CPD/SAG-M na Europa, enquanto que nos Estados Unidos recebe as denominações de AS-1 a AS-5, dependendo da proporção de cada componente (HESS, 2009).

Wardrop et al. (1994) afirmaram que o sangue canino armazenado em bolsas CPDA-1 pode ser conservado sob refrigeração por um período de até 35 dias com preservação da capacidade de transporte de oxigênio e do formato eritrocitário. No entanto, um estudo comparativo observou melhor desempenho das bolsas CPD/SAG-M em relação às bolsas CPDA-1, especialmente no que se refere à capacidade de transporte de oxigênio e preservação da membrana

plasmática do sangue total canino refrigerado por até 41 dias (COSTA JUNIOR et al., 2008).

Subseqüentemente na área médica humana, muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de se desenvolver meios para manter a integridade e a capacidade funcional do sangue estocado por longos períodos. As soluções aditivas (SA) são compostos que devem ser adicionados ao sangue total ou após a centrifugação e remoção do plasma, elas evitam a perda de nutrientes e permitem a extensão do tempo de conservação dos componentes celulares (HOLME, 2005).

Em estudos com sangue humano, Hess et al. (2002) observaram que a adição de fosfato dissódico (FD) às SAs propicia manutenção de maiores níveis do pH comparado ao fosfato monossódico (FM), comumente encontrado nas formulações comerciais, potencializando a conservação de diferentes componentes intracelulares, reduzindo os danos sofridos pelos eritrócitos e permitindo a ampliação do período de conservação do sangue armazenado. Os compostos contendo FD já possuem permissão para uso em soluções conservadoras para bancos de sangue nos Estados Unidos e Europa (HESS et al., 2000a).

O acúmulo de lactato e CO₂, associado à redução da glicólise, natural em baixas temperaturas, promoverá redução do pH, gerando falhas na manutenção dos níveis do trifosfato de adenosina (ATP), nucleotídeo envolvido no equilíbrio eletrolítico pela bomba de sódio e potássio, na manutenção da forma celular e aumento da flexibilidade eritrocitária (SCOTT et al., 2005; LION et al., 2009).

A capacidade do sangue em liberar oxigênio está relacionada ao 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) contido nos eritrócitos de humanos e cães (BUNN, 1971). O principal fator envolvido na redução dos níveis do 2,3-DPG é a queda do pH que ocorre durante o processo de armazenamento do sangue (HÖGMAN et al., 2002; KURUP et al., 2003; HESS e BEYER, 2007) e pelo aumento na taxa de degradação do 2,3-DPG no interior das células (CHO et al. 2008).

Embora os eritrócitos possuam capacidade de regenerar os níveis de ATP e 2,3-DPG após ressuspensão em plasma fresco, esta recuperação acontece em até 50% entre a primeira e a quinta hora após a transfusão no paciente (SCOTT et al., 2005; LION et al., 2009). Entretanto, para que haja recuperação total dos valores do 2,3-DPG, são necessárias 24 a 48 horas após a infusão sangüínea no paciente (LION et al., 2009). Devido a isto, Wardrop e colaboradores (1994)

contraindicam o uso de sangue canino conservado em bolsas CPDA-1 por mais de 21 dias, pois os níveis do 2,3-DPG estão baixos o que elevaria a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio dificultando a liberação deste gás para os tecidos e impossibilitando seu uso em pacientes críticos que necessitam de imediata melhora na taxa de oxigenação tecidual. Por esta razão, Kristensen e Feldman (1997) recomendam o uso de sangue canino armazenado em bolsas CPDA-1 por até 14 a 21 dias ou sangue fresco.

Lion et al. (2009) relataram que em pacientes humanos que receberam concentrado de eritrócitos com baixos níveis de 2,3-DPG, ATP e maiores índices percentuais de hemólise, apresentaram menor taxa de sobrevivência ou maiores reações transfusionais. Estes dados corroboram os encontrados por Kock et al. (2008) quando afirmaram que pacientes que receberam CE armazenados a mais de duas semanas apresentaram aumento significativo dos riscos de apresentarem complicações pós-operatórias.

Em baixas temperaturas, a bomba de sódio e potássio dos eritrócitos humanos apresenta considerável redução da função elevando os níveis do potássio plasmático a uma taxa de 1 mEq/l/dia (Lion et al., 2009). Entretanto, Costa Junior e colaboradores (2008) não encontraram valores de potássio plasmático superiores a duas vezes os níveis iniciais ao fim de 41 dias de conservação do sangue total canino conservado em bolsas CPD/SAG-M.

Objetiva-se com este estudo avaliar os parâmetros bioquímicos e hemogasométricos do concentrado de eritrócitos canino conservado em bolsas CPD/SAG-M acrescidas com fosfato dissódico ao longo de 60 dias de refrigeração.

3.2 Material e Métodos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (protocolo nº 69/2007).

3.2.1 Localização dos Procedimentos

A coleta e armazenamento do sangue canino foi realizado no Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) – Viçosa (MG). A centrifugação das bolsas para a obtenção do

Concentrado de Eritrócitos (CE) foi realizada na Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS), no núcleo regional de Ponte Nova – Viçosa (MG). Os exames laboratoriais foram realizados nos Laboratórios de Análises Clínicas HEMOLAB e do Hospital Veterinário da UFV, no laboratório de BIOFARMACOS vinculado ao Departamento de Bioquímica da UFV, e no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química da UFV.

3.2.2 Coleta das Amostras

Foi utilizado sangue de seis cães adultos, machos, não castrados sendo dois da raça Pit Bull, dois Rottweilers e dois Labradores. Os animais possuíam peso superior a 30 kg, de comportamento dócil, em boas condições de saúde, verificados pelo exame físico, hemograma, pesquisa de hematozoários e parasitológico de fezes. Esses animais tinham hematócrito superior a 40% e de proprietários residentes na cidade de Viçosa (MG).

O procedimento de coleta foi realizado na Sala de Fluidoterapia do Hospital Veterinário, sobre uma mesa de aço inoxidável, posicionando os cães em decúbito lateral.

A contenção foi manual e executada por dois auxiliares. A venipunção foi feita na veia jugular, posicionando a agulha caudocranialmente, após a depilação e anti-sepsia com solução de álcool 70%.

O sangue foi coletado em bolsas CPD/SAG-M¹ e centrifugados a 5186 G por 5 minutos para a obtenção do concentrado de eritrócitos (CE). Após centrifugação o CE foi transferido para a bolsa satélite onde continha a solução aditiva (SA) de adenina, glicose e manitol em solução salina. Posteriormente a transferência, o conteúdo desta bolsa foi dividido em duas outras bolsas de tal forma que ambas possuíam a mesma quantidade de CE em solução aditiva, atestada pelo peso e numeradas de acordo com o animal doador. Com isto obteve-se de cada animal duas bolsas com CE.

Após os procedimentos anteriores, a uma das bolsas de cada animal foi adicionada solução de fosfato dissódico conforme a Tabela 1, de tal forma que esta, após diluição ao volume pré-existente no interior da bolsa, apresentasse ao

¹ Bolsas plásticas triplas, para coleta de sangue – Fresenius hemocare.

final da mistura, a concentração de 27 mmol/l de Na₂HPO₄ e 9 mmol/l de NaCl para equilíbrio osmótico evitando a lise eritrocitária.

Tabela 1: Composição das soluções aditivas (SAs) a serem acrescentados nas bolsas satélites, e determinação dos grupos de acordo com a concentração do fosfato dissódico (Na₂HPO₄).

Grupos	Adição do Na ₂ HPO ₄ (mmol/l)	Adição de NaCl (mmol/l)	Volume total do aditivo (ml)
1	0	0	0
2	54	18	50

Após a adição da solução de Fosfato Dissódico, as bolsas foram devidamente identificadas de acordo com a Tabela 2 e conduzidas à refrigeração de 4 a 8° C.

Tabela 2. Identificação das bolsas e separação nos Grupos 1 e 2.

Bolsas	Animal	Composição das Bolsas	Grupo
A1	A	CPD/SAG-M	1
B1	B	CPD/SAG-M	1
C1	C	CPD/SAG-M	1
D1	D	CPD/SAG-M	1
E1	E	CPD/SAG-M	1
F1	F	CPD/SAG-M	1
A2	A	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2
B2	B	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2
C2	C	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2
D2	D	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2
E2	E	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2
F2	F	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2

3.2.3 Dias das Avaliações Laboratoriais

As avaliações laboratoriais, morfológicas e morfométricas do sangue contido nas bolsas foram realizadas em sete dias diferentes, com intervalos de 10 dias entres estes, iniciando imediatamente após a centrifugação e adição do Fosfato Dissódico às bolsas do grupo 2.

3.2.4 Avaliação Laboratorial

Antes da avaliação das amostras, foi realizada a homogeneização do sangue contido nas bolsas, seguida da retirada asséptica e em ambiente de capela de 15 ml de sangue para a mensuração das variáveis bioquímicas.

Foi coletada amostra para mensuração do 2,3-DPG, glicose plasmática, potássio plasmático, hemoglobina e hematócrito para o cálculo do percentual de hemólise, lactato e gasometria para obtenção do pH, pO₂, pCO₂ e bicarbonato.

Para a avaliação do 2,3- Difosfoglicerato (2,3-DPG) foram utilizados 5 ml do sangue retirado das bolsas de ambos os grupos e centrifugado para a obtenção de 1mL de concentrado de eritrócitos. A partir daí, as amostras foram submetidas à desproteinização pelo ácido perclórico 0,6 M e neutralizadas com carbonato de potássio 2,5 M. Na sequência foi realizada a centrifugação para separar o sobrenadante utilizado nas reações bioquímicas que determinaram os valores do 2,3-DPG. Foi utilizado o Kit comercial para análise do 2,3-DPG² por espectrofotometria em luz ultravioleta.

Considerando que foi adicionado um volume extra de 50 ml de solução de fosfato dissódico no grupo 2, os valores do 2,3-DPG para ambos os grupos foram corrigidos pelo hematócrito obedecendo a seguinte fórmula:

$$2,3\text{-DPG}_{(\text{corrigido})} = 2,3\text{-DPG}_{(\text{leitura})} \times 100 / \text{Ht}$$

$$2,3\text{-DPG}_{(\text{corrigido})} = 2,3\text{-Difosfoglicerato corrigido}$$

$$2,3\text{-DPG}_{(\text{leitura})} = 2,3\text{-Difosfoglicerato encontrado na leitura}$$

$$\text{Ht} = \text{Hematócrito}$$

Para as mensurações da glicose e do lactato, foi utilizado o sobrenadante (plasma) oriundo da centrifugação do sangue para os testes do 2,3-DPG. A glicose e o lactato foram mensurados pelo kit enzimático Ultravioleta³ em aparelho bioquímico automático⁴.

Para as medições do potássio plasmático, foi realizada a leitura em aparelho de fotometria de chama⁵. Para a calibração do aparelho foi utilizado o padrão⁶, cuja concentração do potássio era de 5 mEq/l. Considerando que foi adicionado um volume extra de 50 mL de solução de fosfato dissódico, os valores do potássio para ambos os grupos foram corrigidos pelo hematócrito obedecendo a seguinte fórmula:

$$K_{(\text{corrigido})} = K_{(\text{leitura})} \times 100 / \text{Ht}$$

$$K_{(\text{corrigido})} = \text{Potássio corrigido}$$

$$K_{(\text{leitura})} = \text{Potássio encontrado na leitura}$$

$$\text{Ht} = \text{Hematócrito}$$

Para análise do percentual de hemólise (% hemólise) foi mensurada a hemoglobina livre e total através do kit enzimático comercial com leitura por

² Roche Diagnostics – Germany / 30 determinações – UV.

³ Glicose e Lactato Enzimáticos – BIOCLIN.

⁴ Aparelho bioquímico automático ALISÉ.

⁵ Fotômetro de Chama Micronel – B 462.

⁶ Padrão para análise de Sódio e Potássio por Fotometria de Chama – Laboratório CELM.

espectrofotometria colorimétrica⁷, e a mensuração do hematócrito pela técnica do microematócrito. Os dados foram submetidos à fórmula de percentual de hemólise segundo Wardrop et al. (1997):

$$\% \text{ hemólise} = (100 - \text{Ht}) \times \text{Hb livre} / \text{Hb total}$$

Ht = Hematócrito

Hb livre = Hemoglobina livre (g/dl)

Hb total = Hemoglobina total (g/dl)

A medição da proteína total se deu retirando 50 µL do plasma a partir das alíquotas retiradas das bolsas de ambos os grupos e lidas em aparelho de Refratometria⁸.

As mensurações do pH, da pressão parcial de oxigênio (pO₂), pressão parcial de dióxido de carbono (pCO₂) e bicarbonato (HCO₃⁻) foram realizadas através de aparelho de hemogasometria⁹.

3.2.5 Análise Estatística

A avaliação estatística foi realizada ao término da coleta dos dados experimentais e analisada através do programa estatístico SAEG¹⁰, utilizando-se para os dados paramétricos a análise de variância (ANOVA). Posteriormente os dados que passaram pelas premissas da análise de variância, foram submetidos ao teste de Tukey, com grau de significância de 5% (p<0,05), que avaliou o comportamento das variáveis no decorrer do tempo. Exceto para a análise do lactato, onde preconizou-se significância de 10% (p<0,1).

Para a comparação entre grupos, foi realizado o teste t de Student com grau de significância de 5% (p<0,05).

Para os dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Pearson para a análise da correlação entre as variáveis e posteriormente o teste de Wilcoxon para determinação do comportamento no tempo. Ambos com grau de significância de 5% (p<0,05).

⁷ Espectrofotômetro – Fc – 130 – CELM.

⁸ Refratômetro: Atago, Hand Refractometer, Mod. Uricon cat n°. 135.

⁹ Gasômetro ABL 5 – Radiometer / Copen Hagen.

¹⁰ SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

3.3 Resultados e Discussão

Com o posicionamento da agulha caudo-cranialmente na veia jugular o processo de coleta do sangue foi rápido, perfazendo a duração média de 5 a 7 minutos para todas as coletas. Estes resultados são melhores que os encontrados por Oliveira (1998), que realizando a punção na veia safena lateral de cães, necessitou de 21 minutos em média para preencher a bolsa. Provavelmente com a agulha direcionada contra o fluxo sangüíneo, somado à punção em um vaso de maior calibre houve maior entrada de sangue em um menor tempo.

3.3.1 Proteína plasmática total

Não houve variações significativas da proteína plasmática total na comparação entre os momentos. Entretanto observou-se significativa diferença na comparação entre os dois grupos, com o Grupo 1 (G1) apresentando médias superiores às encontradas nos do Grupo 2 (G2) (Tabela 3 e Figura 2).

Este fato pode ser explicado pela diluição ocorrida no sangue contido nas bolsas do G2 após adição de volume de 50 mL da solução de fosfato dissódico à solução aditiva (SA) da bolsa.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão da proteína plasmática total (g/dl) do sangue canino armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	2,04±0,65 ^{Aa}	2,65±1,37 ^{Aa}	3,00±1,82 ^{Aa}	4,18±2,42 ^{Aa}	4,96±3,69 ^{Aa}	5,96±4,13 ^{Aa}	6,60±4,22 ^{Aa}
G2	1,67±0,86 ^{Ba}	1,80±0,85 ^{Ba}	2,25±1,17 ^{Ba}	2,52±1,48 ^{Ba}	2,53±1,49 ^{Ba}	2,80±1,57 ^{Ba}	3,57±1,87 ^{Ba}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,05$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

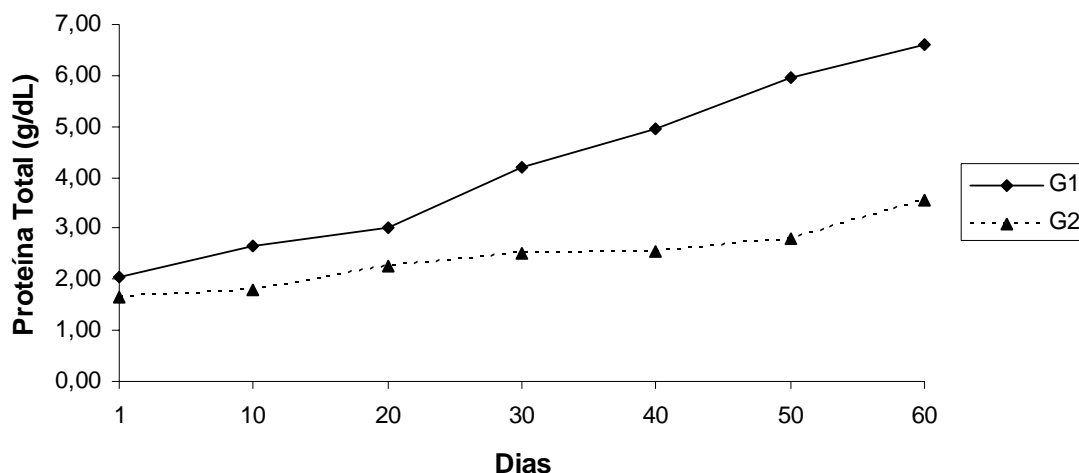


Figura 2. Representação dos valores médios da proteína plasmática total (g/dl) do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.
 G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.
 G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

3.3.2 Glicose plasmática

Houve diferença significativa na comparação entre os grupos G1 e G2, onde o grupo tratado inicialmente apresentou médias inferiores às observadas no primeiro grupo. Entretanto, com o passar dos dias, constatou-se redução dos valores médios da glicose no primeiro grupo, de tal maneira que a partir do D30 as médias do G2 foram superiores às do G1. Da mesma maneira, encontraram-se diferenças significativas quando comparadas as médias no decorrer dos dias analisados (Tabela 4 e Figura 3).

A diferença na concentração da glicose entre os grupos nos períodos iniciais provavelmente se deu pela diluição ocorrida pelas bolsas do G2 que receberam 50 mL de fosfato dissódico a SA das bolsas.

A redução das concentrações da glicose apresentada pelo G1 também foi observada por Wardrop et al. (1994) em estudos de conservação do sangue canino em bolsas CPDA-1.

Em um estudo comparativo onde se conservou o sangue total canino em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M, Costa Junior et al. (2008) observaram menor redução da glicose nas formulações contendo CPD/SAG-M, demonstrando que soluções aditivas que contenham maiores níveis de fosfato promovem melhor conservação dos componentes responsáveis pela manutenção da membrana plasmática, culminando em menor consumo das reservas sanguíneas.

