

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

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA *IN VITRO* DO CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS FELINO
ARMAZENADO EM SOLUÇÕES DE CPDA-1 E CPD/SAGM DURANTE 35 DIAS

FRANCIELE SONAGLIO

PORTO ALEGRE

2014

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

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA *IN VITRO* DO CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS FELINO
ARMAZENADO EM SOLUÇÕES DE CPDA-1 E CPD/SAGM DURANTE 35 DIAS**

Autora: Franciele Sonaglio

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

Orientador: Félix Hilário Diaz González

Co-orientação: Luciana de Almeida Lacerda

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Sonaglio, Franciele

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA IN VITRO DO CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS FELINO ARMAZENADO EM SOLUÇÕES DE CPDA-1 E CPD/SAGM DURANTE 35 DIAS / Franciele Sonaglio. -- 2014.

54 f.

Orientador: Félix Hilário Diaz González.
Coorientadora: Luciana de Almeida Lacerda.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Avaliação bioquímica do sangue armazenado. 2. Concentrado de eritrócitos felino. 3. Soluções de armazenamento sanguíneo. I. Diaz González, Félix Hilário, orient. II. de Almeida Lacerda, Luciana, coorient. III. Título.

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

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DO CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS
FELINO ARMAZENADO EM SOLUÇÕES DE CPDA-1 E CPD/SAGM
DURANTE 35 DIAS**

Aprovada em 25 de fevereiro de 2014.

APROVADO POR:

Félix Hilário Diaz González

Orientador e presidente da comissão

Prof. Dr. Rafael Figuera (UFMS)

Prof^a. Dr^a. Stella Faria Vale (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Simone Gonçalves (UNISA)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus. Obrigada pela Vida e pela oportunidade de estar aqui para evoluir e tentar melhorar sempre. Obrigada pela força e por nunca me abandonar.

Agradeço a minha MÃE Inelva por ser a luz que me guia e me guiou até onde cheguei, pela luta e pelo amor a mim dedicados. Obrigada por me fazer o que sou hoje, você é o meu exemplo de vida, luta e honestidade. Eu te amo muito.

Agradeço aos companheiros de quatro patas, por fazerem desta jornada algo que vale a pena, acreditem sempre lutarei para que o melhor seja feito por vocês. Obrigada aos gatos doadores do meu projeto Mel, Carvão, Rascunho, Mima, Fino, Borges, Rascunha, Raah, Loki, Milk Shake, Thor, Murisco e Fumaça. Com certeza isso não chegaria até o final sem vocês, e obrigada por salvarem muitas e muitas vidas.

Agradeço a minha companheira Juliana, pela paciência, dedicação e carinho. Por ter compreendido minha ausência e meu nervosismo. Por ter transformado a minha vida e por me mostrar a cada dia o quanto é bom ser amada. Obrigada!!

Obrigada a toda equipe BLUT'S, Luciana, Camila, Magnus, Vanessa e Nicole. Lu minha co-orientadora, obrigada por não ter desistido de mim!! E por ter aberto as portas da hemoterapia e de um mundo totalmente novo, aprendi muito, Valeu mesmo. Camila, obrigada pela paciência, pelos conhecimentos, conselhos, apoio e por ter me ajudado tanto, você me surpreendeu a cada dia. Magnus, desde o LACVet obrigada pelos ensinamentos e pela paciência, tua didática com certeza te levará longe junto com teu conhecimento. Vanessa, obrigada pelas anestésias e pelos conhecimentos de diagnóstico por imagem nas horas vagas, foi muito bom te ouvir falar e pode esperar que eu volto para fazer estágio contigo. Nicole, obrigada por fazer a minha ponte com o LACVet e com o mestrado e pela ajuda.

Obrigada ao meu orientador Félix Hilário Diaz González, pela oportunidade de estar me tornando mestre.

Obrigada as minhas amigas do Hospital Veterinário da Unoesc Xanxerê, Luciana, Elisandra, Eliana, Analice. Por ter me apoiado, pela paciência e por ter compreendido tantas ausências e tantos desabafos. Obrigada!!!!!!!

Obrigada aos tutores dos doadores, que entenderam o quanto isso seria importante e permitiram que seus gatinhos pudessem doar sangue para este projeto. Obrigada Jéssica Miozzo muito obrigada mesmo. Cami, Mag, Lu obrigada pelos doadores e pelo carinho que vocês têm com cada um deles, não importa de quem sejam.

Obrigada a minha amiga e parceira de mestrado Naila, obrigada pela amizade, apoio e pela hospedagem em sua casa. Você é uma pessoa de coração bom. Não perca isso nunca. Obrigada!

Obrigada a minha amiga Luciane Pastore, você sempre estará perto de mim mesmo estando longe. Obrigada pela amizade sincera.

Obrigada às pessoas que sempre me incentivaram a prestar a prova de mestrado e acreditar que isso seria possível; obrigada Graziela minha amiga que mesmo longe deixou sua marca dentro do meu coração, você sempre será um exemplo para mim. Eu consegui, obrigada por tudo.

Enfim obrigada a todos que de alguma maneira me ajudaram a chegar até aqui. Com certeza toda esta jornada me trouxe muito aprendizado, não só profissional, mas principalmente o que aprendi da vida e que Deus abençoe a todos!!!!

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado”.

Albert Einstein

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DO CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS FELINO ARMAZENADO EM SOLUÇÕES DE CPDA-1 E CPD/SAGM DURANTE 35 DIAS

Autora: Franciele Sonaglio

Orientador: Félix H. D. González

RESUMO

O curto tempo de armazenamento dos hemocomponentes é um dos fatores que dificulta e limita a quantidade de sangue que pode ser efetivamente armazenada, o que é uma desvantagem na medicina veterinária, pois o acesso a doadores é restrito e a demanda é contínua e cada vez maior na prática de clínicas e hospitais veterinários. Durante o armazenamento do sangue em baixas temperaturas, seja sob a forma de sangue total ou concentrado de eritrócitos, há uma queda intensa de metabólitos importantes para a viabilidade e funcionalidade dos eritrócitos. O desenvolvimento de meios e soluções de preservação sanguínea possibilitou o armazenamento dos eritrócitos e, conseqüentemente, facilitou o trabalho dos bancos de sangue. Portanto, a busca por melhores formas e soluções para preservação 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. O presente trabalho avaliou o concentrado de eritrócitos felino armazenado na solução de CPDA-1 e CPD/SAGM durante 35 dias. Os dados laboratoriais foram comparados entre grupos e ao longo do tempo. Neste experimento foram utilizadas 10 bolsas de concentrado de eritrócitos felino divididos em dois grupos de cinco para avaliação de cada um dos aditivos. Os parâmetros laboratoriais K^+ , Na^+ , Cl^- , lactato, HCO_3^- , amônia, glicose e pH foram avaliados nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 35 após a coleta. Vários parâmetros (K^+ , lactato, HCO_3^- , glicose e cloreto) demonstraram que a solução CPD/SAGM manteve o metabolismo energético do eritrócito mais estável. Com este trabalho, foi possível entender melhor as alterações metabólicas sofridas pelos eritrócitos felinos durante o armazenamento. Concluímos que, apesar da solução CPD/SAGM se mostrar mais eficaz *in vitro*, são necessários mais estudos com relação aos hemocomponentes em gatos e à sua viabilidade pós-transfusional.

