

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EFEITOS DA LEUCORREDUÇÃO E DE QUATRO SOLUÇÕES ADITIVAS SOBRE A  
QUALIDADE DO CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS CANINO DURANTE O  
ARMAZENAMENTO**

**LUCIANA DE ALMEIDA LACERDA**

**PORTO ALEGRE**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EFEITOS DA LEUCORREDUÇÃO E DE QUATRO SOLUÇÕES ADITIVAS SOBRE A  
QUALIDADE DO CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS CANINO DURANTE O  
ARMAZENAMENTO**

**Autora:** Luciana de Almeida Lacerda

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e  
Patologia Animal

**Orientador:** Félix Hilario Diaz González

**PORTO ALEGRE**

**2011**

## CIP - Catalogação na Publicação

Lacerda, Luciana de Almeida  
EFEITOS DA LEUCORREDUÇÃO E DE QUATRO SOLUÇÕES  
ADITIVAS SOBRE A QUALIDADE DO CONCENTRADO DE  
ERITRÓCITOS CANINO DURANTE O ARMAZENAMENTO / Luciana  
de Almeida Lacerda. -- 2011.  
61 f.

Orientador: Félix Hilario Diaz González.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2011.

1. hemoterapia. 2. transfusão. 3. sangue. 4. cão.  
5. leucodepleção. I. González, Félix Hilario Diaz,  
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**EFEITOS DA LEUCORREDUÇÃO E DE QUATRO SOLUÇÕES ADITIVAS SOBRE A  
QUALIDADE DO CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS CANINO DURANTE O  
ARMAZENAMENTO**

Aprovada em 10 de março de 2011

APROVADO POR:

---

Félix Hilario Diaz González

Orientador e presidente da comissão

---

Ana Cristina Araujo (UFRGS)

Membro da comissão

---

Carlos Termignoni (UFRGS - Centro de Biotecnologia)

Membro da comissão

---

Regina Takahira (UNESP - Botucatu)

Membro da comissão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por permitirem e me apoiarem na busca dos meus sonhos mais loucos, em especial à minha mãe que sempre esteve presente e me apoiou em todos os momentos de minha vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Félix H. D. González, o qual sempre confiou em mim e me deu liberdade para tentar alcançar meus objetivos.

Agradeço às minhas irmãs de coração Sílvia R. Terra, Nicole R. C. Hlavac, Simone T. O. Stedile, Camila S. Lasta, as quais mesmo conhecendo todos os meus defeitos foram capazes de estar ao meu lado, cada uma a sua maneira, nos momentos mais difíceis, mas não menos desafiadores e legais desta trajetória profissional.

Agradeço a toda equipe LACVet-UFRGS que sempre confiou no meu trabalho e me apoiou quando precisei. Saibam que tenho orgulho deste lugar e espero que ele cresça ainda mais.

Agradeço a todos os meus amigos pesquisadores que me auxiliaram nesta tese, em especial à Dra. Jane Wardrop, à Dra. W Jean Dodds e ao Dr. Korte e sua equipe.

# EFEITOS DA LEUCORREDUÇÃO E DE QUATRO SOLUÇÕES ADITIVAS SOBRE A QUALIDADE DO CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS CANINO DURANTE O ARMAZENAMENTO

Autora: Luciana de Almeida Lacerda

Orientador: Félix Hilario Diaz González

## RESUMO

**Histórico:** As soluções aditivas (SA) e a leucorredução pré-armazenamento (LR) são importantes ferramentas utilizadas para manter a viabilidade eritrocitária durante o armazenamento e evitar algumas reações transfusionais nos receptores, respectivamente.

**Objetivos:** Comparar o efeito de quatro SA (SAGM, ADSOL<sup>®</sup>, OPTISOL<sup>®</sup> e PAGGG-M) e da LR por filtração (IMMUGARD III-RC<sup>®</sup>) sobre a qualidade do concentrado de eritrócitos (CE) canino armazenado por 41 dias.

**Animais:** Dezesesseis cães de raças de grande porte de proprietários particulares com consentimento escrito.

**Materiais e métodos:** Unidades de sangue total (500 mL) foram coletadas em 70 mL de solução de CPD; oito desta foram leucorreduzidas (grupo LR). Cada unidade foi processada e separada em unidades de CE e plasma. O CE de cada cão foi dividido igualmente em quatro bolsas menores contendo uma das diferentes SA. As bolsas foram armazenadas por 41 dias a 4 °C e avaliadas a cada 10 dias. Os parâmetros analisados foram: pH, hematócrito, grau de hemólise, lactato, glicose, K, Na, ATP e 2,3-DPG.

**Resultados:** O processo de LR por filtração se manteve dentro da padronização estabelecida para humanos em relação à contagem de leucócitos residuais. Ambos os grupos LR e não-LR apresentaram diminuição do pH, das concentrações de glicose, 2,3-DPG e ATP, e aumento do grau de hemólise e das concentrações de lactato, Na e K, sendo que o grupo LR apresentou menores alterações ( $p < 0.05$ ). A solução PAGGG-M demonstrou uma melhor manutenção das

concentrações de ATP e 2,3-DPG. **Conclusões e importância clínica:** Todas as SA utilizadas em ambos os grupos apresentaram resultados satisfatórios durante 21 dias de armazenamento, mas o uso da LR pré-armazenamento e da solução PAGGG-M parecem ter um maior efeito benéfico sobre o armazenamento do CE canino. Estudos sobre a viabilidade pós-transfusional são necessários para testar estas soluções em cães.

**Palavras-chave:** *hemoterapia, transfusão, sangue, cão, leucodepleção.*

# EFFECTS OF LEUKOREDUCTION AND FOUR ADDITIVE SOLUTIONS ON CANINE RED CELL CONCENTRATE QUALITY DURING STORAGE

Author: Luciana de Almeida Lacerda

Advisor: Félix Hilario Diaz González

## ABSTRACT

**Background:** Additive solutions (AS) and prestorage leukoreduction (LR) are important transfusion tools used to maintain erythrocyte viability during storage and avoid some transfusion reactions in recipients, respectively. **Objectives:** Compare the effect of four AS (SAGM, ADSOL<sup>®</sup>, OPTISOL<sup>®</sup> and PAGGG-M) and leukocyte filtration (IMMUGARD III-RC<sup>®</sup>) on the quality of canine RBCs stored for 41 days. **Animals:** Sixteen large-breed dogs from private owners with written consent. **Methods:** Whole blood units (500 mL) were collected in 70 mL of CPD solution; eight of those units were leukoreduced (LR group). Each unit was processed and separated into RBC concentrate and plasma components. The RBCs of each dog were spliced equally into four bags containing a different AS. Bags were stored for 41 days at 4°C and evaluated every ten days. Parameters analyzed included pH, PCV, % hemolysis, lactate, glucose, K, Na, ATP and 2,3-DPG. **Results:** The LR filtration process met the human standards for residual WBC count. Both LR and non LR groups showed decreases in pH, glucose, 2,3-DPG and ATP concentrations, and increases in hemolysis, lactate, Na and K concentrations, with less change seen in the LR group ( $p < 0.05$ ). PAGGG-M provided the best maintenance of ATP and 2,3-DPG concentrations. **Conclusions and clinical importance:** All AS used for both groups had satisfactory results during the first 21 days of storage, but prestorage LR and the solution PAGGG-M seem to have the most beneficial effect on canine RBC storage. Posttransfusion viability studies are needed to further test these storage solutions in dogs.