Na comparação entre o primeiro e o 60^o dia de conservação em cada grupo, o G2 demonstrou menor redução da glicose ao final do período. Esta superioridade das bolsas do G2 pode ser atribuída à melhor conservação do ATP, pois segundo Högman et al. (2002) e Hess (2009), com a queda do pH existe maior consumo de glicose na tentativa de manter os níveis do ATP.

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão da glicose plasmática (mg/dl) do sangue canino armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	637,2±113,5 ^{Aa}	530,9±218,6 ^{Aab}	414,9±223 ^{Aabc}	308,6±214,5 ^{Abc}	285,1±219 ^{Ac}	281,3±212,5 ^{Ac}	275,2±208 ^{Ac}
G2	483,3±42,7 ^{Ba}	464,4±43,6 ^{Bab}	407,8±47,5 ^{Babc}	378,9±37,5 ^{Bbc}	334,2±26,5 ^{Bc}	315,9±38 ^{Bc}	310,9±48,5 ^{Bc}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey (p<0,05). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student (p<0,05).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

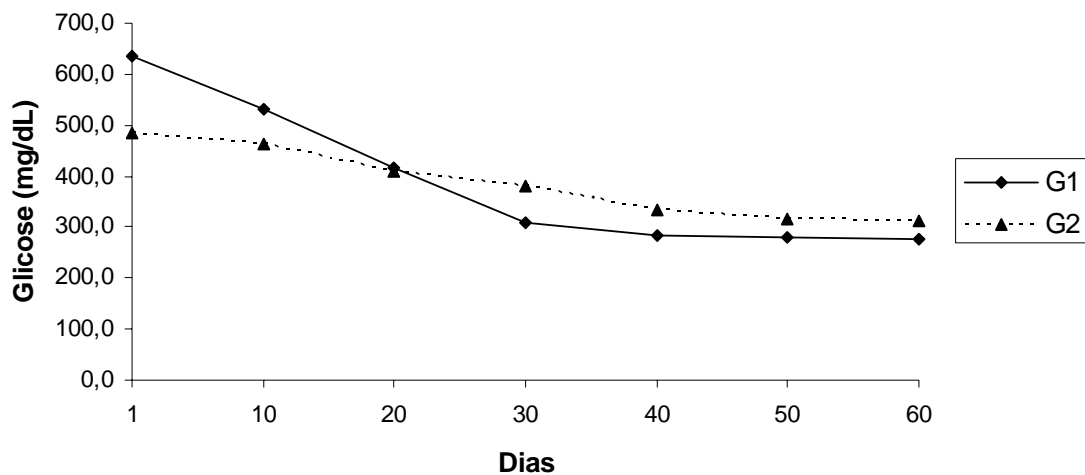


Figura 3. Representação dos valores médios da glicose plasmática (mg/dL) do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias (D) analisados.

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

3.3.3 Potássio plasmático

Na análise dos tempos, houve um acréscimo significativo nos níveis do potássio de ambos os grupos. Na comparação entre estes, também foi observada diferença significativa com as médias do G1 superiores às observadas no G2 (Tabela 5 e Figura 4).

Por ser um íon intracelular, o aumento nos níveis do potássio extracelular representa redução na capacidade da membrana em manter as concentrações de potássio no meio intracelular, ou até mesmo indicar hemólise. Entretanto, segundo Lion et al. (2009), em baixas temperaturas há redução da função da

bomba de sódio e potássio, permitindo a saída de íons citosólicos. Considerando que ambos os grupos estiveram expostos às mesmas condições de temperatura, a explicação para as diferenças nas médias do potássio plasmático se dá em uma melhor preservação do ATP pelo G2, pois, segundo Kurup et al. (2003), este nucleotídeo está intimamente relacionado à membrana plasmática, sendo também responsável pelo equilíbrio eletrolítico da célula.

A variação entre as médias observadas entre o primeiro e o 60º dia de conservação, principalmente no G2, confirmam as conclusões de Kerr (2003), e de Korte e Verhoeven (2004) quando afirmaram que em cães os níveis intracelulares do potássio são menores quando comparados com outras espécies, e sua concentração plasmática não se elevaria na mesma proporção que a observada em eqüinos e humanos. Kurup e colaboradores (2003) no 28º de conservação do sangue humano encontraram níveis de potássio plasmático em 43 e 61 mEq/l nas bolsas contendo CPD e SAG-M respectivamente. Estes resultados diferem dos achados por Costa Junior et al. (2008) em estudos comparativos de conservação do sangue total canino em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M, pois ao fim de 41 dias de conservação, estes observaram valores do potássio plasmático em 5,1 e 3,8 mEq/L respectivamente. Esta diferença, provavelmente se deu pelo fato de que o estudo realizado por estes autores foi feito com sangue total, enquanto que na presente pesquisa as bolsas continham concentrado de eritrócitos, o que determina maior concentração de potássio por unidade de medida. Entretanto, representando valores ainda inferiores aos encontrados em sangue humano, como relatado por Kurup et al. (2003).

Tabela 5. Valores médios* e desvio padrão do potássio plasmático (mEq/l) do sangue canino armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	4,3±1,7 ^{Ad}	7,9±2,1 ^{Ac}	9,5±1,3 ^{A^{bc}}	10,3±2,1 ^{A^{ab}}	11,9±2,4 ^{A^a}	11,8±1,9 ^{A^{ab}}	14,0±5 ^{A^{ab}}
G2	3,3±1 ^{B^d}	6,3±1,8 ^{B^c}	8,0±0,9 ^{B^{bc}}	9,2±1,8 ^{B^{ab}}	8,6±1,2 ^{B^a}	9,5±2,1 ^{B^{ab}}	8,9±2,2 ^{B^{ab}}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,05$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

* Valores corrigidos pelo hematócrito (100%)

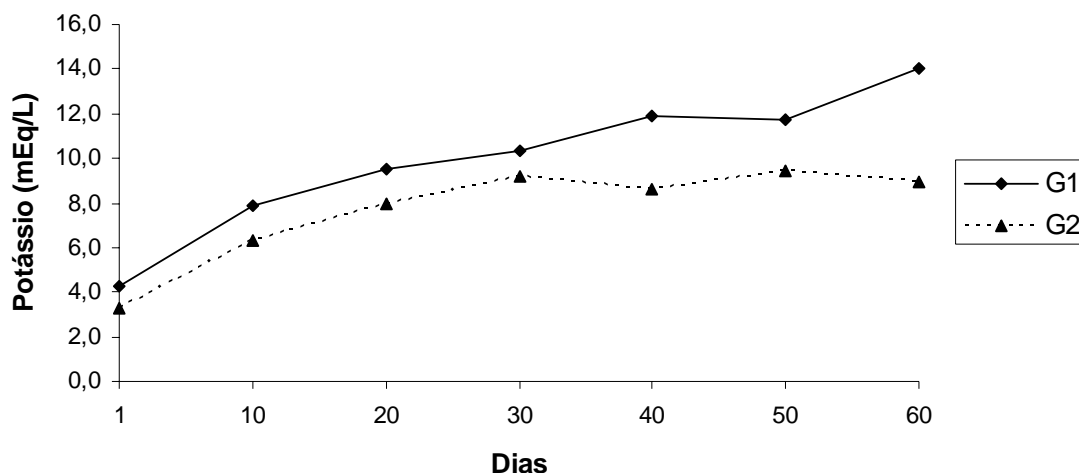


Figura 4. Representação dos valores médios do Potássio (mEq/l) do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.
 G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.
 G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

Feita a correlação entre os níveis médios de potássio em função do pH para o G1 e G2 respectivamente, observou-se significância nas comparações ($p < 0,01$) apresentando uma forte correlação negativa para G1 ($r = -0,9515$) e G2 ($r = -0,9779$), (Figura 5). Desta forma, pode-se dizer que os valores do potássio plasmático são inversamente proporcionais aos valores do pH sanguíneo. Isto pode ser confirmado pelos achados indicativos da elevação do potássio extracelular em 91% no G1 e 96% no G2, elevação esta justificada pela redução dos valores do pH. Estes dados concordam com as afirmações de Bush (2004), quando disse que a membrana plasmática é diretamente influenciada pela redução do pH, levado a migração do potássio contido no fluido intracelular para o meio extracelular.

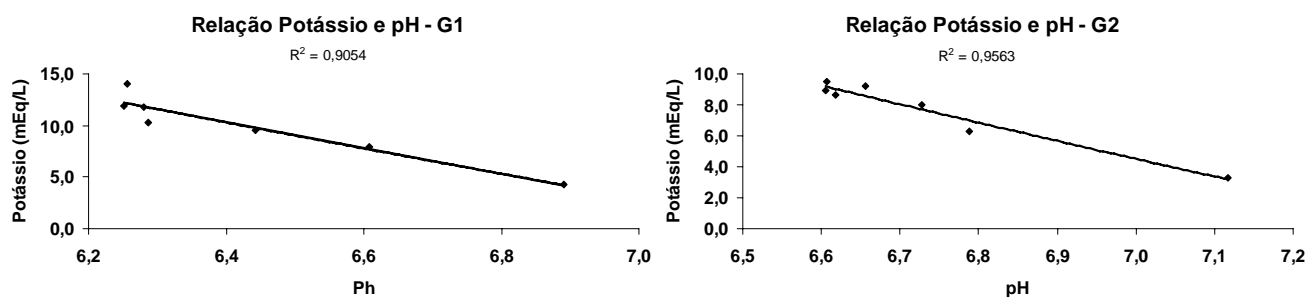


Figura 5. Representação gráfica da comparação entre a variável potássio plasmático em função do pH.

3.3.4 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG)

Houve no primeiro dia de análise valores abaixo do limiar mínimo de mensuração para ambos os grupos, entretanto a partir do 10^o dia de conservação observou-se aumento do 2,3-DPG nos dois grupos, sendo que do D10 ao D60, as médias do G2 foram superiores às observadas no G1.

Da mesma maneira foram constatadas diferenças significativas nas médias entre os dias de conservação, demonstrando redução dos níveis do 2,3-DPG a partir do D20 (Tabela 6 e Figura 6).

A explicação para os valores próximos de zero no primeiro dia pode estar no fato de que inicialmente o sangue é coletado na bolsa primária que, embora contenha citrato e dextrose tamponados com fosfato (CPD), esta solução possui pH ligeiramente inferior a 6. Devido a isto, é possível que o metabolismo eritrocitário reduza consideravelmente, aumentando a degradação do 2,3-DPG pela exacerbação da 2,3-DPG-fosfatase (enzima que degrada o 2,3-DPG), e inativação da 2,3-DPG mutase (enzima que converte o 1,3-DPG em 2,3-DPG).

D'Almeida et al. (2000) quando em estudos com sangue humano e de ratos em bolsas contendo CPDA-1, relataram que os níveis do 2,3-DPG apresentam constante redução dos seus valores a partir do primeiro dia de conservação. Lion et al. (2009) acrescentam que o 2,3-DPG tem seus níveis reduzidos ainda nas primeiras horas de conservação. Entretanto, estes últimos autores não mencionam a recuperação desta substância durante o processo de armazenamento.

Neste estudo foi observado aumento significativo nos níveis do 2,3-DPG no dia 10 para ambos os grupos. Estes resultados contrariam os achados por Eisenbrandt e Smith (1973) quando estudaram o comportamento bioquímico do sangue canino armazenado em solução de ácido cítrico e dextrose, demonstrando que o 2,3-DPG sofre redução a partir dos primeiros dias de conservação.

A explicação para o aumento nas médias do 2,3-DPG após o primeiro dia de conservação, alcançando picos no 10^o dia para ambos os grupos, pode estar no fato de que as soluções conservantes das bolsas já possuem altos níveis de adenina, energia (na forma de dextrose) e fosfato, componentes considerados substratos para a formação do 2,3-DPG.

O melhor desempenho do G2 pode ser explicado pelas informações de Bremner (2002) e Scott et al. (2005), quando afirmaram que quantidades maiores

de fosfato inorgânico (Pi) aumentam a concentração de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) o que eleva os níveis do 1,3-Difosfoglicerato (1,3-DPG), tido como precursor para a produção de mais 2,3-DPG. Desta forma, soluções que possuem maior potencial tamponante, bem como disponibilizam maiores quantidades de fosfato, como observado nas bolsas do G2, possuem melhores condições de preservar o 2,3-DPG durante o processo de conservação.

Embora Wardrop et al. (1994), Hess e Greenwalt (2002) e Kurup et al. (2003) tenham observado em seus estudos que existe tendência no colapso na produção do 2,3-DPG em pH inferior a 7, neste estudo foi observado que no G1 houve aumento do 2,3-DPG entre o primeiro e o 10^o dia de conservação com valores para o pH abaixo de 7. Porém, após este período, houve queda contínua dos valores do 2,3-DPG. Estes dados concordam com os encontrados por Costa Junior et al. (2008), em estudos de conservação de sangue total canino em bolsas contendo CDPA-1 e CPD/SAG-M. Este fenômeno pode ser explicado por Hess e Beyer (2007) quando relataram que somente após o aumento dos níveis de prótons (íons H⁺) oriundos do metabolismo celular e do acúmulo de CO₂, é que ocorrerá redução na produção e aumento da degradação do 2,3-DPG.

Como citado por D'Almeida et al. (2000), o sangue de diferentes espécies, quando expostos aos mesmos tipos de conservação, podem apresentar diferenças no comportamento dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Com isto é plausível a diferença observada com o sangue canino em comparação a outras espécies.

Lion et al. (2009) presumem que após 14 dias de conservação os eritrócitos humanos têm sua taxa metabólica reduzida pela depleção de energia, diminuição da glicólise e não reciclagem de importantes fatores antioxidantes. Desta forma, pode-se explicar o motivo da depreciação das variáveis, inclusive do 2,3-DPG, no interior das bolsas de transfusão após o 10^o dia de armazenamento.

Tabela 6. Valores médios* e desvio padrão de 2,3-Difosfoglicerato (mmol/l) do sangue canino armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	0±0 ^{Ac}	2,38±0,95 ^{Aa}	0,90±0,8 ^{Ab}	0,67±0,57 ^{Abc}	0,67±0,6 ^{Abc}	0,31±0,28 ^{Abc}	0,61±0,4 ^{Abc}
G2	0±0 ^{Ac}	2,72±1,18 ^{Ba}	1,78±0,87 ^{Bb}	1,18±0,66 ^{Bbc}	0,82±1 ^{Bbc}	0,66±0,67 ^{Bbc}	0,72±0,61 ^{Bbc}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey (p<0,05). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student (p<0,05).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

* Valores corrigidos pelo hematócrito (100%)

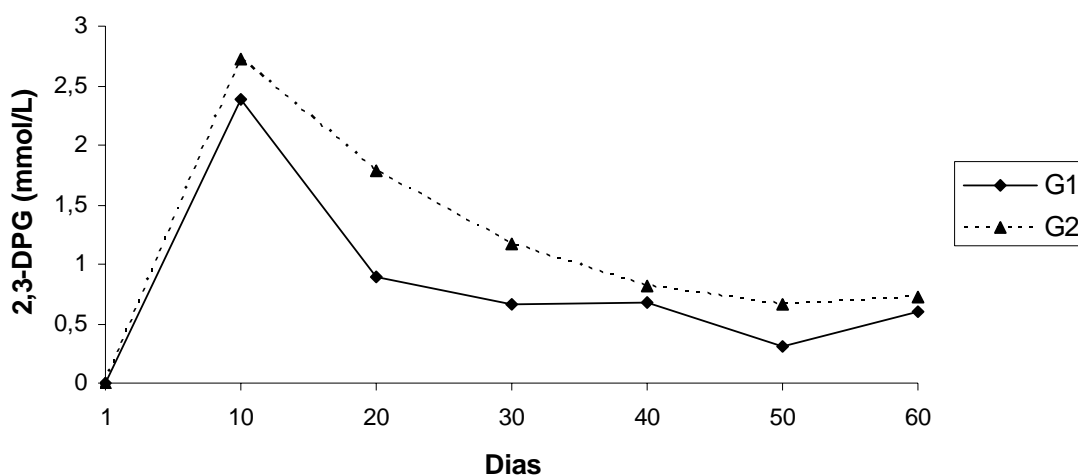


Figura 6. Representação dos valores médios do 2,3-DPG (mmol/l) do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

Em análise de correlação entre a variável 2,3-DPG em função do pH a partir do 10^o dia de conservação, em ambos os grupos constatou-se correlação positiva (p<0,01), demonstrando coeficiente de determinação de 84% (r= 0,9211) para o G1 e 98% (r=0,9916) para o G2. Desta forma, a redução do 2,3-DPG é explicado em 84% e 98% pelo decréscimo do pH para o G1 e G2 respectivamente, a partir do 10^o dia de conservação (Figura 7). Estes dados concordam com os de Bremner (2002), Scott et al. (2005), Costa Junior et al. (2008), Hess (2009) e Lion et al. (2009), quando afirmam que a manutenção do 2,3-DPG está diretamente relacionada com níveis ótimos do pH, demonstrando direta correlação entre estas variáveis.

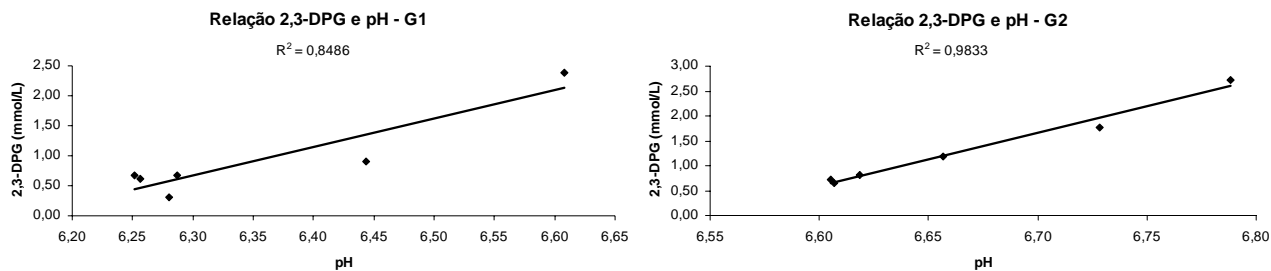


Figura 7. Representação gráfica da comparação entre a variável 2,3-DPG em função do pH a partir do 10º dia de conservação.