PALAVRAS-CHAVE: transfusão, banco de sangue, gato, hemácias.

BIOCHEMISTRY CHANGES OF FELINE ERYTHROCYTE CONCENTRATES STORED IN CPDA-1 AND CPD-SAGM DURING 35 DAYS

Author: Franciele Sonaglio

Advisor: Félix Hilário Diaz González

ABSTRACT

The short shelf life of blood products is one factor that complicates and limits the amount of blood that can be effectively stored, and it is a disadvantage in veterinary practice, because the access to donors is restricted and the demand is continuous and increasing at veterinary clinics and hospitals. During blood storage at low temperatures, either as whole blood or as packed red cells, there is a significant decrease of metabolites that are important for the viability and functionality of erythrocytes. The development of blood preservation solutions has enabled the storage of red blood cells and improved the service at the blood banks. Therefore, the search for better ways and blood preservation solutions to avoid or reduce these harmful effects during the storage conditions is continuous, in order to obtain the best blood product to be transfused. This study evaluated 10 bags of feline erythrocyte concentrate divided into two groups, stored in CPDA-1 and CPD/SAGM solutions during 35 days. The laboratory data were compared between groups and over time. K^+ , Na^+ , Cl^- , lactate, HCO_3^- , ammonia, glucose and pH were assessed on days 1, 7, 14, 21, 28, and 35 after collection. On various parameters (K^+ , Cl^- , HCO_3^- , glucose and lactate) solution of CPD/SAGM kept the energy metabolism of red blood cells more stable. With these results we can better understand the biochemical changes of feline erythrocytes during storage. We conclude that, although the CPD/SAGM solution shown to be more effective, more studies are needed to improve knowledge of feline blood components and post-transfusion viability.

Key words: transfusion, blood bank, cat, red blood cells

LISTA DE FIGURAS ARTIGO

Figura 1- Coleta do sangue realizada por punção da veia jugular de um doador felino.....	31
Figura 2- Sistema fechado para coleta de sangue felino.....	32
Figura 3- Alterações no grau de hemólise, Ht, pH, Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , amônia, glicose, lactato, Na ⁺ e K ⁺ no concentrado de eritrócitos felino armazenado em duas soluções (■ CPD/SAGM, ■ CPDA-1) por 35 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença ao longo do tempo (p<0,05) e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre as soluções a cada dia (p<0,05).....	42

LISTA DE TABELAS ARTIGO

Tabela 1- Composição das soluções utilizadas no experimento.....	41
Tabela 2- Parâmetros bioquímicos do CE felino em CPDA-1 e CPD/SAGM durante 35 dias.....	41

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	53
Anexo 2 - Questionário pré-doação de sangue – felinos.....	55
Anexo 3 - Termo de consentimento & cuidados após-doação de sangue em gatos.....	56
Anexo 4- Termo de consentimento para divulgação de fotos.....	57
Anexo 5- Termo de autorização para procedimento anestésico.....	58
Anexo 6- Laudo microbiológico.....	59
Anexo 7 - Laudo microbiológico.....	60

Sumário

1. INTRODUÇÃO	142
2. OBJETIVOS.....	153
2.1 GERAL	154
2.2 ESPECÍFICOS	154
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	154
3.1 TRANSFUÇÃO SANGUÍNEA EM FELINOS	154
3.2 INDICAÇÕES PARA TRANSFUÇÃO SANGUÍNEA EM FELINOS	164
3.3 TIPOS SANGUÍNEOS EM FELINOS	187
3.4 SELEÇÃO E COLETA DE DOADORES FELINOS	198
3.5 HEMOCOMPONENTES E ARMAZENAMENTO DO SANGUE EM FELINOS	209
3.6 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DOS ERITRÓCITOS DURANTE O ARMAZENAMENTO	20
3.7 ARMAZENAMENTO DO SANGUE E SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO	243
4. RESULTADOS.....	287
REFERÊNCIAS	475

1. INTRODUÇÃO

Na Medicina Veterinária, a utilização de sangue e hemocomponentes em felinos está se tornando cada vez mais comum e assim é possível atender cada caso em que existe a necessidade de transfusão sanguínea. Entretanto, poucos estudos foram realizados em gatos e ainda existem dúvidas quanto à melhor solução de preservação de eritrócitos e outros produtos do sangue, provavelmente devido ao pequeno volume coletado do doador e ao fato de que frequentemente são utilizados sistemas abertos de coleta nesta espécie. Nestes sistemas o risco de contaminação bacteriana é grande, o que impede o armazenamento e separação dos hemocomponentes. O método de coleta com sistema fechado nesta espécie ainda está em adaptação, portanto são necessárias mais pesquisas (CASTELLANOS, COUTO, GRAY, 2004; KOHN, WEINGART, 2012).

Sabe-se que durante o armazenamento do sangue a baixas temperaturas, 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-difosfoglicerato (2,3-DPG) e adenosina trifosfato (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. O objetivo é que, ao final, se obtenha uma melhor qualidade do sangue a ser transfundido por um período mais longo de armazenamento (WARDROP, 1995, SARAIVA, OTTA, 2007).

A avaliação bioquímica durante o armazenamento do concentrado de eritrócitos felino com diferentes soluções aditivas constitui uma informação prática para a medicina veterinária, gerando assim maior conhecimento, motivando novos projetos de estudos e criando um núcleo de pesquisa e extensão no auxílio à hemoterapia veterinária a qual se torna a cada dia mais uma especialidade da medicina veterinária.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Realizar avaliação *in vitro* do concentrado de eritrócitos felino armazenado em CPDA-1 e CPD/SAGM durante 35 dias.

2.2 Específicos

- Avaliar o metabolismo eritrocitário felino *in vitro* através de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

- Comparar o efeito das soluções de CPDA-1 e CPD/SAGM sobre concentrado de eritrócitos felino com base no metabolismo eritrocitário *in vitro*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Transfusão sanguínea em felinos

O visível aumento na população de gatos domésticos, somado ao grau de exigência dos seus tutores, traz a necessidade de cuidados mais especializados em relação à saúde e a expectativa de vida destes animais; e a terapia transfusional é uma boa opção para os médicos veterinários na manutenção da sobrevivência de pacientes acometidos por distúrbios hematológicos (PIMENTA, MATOCCO e RABELO, 2010), pois a transfusão sanguínea é uma importante ferramenta quando se trata de cuidados intensivos e intervenções cirúrgicas. O número de transfusões em gatos aumentou significativamente entre os anos de 1998 e 2009, sendo geralmente realizadas com sangue total fresco. No entanto, a utilização de hemocomponentes tem aumentado devido à maior disponibilidade de bancos de sangue veterinários (KOHN e WEINGART, 2012).

Comumente o objetivo da transfusão é fornecer um aporte de hemácias, aumentando a capacidade de transporte de oxigênio e assim amenizar os sinais clínicos mais graves relacionados à anemia até que se possa corrigir a causa de base, sendo muitas vezes uma medida essencial na sobrevivência do paciente crítico (KNOTTENBELT 2002; KNOTTENBELT e BLACKWOOD, 2006; KOHN e WEINGART, 2012).

3.2 Indicações para transfusão sanguínea em felinos

Os componentes sanguíneos, ou hemocomponentes, são subprodutos do sangue e 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). A separação dos hemocomponentes permite que mais de um paciente possa se beneficiar de apenas um doador, além de reduzir os riscos de uma reação transfusional contra os outros componentes desnecessários (AUBUCHON, 2003).