**Key words:** *hemotherapy, transfusion, blood, dog, leukodepletion.*

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

FIGURE 1. CHANGES IN PH, HEMOLYSIS, LACTATE, GLUCOSE, ATP, 2,3 DPG, NA,  
AND K IN LR CANINE PRBC STORED IN 4 DIFFERENT ADDITIVE SOLUTIONS.. .....54

FIGURE 2. CHANGES IN PH, HEMOLYSIS, LACTATE, GLUCOSE, ATP, 2,3 DPG, NA,  
AND K IN NON-LR CANINE PRBC STORED IN 4 DIFFERENT ADDITIVE SOLUTIONS.. .....55

LISTA DE TABELAS

TABLE 1. COMPOSITION OF SOLUTIONS.....51

TABLE 2. EVALUATION OF LR CANINE RBC VARIABLES.....52

TABLE 3. EVALUATION OF NON-LR CANINE RBC VARIABLES.....53

## LISTA DE ABREVIATURAS

2,3-DPG	2,3-Difosfoglicerato
ATP	Adenosina trifosfato
CPD	Citrato de sódio, fosfato, glicose (dextrose)
CPDA	Citrato de sódio, fosfato, glicose (dextrose) e adenina
EDTA-K <sub>2</sub>	Ácido etilenodiamino-tetracético dipotássico
ICSH	International Committee for Standardization in Haematology
IPR	Índice de Produção de Reticulócitos (do inglês, RPI)
K	Potássio
LACVet	Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias
Na	Sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
SNO	S-nitrosotiol
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
vCJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
3.1. HISTÓRICO DA MEDICINA TRANSFUSIONAL .....	17
3.2. ARMAZENAMENTO DO SANGUE E SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO .....	19
3.3. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DA QUALIDADE DE PRESERVAÇÃO DO SANGUE .....	20
3.3.1. Adenosina trifosfato (ATP).....	22
3.3.2. 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG).....	23
3.4. SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO SANGUÍNEA E SEUS EFEITOS SOBRE O METABOLISMO ERITROCITÁRIO .....	25
3.4.1. Soluções aditivas e o uso do concentrado de eritrócitos .....	25
3.4.2. Soluções de preservação sanguínea e o uso em Medicina Veterinária .....	26
3.5. LEUCORREDUÇÃO .....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. ARTIGO .....	34
<i>Title of the manuscript: Effects of leukoreduction and four additive solutions on canine red cell concentrate quality during storage .....</i>	<i>34</i>
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	56
6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS .....	57
ANEXO 1 - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA.....	61

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse pela medicina transfusional tem crescido nestes últimos anos na medicina veterinária e é constante na medicina humana. No Brasil, diversos serviços de hemoterapia veterinária públicos (USP, Unesp, UEL, entre outros) e até privados (HEMOVET – SP, HEMOPET – RJ, entre outros) estão se desenvolvendo, e por isso a pesquisa nesta área é essencial para auxiliar e melhorar o atendimento nestes centros.

No Brasil e em outros países, como Estados Unidos e Austrália, já são realizados rotineiramente procedimentos essenciais, como separação de hemocomponentes para melhor atender cada caso em que exista a necessidade de transfusão sanguínea, mas ainda existem dúvidas quanto à melhor solução de preservação de eritrócitos e outros produtos do sangue, pois foram feitos poucos estudos em cães.

Este projeto teve como objetivo comparar os efeitos da leucorredução por filtração e de quatro soluções aditivas sobre a qualidade do concentrado de eritrócitos canino durante o armazenamento, promovendo melhorias nos bancos de sangue e realizando estudos que contribuam para a hemoterapia veterinária, bem como para a medicina transfusional humana, visto que o cão pode servir como um bom modelo experimental nesta área.

Assim como na medicina humana, na medicina veterinária, o curto tempo de armazenagem é um dos fatores que dificulta e limita a quantidade de sangue que pode ser efetivamente armazenada e é uma desvantagem na medicina veterinária, pois o acesso a cães doadores é restrito e a demanda é contínua e cada vez maior na prática de clínicas e hospitais veterinários. Durante o armazenamento de sangue canino a baixas temperaturas, assim como ocorre com sangue humano, seja sob a forma de sangue total ou concentrado de eritrócitos, há uma queda repentina e intensa de metabólitos importantes para a viabilidade e funcionalidade

dos eritrócitos, como os níveis de 2,3-DPG e ATP, juntamente com o pH. A busca por melhores formas e soluções para preservação dos eritrócitos, capazes de evitar ou diminuir estes efeitos prejudiciais durante o seu armazenamento, é contínua para que, ao final, se obtenha uma melhor qualidade do sangue transfundido.

A avaliação bioquímica durante o armazenamento do concentrado de eritrócitos canino com diferentes soluções aditivas constitui uma informação prática para a medicina veterinária brasileira, gerando assim maior conhecimento, motivando novos projetos de estudos *in vitro* e *in vivo*, e criando um núcleo de pesquisa e extensão no auxílio à hemoterapia veterinária.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Comparar os efeitos da leucorredução por filtração e de quatro soluções aditivas sobre a qualidade do concentrado de eritrócitos canino durante o 41 dias de armazenamento.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ▶ Determinar qual das soluções aditivas mantém a qualidade do concentrado de eritrócitos canino por mais tempo.
- ▶ Avaliar o efeito da leucorredução por filtração sobre a qualidade do concentrado de eritrócitos de cães.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Histórico da medicina transfusional**

Transfusão é a palavra que define a terapia intravenosa com sangue total ou seus subprodutos (hemocomponentes e hemoderivados). Há anos, a hemoterapia tem se baseado no uso de sangue total, e este ainda é o principal uso em medicina veterinária (ABRAMS-OGG, 2000).

A prática da transfusão sanguínea teve início no século passado na medicina humana, e vem evoluindo desde então (AUBUCHON, 2003). Na medicina veterinária, o processo foi um pouco mais lento, mas atualmente existem grandes bancos de sangue veterinários em vários países do mundo que tornaram possíveis a prática da medicina transfusional veterinária de alta qualidade. Entretanto, sabe-se que isto não depende somente da disponibilidade de componentes sanguíneos e do uso adequado de cada um deles, mas também da qualidade destes componentes. Respeitar normas adequadas para colheita, processamento e armazenamento é a melhor maneira de alcançar os melhores resultados (SCHNEIDER, 2000; HOHENHAUS, 2007).