A partir destes dados, verifica-se que o melhor momento para infundir o concentrado de eritrócitos seja por volta do 10º dia de conservação, pois neste intervalo é observado o pico de produção do 2,3-DPG. Esta afirmação também é feita por Costa Junior et al.(2008), quando em estudos com sangue total canino em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M, observaram maiores níveis desta variável por volta do 7º dia de armazenamento. Considerando que o organismo leva 24 a 48 horas para ter o total restabelecimento do 2,3-DPG, este fato torna-se ainda mais relevante quando em pacientes críticos que necessitam de máximos níveis do 2,3-DPG no imediato momento da transfusão.

3.3.5 pH

Na análise do pH foi encontrada diferença significativa na comparação entre os grupos e durante o tempo do estudo (Tabela 7 e Figura 8).

Os valores para o pH no primeiro dia diferem dos encontrados por Wardrop et al. (1994) e Costa Junior et al. (2008), que em estudo com sangue canino em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M, constataram média de 6,98 do pH no primeiro dia de conservação do sangue. Entretanto, os dados observados no G2, corroboram os fornecidos por Kurup et al. (2003), que em seu trabalho com sangue humano, obtiveram valores para o pH acima de 7 para o sangue conservado em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M ainda no primeiro dia de conservação.

O decréscimo do pH logo no primeiro dia pode ser explicado pelas afirmações de Ribeiro Filho et al. (1994) e Hess et al. (2002), quando observaram que o pH das soluções contidas nas bolsas é ácido, reduzindo o pH do sangue ainda no primeiro dia de armazenamento. Segundo Ribeiro Filho et al. (1994), e Holme (2005), a queda do pH durante o tempo de análise se dá pelos metabólitos ácidos provenientes do metabolismo anaeróbico dos eritrócitos durante a conservação.

Considera-se que a integração pH e ATP está intimamente relacionada à manutenção do 2,3-DPG, pois a célula necessita de energia para a manutenção dos níveis normais, de tal forma que existe consumo basal para sua manutenção (SCOTT et al. , 2005). Entretanto, com a redução do pH causada pela produção de lactato e CO₂, haverá redução da glicólise e consequente diminuição da produção de ATP, particularmente pela inativação das enzimas hexoquinase e a fosfofrutoquinase, substâncias que participam da via glicolítica e que geram energia na forma de ATP (HÖGMAN et al., 2002; HOLME, 2005).

Segundo Scott et al. (2005), Hess (2009) e Lion et al. (2009) a redução do pH propicia aumento da degradação do 2,3-DPG e redução na produção do mesmo, além de afetar diversos outros componentes celulares, prejudicando a manutenção das características bioquímicas e morfológicas do sangue armazenado.

Desta forma é possível verificar que o G2 apresentou melhor desempenho em conservar o 2,3-DPG, pois esse grupo manteve os melhores níveis do pH, maior disponibilização do Pi, consequentemente aumentando a concentração de gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) o que elevaria os valores do 1,3-Difosfoglicerato (1,3-DPG), considerado o precursor do 2,3-DPG (BREMNER, 2002).

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão de pH sanguíneo do sangue canino armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	6,89±0,11 ^{Aa}	6,61±0,17 ^{Ab}	6,44±0,23 ^{Abc}	6,29±0,27 ^{Ac}	6,25±0,26 ^{Ac}	6,28±0,23 ^{Ac}	6,26±0,23 ^{Ac}
G2	7,12±0,08 ^{Ba}	6,79±0,21 ^{Bb}	6,73±0,08 ^{Bbc}	6,66±0,12 ^{Bc}	6,62±0,16 ^{Bc}	6,61±0,19 ^{Bc}	6,61±0,2 ^{Bc}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey (p<0,05). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student (p<0,05).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

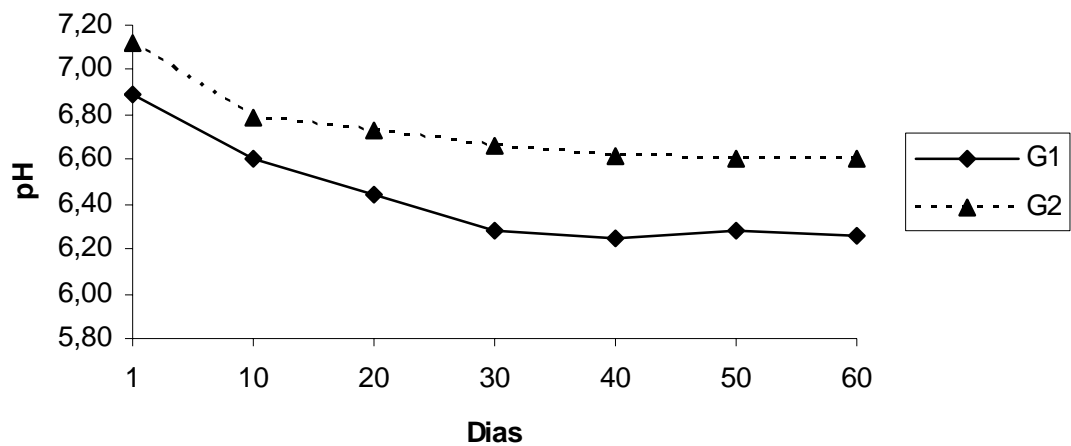


Figura 8. Representação dos valores médios do pH do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

3.3.6 Pressão parcial de oxigênio (pO_2)

Houve para ambos os grupos nos dias avaliados, aumento significativo nos níveis da pO_2 . Na comparação entre grupos, não foi observada diferença (Tabela 8 e Figura 9).

Ficou claro o aumento da pO_2 em ambos os grupos. Este dado corrobora os encontrados por Ribeiro Filho et al. (1994), onde, em estudos com sangue total bovino em bolsas CPDA-1, relataram que o plástico das bolsas é permeável ao oxigênio (O_2). Este fato pode explicar o aumento dos níveis da pO_2 no sangue armazenado. Entretanto, contraria as afirmações de Högman et al. (2002), Hess e Greenwalt (2002) quando afirmam que o plástico é permeável apenas ao CO_2 , sendo pouco transpassado por outros gases.

Segundo Lion et al. (2009) o aumento na pO_2 não é benéfico às células sanguíneas, pois o excesso de oxigênio intracelular propicia estresse oxidativo altamente danoso ao citoesqueleto, afetando diretamente a flexibilidade do eritrócito.

Tabela 8. Valores médios e desvio padrão da pressão parcial de oxigênio (mmHg) do sangue canino armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	78,8±17,5 ^{Ab}	172,8±65,3 ^{Ab}	228,7±76,7 ^{Aa}	244,8±75,2 ^{Aa}	259,7±21,4 ^{Aa}	272,6±12,3 ^{Aa}	281,4±18,8 ^{Aa}
G2	64,2±12,4 ^{Ab}	146,2±60,3 ^{Ab}	232,8±48 ^{Aa}	250,7±30,7 ^{Aa}	262,7±15,5 ^{Aa}	265,7±16,3 ^{Aa}	274,5±15,3 ^{Aa}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,05$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

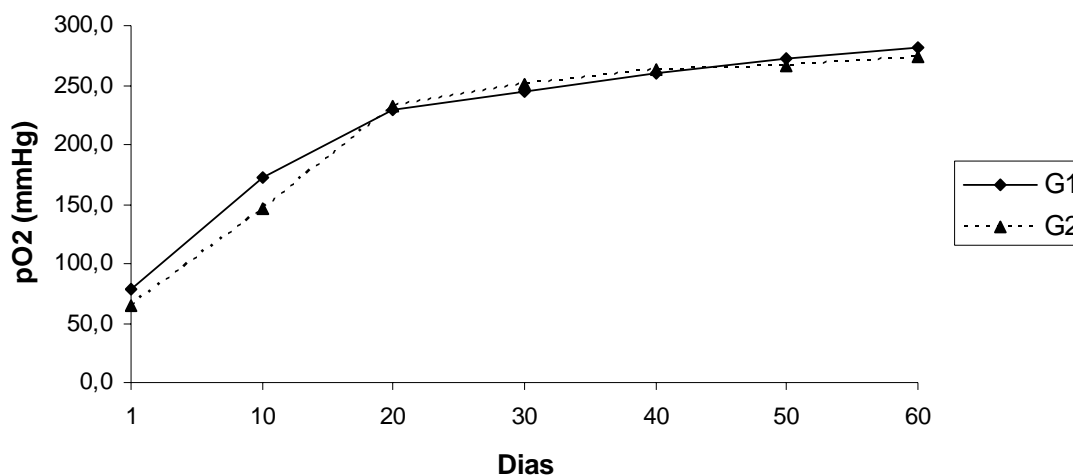


Figura 9. Representação dos valores médios da pressão parcial de oxigênio (mmHg) do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

3.3.7 Pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2)

A pCO_2 apresentou variação significativa, aumentando até o 10^o dia de conservação e estabilizando a partir do 30^o dia perdurando até o término do estudo para ambos os grupos.

Na comparação entre grupos, foi observada diferença significativa em todo o período estudado. No intervalo entre o primeiro e 30^o dias, o G2 apresentou médias inferiores ao G1. A partir de então se observou no G1 médias inferiores às observadas no G2 (Tabela 9 e Figura 10).

Este comportamento da pCO_2 nas bolsas também foi observado por Ribeiro Filho et al. (1994) quando estudaram o sangue bovino conservado em bolsas CPDA-1, e Costa Junior et al. (2008), no estudo com sangue total canino preservado em bolsas CPDA-1. Da mesma maneira, Hess et al. (2001) observaram o mesmo comportamento quando em estudos com sangue humano sob diferentes soluções aditivas.

O aumento dos níveis da pCO₂ até o 10^o dia provavelmente se deu pela neutralização do ácido láctico, resultando na produção de CO₂. A partir do 30^o dia, talvez pelo consumo da anidrase carbônica, a velocidade de produção deste gás tenha sido reduzida, sendo assim ultrapassada pela quantidade de dióxido de carbono que transpassou o plástico da bolsa, como explicado por Hess e Greenwalt (2002), quando afirmam que o material das bolsas de transfusão é permeável ao CO₂. Desta forma pode ser justificada a redução dos níveis deste gás entre o 30^o e o 40^o dias de armazenamento.

Segundo Högman et al. (2002) altos níveis da pCO₂ expõem o 2,3-DPG a maior taxa de degradação, provavelmente por competir por seu sítio de ligação na hemoglobina, deixando o 2,3-DPG livre, o que acelera sua degradação. Além disto, com a queda do pH causado pela produção de lactato e CO₂, haverá redução da glicólise e conseqüente diminuição da produção de ATP (HÖGMAN et al., 2002; HOLME, 2005). Com isto a célula terá menos disponibilidade de energia para a manutenção do 2,3-DPG e da integridade da membrana plasmática.

Tabela 9. Valores médios e desvio padrão da pressão parcial de dióxido de carbono (mmHg) do sangue canino armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	54,5±19,9 ^{Abc}	70,8±24,2 ^{Aa}	66,3±20,3 ^{Aab}	45,2±15,2 ^{Aabc}	31,0±15 ^{Ac}	22,6±13,3 ^{Ac}	16,8±10,7 ^{Ac}
G2	34,5±16,4 ^{Bbc}	55,7±30,5 ^{Ba}	48,8±14,4 ^{Bab}	40,5±7,6 ^{Babc}	31,5±6,4 ^{Bc}	23,8±7,3 ^{Bc}	19,0±7,6 ^{Bc}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey (p<0,05). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student (p<0,05).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

Baseado nestes achados é possível afirmar que até o 30^o dia de armazenamento do sangue canino, o G2 apresentou-se mais eficaz do que o G1. Entretanto, após este período as médias se invertem passando o G1 a apresentar menores médias.

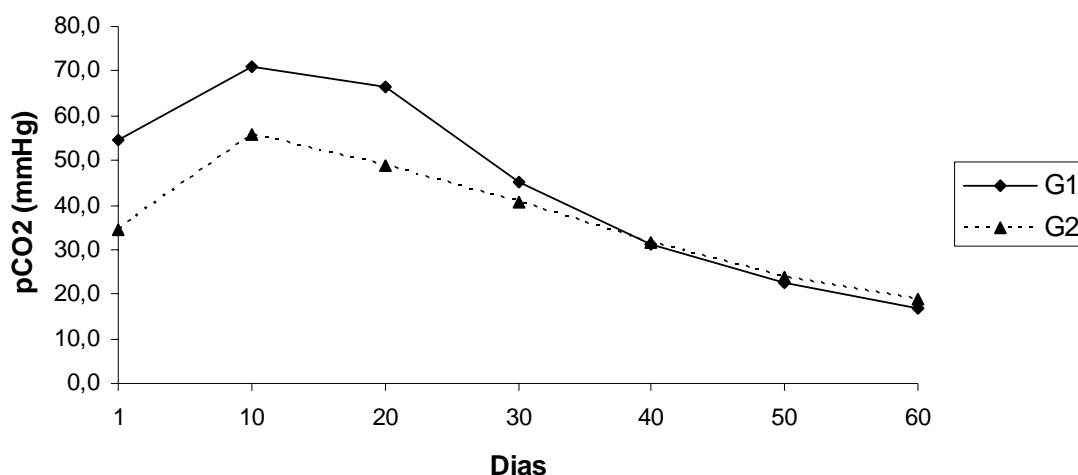


Figura 10. Representação dos valores médios da pressão parcial de dióxido de carbono (mmHg) do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.
 G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.
 G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

3.3.8 Bicarbonato plasmático (HCO_3^-)

Redução gradual e altamente significativa foi notada em ambos os grupos. Da mesma maneira, na comparação das médias do bicarbonato entre os grupos foram observadas diferenças significativas em todos os dias analisados, demonstrando maiores médias para o G2 (Tabela 10 e Figura 11).

Esta redução do bicarbonato em ambos os grupos pode ser explicada por Luna (2002), quando afirma que o bicarbonato é base fraca e responsável por mais de 50% da capacidade tamponante do meio extracelular. Desta forma, a redução se dá pelo consumo dos íons bicarbonato para o controle da acidez. Provavelmente o consumo do bicarbonato foi equivalente à produção de ácido metabólico no interior das bolsas.

O declínio do bicarbonato também foi encontrado por Ribeiro Filho et al. (1994) em estudo com sangue total bovino conservado em bolsas CPDA-1, e por Costa Junior et al. (2008) em estudo com sangue total canino conservado em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.

Devido à manutenção de médias superiores em todos os dias, pode-se verificar que as bolsas do G2 apresentaram vantagem na conservação do sangue de cães, pois neste grupo houve menor consumo do bicarbonato devido à manutenção de maiores médias para o pH, minimizando desta forma, os danos ao 2,3-DPG e ao ATP.

Tabela 10. Valores médios e desvio padrão do bicarbonato (mmol/l) do sangue canino armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	9,67±3,2 ^{Aa}	6,67±1,97 ^{Aab}	4,50±1,64 ^{Abc}	2,33±1,51 ^{Acđ}	1,50±1,22 ^{Ad}	1±0,71 ^{Ad}	1±0,71 ^{Ad}
G2	10,17±3,71 ^{Ba}	7,67±3,08 ^{Bab}	6,17±2,04 ^{Bbc}	4,33±1,63 ^{Bcd}	3,33±1,63 ^{Bđ}	2,17±0,98 ^{Bđ}	1,83±0,98 ^{Bđ}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,05$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

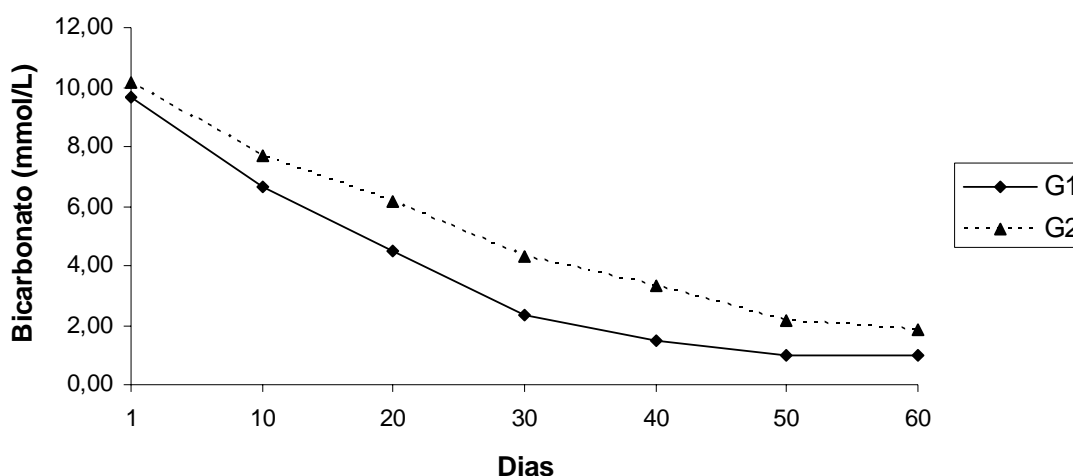


Figura 11. Representação dos valores médios do bicarbonato (mmol/l) do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas do fosfato dissódico.

3.3.9 Percentual de hemólise (% hemólise) e Hematócrito

Na análise do percentual de hemólise foram encontradas médias significativamente menores no G2 a partir do 20º dia de conservação. Na avaliação no decorrer do tempo de conservação também foram encontradas diferenças entre os dias, demonstrando significativo aumento nas médias, especialmente para o grupo G1 (Tabela 11 e Figura 12).

Na análise do hematócrito não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ou no decorrer dos dias analisados (Tabela 12 e Figura 13).

O aumento no percentual de hemólise não configura necessariamente uma condição de colapso celular, pois segundo Hess e Greenwalt (2002), as alterações morfológicas nos eritrócitos armazenados já são observadas nas primeiras horas de conservação e se configuram principalmente em esferócitos e na formação de

estruturas espiculares (equinócitos). Hess (2009) acrescenta que no decorrer do período de conservação ocorre o rompimento destas espículas promovendo a liberação de material citosólico e hemoglobina sem, no entanto, representar a lise celular. Provavelmente devido a este fator não foi observado declínio significativo do hematócrito nos grupos.

Lion et al. (2009) afirmaram que em baixas temperaturas a bomba de sódio e potássio apresenta redução da sua função permitindo a saída de potássio e o influxo de sódio. Com isto, é plausível imaginar que, para ocorrer equilíbrio osmótico, haja a entrada de água no interior da célula, o que elevaria o volume globular médio dos eritrócitos. Porém, neste estudo não foi observado aumento do hematócrito. Este fato pode ser explicado por Bain (2006) e Hess (2009), quando relataram que o eritrócito tende a reduzir o seu diâmetro devido à ruptura das espículas e consequente saída de material citosólico, inclusive hemoglobina. Talvez devido ao ingurgitamento eritrocitário, concomitantemente à ruptura das espículas, houvesse manutenção do hematócrito no transcorrer do período de conservação.