O sangue total fresco é composto por eritrócitos, leucócitos, plaquetas, fatores de coagulação, albumina e imunoglobulinas (CHIARAMONTE, 2004), porém, após seis horas de armazenamento a função plaquetária e a atividade de fatores de coagulação reduzem significativamente (ABRAMS-OGG, 2000). O sangue total pode ser armazenado como tal, ou separado em concentrado de eritrócitos, plasma fresco congelado e concentrado de plaquetas (GIBSON, 2007). O componente sanguíneo mais utilizado na clínica médica de pequenos animais é o concentrado de eritrócitos (também conhecido como *papa* de hemácias), indicado no tratamento de anemia normovolêmica (WARDROP et al., 1994).

O maior impulso para a pesquisa sobre biopreservação de eritrócitos é a enorme demanda clínica). A transfusão de sangue e seus componentes é uma bastante utilizada em casos onde há necessidade de cuidados críticos e emergências, constituindo uma terapia de suporte importante,

embora não seja a solução definitiva (BARFIELD, ADAMANTOS, 2011).

Transfusão de sangue total fresco é tradicionalmente utilizada em cães e gatos com anemia, choque hipovolêmico e coagulopatias (WEINGART et al., 2004). Esta terapia repõe a deficiência de eritrócitos ou de fatores plasmáticos da coagulação prolongando assim a vida do animal. As transfusões de eritrócitos auxiliam no suporte terapêutico através do aumento da massa eritrocitária em pacientes que possuem baixa capacidade de carreamento de oxigênio devido à perda de eritrócitos (ex. trauma/ hemorragia), diminuição da produção pela medula óssea (ex. anemia aplásica), defeitos na molécula de hemoglobina, e diminuição da sobrevivência dos eritrócitos (ex. anemias hemolíticas) (HONENHAUS, 2004; WEINGART et al., 2004).

A maior parte dos benefícios da transfusão em gatos é observada quando há perda sanguínea ou anemia grave (KNOTTENBELT e BLACKWOOD; 2006). As indicações mais comuns para a transfusão sanguínea são a anemia por perda sanguínea (principalmente aguda), eritropoiese ineficiente ou hemólise (HELM e KNOTTENBELT; 2010; KOHN e WEINGART, 2012). Em estudo realizado por Castellanos e colaboradores (2004), as principais causas de anemia em felinos com indicação de transfusão foram perda sanguínea e anemia associada à doença renal; enquanto Weingart e colaboradores (2004) observaram que de 91 felinos transfundidos devido anemia grave, 33,9% apresentavam hemorragia, 13,8% hemólise e 52,3% eritropoiese ineficiente.

A decisão por realizar a transfusão deve se basear não só no grau da anemia e no hematócrito (abaixo de 10-15%), mas também na condição clínica do paciente, ou seja, na observação de sinais clínicos de oxigenação inadequada como: taquicardia, taquipneia, pulso fraco, letargia e fraqueza - sinais que corroboram a necessidade da transfusão (HELM e KNOTTENBELT, 2010; KOHN e WEINGART, 2012).

Salienta-se que as transfusões apresentam riscos de reações, por isso os pacientes devem ser avaliados individualmente, assim como o risco – benefício do procedimento. Em geral, gatos com anemia crônica toleram melhor um hematócrito baixo em relação àqueles com quadros de anemia

aguda (KOHN e WEINGART, 2012), e podem apresentar apenas uma leve letargia mesmo com hematócrito entre 10% e 15%. Nestas situações crônicas, os gatos costumam tolerar um hematócrito muito baixo por vários dias, porém quando submetidos a situações de estresse (ex: exame clínico), podem vir a apresentar comprometimento cardiovascular (HELM e KNOTTENBELT, 2010).

3.3 Tipos sanguíneos em felinos

Os gatos apresentam três tipos sanguíneos (sistema AB), os quais são A, B e AB. Todos os animais com sangue tipo A e tipo B possuem naturalmente anticorpos contra os antígenos do grupo que lhes falta (gatos tipo A possuem anticorpos contra o tipo B e vice-versa). Estes aloanticorpos presentes no plasma são responsáveis pela destruição prematura dos eritrócitos transfundidos, reações transfusionais graves e isoeritrolise neonatal (KNOTTENBELT, 2002; KNOTTENBELT e BLACKWOOD, 2006).

Os gatos tipo B possuem hemolisinas e hemaglutininas potentes anti-A, enquanto gatos tipo A geralmente possuem hemolisinas e hemaglutininas anti-B mais fracas. Por este motivo, gatos tipo A que recebem sangue tipo B desenvolvem reações menos severas do que gatos tipo B que recebem sangue tipo A. No primeiro caso ocorre somente uma menor sobrevivência dos eritrócitos transfundidos e reação moderada que geralmente não leva a apresentação de sinais clínicos, enquanto no segundo caso é comum reação transfusional hemolítica grave e potencialmente fatal (KNOTTENBELT, 2004; GIBSON, 2007; HELM, KNOTTENBELT, 2010).

De maneira geral, o tipo sanguíneo mais comum na maioria da população felina é o tipo A, enquanto o grupo AB se mostra como o mais raro dos três grupos (KNOTTENBELT, 2002; WEINGART, GIGER, KOHN, 2004; LACERDA et al., 2008). Segundo Gibson (2007), a presença de aloanticorpos pode causar isoeritrolise neonatal em gatas tipo B que tem filhotes tipo A ou AB,

pois os anticorpos anti-A são transferidos via colostro, induzindo a uma anemia hemolítica nesses filhotes.

Devido à ocorrência das reações transfusionais, é de grande importância o conhecimento do tipo sanguíneo do doador e do receptor através da tipagem sanguínea, evitando assim reações e/ou óbito do paciente pela intensa hemólise (CASTELLANOS, COUTO, GRAY, 2004). A administração de sangue do tipo inapropriado resulta em reação severa e isso pode ser facilmente evitado com a realização da tipagem sanguínea. O risco de reação em gatos que recebem sangue do mesmo tipo é próximo de zero, o que demonstra que reações por falta de tipagem são inaceitáveis (BARFIELD, ADAMANTOS, 2001). Quando não é possível a realização da tipagem sanguínea, a prova de compatibilidade sanguínea é uma excelente alternativa. Nesta, existem duas provas: a prova maior (ou principal), que testa o plasma do receptor contra os eritrócitos do doador; e a prova menor, que testa o plasma do doador contra os eritrócitos do receptor. A ocorrência de aglutinação indica que os dois indivíduos são incompatíveis (KOHN, WEINGART, 2006).

3.4 Seleção e coleta de doadores felinos

Para se escolher o doador, algumas exigências devem ser cumpridas, como por exemplo, o gato deve ser adulto (entre 1 e 8 anos), livre de doenças, comportamento dócil, sem histórico de transfusões prévias, ser vacinado, ter peso mínimo de quatro quilos (GIBSON, 2007), além de exames dentro dos valores de referência para a espécie e hematócrito maior que 35% (KOHN, WEINGART, 2012).