Os hemocomponentes sanguíneos podem ser obtidos através de centrifugação, ou, menos comumente, através de aférese (técnica que utiliza equipamentos especializados que permitem a separação de apenas um componente do sangue do doador, devolvendo-lhe o restante). Sabendo-se que muitas vezes o paciente requer uma transfusão de apenas um componente sanguíneo específico, a separação dos hemocomponentes permite que mais de um paciente possa se beneficiar de apenas um doador e reduzir os riscos de uma reação transfusional contra os outros componentes desnecessários (AUBUCHON, 2003).

Ambos, sangue total e seus componentes, podem ser utilizados logo após a colheita (produtos frescos) ou após o armazenamento (produtos armazenados/ estocados). A biopreservação é o processo de manutenção da integridade e funcionalidade das células mantidas

fora do seu ambiente de origem por períodos extensos de tempo e o armazenamento hipotérmico é a técnica mais antiga e mais estudada no mundo todo. A preservação dos eritrócitos sob baixas temperaturas é baseada no princípio de que os eventos bioquímicos e as reações moleculares podem ser suprimidos pela redução da temperatura (LLOHN et al., 2005; SCOTT et. al., 2005).

O maior impulso para o campo da biopreservação de eritrócitos é a enorme demanda clínica. As transfusões de eritrócitos salvam vidas através do aumento da massa eritrocitária em pacientes que possuem baixa capacidade de carreamento de oxigênio devido ao aumento da perda de eritrócitos (trauma/ hemorragia cirúrgica), diminuição da produção pela medula óssea (anemias aplásicas), defeitos na molécula de hemoglobina (hemoglobinopatias e talassemias), e diminuição na sobrevivência dos eritrócitos (anemias hemolíticas) (SCOTT et. al., 2005).

Um dos componentes sanguíneos mais utilizados para transfusão é o concentrado de eritrócitos (também conhecido como papa de hemácias) e o seu uso tem se tornado uma prática terapêutica comum na medicina veterinária. O concentrado de eritrócitos é indicado no tratamento de anemia normovolêmica (WARDROP et al., 1994) ou de anemia hemorrágica aguda quando combinado com plasma, soluções colóides sintéticas ou soluções cristalóides (ABRAMS-OGG, 2000; HOHENHAUS, 2007).

O armazenamento permite acesso imediato ao sangue total e seus subprodutos, mas a colheita sanguínea e a preparação destes podem ser intensivamente trabalhosas e consomem bastante tempo, o que justifica a existência de um banco de sangue em clínicas/ hospitais que realizam transfusões rotineiramente. Durante a última década houve um aumento do interesse na medicina veterinária transfusional, acompanhado pelos avanços na oncologia veterinária e pela terapia intensiva, e atualmente os componentes sanguíneos são rotineiramente preparados por certas instituições e empresas comerciais em alguns países da Europa, nos Estados Unidos e mais recentemente no Brasil (ABRAMS-OGG, 2000; GONÇALVES, 2005; ULATA, 2005, HOHENHAUS, 2007).

### **3.2. Armazenamento do sangue e soluções de preservação**

Muitos trabalhos foram e ainda são realizados com sangue humano e de outras espécies para desenvolver um meio que possa efetivamente estender o tempo de armazenamento de sangue total e concentrado de eritrócitos (ALLEN, 2003, LLOHN et al., 2005; HÖGMAN et al., 2006; WINSLOW e INTAGLIETTA, 2008).

O desenvolvimento de meios e soluções de preservação sanguínea possibilitou o armazenamento dos eritrócitos e, conseqüentemente, facilitou o trabalho dos bancos de sangue. As soluções utilizadas para o armazenamento de sangue, em geral, contêm heparina ou citrato de sódio, que tem função anticoagulante, a primeira por inibir a trombina e o segundo por quelar íons de cálcio. O uso da heparina deve ser restrito ao sangue colhido para transfusão imediata. As soluções que contêm citrato de sódio podem também conter outros agentes que atuam na preservação dos eritrócitos (ABRAMS-OGG, 2000; HOHENHAUS, 2007).

O citrato de sódio tem sido usado desde o início do século XX como um anticoagulante estável, minimamente tóxico que também possui propriedades preservativas (ROUS e TURNER, 1916). O citrato de sódio em soluções de preservação também influencia o pH intracelular, promovendo o tamponamento. Este composto faz parte do ciclo de Krebs, sendo metabolizado pelo músculo, fígado e córtex renal e armazenado nos ossos (CAMPBELL-LEE e NESS, 2003).

### 3.3. Avaliação bioquímica da qualidade de preservação do sangue

Durante a década de 60 até meados da de 80, houve um grande progresso no melhoramento da qualidade do concentrado de eritrócitos humanos durante o seu armazenamento. Além disso, nesta época, também houve a introdução de novos anticoagulantes, bolsas plásticas, soluções aditivas, possibilidades da remoção da capa leucocitária e/ ou leucorredução. As soluções de preservação de eritrócitos são essencialmente soluções de cultura de tecido primitivas para lenta metabolização das células estocadas em um sistema fechado e refrigerado (1 a 6°C). Devido à preocupação de agências nacionais e internacionais, que regulamentam e estabelecem padrões para estes produtos, o progresso nesta área se tornou mais lento nos últimos anos. Cada etapa no processamento de um hemocomponente é extremamente importante e necessita de pesquisas detalhadas para alcançar os melhores resultados sem colocar em risco a vida dos pacientes (DE KORTE e VERHOEVEN, 2004).

A qualidade do concentrado de eritrócitos depende da qualidade de uma série de etapas: colheita de sangue, temperatura de processamento e armazenamento, preparação do componente (ex. velocidade de centrifugação adequada), remoção da capa leucocitárias e/ou leucodepleção por filtração, escolha e adição da solução aditiva e tempo de armazenamento (SOWEMIMO-COKER, 2002).

Existem diversos testes disponíveis para avaliação da qualidade dos eritrócitos durante o armazenamento. Apenas alguns foram padronizados suficientemente para serem considerados testes de qualidade padrão para bancos de sangue e estes foram e ainda são muito utilizados na pesquisa para avaliação dos eritrócitos. Em geral, o conhecimento dos fatores determinantes da qualidade dos eritrócitos em relação com a qualidade e/ ou função *in vivo* são em sua maior parte baseados em estudos sobre o armazenamento de eritrócitos normais em diferentes soluções aditivas sob condições padronizadas (temperatura, tempo e etc.). Os parâmetros mais utilizados para a avaliação da qualidade *in vitro* dos eritrócitos são: inspeção visual, grau de hemólise e os

parâmetros hematológicos, permeabilidade aos cátions, nível de 2,3 difosfoglicerato, nível de nucleotídeos intracelulares, morfologia eritrocitária, entre outros (DE KORTE e VERHOEVEN, 2004).