Após avaliar os valores médios do percentual de hemólise é possível constatar a superioridade das bolsas do G2 na preservação dos eritrócitos. Estes dados concordam com os encontrados por Wardrop et al. (1997), em estudo conservativo do sangue canino, quando observaram que a adição de soluções aditivas (SA) de fosfato monobásico às bolsas CPDA-1 apresentou melhores resultados quando comparadas às mesmas bolsas sem a adição desta SA. Desta forma é possível verificar que a manutenção de maiores médias para o pH interfere diretamente na preservação da integridade celular.

Tabela 11. Valores médios e desvio padrão do percentual de hemólise do sangue canino armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	0,5±0,4 ^{Ab}	1,2±0,4 ^{Ab}	1,2±0,9 ^{Aab}	4,9±7,1 ^{Aab}	9,9±14,6 ^{Aa}	10,2±12,9 ^{Ab}	14,5±17,6 ^{Aa}
G2	1,2±0,6 ^{Ab}	1,1±0,7 ^{Ab}	0,8±0,5 ^{Bab}	1,9±1,8 ^{Bab}	2,6±2,2 ^{Ba}	3,6±2,6 ^{Bb}	5,4±3,8 ^{Ba}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey (p<0,05). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student (p<0,05).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

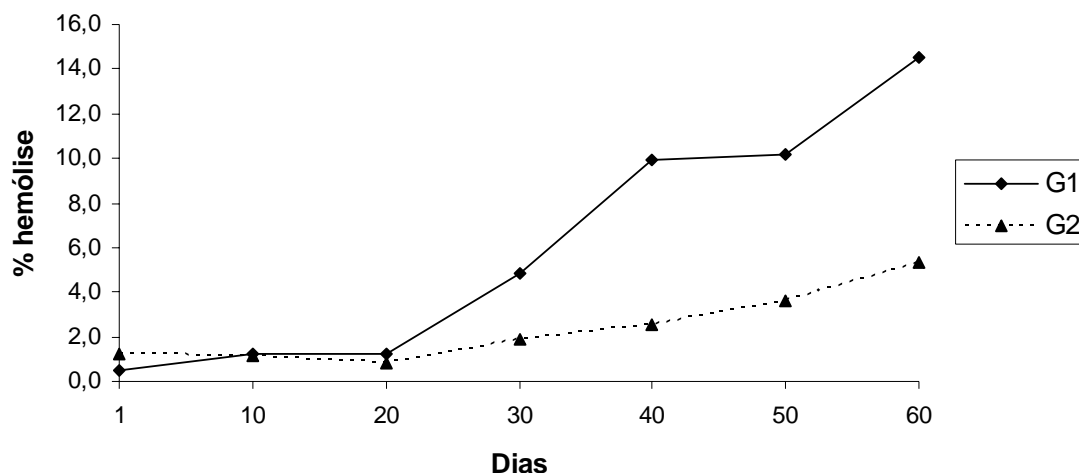


Figura 12. Representação dos valores médios do percentual de hemólise do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.
 G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.
 G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

Tabela 12. Valores médios e desvio padrão do hematócrito (%) do sangue canino armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	44,8±15,4 ^{Aa}	43,7±16,2 ^{Aa}	44,3±17,4 ^{Aa}	45,3±17,9 ^{Aa}	43,2±19,3 ^{Aa}	43,8±21,2 ^{Aa}	40,6±24,2 ^{Aa}
G2	43,3±19,3 ^{Aa}	43,3±20,6 ^{Aa}	45,0±22,3 ^{Aa}	46,3±23,2 ^{Aa}	47,8±24,6 ^{Aa}	48,5±24,6 ^{Aa}	48,2±25,1 ^{Aa}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,05$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

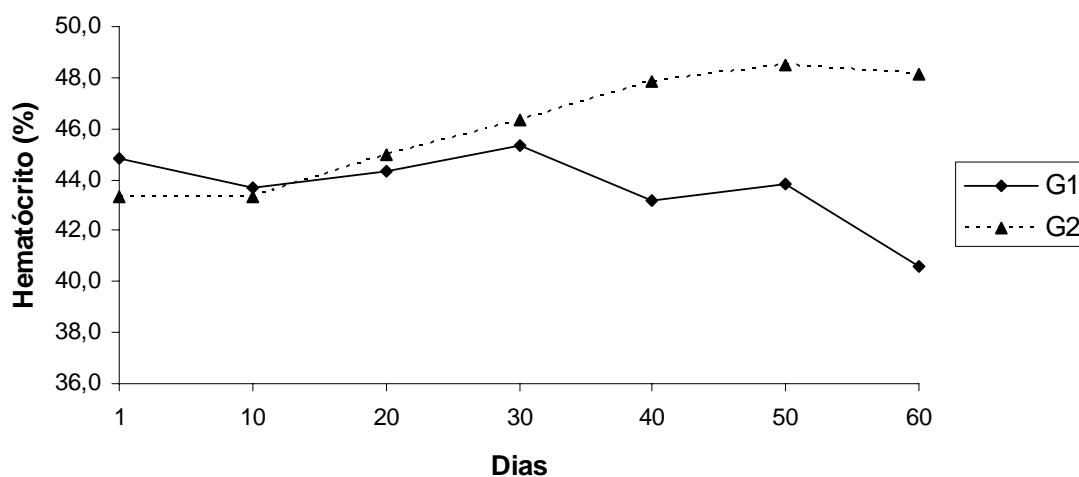


Figura 13. Representação dos valores médios do hematócrito do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.
 G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.
 G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

3.3.10 L-Lactato

Considerando grau de significância de 10%, foi observado aumento significativo ($p < 0,1$) para as médias do lactato na comparação entre os grupos, sendo que o G2 apresentou menores médias ao final do estudo (Tabela 13 e Figura 14).

Na avaliação entre os dias foi observado aumento significativo entre o primeiro e o 20º dias ($p < 0,1$) para ambos os grupos. A partir de então foi mantida estável as médias nos dois grupos.

Na análise das médias é possível avaliar que o grupo 2 apresentou melhores resultados na preservação eritrocitária a partir do 10º dia, principalmente porque neste grupo as médias do lactato aumentaram em no máximo 3 vezes o valor inicial, enquanto que no grupo 1, houve aumento de mais de 6 vezes comparado com as médias do primeiro dia. Este resultado se deu pela melhor manutenção do pH no grupo 2, mantendo valores superiores, pois houve menor exigência de produção de energia pela quebra de carboidratos com conseqüente redução na produção do lactato. Para Hess et al. (2002), o excesso do lactato causa a degradação dos constituintes eritrocitários, particularmente o 2,3-DPG.

Tabela 13. Valores médios e desvio padrão do lactato (mg/dl) do sangue canino armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	37,1±18,6 ^{Ac}	138,0±59,8 ^{Ab}	158,2±78,8 ^{Aab}	233,5±74,7 ^{Aa}	213,1±59,6 ^{Aab}	206,9±39,9 ^{Aab}	231,5±43,6 ^{Aa}
G2	55,8±25,8 ^{Bc}	134,4±65 ^{Bb}	154,7±52,7 ^{Bab}	155,6±44,5 ^{Ba}	152,8±38,8 ^{Bab}	170±25,3 ^{Bab}	186,9±30,2 ^{Ba}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,1$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

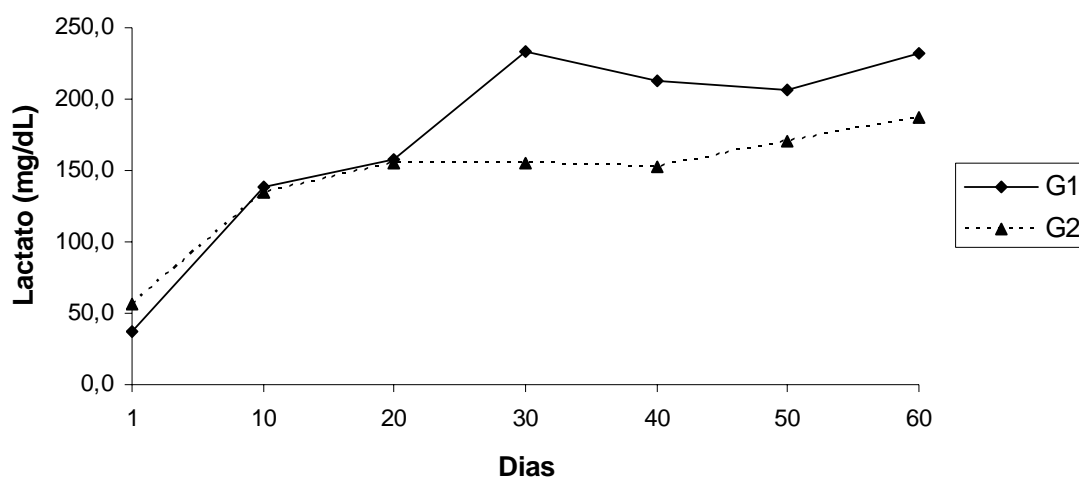


Figura 14. Representação dos valores médios do lactato (mg/dl) do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.
 G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.
 G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

Em análise de correlação entre a variável lactato em função do pH, foi observado para ambos os grupos correlação negativa, demonstrando coeficiente de determinação de 97% ($r = -0,9702$) para o G1 e de 94% ($r = -0,9413$) para o G2. Desta forma, a redução do pH é explicado em 97% e 98% pelo aumento do lactato para o G1 e G2 respectivamente (Figura 15). Esta correlação, assim como os dados, também foram encontrados por Hess et al. (2001), quando em estudos com sangue humano sob diferentes soluções aditivas.

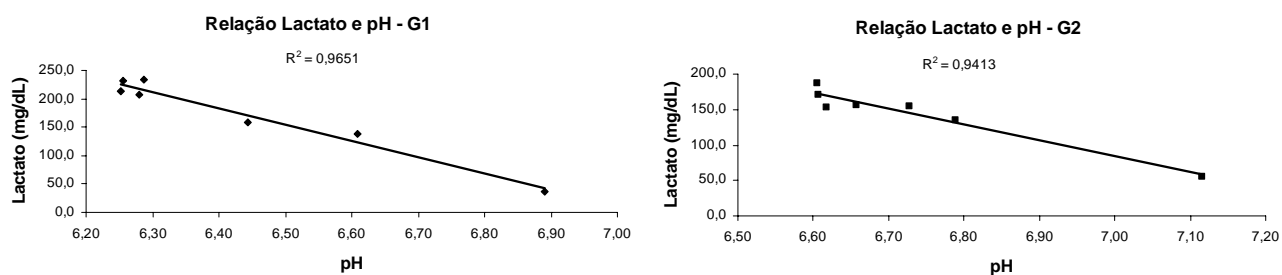


Figura 15. Representação gráfica da comparação entre a variável lactato em função do pH.

3.4 Conclusões

Após a análise dos resultados obtidos e nas condições deste estudo, pode-se concluir, até o 60^o dia de armazenamento do sangue canino em bolsas CPD/SAG-M e CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico que:

O 2,3-Difosfoglicerato continua a ser produzido após a coleta alcançando valores máximos por volta do 10^o dia de conservação indicando ser este o melhor momento para a utilização deste hemoderivado;

A bolsa CPD/SAG-M acrescida de fosfato dissódico demonstrou vantagens quando comparada a bolsa CPD/SAG-M, principalmente no que se referem às variáveis 2,3-DPG e pH;

É mais indicado o uso das bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico para a conservação do sangue canino sob refrigeração em período máximo de 60 dias de conservação em relação às bolsas CPD/SAG-M.

4. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO SANGUE CANINO CONSERVADO EM BOLSAS CPD/SAG-M E CPD/SAG-M ACRESCIDAS DE FOSFATO DISSÓDICO

4.1 Introdução

As bases da conservação do sangue para a transfusão estão na dependência de uma adequada coleta, da temperatura de conservação, da frequência de homogeneização durante o armazenamento, além da manutenção dos parâmetros bioquímicos (AUTHEMENT et al, 1987; LOPES et al., 1995; HÖGMAN et al, 2002) e morfológicos observados no sangue (HESS, 2009). Para tal, as soluções anticoagulantes e conservadoras contidas no interior das bolsas de transfusão são fundamentais, pois estas suprirão os substratos necessários para a manutenção da integridade celular (HOLME, 2005).

As Lesões de Conservação (LC) são todas aquelas alterações bioquímicas e morfológicas, ocorridas nos eritrócitos durante o processo de conservação. Estas lesões são exemplificadas principalmente pela redução dos níveis do pH, que por sua vez, influi diretamente na redução do trifosfato de adenosina (ATP). Este nucleotídeo está presente no interior das células e fornece energia (Figura 1) que, dentre várias ações, manterá o controle do balanço eletrolítico da bomba de sódio e potássio, e da sua forma com preservação da flexibilidade celular (SCOTT et al., 2005).

Da mesma forma como ocorre com o ATP, as lesões de conservação também podem ser mensuradas pela avaliação do 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Este está ligado à hemoglobina e é responsável pela afinidade desta pelo oxigênio. Desta forma, a redução deste componente no interior das células acarretará em maior afinidade por este gás, dificultando a liberação do oxigênio aos tecidos (HÖGMAN et al, 2002; KURUP et al, 2003). A produção do 2,3-DPG consome energia e se dá pelo desvio Rapoport-Leubering da via glicolítica (Figura 1) (HESS e BEYER, 2007).

As soluções aditivas (SA) são preparados que devem ser adicionados ao sangue total, composto pelas células sanguíneas e plasma, ou após a centrifugação e remoção deste. As SAs evitam a perda de nutrientes e permitem a extensão do tempo de conservação dos componentes celulares (HOLME, 2005).

Hess e Beyer (2007) observaram que a adição de soluções tampão, particularmente o fosfato, tem trazido novas perspectivas na manutenção dos

componentes hematológicos, tais como o 2,3-DPG e ATP, preservando suas características e potencializando não somente a vida útil das células como otimizando sua ação no organismo receptor.

Wardrop et al. (1994) observaram que o sangue canino conservado em bolsas contendo citrato, como anticoagulante, fosfato monobásico, como tampão, dextrose e adenina (CPDA-1), pode ser mantido por até 21 dias. Wardrop et al. (1997) acrescentam que o sangue canino mantido em bolsas CPDA-1 adicionadas da solução preservativa Nutricel pode ser armazenado por até 35 dias. Em estudo comparativo, Costa Junior et al. (2008) observaram superioridade das bolsas contendo citrato, fosfato monobásico, dextrose com solução aditiva de glicose, adenina e manitol em solução salina (CPD/SAG-M) na conservação do sangue total canino, quando este pode ser mantido por no máximo 41 dias.

Em estudos com sangue humano, Hess et al. (2002) observaram que a adição de fosfato dissódico ou dibásico (FD) às SAs propicia melhor manutenção do pH comparado ao fosfato monossódico ou monobásico (FM), potencializando a preservação de diferentes compostos intracelulares, reduzindo os danos sofridos pelos eritrócitos e permitindo uma ampliação do período de conservação do sangue armazenado. Os compostos contendo FD já possuem permissão para uso em soluções conservadoras para bancos de sangue nos Estados Unidos e Europa (HESS et al., 2000a).

Considera-se que a integração pH e ATP está intimamente relacionada na manutenção do 2,3-DPG, pois em ambiente com pH baixo haverá o bloqueio da enzima difosfoglicerato mutase (enzima que converte o 1,3-difosfoglicerato em 2,3-DPG) e ativação da difosfoglicerato fosfatase (enzima que decompõe o 2,3-DPG). Além disto, a célula necessita de energia para a manutenção dos níveis normais, de tal forma que existe um consumo basal para sua manutenção (SCOTT et al. , 2005). Entretanto, com a redução do pH causada pela produção de lactato e CO₂, haverá redução da glicólise e conseqüente diminuição da produção de ATP, particularmente pela inativação das enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase, substâncias que participam da via glicolítica e que gera energia na forma de ATP (HÖGMAN et al., 2002; HOLME, 2005). Com a redução dos níveis do ATP ocorrerá alterações no formato normal e aumento da fragilidade da membrana, ocasionando maior grau de hemólise, tanto durante a conservação como após a sua administração no paciente (EISENBRANT e

SMITH, 1973; GUYTON e HALL, 1997; HÖGMAN et al., 2002; KURUP et al., 2003).

As alterações morfológicas ocorridas com os eritrócitos durante o processo de armazenamento acarretarão em perda do formato bicôncavo e da integridade da membrana culminando no aumento dos níveis de hemoglobina e potássio plasmáticos (HOLME, 2005), além de estarem relacionadas a reações pós-transfusão em pacientes humanos (LION et al., 2009). Greenwalt (2006) relatou que devido às modificações morfológicas sofridas pelas células, estas serão rapidamente eliminadas pelo Sistema Monocítico Fagocitário (SMF) do paciente reduzindo sua vida útil no organismo receptor.

Um eritrócito canino normal possui diâmetro médio de 7 μ m e para que este exerça sua função de transportar oxigênio aos tecidos é necessário a manutenção das características de forma e flexibilidade da célula. Isto denota preservação das proteínas de membrana e do seu citoesqueleto (THRALL, 2007).

A mais notável alteração morfológica percebida nos eritrócitos estocados é perda da biconcavidade adquirindo formato esferóide (esferócito) ou equinócítico ainda nos primeiros momentos do processo de conservação do sangue (HESS e GREENWALT, 2002). Embora o esferócito seja caracteristicamente um eritrócito de diâmetro menor, a perda da biconcavidade com forma esférica e sem espículas na membrana são consideradas no processo de conservação, por diversos autores, como esferócitos. Muitas células apresentam ambas as características, esferócito e espículas na membrana, desta forma podem ser denominadas de esferoequinócitos. Em muitos casos, estas alterações são reversíveis apenas com a ressuspensão destas células em plasma fresco, com concomitante recuperação do ATP e do 2,3-DPG (BAIN, 2006; HESS, 2000b; HESS, 2009).

Sparrow et al. (2007) relataram não haver diferenças morfológicas no decorrer do período de estocagem dos eritrócitos. Desta forma, as alterações na forma, observadas nos primeiros dias de estocagem são, em número, semelhantes às observadas ao fim de 41 dias de armazenamento. Entretanto, Lion et al (2009) observaram aumento significativo das formações espiculares na membrana dos eritrócitos estocados no mesmo período.