A maioria dos gatos requer sedação ou anestesia para a realização da doação sanguínea (ABRAMS-OGG, 2000; HELM, KNOTTENBELDT, 2011b). Esta pode ser realizada através de protocolos que incluem quetamina e midazolam intravenoso ou indução com máscara de isoflurano (GIBSON, 2007; HELM, KNOTTENBELT, 2010b; KONH, WEINGART, 2012). Alguns

veterinários utilizam butorfanol, diazepam e propofol, caso a sedação não seja suficiente (ABRAMS-OGG, 2000). O protocolo com acepromazina, diazepam e butorfanol também se mostrou seguro (BOTTEON, 2012). A coleta de sangue do doador deve ser feita pelo acesso da veia jugular, através de um sistema aberto (com o uso de seringa) ou fechado (bolsa pediátrica adaptada). O sangue na seringa deve ser homogeneizado e a sucção lenta, para evitar colapamento da veia e lise das células (KOHN, WEINGART, 2012). Quando o sangue é coletado em um sistema aberto há uma potencial chance de contaminação, por isso este deve ser utilizado até 4 horas após a coleta ou ser armazenado (1-6°C) por no máximo 24 horas (GIBSON, 2007). A escolha entre os dois tipos de sistema é importante, pois o risco de contaminação bacteriana é mais elevado em sistemas abertos, o que é relevante principalmente quando o sangue é armazenado (WEINGART, GIGER e KOHN, 2004). A universidade da Pensilvânia desenvolveu um sistema fechado que consiste de duas bolsas pediátricas seladas com uma agulha de aférese 19G. Este permite a coleta fechada, a separação dos hemocomponentes, e o armazenamento por período superior a 24 horas (SPRINGER et al. 1998). Porém, o sistema semi - fechado de coleta com seringa foi considerado o mais adequado pela sua praticidade de aplicação e pela facilidade de acesso aos materiais nacionais (BOTTEON, 2012).

O volume de sangue a ser coletado por doação é de 11 mL/kg de peso corporal (HELM e KNOTTENBELT, 2010b; KOHN, WEINGART, 2012), sendo que apenas 10% do volume total de sangue deve ser coletado dos doadores duas a três vezes por ano (WEINGART et al., 2004).

3.5 Hemocomponentes e armazenamento do sangue em felinos

O princípio da terapia com hemocomponentes consiste em dividir o sangue total em seus elementos por centrifugação (KOHN, WEINGART, 2006). O sangue total e seus componentes podem ser utilizados logo após a coleta (produtos frescos) ou após o armazenamento (produtos armazenados/estocados). Quando o sangue é coletado (sangue total), pode ser utilizado

imediatamente ou separado em componentes para proporcionar o uso mais econômico de todos os doadores. Todos os produtos devem ser claramente identificados com a data, hora da coleta, identificação do doador e tipo de sangue e um protocolo asséptico deve ser utilizado na preparação de componentes ou manusear os produtos. Todos os produtos do sangue total devem ser armazenados entre 4 ° C e 6 ° C até sua utilização (LUCAS, LENTZ, HALE, 2004).

O concentrado de eritrócitos é composto pelos eritrócitos que permanecem na bolsa depois que esta é centrifugada e o plasma extraído para uma bolsa-satélite que devem ser separados do plasma em até 18 (dezoito) horas após a coleta do sangue total, sendo que o concentrado de eritrócitos sem solução aditiva deve ter hematócrito entre 65% a 80% e no caso de bolsas com solução aditiva, o hematócrito pode variar de 50 a 70% (MS, 2008).

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 a baixas temperaturas é baseada no princípio que os eventos bioquímicos e as reações moleculares ficam reduzidos (LLOHN et al., 2005). O armazenamento permite acesso imediato ao sangue total e seus subprodutos, mas a coleta e a preparação destes podem ser intensivamente trabalhosas e consumir bastante tempo, o que justifica a existência de um banco de sangue em clínicas/hospitais que realizam transfusões rotineiramente (ABRAMS-OGG, 2000; GONÇALVES, 2005; ULATA, 2005, HOHENHAUS, 2007).

O armazenamento do sangue felino raramente é realizado, pois o sistema de coleta aberto é o mais utilizado nesta espécie devido ao pequeno volume de sangue coletado do doador (cerca de 40 a 60 mL por doador). A principal desvantagem do sistema de coleta aberto é a impossibilidade de armazenamento devido ao risco de contaminação bacteriana (WEINGART et al., 2004). Em cães, a utilização de hemocomponentes de acordo com a necessidade de cada paciente já é uma realidade na

prática clínica, entretanto há pouca informação sobre a utilização dos hemocomponentes em gatos (CASTELLANOS, COUTO e GRAY, 2004).

3.6 Alterações bioquímicas dos eritrócitos durante o armazenamento

Durante o armazenamento sanguíneo, ocorrem alterações bioquímicas importantes, como o aumento nos níveis de potássio, lactato e saturação da hemoglobina pelo oxigênio, e a diminuição do pH, níveis de 2,3-DPG e diminuição da deformabilidade dos eritrócitos (BENNETT-GUERRERO et al., 2007). Esse conjunto de alterações é conhecido como lesão de armazenamento ou estocagem. A lesão de armazenamento leva à hemólise, variações no pH e aumento na concentração de uma série de metabólitos. A importância do conhecimento destas lesões está na evidência de que o período de armazenamento influencia na qualidade dos componentes na bolsa de sangue. Além do tempo, a temperatura de armazenamento, o tipo de embalagem e manuseio durante os períodos de conservação também estão diretamente relacionados à lesão de armazenamento (HALE, 2006).

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 de novos produtos eritrocitários. Em geral, o conhecimento dos fatores determinantes da qualidade dos eritrócitos e sua 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 etc.) (DE KORTE, VERHOEVEN, 2004).

Os eritrócitos possuem funções vitais no organismo, como o tamponamento dos íons hidrogênio e o transporte de oxigênio e de dióxido de carbono, mas para a manutenção destas atividades é necessário energia sob a forma de ATP (HARVEY, 2000). Ao completarem a maturação, os eritrócitos perdem diversas organelas, entre elas a mitocôndria o que resulta na

inexistência de glicólise aeróbica, tornando-os dependentes exclusivamente da glicólise anaeróbia - responsável pela formação de 90% do ATP necessário a esta célula. Nesta via, cada molécula de glicose é metabolizada em duas de lactato e são formadas duas moléculas de ATP. A demanda metabólica do eritrócito é menor do que a de outras células sanguíneas, mas ainda assim, necessita de ATP para a manutenção da forma e da deformabilidade celular, para a fosforilação de lipídeos e proteínas da membrana, para o transporte ativo de diversas moléculas pela membrana e para a síntese de glutathion reduzido (GSH) (HARVEY, 1997). Para a produção de ATP é utilizado o metabolismo celular anaeróbico, que tem como produto final o lactato, levando ao acúmulo de íons H^+ (AUTHEMENT et al., 1986). Desta forma, durante o armazenamento ocorre rápida elevação na concentração de lactato e conseqüentemente diminuição do pH. A velocidade do metabolismo eritrocitário depende da temperatura, da composição do meio de armazenamento e do meio intracelular (HÖGMAN, MERYMAN, 2006).