Durante o armazenamento do sangue, ocorrem alterações celulares que podem afetar a viabilidade e a função dos eritrócitos e que contribuem para a diminuição da viabilidade e funcionalidade celular após a transfusão. Tais alterações são conhecidas coletivamente como “lesão de armazenamento” do sangue. As soluções aditivas tem sido formuladas para minimizar este efeito prejudicial, resultando num tempo maior de armazenamento (WARDROP et al., 1994; DE KORTE e VERHOEVEN, 2004).

Uma das maiores preocupações ao desenvolver soluções de preservação sanguínea é a manutenção *in vitro* dos níveis de glicose, adenosina trifosfato (ATP) e 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), ou seja, do metabolismo energético celular até o momento da transfusão (ABRAMS-OGG, 2000; CAMPBELL-LEE e NESS, 2003; DE KORTE e VERHOEVEN, 2004; HÖGMAN et al., 2006).

Estudos recentes discutem a importância dos níveis óxido nítrico sob a forma de S-nitrosotiol (SNO) nos eritrócitos, o qual age no relaxamento do endotélio endógeno e facilita o fluxo de sangue para áreas isquêmicas modulando a oferta de oxigênio tecidual. Pesquisadores tem demonstrado uma queda nos níveis de SNO durante o armazenamento e sugerem que isto pode estar associado à menor eficácia da transfusão de concentrado de eritrócitos armazenados, quando comparado com concentrado de eritrócitos frescos em pacientes em estado crítico (BENNET-GUERRERO et al., 2007; WINSLOW e INTAGLIETTA, 2008).

### ***3.3.1. Adenosina trifosfato (ATP)***

Os eritrócitos possuem funções vitais no organismo, como o tamponamento dos íons hidrogênio e o transporte de oxigênio e de dióxido de carbono, e para a manutenção destas atividades é necessário energia sob a forma de ATP (HARVEY, 2000). Ao completarem a maturação, os eritrócitos imaturos (reticulócitos) perdem diversas organelas, entre elas a mitocôndria, o que resulta na perda do ciclo de Krebs (glicólise aeróbica), tornando-o dependente da glicólise anaeróbia, responsável pela formação de 90% do ATP necessário a esta célula. Nesta via, são formadas duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose metabolizada em duas moléculas de lactato. A demanda metabólica do eritrócito é menor do que a de outras células sanguíneas, mas ainda assim, o eritrócito precisa de ATP para a manutenção da forma e deformabilidade celular, para a fosforilação de fosfolpídeos e proteínas da membrana, para o transporte ativo de diversas moléculas pela membrana e para a síntese de glutathiona reduzida (GSH) (HARVEY, 1997).

Sendo a glicose o principal combustível dos processos que requerem energia para a preservação da função da membrana celular, no início do processo de desenvolvimento destas soluções de preservação sanguínea, a glicose foi adicionada ao citrato de sódio como uma fonte energética, mas durante o processo de esterilização por calor, ocorreu a caramelização devido ao pH alcalino (BORAL e HENRY, 1996). O citrato de sódio e a glicose passaram a ser esterilizados separadamente, e só misturados antes da colheita de sangue. Em 1943, pesquisadores adicionaram ácido cítrico, criando a solução de ácido cítrico e glicose, conhecida por ACD. Esta formulação diminui o pH, permitindo a esterilização sem o efeito de caramelização e possibilitando armazenamento de sangue total humano por até 21 dias. Estes autores observaram também, que devido à diminuição do pH, o sangue e a solução de preservação deveriam estar completamente homogeneizados para evitar a formação de coágulos (LOUTIT e MOLLISON, 1943).

O ATP (adenosina trifosfato) contido em concentrados de eritrócitos humanos diminui durante o armazenamento em CPDA-1 (solução de citrato de sódio, fosfato, glicose e adenina) (MOORE et al., 1981). Em 1947, Rapoport observou alterações na morfologia eritrocitária e aumento da fragilidade celular durante o armazenamento de eritrócitos (RAPOPORT, 1947). Somente em 1962, foi determinada uma correlação direta entre os níveis de ATP e a morfologia eritrocitária (NAKAO et al., 1962). A diminuição dos níveis de ATP durante o armazenamento é associada com a mudança da forma de disco bicôncavo eritrocitário para esferócito, bem como a diminuição dos lipídeos de membrana e aumento da rigidez celular. Além disso, os níveis de ATP devem ser mantidos para garantir a viabilidade pós-transfusional dos eritrócitos. A adição de adenina supre as perdas dos grupos adenina, fornecendo ATP suficiente à sobrevivência das células.

A influência da adenina sobre os níveis de ATP foi investigada primariamente utilizando-se ACD como solução de preservação para sangue total humano. A inclusão deste nucleotídeo nas soluções de preservação prolonga o tempo de armazenagem de eritrócitos satisfatoriamente a 1-6°C. Soluções suplementadas com adenina são usadas na Alemanha e Suécia desde a década de 1960 e a formulação designada CPDA-1 contendo 0,25 mM de adenina (concentração final) e 25% mais glicose que o CPD (citrato de sódio, fosfato e glicose) foi licenciada para uso em humanos nos Estados Unidos em 1978. Segundo estes autores, o sangue total e o concentrado de eritrócitos humanos podem ser armazenados com CPDA-1 por um período de até 35 dias, enquanto o uso de CPD permite a armazenagem de concentrado de eritrócitos humanos por 21 dias (MOROFF e DENDE, 1983).

### ***3.3.2. 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG)***

O 2,3-DPG é um produto do metabolismo energético do eritrócito. Os eritrócitos de caninos, equinos, suínos, e humanos normalmente contem altas concentrações de 2,3-DPG,

enquanto os de felinos e ruminantes domésticos possuem baixas concentrações (HARVEY, 2000).

A principal função do 2,3-DPG eritrocitário é regular a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Quando ocorre esta ligação, a molécula de deoxihemoglobina é estabilizada e diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e permitindo sua liberação para os tecidos. Assim, uma diminuição de 2,3-DPG interfere neste mecanismo, reduzindo a liberação de oxigênio aos tecidos (HARKEN, 1977).

A concentração de 2,3-DPG em concentrados de eritrócitos caninos diminui durante o armazenamento, assim como ocorre em humanos (ABRAMS-OGG, 2000). Após a transfusão, até 50% do nível normal de 2,3-DPG é sintetizado dentro de 3 a 8 horas, e a maior parte dentro de 24 horas (ABRAMS-OGG, 2000), podendo ser necessário um período de até 48 horas para que os níveis normais sejam alcançados, o que pode ser prejudicial em determinados casos clínicos (SCOTT et. al., 2005).