Diversos fatores levam às alterações morfológicas dos eritrócitos. Para Lion et al. (2009) mudanças na membrana por danos oxidativos inclusive à

própria hemoglobina, influxo de cálcio e redução do pH e do ATP são grandes responsáveis pela mudança na conformação e deterioração, algumas vezes irreversível, da membrana plasmática. Já Bain (2006) acrescenta que, com a ação das enzimas inflamatórias liberadas pelos leucócitos presentes no interior das bolsas, ocorrerão lesões da membrana plasmática com conseqüente exposição de componentes internos da membrana bilipídica, possibilitando a ligação com imunoglobulinas que culminarão em alterações na conformação e elasticidade normal dos eritrócitos.

Estudos revelam que uma das primeiras alterações sofridas pela célula é a perda da capacidade de regulação dos canais iônicos, com conseqüente entrada de íons cálcio (Ca^+) no interior da célula. Isto ocorre pela liberação de substâncias no interior das bolsas, algumas delas oriundas de prostaglandinas ativadas, que levam à liberação do fator de ativação plaquetário gerando uma série de reações em cadeia que irão culminar na desorganização da membrana plasmática, aumentando a expressão da fosfatidilserina (FS) e permitindo o influxo excessivo de Ca^+ . A FS irá ativar a calpaina degradando a espectrina e conseqüentemente o citoesqueleto. Além disto, o excesso de Ca^+ aumenta diretamente a atividade da transglutaminase 2 (TG2) que, por reação cruzada, degrada o citoesqueleto. A combinação da ação da calpaina e da TG2 é o grande responsável pela redução da elasticidade do citoesqueleto e deformidade celular (LANG et al., 2003; BAIN, 2006).

Os eritrócitos estão constantemente expostos ao estresse oxidativo. Com o influxo de oxigênio (O_2) há a formação de metahemoglobina (met-Hb) que, em condições normais, é reciclada em hemoglobina pela metahemoglobina redutase. Porém, este mecanismo necessita de energia na forma de ATP e, sendo assim, situações com baixos níveis de ATP culminarão na formação de uma hemoglobina desnaturada que se ligará à espectrina, formando hemicromos que alteram o citoesqueleto aumentando a rigidez celular formando estruturas espiculares (equinócitos) e microvesículas (BAIN, 2006; KRIEBARDIS et al., 2006; HESS, 2009).

Com o passar do período de conservação ocorre o rompimento destas espículas ou microvesículas promovendo a liberação de material citosólico e hemoglobina. Com a ruptura das microvesículas, ocorre também a exposição da fosfatidilserina que normalmente se localiza na face interna da membrana. A

expressão excessiva da FS componente expõe a célula à ação de imunoglobulinas que causarão danos à membrana promovendo o desprendimento de pequenos fragmentos da mesma e saída de material citoplasmático (HESS, 2009). No paciente, este mecanismo pode levar a reações inflamatórias e trombóticas (LION et al., 2009), particularmente em pacientes pós-cirúrgicos que receberam sangue armazenado a mais de 20 dias (KOCK et al., 2008).

Segundo Bain (2006) e Hess (2009), a ação destas imunoglobulinas sobre os eritrócitos seriam o princípio básico da formação dos esferóides além do mecanismo que explicaria a redução do diâmetro celular. Entretanto, para Korte e Verhoeven (2004), as soluções presentes nas bolsas são capazes de promover edemaciação das células, com conseqüente aumento em seu volume. Esta afirmação é confirmada por Lion et al. (2009), quando relataram que em baixas temperaturas a bomba de sódio e potássio apresenta uma redução na sua função permitindo a saída de potássio e entrada de sódio. Desta forma é plausível pensar que haja maior influxo de água na célula, promovendo o aumento do diâmetro eritrocitário.

Segundo afirmações de Hess e Greenwalt (2002), este efeito edemaciante sobre as células é desejável, pois reduziria alterações morfológicas como a formação de equinócitos.

Objetiva-se com este estudo avaliar os parâmetros morfológicos do concentrado de eritrócitos canino conservado em bolsas CPD/SAG-M acrescidas com fosfato dissódico ao longo de 60 dias de refrigeração bem como reconhecer se existe relação entre as variáveis morfológicas e bioquímicas a fim de estimar os valores bioquímicos através da avaliação morfológica dos eritrócitos conservados.

4.2 Materiais e Métodos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (protocolo n° 69/2007).

4.2.1 Localização dos procedimentos

A coleta do sangue e o armazenamento foram realizados no Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa

(UFV) – Viçosa (MG). A centrifugação das bolsas para a obtenção do Concentrado de Eritrócitos (CE) foi realizada na Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS), no núcleo regional de Ponte Nova – Viçosa (MG). Os exames laboratoriais foram realizados nos Laboratórios de Análises Clínicas HEMOLAB e do Hospital Veterinário da UFV, no Laboratório de BIOFARMACOS vinculado ao Departamento de Bioquímica da UFV e no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química da UFV.

4.2.2 Coleta das Amostras

Foi utilizado sangue de seis cães adultos, machos, não castrados sendo dois da raça Pit Bull, dois Rottweilers e dois Labradores. Os animais possuíam peso superior a 30 kg, de comportamento dócil, em boas condições de saúde, verificados pelo exame físico, hemograma, pesquisa de hematozoários e parasitológico de fezes. Esses animais tinham hematócrito superior a 40% e de proprietários residentes na cidade de Viçosa (MG).

O procedimento de coleta foi realizado na Sala de Fluidoterapia do Hospital Veterinário, sobre uma mesa de aço inoxidável, posicionando os animais em decúbito lateral.

A contenção foi manual e executada por dois auxiliares. A venipunção foi feita na veia jugular, posicionando a agulha caudocranialmente, após a depilação e anti-sepsia com solução de álcool 70%.

O sangue foi coletado em bolsas CPD/SAG-M¹¹ e centrifugados a 5186 G por 5 minutos para a obtenção do concentrado de eritrócitos (CE). Após centrifugação o CE foi transferido para a bolsa satélite onde continha a solução aditiva (SA) de adenina, glicose e manitol em solução salina. Posteriormente a transferência o conteúdo desta bolsa foi dividido em duas bolsas de tal forma que ambas possuiriam a mesma quantidade de CE em solução aditiva, atestada pelo peso e numeradas de acordo com o animal doador. Com isto obteve-se de cada animal duas bolsas com CE.

Após os procedimentos anteriores, a uma das bolsas de cada animal foi adicionada solução de fosfato dissódico conforme a Tabela 1, de tal forma que

¹¹ Bolsas plásticas triplas, para coleta de sangue – Fresenius hemocare.

esta, após diluição ao volume pré-existente no interior da bolsa, apresentasse ao final da mistura, a concentração de 27 mmol/l de Na_2HPO_4 e 9 mmol/l de NaCl para equilíbrio osmótico evitando a lise eritrocitária.

Tabela 14: Composição das soluções aditivas (SAs) a serem acrescentados nas bolsas satélites, e determinação dos grupos de acordo com a concentração do fosfato dissódico (Na_2HPO_4).

Grupos	Adição do Na_2HPO_4 (mmol/l)	Adição de NaCl (mmol/l)	Volume total do aditivo (ml)
1	0	0	0
2	54	18	50

Após a adição da solução de fosfato dissódico, as bolsas foram devidamente identificadas de acordo com a Tabela 15 e conduzidas à refrigeração de 4 a 8° C.

Tabela 15. Identificação das bolas e separação nos Grupos 1 e 2.

Bolsas	Animal	Composição das Bolsas	Grupo
A1	A	CPD/SAG-M	1
B1	B	CPD/SAG-M	1
C1	C	CPD/SAG-M	1
D1	D	CPD/SAG-M	1
E1	E	CPD/SAG-M	1
F1	F	CPD/SAG-M	1
A2	A	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2
B2	B	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2
C2	C	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2
D2	D	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2
E2	E	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2
F2	F	CPD/SAG-M com fosfato dissódico	2

4.2.3 Dias das Avaliações Laboratoriais

As avaliações laboratoriais, morfológicas e morfométricas do sangue contido nas bolsas foram realizadas em sete dias diferentes, com intervalos de 10 dias entres estes, iniciando imediatamente após a centrifugação e adição do Fosfato Dissódico às bolsas do grupo 2.

4.2.4 Avaliação Laboratorial

Antes da avaliação das amostras, foi realizada a homogeneização do sangue contido nas bolsas, seguida da retirada asséptica e em ambiente de capela de 15 ml de sangue para a mensuração das variáveis bioquímicas e preparação do esfregaço para análise morfológica e morfométrica das células.

Foi coletada amostra para mensuração do 2,3-DPG, percentual de hemólise, potássio e pH.

Para a avaliação do 2,3- Difosfoglicerato (2,3-DPG) foram utilizados 5 ml do sangue retirado das bolsas de ambos os grupos e centrifugado para a obtenção de 1mL de concentrado de eritrócitos. A partir daí, as amostras foram submetidas à desproteinização pelo ácido perclórico 0,6 M e neutralizadas com carbonato de potássio 2,5 M. Na seqüência foi realizada a centrifugação para separar o sobrenadante utilizado nas reações bioquímicas que determinaram os valores do 2,3-DPG. Foi utilizado o Kit comercial para análise do 2,3-DPG¹² por espectrofotometria em luz ultravioleta.

Considerando que foi adicionado um volume extra de 50 mL de solução de Fosfato Dissódico, os valores do 2,3-DPG para ambos os grupos foram corrigidos pelo hematócrito obedecendo a seguinte fórmula:

$$2,3\text{-DPG}_{(\text{corrigido})} = 2,3\text{-DPG}_{(\text{leitura})} \times 100 / \text{Ht}$$

$$2,3\text{-DPG}_{(\text{corrigido})} = 2,3\text{-Difosfoglicerato corrigido}$$

$$2,3\text{-DPG}_{(\text{leitura})} = 2,3\text{-Difosfoglicerato encontrado na leitura}$$

$$\text{Ht} = \text{Hematócrito}$$

Para análise do percentual de hemólise (% hemólise) foi mensurada a hemoglobina livre e total através do kit enzimático comercial com leitura por espectrofotometria colorimétrica¹³, e a mensuração do hematócrito pela técnica do microematócrito. Os dados foram submetidos à fórmula de percentual de hemólise segundo Wardrop et al. (1997):

$$\% \text{ hemólise} = (100 - \text{Ht}) \times \text{Hb livre} / \text{Hb total}$$

$$\text{Ht} = \text{Hematócrito}$$

$$\text{Hb livre} = \text{Hemoglobina livre (g/dl)}$$

$$\text{Hb total} = \text{Hemoglobina total (g/dl)}$$

Para as medições do potássio plasmático, foi realizada a leitura em aparelho de fotometria de chama¹⁴. Para a calibração do aparelho foi utilizado o Padrão¹⁵, cuja concentração do potássio era de 5 mEq/l. Considerando que foi adicionado um volume extra de 50 mL de solução de Fosfato Dissódico, os valores do potássio para ambos os grupos foram corrigidos pelo hematócrito obedecendo a seguinte fórmula:

¹² Roche Diagnostics – Germany / 30 determinações – UV.

¹³ Espectrofotômetro – Fc – 130 – CELM.

¹⁴ Fotômetro de Chama Micronel – B 462.

¹⁵ Padrão para análise de Sódio e Potássio por Fotometria de Chama – Laboratório CELM.

$$K_{(\text{corrigido})} = K_{(\text{leitura})} \times 100 / Ht$$

$K_{(\text{corrigido})}$ = Potássio corrigido

$K_{(\text{leitura})}$ = Potássio encontrado na leitura

Ht = Hematócrito

As mensurações do pH foi realizada através de aparelho de hemogasometria¹⁶.

Para a avaliação morfológica e morfométrica foi confeccionado um esfregaço com uma gota do sangue retirado das bolsas nos dias estabelecidos. O esfregaço foi fixado e corado pelo método de Romanowsky (Panótico Rápido¹⁷). Após secagem foi montado com Entellan entre lâmina e lamínula.

As lâminas foram focalizadas na área da cauda do esfregaço, na região de monocamada eritrocitária em aumento de 1000x e fotografadas em fotomicroscópio¹⁸ no Departamento de Veterinária da UFV. As imagens obtidas foram sobrepostas por grátícula de 10x10, onde cada ponto de intersecção superposto a um eritrócito foi quantificado e a célula classificada de acordo com a Tabela 16. Foram fotografados 10 campos de observação de onde se obtiveram 1000 pontos de intersecção superpostos a eritrócitos de cada esfregaço das amostras em cada dia do estudo. Demais estruturas superpostas às intersecções, tais como fragmentos celulares, não foram quantificadas.

Tabela 16. Classificação das células eritrocitárias de acordo com a morfologia.

Classificação	Característica morfológica
Normal	Aspecto normal sem alterações morfológicas
Esferóide	Célula sem biconcavidade e sem espiculações
Esferoequinócito	Célula esferóide com espiculações distribuídas na superfície da célula
Poiquilócito	Outras alterações morfológicas que não o esferóide ou esferoequinócito
Alterada	Somatório dos percentuais para o esferoequinócito e poiquilócito

Para as mensurações morfométricas foi utilizado a régua micrométrica cuja menor subdivisão apresentava 10 micrômetros (10 μm) de extensão. Esta escala foi fotografado em fotomicroscópio. Com esta imagem foi ainda gerada uma nova escala com 20 subdivisões de 0,5 micrômetros (0,5 μm) cada

¹⁶ Gasômetro ABL 5 – Radiometer / Copen Hagen.

¹⁷ Newprov - Instant Prov - Conjunto de corantes para coloração diferencial rápida em hematologia.

¹⁸ Fotomicroscópio Olympus CX31 com câmera Olympus SC20 e tubo adaptador de imagem Olympus U-CMAD3.

utilizando o editor de imagem Adobe Photoshop¹⁹. Esta escala de 10 micrômetros e com subdivisões de 0,5 micrômetros foi sobreposta às fotomicrografias dos esfregaços sanguíneos. As células foram medidas em seu comprimento e largura, permitindo a obtenção do diâmetro médio dos eritrócitos. De acordo com a avaliação das medidas morfométricas para cada repetição no dia analisado, e estas apresentando um desvio padrão inferior a 5%, optou-se por mensurar sete células para cada classificação morfológica, em cada um dos 10 campos observados, por dia de observação. Totalizando 70 mensurações para cada repetição em cada dia analisado. Desta forma obteve-se um montante representativo das amostragens morfométricas em cada uma das repetições.

4.2.5 Análise Estatística

A avaliação estatística foi feita pelo programa estatístico SAEG²⁰, utilizando-se para os dados paramétricos a análise de variância (ANOVA). Posteriormente os dados que passaram pelas premissas da análise de variância, foram submetidos ao teste de Tukey, com grau de significância de 5% ($p < 0,05$), que avaliou o comportamento das variáveis no decorrer do tempo.

Na comparação entre grupos, foi realizado o teste t de Student com grau de significância de 5% ($p < 0,05$).

Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Pearson no sentido de verificar correlação entre as variáveis e posteriormente o teste de Wilcoxon para determinação do comportamento no tempo ($p < 0,05$).

4.3 Resultados e Discussões

4.3.1 Potássio plasmático

Na análise do sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M e CPD/SAG-M Modificada no período do estudo, foi observado um acréscimo significativo nos níveis de potássio de ambos os grupos. Na comparação entre grupos, também foi observada diferença significativa sendo as médias do grupo 1 (G1) superiores às observadas no grupo 2 (G2) (Tabela 17 e Figura 16).

¹⁹ Editor de imagens Adobe Photoshop CS2 Versão 9.0, 1990-2005.

²⁰ SAEG Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

Por ser um íon intracelular, o aumento nos níveis de potássio extracelular representa uma redução na capacidade da membrana em manter as concentrações de potássio no meio intracelular, ou até mesmo, indicar hemólise. Entretanto, segundo Lion et al. (2009), em baixas temperaturas há uma redução da função da bomba de sódio e potássio, permitindo a saída de íons citosólicos, levando a um meio extracelular hipercalêmico. Considerando que ambos os grupos estiveram expostos às mesmas condições de temperatura, a explicação para as diferenças nas médias de potássio plasmático se dá em uma melhor preservação do ATP pelo G2. Segundo Kurup et al. (2003), este nucleotídeo está intimamente relacionado à membrana plasmática, sendo também, responsável pelo equilíbrio eletrolítico da célula. Desta forma é possível observar que houve melhor preservação da membrana plasmática da célula no grupo tratado com o fosfato dissódico.

Tabela 17. Valores médios* e desvio padrão de potássio plasmático (mEq/l) do sangue cães armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	4,3±1,7 ^{Ad}	7,9±2,1 ^{Ac}	9,5±1,3 ^{Abc}	10,3±2,1 ^{Aab}	11,9±2,4 ^{Aa}	11,8±1,9 ^{Aab}	14,0±5 ^{Aab}
G2	3,3±1 ^{Bd}	6,3±1,8 ^{Bc}	8,0±0,9 ^{Bbc}	9,2±1,8 ^{Bab}	8,6±1,2 ^{Ba}	9,5±2,1 ^{Bab}	8,9±2,2 ^{Bab}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,05$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

* Valores corrigidos pelo hematócrito (100%)

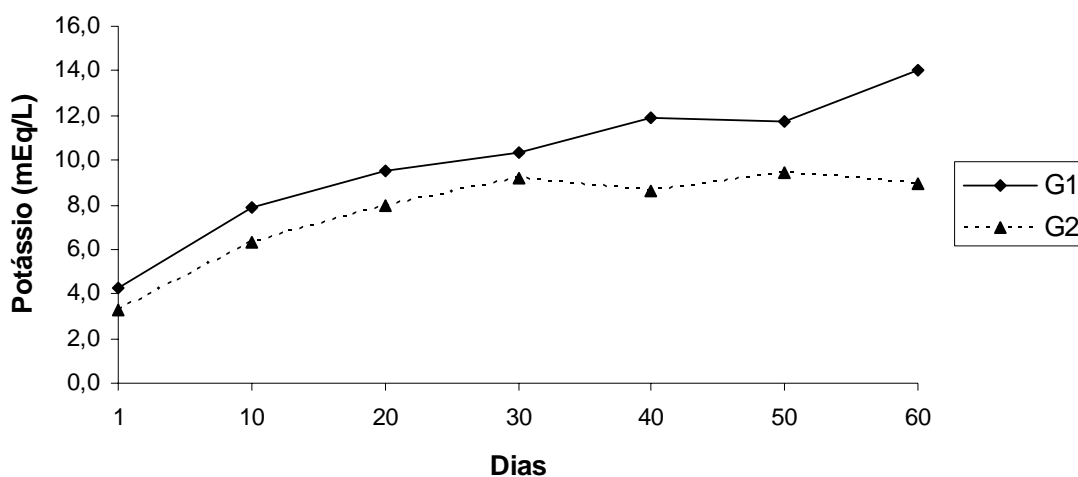


Figura 16. Representação dos valores médios do Potássio (mEq/l) do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

Feita a correlação entre os níveis médios de potássio em função do pH para o G1 e G2 respectivamente, observou-se significância nas comparações apresentando forte correlação negativa para G1 ($r=-0,9515$) e G2 ($r=-0,9779$), resultando em um alto coeficiente de correlação para estes grupos (Figura 17). Desta forma, pode-se dizer que os valores do potássio plasmático são inversamente proporcionais aos valores do pH sanguíneo. Isto pode ser confirmado pelos achados indicativos da elevação do potássio extracelular em 91% no G1 e 96% no G2, elevação esta justificada pela queda do pH. Estes dados concordam com as afirmações de Bush (2004), quando disse que a membrana plasmática é diretamente influenciada pela redução do pH, levado a uma migração do potássio contido no fluido intracelular para o meio extracelular.