Durante o armazenamento do sangue, os níveis de ATP eritrocitário diminuem e, em associação com o pH baixo, as células sofrem alterações na membrana e hemólise, resultando em extravasamento de potássio intracelular para o meio extracelular. Geralmente os eritrócitos felinos contêm concentrações baixas de potássio (comparados aos eritrócitos humanos), semelhantes às do plasma, de forma que a hemólise nesta espécie não ocasiona hipercalemia (PRICE et al., 1988). Por outro lado, pacientes com comprometimento da função renal que recebem transfusão em grandes volumes podem apresentar agravamento do quadro de hipercalemia (HOHENHAUS, 2007).

Existe uma correlação direta entre os níveis de ATP e a morfologia eritrocitária: a diminuição dos níveis de ATP durante o armazenamento é associada com a mudança da forma de disco bicôncavo eritrocitário para esférica, bem como a diminuição dos lipídeos de membrana e o 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 nas soluções de preservação supre as perdas dos grupos adenina, fornecendo ATP suficiente à sobrevivência das células (NAKAO et al., 1962). A

concentração de ATP mínima recomendada está entre 2,3 e 2,7 $\mu\text{mol/g Hb}$, relacionada com 75% de viabilidade pós-transfusional em humanos (ALMIZRAQ et al., 2013). Além disso, uma associação significativa foi encontrada entre a deformabilidade dos eritrócitos e concentrações de ATP menores do que 2,5 $\mu\text{mol/g Hb}$ (KARGER et al., 2012).

O 2,3-DPG é um produto do metabolismo energético do eritrócito e está presente no seu interior. Este se liga à subunidade β da hemoglobina e diminui sua afinidade pelo oxigênio resultando em liberação do oxigênio para os tecidos. Com isso, quanto menores os níveis de 2,3-DPG, maior será a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, e conseqüentemente menos oxigênio é liberado aos tecidos (BOOTHE, 2001). Porém, os felinos possuem dois tipos de hemoglobina ($\text{Hb}\alpha$ e $\text{Hb}\beta$), presentes em diferentes proporções em diferentes indivíduos. A cadeia α de cada tipo de hemoglobina é idêntica para todas as espécies de mamíferos, mas a cadeia β exibe poucas e importantes diferenças. Na cadeia β dos felinos faltam dois resíduos carregados positivamente no terminal amina (valina e histidina), e estes são sítios de ligação para 2,3-DPG em espécies com elevada quantidade de 2,3-DPG nos eritrócitos (HARVEY, 1997; WONG, HASKINS, 2005).

Nos gatos, bovinos, ovinos e caprinos o cloreto é o principal regulador da afinidade do oxigênio. O cloreto e o 2,3 DPG parecem competir pelos mesmos sítios de ligação na desoxihemoglobina. O cloreto tem um efeito mínimo sobre a afinidade do oxigênio pela Hb nas espécies com alta concentração intra-eritrocitária de 2,3 DPG, mas atua como o principal regulador em espécies em que a concentração de 2,3 DPG é baixa, que é o caso dos gatos (HARVEY, 1997; WONG, HASKINS, 2005). Além disso, a afinidade da hemoglobina nestas espécies é apenas minimamente afetada pela adição de 2,3 DPG (HARVEY, 1997).

3.7 Armazenamento do sangue e soluções de preservação

Embora o sangue seja utilizado terapeuticamente em animais há mais de um século, apenas nas últimas décadas pesquisas envolvendo a viabilidade celular e o uso de soluções de conservação tem sido realizadas na medicina veterinária. As soluções de preservação sanguínea são formuladas com o objetivo de manter os níveis de glicose, ATP e de 2,3-DPG, ou seja, manter o metabolismo energético do eritrócito durante o armazenamento até o momento da transfusão (ABRAMS-OGG, 2000; CAMPBELL-LEE, NESS, 2003; DE KORTE, VERHOEVEN, 2004).

As soluções utilizadas para o armazenamento de sangue, em geral, contêm citrato de sódio como anticoagulante, cuja ação se dá nas fases cálcio-dependentes da cascata de coagulação (ABRAMS-OGG, 2000; HOHENHAUS, 2007). Este tem sido utilizado desde 1914 como um anticoagulante estável e minimamente tóxico (ROUS, TURNER, 1916). As primeiras transfusões utilizando citrato ocorreram em 1914; e em 1918 deu-se o início à utilização de sangue armazenado em garrafas com citrato para posterior transfusão sanguínea (MOLLISON, 2000). Somente no ano de 1950 surgiram as primeiras bolsas plásticas, e a partir do ano de 1960 estas começaram a ser produzidas e comercializadas (HEES, 2010).

A primeira solução de armazenamento sanguíneo foi desenvolvida em 1916, e continha uma mistura de ácido cítrico e dextrose (ACD). O objetivo desta era armazenar sangue de coelho para testes de aglutinação de sífilis. O estudo demonstrou que a solução preservou o sangue em caixas de gelo por mais de quatro semanas com mínima hemólise. No entanto, a adição da glicose ao citrato durante o armazenamento aumentava o risco de proliferação bacteriana, sendo necessária esterilização prévia das soluções, que caramelizavam quando autoclavadas. A adição de glicose ao citrato dissódico não caramelizava (ROUS, URNER, 1916). Mais tarde, o fosfato foi adicionado à solução de ACD para suprir a demanda de ATP pelas hemácias. Com o suporte adicional de fosfato, os eritrócitos permaneceram por mais tempo na circulação após o armazenamento e esta solução ficou denominada CPD (citrato, fosfato e dextrose) (HESS, 2010).

Em 1955, a adição do nucleotídeo adenina à solução de citrato e dextrose prolongou o tempo de armazenamento e a qualidade dos eritrócitos a serem transfundidos em até cinco semanas (GABRIO, DONOHUE, FINCH, 1955). Neste estudo houve uma sobrevida de 62% a 79% dos eritrócitos, assim como relatado por outros autores (SIMON, CHAPMAN, FINCH, 1962).

A solução contendo CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrose e adenina) foi desenvolvida em 1968, demonstrando uma sobrevida média de 80% dos eritrócitos após armazenamento de sangue total durante 35 dias, o que diferiu do sangue armazenado com CPD no qual teve uma sobrevida de 21 dias. O armazenamento do concentrado de eritrócitos em solução de CPDA-1 apresentou uma sobrevida maior (28 dias) quando comparado ao armazenamento em CPD ou ACD (21 dias), o que facilitou o trabalho dos bancos de sangue (ZUCK et al., 1977).

A solução de CPDA-1 contendo 0,25 mM de adenina (concentração final) e 25% mais glicose que o CPD (citrato de sódio, fosfato e dextrose) foi licenciada para uso em humanos nos Estados Unidos em 1978 (MOROFF, DENDE, 1983). Na composição do CPDA-1, o fosfato, além de ser um importante substrato na produção de ATP, também ajuda no controle do pH sanguíneo (KURUP et al., 2003). A adição de dextrose como fonte de energia, baseia-se no lento consumo desse carboidrato pelo metabolismo celular em baixas temperaturas, o que contribui, inclusive, com a manutenção de níveis adequados de ATP (AUTHEMENT et al., 1986). A adição de adenina está fundamentada no fato de que, com a queda do pH durante a conservação do sangue, há inativação de enzimas que participam da via glicolítica, levando a uma menor produção de ATP. Essa adição de adenina promove um aumento do adenilato, que servirá de substrato para nova síntese de ATP, aumentando as reservas desse nucleotídeo no interior das células (AUTHEMENT et al., 1986; HÖGMAN et al., 2006).