A diminuição de 2,3-DPG é dependente do pH. Em sangue total humano armazenado por 35 dias em CPDA-1, o pH diminui devido à formação de ácido láctico e a concentração de 2,3-DPG também (MOORE et al., 1981). O 2,3-DPG é produzido durante a glicólise eritrocitária através da via Luebering-Rapoport, pela ação da enzima 2,3-DPG mutase sobre o 1,3-DPG (HÖGMAN, 1991). O 2,3-DPG é então ativado pela 2,3-DPG fosfatase formando 3-PG, que é utilizado pela via glicolítica. A diminuição do pH dos eritrócitos durante o período de armazenamento contribui para a diminuição do 2,3-DPG, pois a 2,3-DPG fosfatase é ativada em pH abaixo de 7,2 (HÖGMAN, 1998).

### **3.4. Soluções de preservação sanguínea e seus efeitos sobre o metabolismo eritrocitário**

A solução de CPD (ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato e glicose) foi desenvolvida para manter melhores níveis de 2,3-DPG no sangue humano armazenado, entretanto, os níveis continuavam decaindo de alguma forma durante o armazenamento nestas soluções. Em um cão apresentando anemia aguda severa, deseja-se que o sangue a ser transfundido contenha níveis adequados de 2,3-DPG para oxigenação tissular imediata. Para estes casos, pode-se utilizar concentrado de eritrócitos ou sangue total, desde que armazenados por um período menor que duas e quatro semanas, respectivamente (supondo que a estocagem seja realizada com as seguintes soluções: CPD, CPDA-1, ADSOL<sup>®</sup>, Nutricel<sup>®</sup> ou OPTISOL<sup>®</sup>). Este fato não é tão importante em gatos, visto que esta espécie possui normalmente baixos níveis de 2,3-DPG. As soluções mais frequentemente utilizadas atualmente para o armazenamento de sangue canino e felino são o CPD, CP2D e o CPDA-1 (ABRAMS-OGG, 2000).

#### ***3.4.1. Soluções aditivas e o uso do concentrado de eritrócitos***

Em bancos de sangue humanos, soluções salinas, glicosadas e com adenina, também conhecidas como soluções aditivas, são adicionadas diretamente ao concentrado de eritrócitos, após a centrifugação e remoção do plasma, e o objetivo de seu uso é prolongar o tempo de estocagem destas células por até 42 dias (HEATON et al., 1984 e HÖGMAN et al., 1986).

Em 1983, a solução aditiva, ADSOL<sup>®</sup> (Fenwal Laboratories, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, EUA), também conhecida como AS-1, foi aprovada para o uso em humanos. A solução consiste em adenina (auxilia na manutenção dos níveis de ATP), glicose, cloreto de sódio, sorbitol e manitol. O ADSOL<sup>®</sup> possui 60% mais adenina e aproximadamente 2,5 vezes mais glicose que o CPDA-1 (MOLLISON et al., 1997). A adição de manitol previne a hemólise excessiva durante o período de armazenamento (HÖGMAN, 1986). O aumento da

glicose permite um fornecimento energético adequado às células durante 35 dias, e o sangue humano pode ser estocado em ADSOL<sup>®</sup> por até 42 dias (KLEIN, 2000). Um dos benefícios adicionais desta solução é que a quantidade de plasma removido de uma unidade de sangue total pode ser maximizada. O hematócrito do concentrado de eritrócitos pode ser de até 85%, que ao adicionar 100 mL de ADSOL<sup>®</sup> resulta em 60% a 70%, ou seja, menos viscoso e mais fluído, facilitando a transfusão em situações de emergência (HEATON et al., 1984). Uma segunda solução aditiva comumente utilizada é a AS-3, também conhecida como Nutricel<sup>®</sup> (Cutter Biological, Miles Laboratories, Emeryville, CA, EUA), mas esta não contém manitol e contém ácido cítrico e citrato de sódio em sua composição (ABRAMS-OGG, 2000).

Outras soluções aditivas com formulações diversas foram criadas e estão disponíveis no mercado, como a AS-5 ou OPTISOL<sup>®</sup> (Terumo Medical Corporation, Summerset, NJ, EUA) e a SAGM-1, ambas compostas por diferentes quantidades de glicose, adenina, manitol e cloreto de sódio (ABRAMS-OGG, 2000).

A busca de uma melhor forma de preservação das células para o oferecimento de um melhor produto para o paciente que necessita de transfusão é constante, e um número grande de pesquisadores tenta desenvolver soluções de armazenamento que possam garantir a qualidade da transfusão (KURUP et al., 2003; LLOHN et al., 2005; HÖGMAN et al., 2006; BENNET-GUERRERO et al., 2007; WINSLOW e INTAGLIETTA, 2008).

#### ***3.4.2. Soluções de preservação sanguínea e o uso em Medicina Veterinária***

O tempo de armazenamento depende da solução anticoagulante utilizada deve ser determinado para cada espécie (de acordo com a meia-vida eritrocitária de cada uma) ao invés de utilizar os tempos preconizados para a espécie humana (exemplo: o tempo de armazenamento para eritrócitos humanos em CPDA-1 é de 35 dias). De acordo com pesquisadores que avaliaram

o uso do CPDA-1 para preservação de eritrócitos caninos, o tempo máximo de armazenamento sugerido é de 20 dias (PRICE et al., 1988). Este curto tempo de armazenagem dificulta e limita a quantidade de sangue canino que pode ser efetivamente armazenada e é uma desvantagem em particular para hospitais de pequenos animais onde o acesso a cães doadores pode ser difícil.

As soluções aditivas conhecidas por AS-1 ou ADSOL<sup>®</sup> e a AS-3 ou Nutricel<sup>®</sup> já foram testadas para a preservação do concentrado de eritrócitos canino e tem capacidade de prolongar o tempo de estocagem, mantendo a viabilidade celular aceitável, por até 37 e 35 dias respectivamente (WARDROP et al., 1994; WARDROP et al., 1997).

A procura por novas formas ou soluções anticoagulantes de preservação é uma preocupação para a medicina humana, e hoje também preocupa a medicina veterinária. A existência de diferentes soluções comercialmente disponíveis (ex. SAGM-1 e OPTISOL<sup>®</sup>), ou recentemente reformuladas, que ainda não foram avaliadas para o uso em cães torna esta área da medicina veterinária transfusional um campo interessante que precisa ser ainda mais explorado.