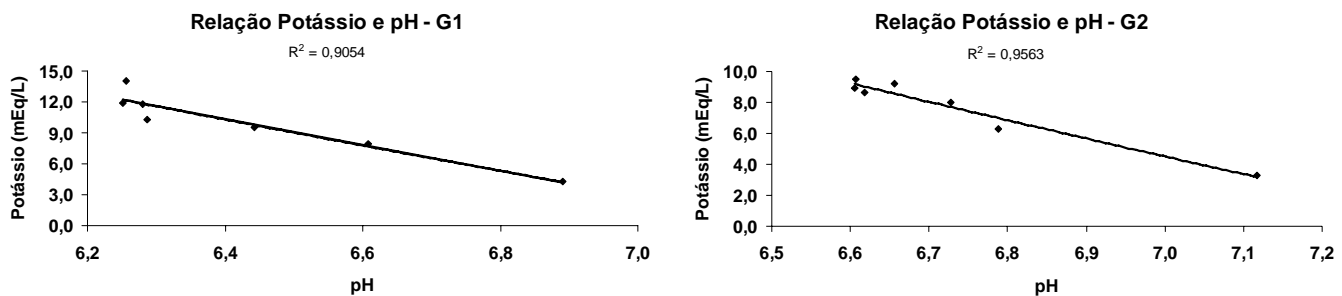


Figura 17. Representação gráfica da comparação entre a variável potássio plasmático em função do pH.
 G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.
 G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

4.3.2 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG)

Houve no primeiro dia de análise valores abaixo do limiar mínimo de mensuração para ambos os grupos, entretanto a partir do 10º dia de conservação observou-se um aumento do 2,3-DPG nos dois grupos, sendo que do D10 ao D60, as médias do G2 foram superiores às observadas no G1.

Da mesma maneira foram constatadas diferenças significativas nas médias entre os dias de conservação, demonstrando redução dos níveis do 2,3-DPG a partir do 20º dia (Tabela 18 e Figura 18).

A explicação para os valores próximos de zero no primeiro dia pode estar no fato de que inicialmente o sangue é coletado na bolsa primária que, embora contenha citrato e dextrose tamponados com fosfato, esta solução possua pH ligeiramente inferior a 6. Devido a isto, é possível que o metabolismo eritrocitário reduza consideravelmente, aumentando o desgaste do 2,3-DPG levando-o a valores muito baixos.

Chiaramonte (2004) e Lion et al. (2009) relatam que o 2,3-DPG sofre de fato redução de seus níveis ainda nas primeiras horas de armazenamento, entretanto não mencionam a recuperação desta substância ainda durante o processo de conservação.

Neste estudo foi observado um aumento significativo nos níveis do 2,3-DPG no D10 de ambos os grupos. Estes resultados contrariam os achados por Eisenbrandt e Smith (1973), quando estudaram o comportamento bioquímico do sangue canino armazenado em solução de ácido cítrico e dextrose. Entretanto corroboram os achados de Costa Junior et al. (2008), que observaram aumento dos níveis de 2,3-DPG no 7^o dia de armazenamento do sangue canino total preservado em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.

A explicação para o aumento nos níveis do 2,3-DPG após o D1, alcançando picos no 10^o dia, para ambos os grupos, pode estar no fato de que as soluções conservantes das bolsas já possuem altos níveis de adenina, energia (na forma de dextrose) e fosfato.

O melhor desempenho do G2 pode ser explicado pelo menor consumo de energia na forma do ATP para a manutenção do 2,3-DPG, conseqüentemente levando a uma maior preservação do ATP celular. Sendo assim, é possível hipotetizar que haja maior disponibilização deste nucleotídeo para as funções de manutenção da membrana celular e conseqüente preservação do formato e flexibilidade dos eritrócitos. Além do mais, Bremner et al. (2002) e Scott et al. (2005) explicam que quantidades maiores de Fosfato Inorgânico (Pi) elevam a concentração de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) o que elevaria a concentração do 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG), considerado o precursor do 2,3-DPG.

Lion et al. (2009) presumem que após 14 dias de conservação os eritrócitos humanos têm sua taxa metabólica reduzida pela depleção de energia, diminuição da glicólise e não reciclagem de importantes fatores antioxidantes. Estes fatores antioxidantes podem levar a redução dos níveis do 2,3-DPG, do formato e flexibilidades normais dos eritrócitos.

Tabela 18. Valores médios* e desvio padrão de 2,3-Difosfoglicerato (mmol/l) do sangue cães armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	0±0 ^{Ac}	2,38±0,95 ^{Aa}	0,90±0,8 ^{Ab}	0,67±0,57 ^{Abc}	0,67±0,6 ^{Abc}	0,31±0,28 ^{Abc}	0,61±0,4 ^{Abc}
G2	0±0 ^{Ac}	2,72±1,18 ^{Ba}	1,78±0,87 ^{Bb}	1,18±0,66 ^{Bbc}	0,82±1 ^{Bbc}	0,66±0,67 ^{Bbc}	0,72±0,61 ^{Bbc}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey (p<0,05). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student (p<0,05).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

* Valores corrigidos pelo hematócrito (100%)

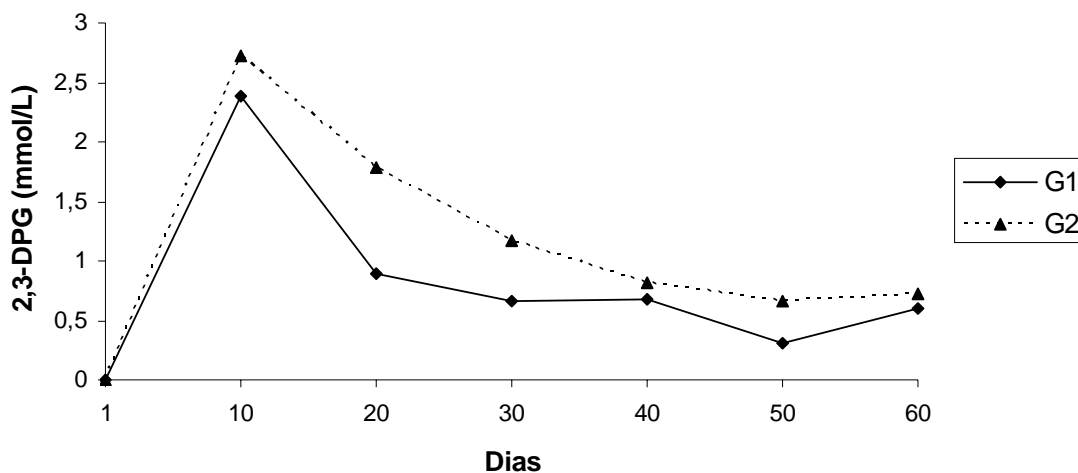


Figura 18. Representação dos valores médios do 2,3-DPG (mmol/l) do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas do fosfato dissódico.

4.3.3 pH

Na análise do pH, foi encontrada diferença significativa na comparação entre os grupos e durante o tempo do estudo (Tabela 19 e Figura 19).

Os valores de pH no primeiro dia diferem aos encontrados por Wardrop et al. (1994) e Costa Junior et al. (2008), quando em estudo com sangue canino em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M, observaram pH médio de 6,98. Entretanto, os dados observados no G2, corroboram os fornecidos por Kurup et al. (2003), em seu trabalho com sangue humano, onde estes obtiveram valores acima de 7 para o sangue conservado em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.

O decréscimo do pH logo no primeiro dia confirma os achados de Ribeiro Filho et al. (1994) e Hess et al. (2002), quando observaram que o pH das soluções contidas nas bolsas é ácido. Desta forma, é capaz de reduzir o pH do sangue ainda no primeiro dia de armazenamento. Segundo Ribeiro Filho et al. (1994) e Holme (2005), a queda do pH durante o tempo de análise se dá pelos metabólitos

ácidos provenientes do metabolismo anaeróbico dos eritrócitos durante a conservação.

Considerando que o pH e o ATP estejam intimamente relacionados, Kriebardis et al. (2006), esclarecem que a célula necessita de energia para a reciclagem da metahemoglobina (met-Hb). Caso este processo não ocorra, haverá formação excessiva de hemoglobina desnaturada que se ligará às proteínas de membrana aumentando a rigidez celular e formando estruturas espiculares (equinócitos) e microvesículas.

Tabela 19. Valores médios e desvio padrão de pH sanguíneo do sangue cães armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	6,89±0,11 ^{Aa}	6,61±0,17 ^{Ab}	6,44±0,23 ^{Abc}	6,29±0,27 ^{Ac}	6,25±0,26 ^{Ac}	6,28±0,23 ^{Ac}	6,26±0,23 ^{Ac}
G2	7,12±0,08 ^{Ba}	6,79±0,21 ^{Bb}	6,73±0,08 ^{Bbc}	6,66±0,12 ^{Bc}	6,62±0,16 ^{Bc}	6,61±0,19 ^{Bc}	6,61±0,2 ^{Bc}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,05$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

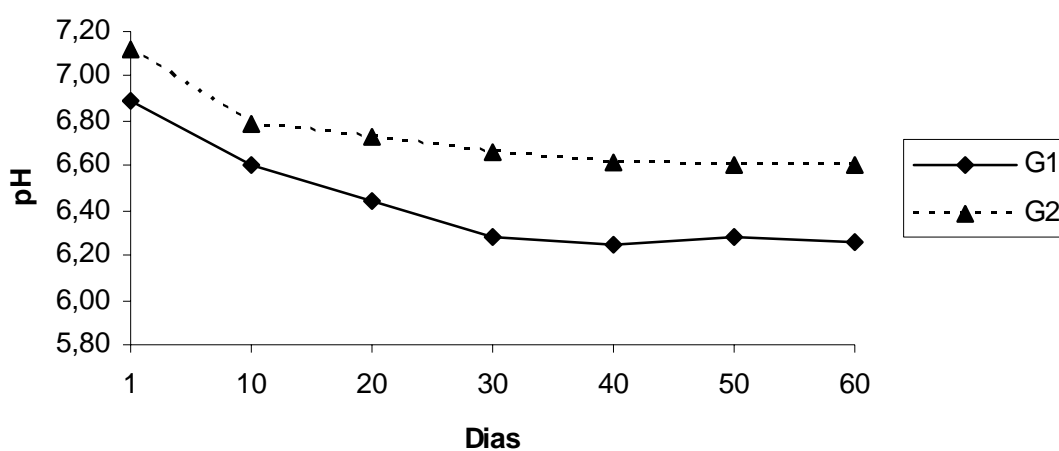


Figura 19. Representação dos valores médios do pH do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

4.3.4 Percentual de hemólise (% hemólise) e Hematócrito

Na análise do % hemólise foram constatadas médias significativamente menores no grupo G2 a partir do 20º dia de armazenamento. Na avaliação no decorrer do tempo de conservação também foram encontradas diferenças entre os

momentos demonstrando um significativo aumento nas médias, especialmente para o grupo G1 (Tabela 20 e Figura 20).

Na análise do Hematócrito (Ht) não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos ou no decorrer dos dias analisados (Tabela 21 e Figura 21).

O aumento no percentual de hemólise não configura necessariamente uma condição de colapso celular, pois segundo Hess e Greenwalt (2002), as alterações morfológicas nos eritrócitos estocados já se dão nas primeiras horas de armazenamento e se configuram principalmente em esferócitos e na formação de estruturas espiculares (equinócitos). Hess (2009) acrescenta que com o passar do período de conservação ocorre o rompimento destas espículas promovendo a liberação de material citosólico e hemoglobina sem, no entanto, representar a lise celular. Provavelmente por isto não observamos um declínio significativo do hematócrito nos grupos.

Embora o nível de significância tenha sido apenas de 10%, curiosamente observamos um aumento nas médias do Ht para o G2. Este fato pode ser explicado por Lion et al. (2009), quando afirmam que em baixas temperaturas a bomba de sódio e potássio apresenta uma redução da sua função permitindo a saída de potássio e o influxo de sódio. Com isto é plausível imaginar que, para que ocorra equilíbrio osmótico, haja a entrada de água no interior da célula, o que elevaria o volume globular médio dos eritrócitos. Entretanto, estas afirmações não corroboram àquelas de Bain (2006) e Hess (2009), quando afirmam que, pela ruptura das espículas e conseguinte saída de material citosólico, inclusive hemoglobina, a célula vermelha tende a reduzir o seu diâmetro.

Após avaliar os valores médios do percentual de hemólise é possível constatar uma larga superioridade das bolsas do G2, contendo a solução CPD/SAG-M modificadas na preservação das células. Estes dados confirmam os encontrados por Wardrop et al. (1997), que em estudo conservativo de sangue canino, testaram as alterações sofridas pelo sangue armazenado em bolsas CPDA-1 e em bolsas contendo SA enriquecidas com fosfato monobásico. Desta forma é possível concluir que a manutenção do pH interfere diretamente na preservação da integridade celular.

Tabela 20. Valores médios e desvio padrão do Percentual de Hemólise do sangue de cães armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	0,5±0,4 ^{Ab}	1,2±0,4 ^{Ab}	1,2±0,9 ^{Aab}	4,9±7,1 ^{Aab}	9,9±14,6 ^{Aa}	10,2±12,9 ^{Ab}	14,5±17,6 ^{Aa}
G2	1,2±0,6 ^{Ab}	1,1±0,7 ^{Ab}	0,8±0,5 ^{Bab}	1,9±1,8 ^{oBab}	2,6±2,2 ^{Ba}	3,6±2,6 ^{Bb}	5,4±3,8 ^{Ba}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,05$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

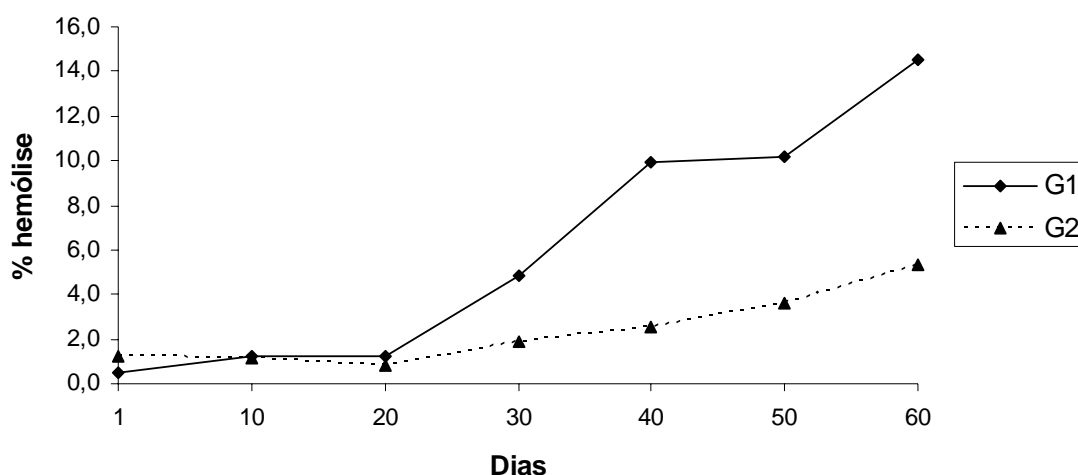


Figura 20. Representação dos valores médios do percentual de hemólise do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas do fosfato dissódico.

Tabela 21. Valores médios e desvio padrão do Hematócrito (%) do sangue de cães armazenado nas bolsas do G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos	D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	44,8±15,4 ^{Aa}	43,7±16,2 ^{Aa}	44,3±17,4 ^{Aa}	45,3±17,9 ^{Aa}	43,2±19,3 ^{Aa}	43,8±21,2 ^{Aa}	40,6±24,2 ^{Aa}
G2	43,3±19,3 ^{Aa}	43,3±20,6 ^{Aa}	45,0±22,3 ^{Aa}	46,3±23,2 ^{Aa}	47,8±24,6 ^{Aa}	48,5±24,6 ^{Aa}	48,2±25,1 ^{Aa}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,05$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

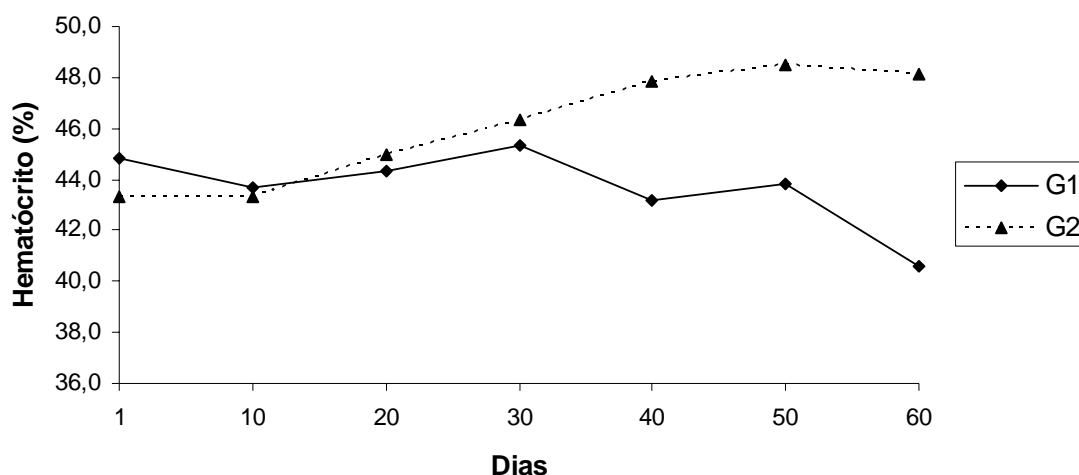


Figura 21. Representação dos valores médios do hematócrito do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2, nos dias analisados.