As soluções aditivas foram desenvolvidas para proporcionar nutrientes para um armazenamento mais longo e maior fluidez dos eritrócitos. A primeira solução aditiva foi a de SAG, nomeada a partir de seus constituintes: solução salina, adenina e glicose. Após a solução ser

adicionada à bolsa, o hematócrito decresce de 80% para 50% aproximadamente, reduzindo a viscosidade do sangue. Os níveis de glicose necessários pelas células são mantidos por cinco semanas, enquanto a adenina serve como substrato para aumentar o adenilato nos estoques de nucleotídeos, e para que as perdas por desaminação sejam supridas. Após cinco semanas de armazenamento, a hemólise se tornou o principal fator limitante, portanto foi adicionado manitol à solução de SAG, que passou a ser chamada SAGM. O manitol age como um sequestrador de radicais livres e como estabilizador de membranas, o que reduziu em 50% a hemólise e ganhou uma semana a mais no tempo de armazenamento (HESS, 2006).

O desenvolvimento de meios e soluções de preservação sanguínea possibilitou o armazenamento dos eritrócitos e, conseqüentemente, facilitou o trabalho dos bancos de sangue humanos (ABRAMS-OGG, 2000; HOHENHAUS, 2007), onde as 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). Dentre outras vantagens, pode se citar o maior rendimento de plasma por unidade de sangue e características de fluxo semelhante ao do sangue total (WARDROP et al., 1994).

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 do sangue total e do concentrado de eritrócitos (ALLEN, 2003, LLOHN et al., 2005; HÖGMAN et al., 2006; WINSLOW, INTAGLIETTA, 2008). Existe uma série de combinações de anticoagulantes com soluções aditivas para conservação de sangue, porém a mais utilizada em medicina veterinária é a CPDA-1 (LANEVSKI, WARDROP, 2001).

Para a manutenção da viabilidade do concentrado de eritrócitos é necessário o controle de qualidade de uma série de etapas: coleta 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 mais adequada e tempo de armazenamento (SOWEMIMO-COKER, 2002). O tempo de armazenamento do concentrado de eritrócitos (CE) depende da solução de armazenamento utilizada, e deve ser determinado para cada espécie com testes *in vitro* seguidos de testes *in vivo*. De acordo com pesquisadores que avaliaram o uso da CPDA-1 para preservação de eritrócitos caninos, o tempo máximo de armazenamento sugerido é de 20 dias (PRICE et al., 1988).

A viabilidade pós-transfusional do sangue total felino armazenado em ACD foi determinada através da marcação eritrocitária com isótopos de cromo (^{51}Cr) e observou-se que a viabilidade teve um decréscimo significativo entre 30 e 40 dias após o armazenamento (MARION, SMITH, 1983). Em outro estudo, o armazenamento do sangue total felino e canino em solução de CPDA-1 e a viabilidade pós-transfusional destes foi realizada através da técnica de biotinilação eritrocitária, cujos resultados mostraram que o sangue canino e felino armazenado por 35 dias apresentou viabilidade de 82,3% e 84,8%, respectivamente. Os autores concluíram que o sangue total armazenado por 35 dias em CPDA-1 teve uma sobrevida satisfatória, ou seja, acima de 75%, o qual é o valor aceitável para viabilidade do sangue a ser transfundido (BÜCHELER, COTTER, 1994).

4. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em forma de artigo científico que será submetido para publicação no periódico *Veterinary Clinical Pathology*.

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS DO CONCENTRADO DE ERITRÓCITOS FELINO ARMAZENADO EM SOLUÇÕES DE CPDA-1E CPD/SAGM DURANTE 35 DIAS

Sonaglio F, Lacerda LA, Lasta CS, Hlavac NRC, Dalmolin M, González FHD

Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO

Quando o sangue é armazenado sob baixas temperaturas, seja sob a forma de sangue total ou concentrado de eritrócitos, há uma queda intensa de metabólitos importantes para a viabilidade e funcionalidade dos eritrócitos. O desenvolvimento de meios e soluções de preservação sanguínea possibilitou o armazenamento dos eritrócitos e, conseqüentemente, facilitou o trabalho dos bancos de sangue. Portanto, a busca por melhores formas e soluções para preservação 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. O presente trabalho avaliou o concentrado de eritrócitos felino armazenado nas soluções CPDA-1 e CPD/SAGM durante 35 dias. Os dados laboratoriais foram comparados entre grupos e ao longo do tempo. Neste experimento foram utilizadas 10 bolsas de concentrado de eritrócitos felino divididos em dois grupos de 5 para avaliação de cada um dos aditivos. Os parâmetros laboratoriais K^+ , Na^+ , Cl^- , lactato, HCO_3^- , amônia, glicose e pH foram avaliados nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 35 após a coleta. Em vários parâmetros (K^+ , lactato, HCO_3^- , glicose e cloreto) a solução CPD/SAGM manteve o metabolismo energético do eritrócito mais estável. Com este trabalho, foi possível entender melhor as alterações laboratoriais sofridas pelos eritrócitos felinos durante o armazenamento. Concluímos que apesar da solução CPD/SAGM se mostrar mais eficaz *in vitro*, são necessários mais estudos com relação aos hemocomponentes em gatos e à sua viabilidade pós-transfusional.

ABSTRACT

During blood storage at low temperatures, either as whole blood or as packed red cells, there is a significant decrease of metabolites that are important for the viability and functionality of erythrocytes. The development of blood preservation solutions has enabled the storage of red blood cells and improved the service at the blood banks. Therefore, the search for better ways and blood preservation solutions to avoid or reduce these harmful effects during the storage conditions is continuous, in order to obtain the best blood product to be transfused. This study evaluated feline erythrocyte concentrate stored in CPDA-1 and CPD/SAGM solutions during 35 days. The laboratory data were compared between groups and over time. In this experiment were used 10 bags of feline erythrocyte concentrate divided into two groups of 5 to evaluate every additive. The laboratory data K^+ , Na^+ , Cl^- , lactate, HCO_3^- , ammonia, glucose and pH were assessed on days 1, 7, 14, 21, 28, and 35 after collection. On various parameters (K^+ , Cl^- , HCO_3^- , glucose and lactate) solution of CPD/SAGM kept the energy metabolism of red blood cells more stable. With these results we can better understand the biochemical changes of feline erythrocytes during storage. We conclude that, although the CPD/SAGM solution shown to be more effective *in vitro*, more studies are needed to improve knowledge of feline blood components and post-transfusion viability.

Introdução

A terapia transfusional na medicina veterinária tornou-se uma opção muito importante, quando o objetivo é a sobrevivência dos pacientes acometidos por distúrbios hematológicos agudos ou crônicos. A medicina transfusional felina vem se desenvolvendo juntamente com o aumento da procura por estes animais de estimação e sua importância emocional ⁽¹⁻²⁾. O uso de hemocomponentes nesta espécie é limitado, e o sangue total ainda é o mais utilizado na rotina clínica devido ao pequeno volume coletado e dificuldades na separação de seus componentes. Porém, com o surgimento de bancos de sangue veterinários, esta prática tem se tornado cada vez mais frequente ⁽³⁻

1- 4).