### **3.5. Leucorredução**

A leucorredução (LR) ou leucodepleção se tornou uma tecnologia bem difundida e estabelecida para a prevenção de muitas complicações resultantes da transfusão de sangue. Em muitos países desenvolvidos (ex. Canadá e países da Europa) a LR é realizada em todos os hemocomponentes (LR universal), em alguns países como os Estados Unidos esta prática é reservada para determinados pacientes, visto que o custo para o sistema de saúde é bastante alto. (DZIK e SZCZEPIORKOWSKI, 2003; SPINELLA et al., 2010)

A técnica de LR se refere a métodos para a diminuição do número de leucócitos residuais do doador no hemocomponente. A LR, quando descrita inicialmente, poderia ser realizada de diferentes formas, e em três diferentes momentos do processamento: pré-estocagem, antes da

liberação do componente para a transfusão e à beira do leito do paciente. Atualmente, estudos demonstraram que a LR pré-estocagem apresenta melhores resultados (ex. menores efeitos colaterais nos receptores) em relação aos outros momentos (DZIK e SZCZEPIORKOWSKI, 2003; Phelan et al., 2010; BARROS e BORDIN, 2007.; CARDIGAN e WILLIAMSON, 2009)

A maior parte da LR é realizada através de filtros que consistem uma rede de microfibras sintéticas com poros de tamanho conhecido. Estes filtros removem leucócitos, e podem remover plaquetas, por diferentes mecanismos: tamanho dos poros, adesão celular à matriz do filtro e interação biológica entre células e a matriz do filtro. A eficácia do filtro pode sofrer interferência de diversos fatores: tipo de filtro, hemocomponente a ser filtrado (composição, temperatura, velocidade de filtração), período (pré ou pós-estoque). Existem vários tipos de filtros, no final da década de 80 surgiram os filtros de 3ª geração compostos por uma malha de fibras de poliésteres, celulose ou microporos de poliuretano, estes filtros podem remover 3 ou mais log de leucócitos dos hemocomponentes, quando utilizados da forma correta (DZIK e SZCZEPIORKOWSKI, 2003; BARROS e BORDIN, 2007; CARDIGAN e WILLIAMSON, 2009).

A temperatura pode influenciar na filtração, uma vez que as membranas dos leucócitos tornam-se mais rígidas a 4°C e, portanto, estes são retidos com mais facilidade pelos filtros. A velocidade também é um fator importante, um fluxo mais lento resulta em decréscimo na eficácia da filtração (DZIK e SZCZEPIORKOWSKI, 2003; BARROS e BORDIN, 2007; CARDIGAN e WILLIAMSON, 2009).

A produção de hemocomponentes humanos leucorreduzidos atualmente é realizada dentro de 48 horas após a coleta do doador. No sangue total, geralmente, este procedimento é realizado através de filtração, mas durante a aférese, a centrifugação e elutrição fazem parte do equipamento utilizado. Os mecanismos de remoção de leucócitos estão relacionados com ativação plaquetária, causando adesão secundária de granulócitos e monócitos, adesão direta e captação de células linfóides mais rígidas. A maior parte dos filtros de LR para sangue total

removem mais de 2 logs de plaquetas e mais de 4 logs de leucócitos, sendo assim, do sangue total leucorreduzido só é possível produzir plasma fresco congelado e concentrado de eritrócitos, o qual pode ter uma solução aditiva adicionada. Outros hemocomponentes, como o concentrado de plaquetas, podem ser preparados e em seguida leucorreduzidos, antes da estocagem. Um volume de 10 a 15% do sangue total é perdido na passagem pelo filtro, mas isso resulta em efeitos adversos mínimos para a qualidade dos hemocomponentes (DZIK e SZCZEPIORKOWSKI, 2003; BARROS e BORDIN, 2007; CARDIGAN e WILLIAMSON, 2009).

A padronização dos hemocomponentes leucorreduzidos em humanos reflete a capacidade atual dos sistemas de LR. Apenas uma pequena fração dos componentes é testada para o número de leucócitos residuais e o limite de sensibilidade dos métodos de contagem é  $0,3 \times 10^6$  unidade. O limite para concentrados de eritrócitos é de  $5 \times 10^6$  leucócitos por unidade nos Estados Unidos, e de  $1 \times 10^6$  leucócitos por unidade de concentrado de eritrócitos ou plaquetas na Europa (DZIK e SZCZEPIORKOWSKI, 2003; CARDIGAN e WILLIAMSON, 2009)..

O número de leucócitos residuais pode ser contado por citometria de fluxo ou método manual através de microscopia utilizando câmara de Nageotte para contagem de volumes maiores. O monitoramento da qualidade dos sistemas de LR é realizado em 1-5% da produção total de cada hemocomponente do serviço de hemoterapia, entretanto podem existir falhas que dependem de muitos fatores: a capacidade do sistema de LR, defeitos na produção do sistema (filtros), a proporção de hemocomponentes que são testados e fatores relacionados com o doador. Um exemplo em serem humanos são pessoas com traço falciforme, e nestes casos os filtros são parcialmente ou totalmente bloqueados (DZIK, 1997; KRAILADSIRI et al., 2001; SCHUETZ et al., 2004).

Muitos estudos demonstram que a leucorredução pré-estocagem pode prevenir ou diminuir o risco de transmissão de vírus, príons, protozoários e outros organismos intracelulares.

No Reino Unido e Irlanda, o risco de que uma variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) pudesse ser transmitida pelo sangue, particularmente pelos leucócitos, foi um fator decisivo em 1998 para a implementação da leucorredução universal (CARDIGAN e WILLIAMSON, 2009; TURNER e LUDLAM, 2009; WILTSHIRE et al., 2010).

Em outros países, benefícios adicionais, como a redução de complicações relacionadas ao sistema imune e a remoção de vírus associados a células foram igualmente importantes. Efeitos imunológicos adversos atribuídos aos leucócitos incluem a exposição a antígenos leucocitários (HLA), doença do enxerto *versus* hospedeiro associada à transfusão e imunossupressão, a qual pode levar ao aumento da incidência de sepse pós-operatória e tumores. Entretanto, a depleção universal de leucócitos pode remover alguns efeitos benéficos da imunomodulação induzida pela transfusão, como o aumento da sobrevivência de pacientes com rins transplantados e supressão da doença de Crohn (DZIK e SZCZEPIORKOWSKI, 2003; BARROS e BORDIN, 2007; CARDIGAN e WILLIAMSON, 2009).

Tabela 2. Especificação para concentrado de eritrócitos (ANVISA, 2004)

<b>HEMOCOMPONENTE</b>	<b>ANÁLISE</b>	<b>VALORES PADRÃO</b>
	Volume de uma unidade	270 ± 50 mL
<b>Concentrado de Eritrócitos (CE)</b>	Concentração de Hemoglobina	> 45 g/unidade de CE
	Hematócrito	50 a 80 %
	Grau de Hemólise	< 0,2% (dia 1) e < 0,8% (dia 35)
	Microbiológica	negativa
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
<b>Concentrado de Eritrócitos Leucorreduzido (CE LR)</b>	Concentração de Hemoglobina	> 40 g/ unidade CEL
	Grau de Hemólise	< 0,8 % da massa eritrocitária
	Leucorredução	> 99,9%
	Leucócitos residuais (Nageotte)	< 5 x 10 <sup>6</sup> /unidade de CEL
	Microbiológica	negativa

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações obtidas neste trabalho mostram a importância do uso de soluções aditivas para prevenir a chamada “lesão de estoque” e manter a viabilidade dos eritrócitos durante o seu armazenamento. Além disso, o uso de filtros para leucorredução permite manter a qualidade do hemocomponente e evitar muitas outras reações adversas resultantes da transfusão.