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

4.3.5 Estudo Morfológico e Morfométrico

Na análise do formato eritrocitário foram encontradas alterações (Figura 22), e significativa diferença entre os grupos nos dias 20, 30, 40 e 50 do estudo. Nos dias 1, 10 e 60 não houve diferenças entre G1 e G2.

Segundo Hess e Greenwalt (2002), os eritrócitos coletados apresentam ainda nas primeiras horas a perda da biconcavidade adquirindo o formato esferóide. Somente com a deterioração que surge com o desgaste da célula e o consumo de suas reservas de ATP, surgirão as espiculações que caracterizam o esferoequinócito. Para Bain (2006), estas deformações são projeções da membrana plasmática que liberam material citoplasmático, elevando a concentração da hemoglobina extracelular sem que, no entanto, ocorra a redução do hematócrito. Além disto, Lion et al. (2009) afirmam que todas estas alterações espiculares são fruto de deformações no citoesqueleto e que conferem, inclusive, um aumento da rigidez celular. Greenwalt (2006) acrescenta que com estas alterações a célula fica mais propensa a ser eliminada pelo sistema monocítico fagocitário (SMF) do receptor após a infusão do sangue no paciente.

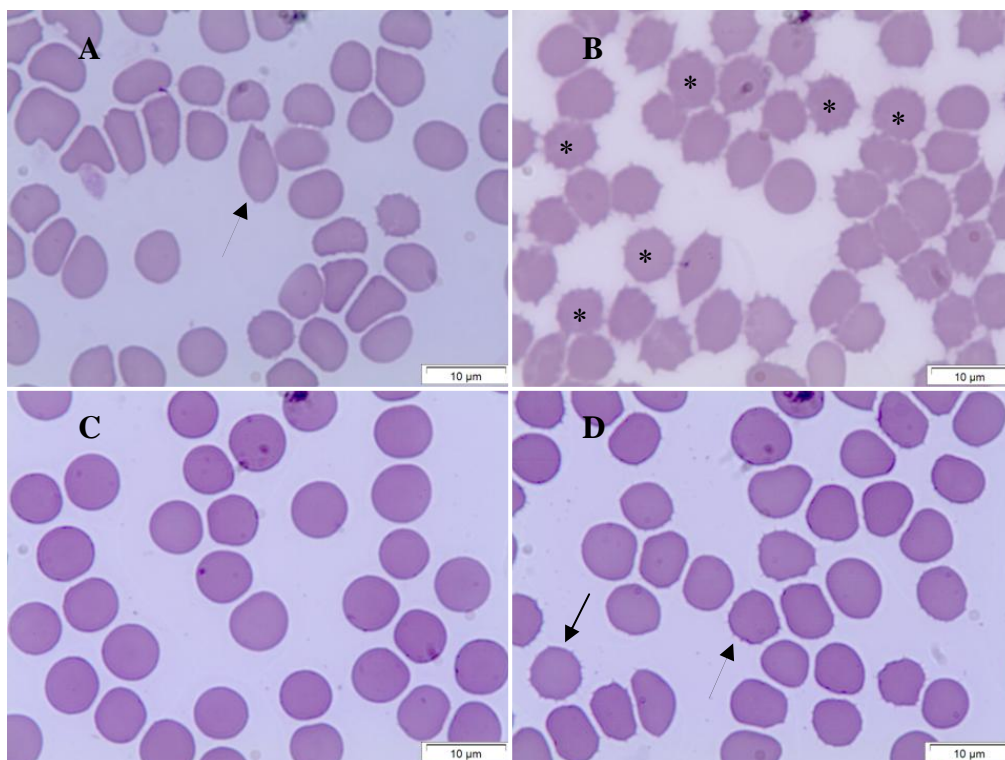


Figura 22. Formações eritrocitárias do sangue armazenado nas bolsas dos G1 e G2 em diferentes momentos da conservação.

Em A, está representado o 40^o dia do G1. Célula com formato característico de dacriócito (seta). B está representando o 60^o dia do G1. Predomínio de células esferoquinocíticas (*). Em C, está representado o primeiro dia no G2. Predomínio de eritrócitos de aspecto esferóide e sem biconcavidade, classificado neste estudo como eritrócitos esferóides. D representa o décimo dia de armazenamento do G2 (seta, esferoquinócito).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

Desta forma é possível concluir que houve um melhor desempenho do G2 na preservação da integridade morfológica celular, pois este manteve, nos dias 20, 30, 40 e 50, médias superiores para a variável esferóide e menores valores para a classificação esferoquinócito e no somatório das médias esferoquinocíticas e poiquilocíticas, representada pela classificação Alterada do D20, D30 e D40 (Tabela 22 e Figura 23). Considera-se o esferóide superior comparado às demais alterações morfológicas, pois esse representa menores alterações na membrana eritrocitária de tal forma que sua integridade e flexibilidade ficam menos afetado, permitindo supor que estas células exercerão melhor sua função no organismo do paciente receptor, bem como recuperarão mais rapidamente seus componentes da membrana plasmática após transfusão e ressuspensão em plasma fresco.

Tabela 22. Valores médios e desvio padrão das médias (%) para as variáveis morfológicas no G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos		D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	Esferóide	72,3±27,3 ^{Aa}	79,7±19,4 ^{Aa}	57,7±14,7 ^{Aa}	53,7±11,4 ^{Aa}	48,2±22,4 ^{Aa}	63,5±10,6 ^{Aa}	70,2±17,2 ^{Aa}
	Esferoequinócito	27,2±27,1 ^{Aa}	20±17,8 ^{Aa}	41,6±14,6 ^{Aa}	46,1±11,4 ^{Aa}	49,5±23,7 ^{Aa}	32,8±8,6 ^{Aa}	25,5±16,6 ^{Aa}
	Poiquilocitose	0,5±0,3 ^{Aa}	0,3±0,4 ^{Aa}	0,7±0,7 ^{Aa}	0,2±0,4 ^{Aa}	2,3±1,3 ^{Aa}	3,7±3,4 ^{Aa}	4,3±1,4 ^{Aa}
	Alterada*	27,7±27 ^{Aa}	20,3±18 ^{Aa}	42,3±14,9 ^{Aa}	46,3±11,4 ^{Aa}	51,8±22,5 ^{Aa}	36,5±17,9 ^{Aa}	29,8±17,2 ^{Aa}
G2	Esferóide	82±18,4 ^{Aa}	86,6±7,2 ^{Aa}	86,4±15,3 ^{Ba}	79,1±11,1 ^{Ba}	75,8±16,7 ^{Ba}	80±14,6 ^{Ba}	77,5±6,7 ^{Aa}
	Esferoequinócito	17,4±18,7 ^{Aa}	12,8±8,6 ^{Aa}	13,3±4,5 ^{Ba}	19,1±11,6 ^{Ba}	20,5±17,6 ^{Ba}	17,4±13,4 ^{Ba}	18,6±8 ^{Aa}
	Poiquilocitose	0,6±0,5 ^{Aa}	0,6±0,4 ^{Aa}	0,3±0,4 ^{Aa}	1,8±1,5 ^{Aa}	3,7±2 ^{Aa}	2,6±1,7 ^{Aa}	3,9±2,4 ^{Aa}
	Alterada*	18,0±18,5 ^{Aa}	13,4±8,8 ^{Aa}	13,6±4,7 ^{Ba}	20,9±12 ^{Ba}	24,2±16,6 ^{Ba}	20±14,4 ^{Aa}	22,5±6,8 ^{Aa}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Turkey ($p < 0,05$). Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna das mesmas variáveis não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,05$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

* Representa o somatório das variáveis esferoequinócito e poiquilocitose.

Korte e Verhoeven (2004), Bain (2006) e Hess (2009), estudando eritrócitos humanos, citaram que estas alterações são reversíveis apenas com a ressuspensão destas células em plasma fresco, com concomitante recuperação do ATP e do 2,3-DPG. Já para Lion et al. (2009) os eritrócitos humanos não recuperarão a sua integridade da membrana se a transfusão for realizada próximo do tempo máximo de armazenamento. Para Wardrop et al. (1997), em estudos com sangue canino conservado em bolsas CPDA-1, as alterações do formato eritrocitário podem ser irreversíveis.

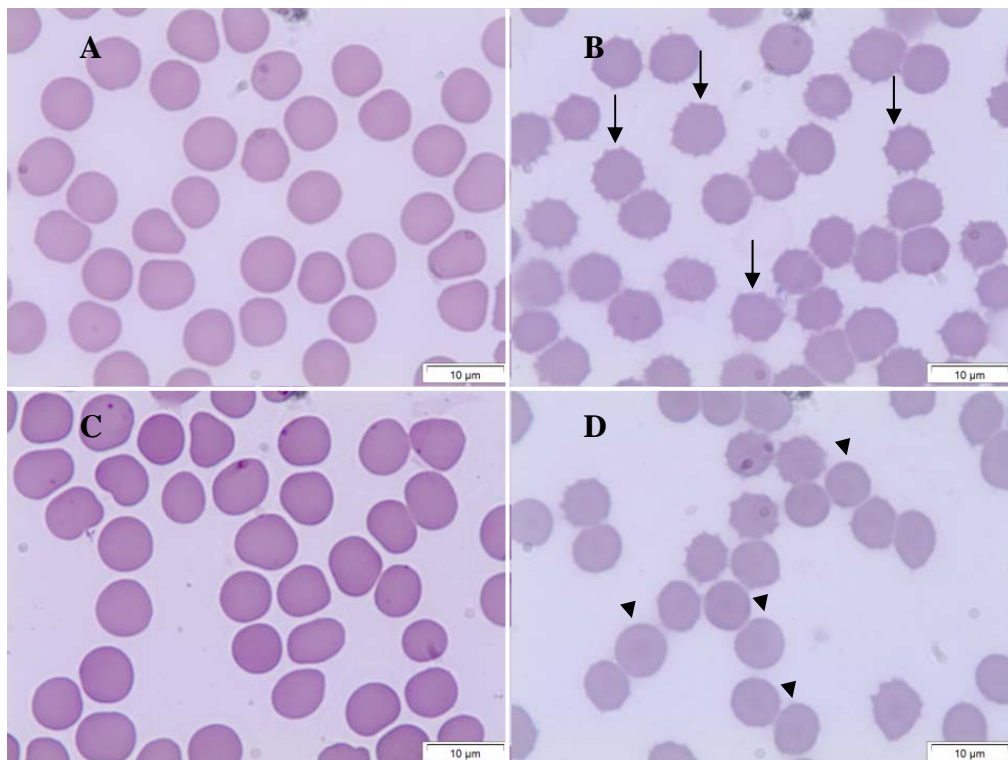


Figura 23. Comparação entre o primeiro e último dia de conservação do sangue nos grupos G1 e G2.

A e C representam o G1 e o G2, respectivamente, no primeiro dia de conservação. Em ambos os grupos a proporção de esferóides é semelhante. B e D representam os G1 e G2, respectivamente, no 50^o dia de conservação. Maior proporção de esferoquinócitos em G1 (setas) e maior de esferóides em G2 (pontas de seta).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

Não foi encontrada correlação entre características morfológicas e o percentual de hemólise. Estes dados corroboram os encontrados por Hess et al. (2000b), em estudos com eritrócitos humanos, que demonstraram não haver correlação entre as alterações morfológicas e o grau de hemólise, podendo, entretanto, ter alguma relação com os níveis de ATP. Este fato pode ser explicado por Bain (2006), quando afirma que ocorrem rupturas das espículas na

membrana levando à liberação de material citosólico, porém sem lise da célula. Desta forma é possível observar um aumento da hemoglobina plasmática sem destruição dos eritrócitos.

Na avaliação das médias do 2,3-DPG e do potássio com as médias morfológicas é possível observar correlação nos dias 10, 30, 40 e 50 do estudo, conforme demonstrado nas Tabelas 23 e 24. Desta forma é possível constatar que no 10^o e 40^o dias de conservação os níveis do potássio são correlacionados com as variáveis morfológicas de tal forma que, quando existe um aumento do potássio, existe uma elevação das médias percentuais das células esferoequinóticas e de outras alterações morfológicas, acompanhado da redução da proporção das células esferóides. Do mesmo modo, quando observamos a variável 2,3-DPG em relação aos dados morfológicos, constata-se que no 30^o e 50^o dias de conservação existe correlação positiva entre estes, de tal forma que a redução dos percentuais das células esferóides acompanha a queda dos valores do 2,3-DPG.

Assim, observando estas relações pode-se, pela avaliação morfológica, presumir os níveis do potássio nos dias 10 e 40, e os valores do 2,3-DPG nos dias 30 e 50 da conservação sanguínea. Este dado torna-se relevante principalmente no estudo da qualidade do sangue estocado, pois em situações envolvendo pacientes críticos, é possível avaliar de forma rápida e simples os níveis do 2,3-DPG e do potássio livre para assim escolher entre duas ou mais unidades de sangue que irão melhor beneficiar o animal em estado crítico.

No entanto, não houve diferenças significativas na comparação entre as médias morfológicas dentro dos grupos no decorrer dos dias. Estes dados corroboram os achados de Sparrow et al. (2007), quando relataram não haver diferenças morfológicas no transcorrer do período de estocagem dos eritrócitos de humanos. Esses autores observaram que as alterações morfológicas vistas nos primeiros dias de estocagem são, em número, semelhantes às observadas ao fim de 41 dias de armazenamento. Entretanto, Lion et al (2009) observaram aumento significativo das estruturas microvesiculares no sangue humano estocado no mesmo período.

Tabela 23. Correlações entre as variáveis morfológicas (%) e bioquímicas, 2,3-DPG (mmol/l) e potássio (mEq/l), no G1 nos dias (D) analisados.

Grupos			D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	Variáveis Morfológicas	Esferóide	72,3 ^A	79,7 ^{A(-)}	57,7 ^A	53,7 ^{A(+)}	48,2 ^{A(-)}	63,5 ^{A(+)}	70,2 ^A
		Esferoequinócito	27,2 ^B	20 ^{B(+)}	41,6 ^B	46,1 ^{B(-)}	49,5 ^{B(+)}	32,8 ^B	25,5 ^B
		Alterada	27,7 ^C	20,3 ^{C(+)}	42,3 ^C	46,3 ^{C(-)}	51,8 ^{C(+)}	36,5 ^C	29,8 ^C
	Variáveis Bioquímicas	2,3-DPG	0 ^D	2,38 ^D	0,90 ^D	0,67 ^{ABC}	0,67 ^D	0,31 ^A	0,61 ^D
		Potássio	4,3 ^E	7,9 ^{ABC}	9,5 ^E	10,3 ^E	11,9 ^{ABC}	11,8 ^E	14,0 ^E

Nas comparações entre as variáveis morfológicas e bioquímicas dentro do grupo, as médias acompanhadas de letras iguais na coluna possuem correlação entre si, segundo teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$).

(+) Correlação positiva; (-) Correlação negativa.

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

Tabela 24. Correlações entre as variáveis morfológicas (%) e bioquímicas, 2,3-DPG (mmol/l) e potássio (mEq/l), no G2 nos dias (D) analisados.

Grupos			D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G2	Variáveis Morfológicas	Esferóide	82 ^A	86,6 ^{A(-)}	86,4 ^A	79,1 ^{A(+)}	75,8 ^{A(-)}	80 ^{A(+)}	77,5 ^A
		Esferoequinócito	17,4 ^B	12,8 ^{B(+)}	13,3 ^B	19,1 ^{B(-)}	20,5 ^{B(+)}	17,4 ^B	18,6 ^B
		Alterada	18,0 ^C	13,4 ^{C(+)}	13,6 ^C	10,9 ^{C(-)}	24,2 ^{C(+)}	20 ^C	22,5 ^C
	Variáveis Bioquímicas	2,3-DPG	0 ^D	2,72 ^D	1,78 ^D	1,18 ^{ABC}	0,82 ^D	0,66 ^A	0,72 ^D
		Potássio	3,3 ^E	6,3 ^{ABC}	8,0 ^E	9,2 ^E	8,6 ^{ABC}	9,5 ^E	8,9 ^E

Nas comparações entre as variáveis morfológicas e bioquímicas dentro do grupo, as médias acompanhadas de letras iguais na coluna possuem correlação entre si, segundo teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$).

(+) Correlação positiva; (-) Correlação negativa.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

Na avaliação morfométrica, não houve diferenças significativas nas comparações entre os grupos. Porém foram encontradas variações significativas no decorrer do tempo de estocagem somente para a variável esferóide (Tabela 25 e Figura 24).

Tabela 25. Valores médios e desvio padrão do diâmetro (μm) dos eritrócitos nas diferentes classificações morfológicas no G1 e G2, nos dias (D) analisados.

Grupos		D 1	D 10	D 20	D 30	D 40	D 50	D 60
G1	Esferóide	8,4 \pm 0,3 ^{Aa}	8,1 \pm 0,4 ^{Aa}	8,0 \pm 0,3 ^{Ab}	8,1 \pm 0,4 ^{Aa}	7,6 \pm 0,4 ^{Ab}	7,7 \pm 0,5 ^{Ab}	7,6 \pm 0,5 ^{Ab}
	Esferoequinócito	8,2 \pm 0,3 ^{Aa}	8,1 \pm 0,3 ^{Aa}	7,8 \pm 0,4 ^{Aa}	8,0 \pm 0,6 ^{Aa}	8,0 \pm 0,5 ^{Aa}	8,1 \pm 0,4 ^{Aa}	7,7 \pm 0,2 ^{Aa}
	Poiquilocitose	8,7 \pm 0,7 ^{Aa}	9,0 \pm 0 ^{Aa}	8,1 \pm 0,4 ^{Aa}	8,5 \pm 1 ^{Aa}	8,0 \pm 0,6 ^{Aa}	9,3 \pm 0,4 ^{Aa}	8,5 \pm 0,4 ^{Aa}
G2	Esferóide	8,3 \pm 0,2 ^{Aa}	8,4 \pm 0,3 ^{Aa}	8,2 \pm 0,2 ^{Ab}	8,4 \pm 0,4 ^{Aa}	7,6 \pm 0,4 ^{Ab}	8,3 \pm 0,3 ^{Ab}	8,1 \pm 0,4 ^{Ab}
	Esferoequinócito	8,4 \pm 0,6 ^{Aa}	10,8 \pm 0,4 ^{Aa}	8,1 \pm 0,5 ^{Aa}	8,3 \pm 0,3 ^{Aa}	7,9 \pm 0,1 ^{Aa}	8,1 \pm 0,3 ^{Aa}	7,7 \pm 0,4 ^{Aa}
	Poiquilocitose	8,0 \pm 0,2 ^{Aa}	8,6 \pm 0,6 ^{Aa}	8,5 \pm 0,6 ^{Aa}	9,0 \pm 0,4 ^{Aa}	8,4 \pm 0,4 ^{Aa}	8,4 \pm 0,4 ^{Aa}	8,4 \pm 0,3 ^{Aa}

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha, não diferem entre si, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Médias acompanhadas de letras iguais maiúsculas na coluna das mesmas variáveis não diferem entre si, segundo teste t de Student ($p < 0,05$).