Quando o sangue é coletado para conservação *in vitro*, os eritrócitos são transferidos para um ambiente diferente, ocasionando uma série de alterações morfológicas, hemogasométricas e bioquímicas ⁽⁵⁾. Durante o armazenamento sanguíneo, ocorrem alterações bioquímicas importantes, como o aumento nos níveis de potássio, lactato, e a diminuição do pH e dos níveis de 2,3-DPG ⁽⁶⁾. Esse conjunto de alterações é conhecido como lesões de armazenamento ou estocagem, que acarretam danos irreversíveis aos eritrócitos e conseqüentemente redução da sobrevivência pós-transfusão. A importância do conhecimento das lesões de armazenamento está na evidência de que o período de armazenamento influencia na qualidade dos componentes na bolsa de sangue ⁽⁵⁻⁷⁾.

A seleção cuidadosa de anticoagulantes-conservantes pode aumentar o período de tempo em que o sangue ou seus produtos podem ser armazenados e diminuir os efeitos adversos do armazenamento ⁽⁸⁾. Entre os anticoagulantes para armazenamento de sangue felino destacam-se o ácido cítrico-dextrose (ACD), o citrato-fosfato-dextrose (CPD) e o citrato-fosfato-dextrose-adenina (CPDA-1). Em estudo ⁽⁹⁾ sob a forma de sangue total a viabilidade dos eritrócitos felinos armazenados por 35 dias em CPDA-1 é de 84,8% após 24 horas.

Esse artigo tem o objetivo de demonstrar a avaliação do metabolismo eritrocitário felino *in vitro*, semanalmente, por 35 dias, através de parâmetros bioquímicos e comparar o efeito das soluções CPDA-1 e CPD/SAGM sobre o concentrado de eritrócitos felino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos animais

Foram utilizados 10 gatos clinicamente saudáveis, machos e fêmeas, provenientes de proprietários particulares de Porto Alegre, avaliados e selecionados conforme critérios pré - estabelecidos por pesquisadores da área ⁽⁹⁾ e descritos neste estudo. O uso dos animais teve permissão do tutor, que foi devidamente alertado sobre todos os riscos do procedimento - de acordo com

conceitos de bioética aplicados à pesquisa animal. Os tutores também responderam a um questionário e assinaram termos de consentimento. Os gatos tinham entre um e oito anos de idade, pesavam mais de 4 kg, apresentavam comportamento dócil, vacinação atualizada (panleucopenia felina, rinotraqueíte viral felina, calicivirose e clamidiose), estavam livres de ectoparasitas, eram domiciliados e não tinham acesso à rua⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

Avaliação dos animais

Os animais foram submetidos a exame clínico (ausculta cardio pulmonar), temperatura retal e palpação), testes de controle laboratoriais (exames hematológicos e bioquímicos) e testados contra o vírus da leucemia felina e vírus da imunodeficiência felina por método imuno-enzimático (Snap Combo felino, Idexx Laboratories, US) antes da doação de sangue. Todos os doadores selecionados apresentavam hematócrito acima de 35%⁽¹⁾.

A determinação dos parâmetros hematológicos foi realizada com auxílio de contador automático (Sysmex *pocH-100iV* Sysmex/ Roche Diagnóstica) e hematócrito pelo método de microhematócrito (centrífuga Spin 1000, Micro-spin). A análise do esfregaço sanguíneo corado e contagem diferencial através de microscopia ótica (corante Panótico Rápido, Laborclin). Também foram realizadas dosagens séricas de albumina, creatinina, ureia, e determinação da atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) através de bioquímica seca (Vitros 250, Ortho-Clinical Diagnostics).

Sistema fechado de coleta de bolsas

Os doadores selecionados foram anestesiados com o seguinte protocolo: indução com midazolam (0,2-0,5 mg/kg) e quetamina (3-5 mg/kg) por via intravenosa e manutenção anestésica com isoflurano após intubação⁽¹⁻¹²⁻¹³⁾. A monitoração anestésica foi realizada através do acompanhamento das frequências cardíaca e respiratória com estetoscópio. Durante todo o

procedimento foram tomados cuidados em relação à antissepsia local antes da coleta das bolsas com álcool 70° e clorexidina 0,5% solução alcoólica, pressão leve no local da punção venosa após a doação (durante dois a cinco minutos) para auxiliar o processo de hemostasia e observação do animal após a doação até sua completa recuperação anestésica.

A coleta do sangue foi realizada por punção da veia jugular, através do método gravitacional, com homogeneização manual do sangue durante o procedimento (Figura 1). Os animais realizaram apenas uma doação durante todo o experimento, cujo volume de sangue coletado foi de 11 mL/kg⁽¹⁾. A coleta das bolsas foi realizada através de um sistema fechado adaptado, o qual consistiu na adaptação de uma bolsa pediátrica (Figura 2) (#402-504, Pedi-Pak, Genesis BPD-LLC) contendo anticoagulante e selada (soldador de tubo para conexão estéril e lâminas TSCD, Terumo Medical do Brasil) com uma agulha de aférese 19G (#P9-7008MG, Medisystems Corporation, Lawrence, US). O cálculo do volume de anticoagulante em cada bolsa foi realizado de acordo com a proporção utilizada em bolsas para coleta de sangue humano (63 mL de solução de CPD ou CPDA-1 para 450 mL de sangue doado).



Figura 1: coleta do sangue realizada por punção da veia jugular de um doador felino.

Processamento das bolsas

O sangue total foi separado por centrifugação (Legend RT, Sorvall/ ThermoScientific), adaptada para a preparação de concentrado de eritrócitos (CE) felino, a 2700 g por 4 minutos a 22° C até 6 horas após a doação ⁽¹¹⁾. As 10 bolsas coletadas foram divididas em dois grupos de 5 para avaliação das soluções CPDA-1 e CPD/ SAGM (Terumo Penpol Limited), durante o armazenamento. Após extração do plasma de todas as bolsas, o plasma autólogo foi adicionado aos CE do grupo 1 e a solução de SAGM foi adicionada aos CE do grupo 2 na proporção de 100 mL de plasma autólogo/SAGM para aproximadamente 225 mL de concentrado de eritrócitos . As bolsas de CE foram armazenadas em posição horizontal e refrigeradas ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 35 dias. A tabela 1 mostra a composição das soluções utilizadas no experimento.

Tabela 1. Composição (g) das soluções utilizadas no experimento.

Composição da solução em 100 mL	CPD	CPDA-1	SAGM-1
Ácido cítrico (anidro)	0,299	0,299	-
Citrato de Sódio (diidratado)	2,63	2,63	-
Fosfato diácido de sódio (monoidratado)	0,222	0,222	-
Glicose (monoidratada)	2,55	3,19	0,900
Adenina	-	0,0275	0,017
Cloreto de sódio	-	-	0,877
Manitol	-	-	0,525
Sódio	-	-	-



Figura 2: Sistema fechado adaptado para coleta de sangue felino.