De acordo com este trabalho, todas as soluções aditivas utilizadas em ambos os grupos apresentaram resultados satisfatórios durante 21 dias de armazenamento, mas o uso da leucorredução pré-armazenamento e da solução PAGGG-M parecem ter um maior efeito benéfico sobre o armazenamento do concentrado de eritrócitos canino.

Em relação ao grupo não leucorreduzido, a hemólise foi extremamente alta e isso provavelmente se deve a algum fator pré-analítico, outros estudos devem ser realizados para avaliar tais soluções sem a leucorredução.

Para determinar se estas soluções são adequadas para o uso *in vivo* e o tempo de armazenamento de cada uma delas, estudos sobre a viabilidade pós-transfusional são necessários para estas soluções ainda não testadas em cães.

No Brasil, apenas a solução SAGM está disponível no mercado, portanto mais estudos *in vitro* e ensaios clínicos devem ser realizados para que se possa utilizá-la de forma correta em animais, visto que o acesso a animais doadores pode ser difícil.

## 6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

1. ABRAMS-OGG, A. C. G. Practical Blood Transfusion. In: DAY, M.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J. (Eds) **Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine**, 1. ed. Hampshire: BSAVA, 2000. cap.15. p.263-303.
2. ALLEN, M. B. Component Preparation and Storage. In: HILLYER, C. D.; SILBERSTEIN, L. E.; NESS, P. M.; ANDERSON, K. C.; ROUSH, K. S. **Blood Banking and Transfusion Medicine – Basic Principles & Practice**, Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003. p. 121-136.
3. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). RDC 153 de 14/06/04. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 2004.
4. AUBUCHON, J. P. Evolution to the 21<sup>st</sup> Century. In: HILLYER, C. D.; SILBERSTEIN, L. E.; NESS, P. M.; ANDERSON, K. C.; ROUSH, K. S. **Blood Banking and Transfusion Medicine – Basic Principles & Practice**, Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003. p. 3-7
5. BARROS, M. M. O.; BORDIN, J. O. Leucorredução de Hemocomponentes Celulares. In: Bordin JO, Langui DMJr, Covas DT. (Eds) **Hemoterapia Fundamentos e Prática**, São Paulo: Atheneu, 2007. p. 227-36
6. BENNETT-GUERRERO, E.; VELDMAN, T. H.; DOCTOR, A.; TELEN, M. J.; ORTEL, T. L.; REID, T. S.; MULHERIN, M. A.; ZHU, H.; BUCK, R. D.; CALIFF, R. M.; MCMAHON, T. J. Evolution of adverse changes in stored RBCs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n.43, p.17063-17068, 2007.
7. BORAL, L.; HENRY, J. B. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 19. ed. Philadelphia. WB Saunders, 1906. 802 p.
8. BUCHELER, J.; COTTER, S. M. Outpatient blood donor program. **Problems in Veterinary Medicine**, 4(4):572-81. 1992.
9. CAMPBELL-LEE, S. A.; NESS, P. M. Packed RBCs and Related Products. In: HILLYER, C. D.; SILBERSTEIN, L. E.; NESS, P.M.; ANDERSON, K. C.; ROUSH, K. S. **Blood Banking and Transfusion Medicine**. 1. ed. Churchill Livingstone (Elsevier Science), 2003. 145-152 p.
10. CARDIGAN, R.; WILLIAMSON, L. M. Production and storage of blood components. In: Murphy, M. F.; Pamphilon, D. H. (Eds) **Practical Transfusion Medicine**, 3<sup>a</sup> Ed., West Sussex: Wiley-Blackwell, 2009. p. 209-24.
11. DE KORTE, D.; VERHOEVEN, A. J. Quality determinants of erythrocyte destined for transfusion. **Cellular & Molecular Biology Research** (Noisy-le-grand), v.50 (março), n.2, p.187-95, 2004.
12. DZIK, W. H.; SZCZEPPIORKOWSKI, Z. M. Leukocyte Reduced Products. In: Hillyer CD, Silberstein LE, Ness PM, Anderson KC, Roush KS. (Eds). **Blood Banking and Transfusion Medicine – Basic Principles & Practice**, Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003. p. 219-40

13. GONÇALVES, S. Padronização do fracionamento do sangue total em cães - Comunicado. In: **Anais do XXVI Congresso Brasileiro da Anclivepa**, 2005, Salvador - BA. XXVI Congresso Brasileiro da Anclivepa, 2005.
14. HALDANE, S., MARKS, S. L.; RAFFE, M. R; ROBERTS, J. Transfusion Medicine. **Compendium**, v.julho, p.502-518, 2004.
15. HARKEN, A. The surgical significance of the oxyhemoglobin dissociation curve. **Surgery Gynecology & Obstetrics**, v.144, p.935, 1977.
16. HARVEY, J. W. Erythrocyte metabolism. In: **Schalm's Veterinary Hematology**, 5. ed., B.F. FELDMAN B. F., ZINKL J. G., JAIN N.C. (Eds), Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 125-134 p.
17. HARVEY, J. W. The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders. In: **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M. L. (eds.). SanDiego: Academic Press, 1997. 157-203 p.
18. HEATON, A.; MIRIPOL, J.; ASTER, R.; HARTMAN, P.; DEHART, D.; RZAD, L.; GRAPKA, B.; DAVISSON, W.; BUCHHOLZ, D. H. Use of Adsol preservation for prolonged storage of low viscosity AS-1 red blood cells. **British Journal of Haematology**, v.57, p.467-478, 1984.
19. HÖGMAN, C. F. Aditive system approach in blood transfusion: Birth of the SAG and Sagman systems. **Vox Sanguinis**, v.51, p.339-340, 1986.
20. HÖGMAN, C. F. Liquid storage of human erythrocytes. In: HARRIS J. R. (ed): **Blood Separation and Plasma Fractionation**. New York, Wiley-Liss, 1991. 63-97 p.
21. HÖGMAN, C. F. Preparation and preservation of red cells. **Vox Sanguinis**, v.74, p.177, 1998.
22. HÖGMAN, C. F., DE VERDIER C. H., ERICSON A., HEDLUND K., SANDHAGEN B. Effects of oxygen on red cells during liquid storage at +4°C. **Vox Sanguinis**, v.51, p.27-34, 1986.
23. HÖGMAN, C. F.; LÖF, H.; MERYMAN, H. T. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate. **Transfusion**, v.26, n.9, p.1543-1552, 2006.
24. KLEIN, H. G. **Standards for Blood Banks And Transfusion Services**. **American Association of Blood Banks**. 20<sup>a</sup> ed. Bethesda, MD, 2000.
25. Krailadsiri P, Gilcher R, Seghatchian J. Leukoreduction of sickle cell trait blood: an unresolved issue. *Transfus Apher Sci.* 2001 Apr;24(2):223-5.
26. KURUP, P. A.; ARUN, P.; GAYATHRI, N. S.; DHANYA, C. R.; INDU, A. R. Modified formulation of CPDA for storage of whole blood, and of SAGM for storage of red blood cells, to maintain the concentration of 2,3-diphosphoglycerate. **Vox Sanguinis**, v.85, n.4, p.253-261, 2003.
27. LLOHN, A. H.; VETLESEN, A.; FAGERHOL, M. K.; KJELDSEN-KRAGH, J. The effect of pre-storage cooling on 2,3-DPG levels in red cells stored in SAG-M. **Transfusion and Apheresis Science**, v.33, n.2, p.113-118, 2005.
28. LOUITT, J. F.; MOLLISON, P. L. Advantages of a disodium-citrate-glucose mixture as a blood preservative. **British Medical Journal**, v.2, p.744, 1943.
29. MOLLISON, P. L.; ENGELFRIET, C. P.; CONTRERAS, M. **Blood Transfusion in Clinical Medicine**. 10<sup>a</sup> ed. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1997. 249 p.