G1: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M.

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

Segundo Thrall (2007), os eritrócitos caninos possuem diâmetro médio de $7\mu\text{m}$ no organismo. Como foi possível observar, embora exista aumento do diâmetro celular no interior das bolsas, notado ainda no primeiro dia do estudo, tendência de redução do tamanho celular durante o período de armazenamento (Tabela 25, Figura 24). Atribui-se isto à perda de material citoplasmático pela ruptura das espículas. Apesar da redução do diâmetro médio das células, estas ainda permanecem maiores que a média dos eritrócitos no organismo animal.

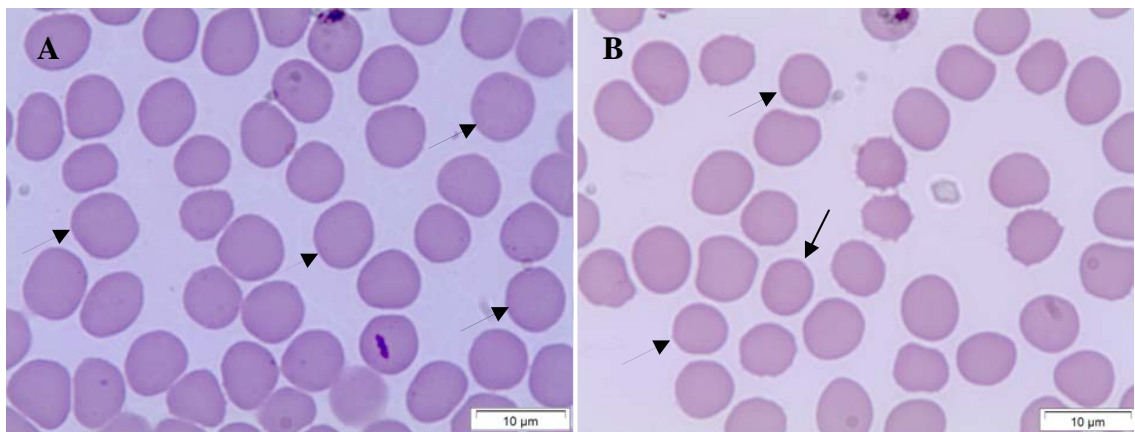


Figura 24. Comparação morfológica dos eritrócitos do G2 entre o primeiro e 60^o dia do estudo.

A representa o primeiro dia de armazenamento no G2. Maioria dos esferócitos com diâmetro homogêneo (setas). Em B, representando o grupo G2 ao 60^o dia do estudo, observa-se redução do diâmetro celular de algumas células esferóides (setas).

G2: Grupo com sangue armazenado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas de fosfato dissódico.

O aumento do diâmetro celular no início da conservação se deu provavelmente pelo ingurgitamento das células em contato com as soluções aditivas. Segundo Korte e Verhoeven (2004), as soluções presentes nas bolsas são capazes de promover uma edemaciação das células, com conseqüente aumento em seu volume.

Lion et al. (2009) explicam que em baixas temperaturas a membrana plasmática sofre uma redução da sua atividade, desta forma permitindo a saída de íons potássio e a entrada de sódio. Por isso, é possível presumir que, para que haja equilíbrio osmótico e facilitado pela redução do controle pela membrana plasmática, exista a entrada do sódio e conseqüente influxo de água na célula exercendo efeito edemaciante na mesma, o que eleva o seu diâmetro. Entretanto estas alterações não foram observadas por D'Almeida et al. (2000), na ocasião do estudo com eritrócitos humanos conservados em bolsas CPDA-1.

Segundo afirmações de Hess e Greenwalt (2002), este efeito edemaciante sobre as células é desejável, pois reduziria as alterações morfológicas como a esferoequinocitose.

Com a ruptura das projeções presentes na membrana, ocorre também a exposição da fosfatidilserina que normalmente se localiza no interior desta. A expressão excessiva deste componente expõe a célula à ação de imunoglobulinas que causarão danos à membrana promovendo a perda de fragmentos e a saída de maiores quantidades de material citoplasmático. Este processo também pode estar envolvido na formação do esferócito além do mecanismo que explicaria a redução do diâmetro celular com o decorrer do tempo de armazenagem, pois com a perda contínua de fragmentos da membrana a célula pode sofrer reduções do seu diâmetro (BAIN, 2006; HESS, 2009).

4.4 Conclusões

Após a análise dos resultados obtidos e nas condições deste estudo, pode-se concluir, até o 60^o dia de armazenamento do sangue canino em bolsas CPD/SAG-M e CPD/SAG-M acrescidas do fosfato dissódico que:

O 2,3-Difosfoglicerato continua a ser produzido após a coleta alcançando valores máximos por volta do 10^o dia de conservação indicando ser este o melhor momento para a utilização deste hemoderivado;

A bolsa CPD/SAG-M acrescida do fosfato dissódico demonstrou vantagens quando comparada a bolsa CPD/SAG-M, principalmente no que se referem às variáveis 2,3-DPG e pH;

Os eritrócitos perdem a biconcavidade e adquirem a forma de esferócito já nos primeiros dias de armazenamento;

O sangue conservado nas bolsas CPD/SAG-M acrescidas do fosfato dissódico apresenta melhor preservação dos eritrócitos sob o ponto de vista morfológico, demonstrado por aumento das médias percentuais para esferócitos e redução percentual dos esferoequinócitos;

Os eritrócitos apresentam aumento do diâmetro já no início do processo de conservação e passam a reduzir o seu volume com o decorrer do tempo de armazenamento;

É mais indicado o uso das bolsas CPD/SAG-M acrescidas do fosfato dissódico para a conservação do sangue canino sob refrigeração em um período máximo de 60 dias de armazenagem em relação às bolsas CPD/SAG-M.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUTHEMENT, J.M.; WOLFSHEIMER, K.J.; CATCHINGS, S. Canine blood component therapy: product preparation, storage and administration. *Journal American Animal Hospital Association*, v. 23, p. 483-493, 1987.
- BAIN, B.J. Morfologia das células sanguíneas. In: *Células Sanguíneas: Um guia prático*. Artmed. 4 ed, 2006. p.73-187.
- BROOKS, M. Transfusion medicine. In: Murtaugh, R. J.; Kaplan, P. M. *Veterinary emergency and critical care medicine*. Saint Louis, Mosby Yearbook. 1992. 935p.
- BREMNER et al. The effect of phosphate loading on erythrocyte 2,3-biphosphoglycerate levels. *Clinica chimica acta*. v. 323, p. 111-114, 2002.
- BUNN, H. F. Differences in interactions of 2,3-diphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins. *Science*, v.23, p.1049-1050, 1971.
- BUSH, B.M. Eletrólitos e Metais In: *Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais*. Roca. 1 ed, 2004. p. 262-289.
- CHIARAMONTE, D. Blood-Component therapy: selection, administration and monitoring. *Clinical techniques in small animal practice*, v. 19, n. 2, p. 63-67, 2004.
- CHIN-YEE, I.; ARYA, N.; D'ALMEIDA, M.S. The red cell storage lesion and its implication for transfusion. *Transfusion Science*, v. 18, n. 3, p. 447-458, 1997.
- CHO, J.; KING, J. S.; QIAN, X. et al. Dephosphorylation of 2,3-bisphosphoglycerate by MIPP expands the regulatory capacity of the Rapoport–Luebering glycolytic shunt. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. v. 105, n. 6 , p. 5998-6003, 2008.
- COSTA JUNIOR, J.D. VIANA, J.A.; RIBEIRO FILHO, J.D.; FAVARATO, E.S.; CAMPOS MATA, L.; ARGÔLO NETO, N. Parâmetros bioquímicos e

hemogasométricos do sangue total canino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M. 378 Ciência Rural, Santa Maria. v. 38, n. 2, p.378-383, 2008.

D'ALMEIDA, M.S.; JAGGER, J.; DUGGAN, M.; WHITE, M.; ELLIS, C.; CHIN-YEE, I.H. A comparison of biochemical and functional alterations of rat and human erythrocytes stored in CPDA-1 for 29 days: implications for animal models of transfusion. *Transfusion medicine*, v. 10, p. 291-303, 2000.

EISENBRANDT, D.L.; SMITH, J.E. Use of biochemical measures to estimate viability of red blood cells in canine blood storage in acid citrate dextrose solution, with and without added ascorbic acid. *Journal American animal hospital association*, v.163, n. 8, p.984-987, 1973.

FELDMAN, B. F. Anemias associated with blood loss and hemolysis. *Veterinary clinics north America: Small Animal Practice*, v.11, p.265-275, 1981.

FELDMAN, B. F.; SINK, C. A. Hemoterapia para o clínico de pequenos animais. ROCA. 2007, 104 p.

FRIEL, J. *Dorland's illustred medical dictionary*. 26 ed. Philadelphia, Saunders, 1981, 1478p.

GREENWALT, T. The how and why of exocytic vesicles. *Transfusion*. v. 46, p. 146-152, 2006.

GUYTON, A.C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. 9 ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 1997. 864p.

HESS, J.R. Red cell storage. *Journal of Proteomics* (2009), doi: 10.1016/j.prot.2009.11.005

HESS, J.R.; BEYER, G.M. Red blood cell metabolism during storage: Basic principles and practical aspects. In: HILLYER et. al. *Blood banking and transfusion medicine: Basic principles & practice*. Churchill Livingstone. 2 ed. 2007, p. 205-211.

- HESS, J.R.; GREENWALT, T.J. Storage ed blood cells: New approaches. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 16, n. 4, p. 283-295, 2002.
- HESS, J.R.; HILL, H.R.; OLIVER, C.K.; LIPPERT, L.E.; GREENWALT, T.J. Alkaline CPD and the preservation of 2,3-DPG. *Transfusion*, v. 42, p. 747-752, 2002.
- HESS, J.R.; LIPPERT, L.E.; DERSE-ANTHONY, C.P.; HILL, H.R.; OLIVER, C.K.; RUGG, N.; KNAPP, A.D.; GORMAS, J.F.; GREENWALT, T.J. The effects of phosphate, pH, and AS volume on RBCs stored in saline-adenine-glucose-manitol solutions. *Transfusion*, v. 40, p. 1000-1006, 2000a.
- HESS, J.R.; RUGG, N.; GORMAS, J.F.; KNAPP, A.D.; GREENWALT, T.J. The meaning of RBC morphologic changes during blood bank storage. *Transfusion*, v. 60, 60s, 2000b.
- HESS, J.R.; RUGG, N.; KNAPP, A.D.; GORMAS, J.F.; HILL, H.R.; OLIVER, C.K.; LIPPERT, L.E.; GREENWALT, T.J. The role of electrolytes and pH in RBC Additive Solutions. *Transfusion* 41, p.1045-1051, 2001.
- HÖGMAN, C.F.; KNUTSON, F.; LÖÖF, H.; PAYRAT, M.. Improved maintenance of 2,3 DPG and ATP in RBCs stored in a modified additive solution. *Transfusion*, v. 42, p. 824-829, 2002.
- HOLME, S. Current issues related to the quality of stored RBCs. *Transfusion and apheresis science*. v. 33 p. 55-61, 2005.
- KERR, M.G. Eletrólitos In: *Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia*. Roca. ed. 2, 2003. p. 95-106.
- KOCK, G.G.; LI, L.; SESSLER, D.I.; FIGUEROA, P.; HOELTGER, G.A.; MIHALJEVIC, T.; BLACKSTONE, E. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *New England Journal of Medicine*. v. 358, p. 1229-1239, 2008.
- KORTE, D.; VERHOEVEN, A.J. Quality Determinants of erythrocyte destined for transfusion. *Cellular and Molecular Biology*, v. 50, n. 2, p. 187-195, 2004.

- KRIEBARDIS, A.G.; ANTONELLOU, M.H.; STAMOULIS, K.E.; ECONOMOU-PETERSEN, E.; MARGARITIS, L.H.; PAPASSIDERI, I.S. Membrane protein carbonylation in non-leukodepleted CPDA-preserved red blood cells. *Blood cells, molecules & diseases*. v. 36, p.379-382, 2006.
- KRISTENSEN, A. T.; FELDMAN, B. F. General principles of small animal blood component administration. *Veterinary clinics north America: Small animal practice*, v.25, p.1277-1290, 1995.
- KRISTENSEN, A. T.; FELDMAN, B. F. Bancos de Sangue e Medicina Transfusional. In: ETTINGER, E. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de medicina interna de pequenos animais*, Manole. 4 ed, v.1, 1997. p. 497-517.
- KURUP, P. A.; ARUN, P.; GAYATHRI, C. R.; DHANYA, C. R.; INDU, A. R. Modified formulation of CPDA for storage of whole, and of SAGM for storage of red blood cells, to maintain the concentration of 2,3-diphosphoglycerate. *Vox sanguinis*, v.85, p. 253-261, 2003.
- LANG, F.; LANG K., S.; WIEDER, T. MYSSINA, S.; BIRKA, C.; LANG, P.A.; KAISER, S.; KEMPE, D.; DURATON, C.; HUBER, S. M. Cation channels, cel volume and the death of an erythrocyte. *Pflügers Archives: European Journal of Physiology*. v. 447, p.121-125, 2003.
- LION, N.; CRETZAZ, D.; RUBIN, O. TISSOT, J-D. Stored red blood cells: A changing universe waiting for its map(s). *Journal of Proteomics*, (2009), doi:10.1016/j.jprot.2009.11.001.
- LOPES, R.S.; KOHAYAGAWA, A., RIBEIRO FILHO, J. D. Alterações hematológicas e bioquímicas em sangue total de equinos, conservado para transfusão em bolsas plásticas com ACD-F. *Revista Universidade Rural: Ciência da vida*, v.17, p.91-94, 1995.
- LOUIT, J.F.; MOLLISON, R. L.; YOUNG, I. M. Citric acid-sodium citrate-glucose mixtures for blood storage. *Quimical Journal Experience Physiology*, v.32, p.183-202, 1943.

- LUBAS, G. Transfusión de sangre de perros y gatos. *Waltham focus*, v.6, p.2-9, 1996.
- LUCAS, R. L.; LENTZ, K. D.; HALE, A. S. Collection and preparation of blood products. *Clinical techniques in small animal practice*, v. 19, n. 2, p. 55-62, 2004.
- MORAIS, H. A.; CHEW, D. J.; KOHN, C. W.; DiBARTOLA, S. P. Distúrbios do equilíbrio hídrico, fluidoterapia e transfusão. In: FENNER, W. R. *Consulta Rápida em Clínica Veterinária*. Guanabara Koogan. 3 ed. 2003, p. 182-197.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. Homeostasia e Distúrbios Eletrolíticos e Ácido-Básicos. In: *Medicina de laboratório Veterinário: Interpretação e diagnóstico*. Roca. 1995. p. 83-90.
- NUSBACHER, J. Blood transfusion is mononuclear cell transplantation. *Transfusion*, v.34, p.1002-1004, 1994.
- OLIVEIRA, M.A.G. Avaliação do Volume Globular de Cães Doadores Após a Coleta de Sangue. 1998. 22f. Monografia (Especialização em Clínica e Cirurgia Veterinárias) - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- OU, D.; MAHAFFEY, E.; SMITH, J. E. Effect of storage on oxygen dissociation of canine blood. *Journal American animal hospital association*, v.167, p.56-58, 1975.
- PISCIOTTO, P. T. *Terapêutica transfusional: manual para o médico*. 3 ed. Bethesda, Associação Americana de Bancos de Sangue, 1989. 101p.
- RIBEIRO FILHO, J.D.; ALMEIDA, C.T.; GONÇALVES, R.C.; KOHAYAGAWA, A.; CURI, P.R. Alterações hemogasométrias de sangue bovino durante a conservação em frascos de vidro com ACD e bolsas plásticas com CPDA-1, por 35 dias. *Veterinary Zootecnic*, v.6, p.77-84, 1994.

- ROUS P., TURNER J. R. The preservation of living red cells *in vitro*. Journal of Experience Medicine . v.23, p.219-237, 1916.
- SCOTT, K.L.; LECAK, J.; ACKER, J.P. Biopreservation of blood cells: past, present, and future. Transfusion Medicine Reviews, v. 19, n. 2, p. 127-142, 2005.
- SPARROW, R.L; VEALE, M.F.; HEALEY, G.; PAYNE, K.A. Red blood cell (RBC) age at collection and storage influences RBC membrane-associated carbohydrates and lectin binding. Transfusion. v.47, p.966-8, 2007.
- THORNTON, G. Blood transfusion. In: KIRK, R. W. Current veterinary Therapy. Philadelphia: Saunders, p.8-15. 1968.
- THRALL, M.A. Morfologia das Hemácias. In: Hematologia e bioquímica clínica veterinária. Roca. 1 ed. 2007. p.65-77.
- WARDROP, K.J.; YOUNG, J.; WILSON, E. An in vitro evaluation of storage media for the preservation of canine packed red blood cells. Veterinary Clinical Pathology. v.23, p.83-88, 1994.
- WARDROP, K. J.; TUCKER, R. L.; MUGNAI, K. Evaluation of Canine Red Blood Cells Stored in a Saline, Adenine, and Glucose Solution for 35 Days. Journal of Veterinary Internal Medicine. v.11, p. 5-8, 1997.
- WILLER, R. L.; RIEDESEL, D. H. Transfusion therapy and blood banking in the dog and cat. Iowa State University Veterinary, v.47, p.102-109, 1985.