30. MOORE, G. L.; PECK, C. C.; SOHMER, P. R.; ZUCK, T. F. Some properties of blood stored in anticoagulant CPDA-1 solution. **Transfusion**, v.21, p.35, 1981.
31. MOROFF, G.; DENDE, D. Characterization of biochemical changes occurring during storage of red cells – Comparative studies with CPD and CPDA-1 anticoagulant-preservative solutions. **Transfusion**, v.23, n.6, p.484-489, 1983.
32. NAKAO, K.; WADA, T.; KAMIYAMA, T.; NAKAO, M.; NAGANO, K. A direct relationship between adenosine triphosphate level and *in vivo* viability of erythrocytes. **Nature**, v.194, p.877, 1962.
33. PHELAN, H. A.; GONZALEZ, R. P.; PATEL, H. D.; CAUDILL, J. B.; TRAYLOR, R. K.; YANCEY, L. R.; SPERRY, J. L.; FRIESE, R. S.; NAKONEZNY, P. A. Prestorage leukoreduction ameliorates the effects of aging on banked blood. **The Journal of Trauma**, v.69, n.2, p.330-7, 2010.
34. PRICE, G. S.; ARMSTRONG, P. J.; MCLEOD, D. A.; BABINEAU, C. A.; METCALF, M. R.; SELLETT, L. C. Evaluation of citrate-phosphate-dextrose-adenine as a storage medium for packed canine erythrocytes. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.2, p.126-132, 1988.
35. RAPOPORT, S. Dimensional, osmotic and clinical changes of erythrocytes in stored blood. I: Blood preserved in sodium citrate, neutral and acid citrate-glucose (ACD) mixtures. **Journal of Clinical Investigation**, v.21, p.135, 1947.
36. ROUS, P.; TURNER, J. R. The preservation of living red blood cells *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, v.23, p.219, 1916.
37. SCHNEIDER, A. Principles of Blood Collection and Processing. In: **Schalm's Veterinary Hematology**, 5. ed., FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N.C. (Eds), Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 827-832 p.
38. SCHUETZ, A. N.; HILLYER, K. L.; ROBACK, J. D.; HILLYER, C. D. Leukoreduction filtration of blood with sickle cell trait. **Transfusion Medicine Reviews**, v.18, n.3, p.168-76, 2004.
39. SCOTT, K. L.; LECAK, J.; ACKER, J. P. Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future. **Transfusion Medicine Reviews**, v.19, n.2, p.127-142, 2005.
40. SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The Normal Probability Distribution. In: SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research**, 2. ed. New York: W.H. Freeman and Co, 1981. 400-453 p.
41. SOWEMIMO-COKER, S. O. Red blood cell hemolysis during processing. **Transfusion Medicine Reviews**, v.16, n.1 (janeiro), p.46-60, 2002.
42. SPINELLA, P. C.; DRESSLER, A.; TUCCI, M.; CARROLL, C. L.; ROSEN, R. S.; HUME, H.; SLOAN, S. R.; LACROIX, J. Pediatric Acute Lung Injury and Sepsis Investigators Network. Survey of transfusion policies at US and Canadian children's hospitals in 2008 and 2009. **Transfusion**, v.50, n.11, p. 2328-35, 2010.
43. TURNER, M, L.; LUDLAM, C. A. An update on the assessment and management of the risk of transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood and plasma products. **British Journal of Haematology**, v.144, n.1, p.14-23, 2009.
44. ULATA, S. K. Causas mais comuns de perda de bolsa de sangue total e de hemocomponentes encontradas durante a fase de implantação do banco de sangue -

- HOVET – USP (2003-2004). In: **Anais do XXVI Congresso Brasileiro da Anclivepa**, 2005, Salvador - BA. XXVI Congresso Brasileiro da Anclivepa, 2005.
45. WARDROP, K. J.; OWEN, T. J.; MEYERS, K. M. Evaluation of an additive solution for preservation of canine red blood cells. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.8, n.4, p.253-7, 1994.
  46. WARDROP, K. J.; REINE, N.; BIRKENHEUER, A.; HALE, A.; HOHENHAUS, A.; CRAWFORD, C.; LAPPIN, M. R. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, n.1, p.135-42, 2005.
  47. WARDROP, K. J.; TUCKER, R. L.; MUGNAI, K. Evaluation of canine red blood cells stored in a saline, adenine, and glucose solution for 35 days. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.11, n.1, p.5-8, 1997.
  48. WILTSHIRE, M.; THOMAS, S.; SCOTT, J.; HICKS, V.; HAINES, M.; COOKSON, P.; GARWOOD, M.; CARDIGAN, R. Prion reduction of red blood cells: impact on component quality. **Transfusion**, v.50, n.5, p.970-9, 2010.
  49. WINSLOW, R. M.; INTAGLIETTA, M. Red cell age and loss of function: advance or SNO-job? **Transfusion**, v.48, n.3, p.411-414, 2008.
  50. Working Committee for the Biological Characterization of Laboratory animals / GV-SOLAS. Guidelines for specification of animals and husbandry methods when reporting the results of animal experiments. **Laboratory Animals**, v.19, p.106-108, 1985.

## ANEXO 1 - APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

04/02/2011

Sistema Pesquisa - Pesquisador

**Sistema Pesquisa - Pesquisador: Felix Hilario Diaz Gonzalez**

**Projeto Nº:** 12482

**Título:** USO DE SOLUCOES ADITIVAS PARA ARMAZENAMENTO DE CONCENTRADO DE ERITROCITOS CANINO: INDICADORES BIOQUIMICOS DE AVALIACAO

COMITE DE ETICA EM PESQUISA DA UFRGS: Parecer

Conforme solicitado, o projeto foi substituído incluindo o termo de consentimento e cuidados após a doação de sangue e o termo referente à autorização para usar fotografias do cão e/ou do proprietário. Assim, recomenda-se a aprovação do presente projeto.