Avaliação laboratorial dos concentrados de eritrócitos

Os parâmetros laboratoriais foram avaliados no CE armazenado em CPDA-1 e CPD/ SAGM nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 35 após a coleta. As bolsas foram homogeneizadas (Labnet Gyro Twister GX-1000 3-D) por 60 segundos antes da retirada de amostras de 2 mL do CE, obtidas com auxílio de uma seringa estéril através de uma cânula para coleta de bolsas (#4C2405 Sampling Site Coupler, Fenwal) e agulha 16G. Uma alíquota da amostra foi utilizada para determinação do hematócrito (Ht) e hemoglobina total (Hb) (Hemocue Hb301, HemoCue AB). O restante da amostra foi centrifugado a 2700 g por 10 minutos a 4°C (Legend-RT plus, Sorvall, Thermo Scientific) e o sobrenadante utilizado para dosagem da hemoglobina plasmática (Hp plasma) (Hemocue Plasma Low/Hb, HemoCue AB), glicose, amônia e lactato (Vitros 250, Ortho-Clinical Diagnostics). Além disso, as concentrações de potássio (K^+), sódio (Na^+), cloreto (Cl^-), bicarbonato (HCO_3^-), juntamente com pH foram determinadas com analisador de gases sanguíneos portátil (I-Stat 1 e cartucho CG8+, Abbott

Point of Care Inc.). O grau de hemólise foi expresso em percentagem da hemoglobina total presente no CE após correção para o hematócrito, de acordo com a seguinte fórmula⁽¹⁴⁾:

$$\% \text{ grau de hemólise} = (100 - \text{Ht}) \times \frac{\text{Hemoglobina plasmática (g/dL)}}{\text{Hemoglobina total (g/dL)}}$$

Ao final dos 35 dias de armazenamento, as unidades de CE foram encaminhadas para análise microbiológica.

Análise Estatística

Foi realizado one way ANOVA (Análise de Variância simples), seguido de teste de Tuckey para comparar as soluções ao longo do tempo. O t-test foi usado para comparar as duas soluções a cada dia para cada parâmetro. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de p foi $\leq 0,05$. Para as análises foi utilizado o programa estatístico SPSS (PASW[®] Statistics 18, IBM Corporation).

Resultados

As alterações bioquímicas sofridas durante o armazenamento estão descritas na Tabela 2 e representadas na Figura 3. O hematócrito de todas as bolsas esteve de acordo com a determinação do Ministério da Saúde para CE com solução aditiva (50% a 70%)⁽¹⁵⁾ e da Associação Americana de Bancos de Sangue para CE humano ($\leq 80\%$)⁽¹⁶⁾. Um aumento significativo foi observado no grau de hemólise em ambas as soluções durante os 35 dias, mas o hematócrito se manteve constante sem diferença significativa entre as soluções ($p < 0,05$). O pH e as concentrações de glicose sofreram uma diminuição significativa durante o armazenamento, mas sem diferença entre as soluções ($p < 0,05$).

A concentração de cloretos aumentou significativamente após o 14^o dia na solução CPDA-1 e se manteve constante na solução de CPD/SAGM ($p < 0,05$). As concentrações de sódio se mantiveram na solução CPD/SAGM e aumentaram significativamente na solução CPDA-1 ($p < 0,05$). As concentrações de amônia, lactato e potássio apresentaram um aumento significativo em ambas soluções, mas sem diferença entre elas ($p < 0,05$). A concentração de HCO_3 apresentou uma diminuição significativa em ambas, sendo que a solução CPDA-1 apresentou uma concentração menor até o 14^o dia ($p < 0,05$).

Todas as culturas microbiológicas foram negativas para crescimento bacteriano.

Discussão

Neste estudo, a solução CPD/SAGM demonstrou uma menor redução das concentrações de glicose durante o armazenamento. Esta superioridade dos CE da solução CPD/SAGM pode ser atribuída à maior concentração de glicose na solução aditiva e conseqüentemente melhor conservação do metabolismo energético e do ATP eritrocitário⁽¹⁷⁻¹⁸⁾. A redução das concentrações da glicose apresentada pela solução CPDA-1 também foi observada⁽¹⁹⁾ em estudos de conservação do concentrado de eritrócitos caninos em bolsas CPDA-1 e em estudo com sangue total canino armazenado em CPDA-1 e CPD/SAGM⁽²⁰⁾.

Quanto ao grau de hemólise, os requisitos atuais para patentear novas soluções aditivas nos EUA, e também sugerido pelo Conselho Europeu, têm como base dois parâmetros: o nível de hemólise (abaixo do limiar de 0,8% no final do período de armazenamento) e uma taxa de sobrevivência das células acima de 75% após 24 horas da transfusão⁽²¹⁾. Nesse sentido, ambas as soluções apresentaram grau de hemólise abaixo de 0,8% após 35 dias no presente experimento, ou seja, dentro dos limites sugeridos aos bancos de sangue humanos.

Apesar das soluções conservadoras e aditivas possuírem fontes de energia para a manutenção do metabolismo eritrocitário, a sobrevivência dos eritrócitos é limitada tanto pela redução da fonte

energética ao longo do armazenamento como pelo envelhecimento natural das hemácias. O período de armazenamento promove uma série de alterações na membrana plasmática dos eritrócitos como redução do tamanho e esferocitose progressiva, surgimento de microvesículas e aumento gradual da fragilidade osmótica, sendo que algumas sofrem lise, acarretando em um aumento da hemoglobina plasmática entre outras alterações ⁽²²⁾. A liberação de hemoglobina livre é um marcador de perda celular (hemólise) e é inversamente relacionado ao o metabolismo energético e o grau de hemólise, o que sugere que o metabolismo energético é o principal determinante na hemólise ⁽²³⁾, fato observado neste estudo, no qual o grau de hemólise aumentou significativamente ao longo dos dias em ambas as soluções, no entanto, o hematócrito se manteve sem alterações significativas ao longo de todo o período.

O pH tem um papel determinante na preservação dos eritrócitos, e sua diminuição se deve principalmente ao metabolismo das hemácias no qual a glicose é metabolizada até lactato, aumentando o número de íons H^+ . Isto explica a diminuição progressiva de glicose e a diminuição do pH ^(17- 24) juntamente com o aumento do lactato. Quando se avaliou o decréscimo do pH em relação aos dias observou-se que a solução CPD/SAGM manteve o pH mais estável a partir da terceira semana, diferente da solução CPDA-1 que continuou apresentando diminuição do pH. Este fato pode estar associado com a maior capacidade tamponante da solução. Quando comparados os resultados das análises, a solução CPD/SAGM demonstrou menor diferença estatística e mais estabilidade nos níveis de HCO_3 . O metabolismo anaeróbico das hemácias produz ácidos que são neutralizados pela ação do HCO_3 plasmático, que tem papel tamponante no meio extracelular ⁽²⁵⁾. Assim como demonstrado em estudo que analisou sangue bovino, os níveis de lactato aumentaram ao longo do período de armazenamento, enquanto ocorreu uma redução gradual nos níveis de bicarbonato plasmático, de modo a neutralizar esses ácidos ⁽²⁴⁾. No presente estudo a solução CPD/SAGM mostrou menores valores quando comparada à solução CPDA-1 nas três primeiras semanas. Além

disso, as diferenças entre as análises do dia 1 e do dia 35 foram menores na solução CPD/SAGM, o que demonstra que esta manteve o metabolismo estável por mais tempo.

Ao comparar as soluções, foi observado um aumento significativo do potássio plasmático em ambos os grupos durante todo o período estudado, mas a solução CPD/SAGM manteve os níveis mais baixos de ao longo do armazenamento, assim como observado em outros estudos com sangue total canino e felino⁽²⁰⁻²⁶⁻²⁷⁾. Este achado sugere um melhor desempenho da solução CPD/SAGM devido a maior preservação da membrana plasmática.

Os eritrócitos de gatos, assim como os de *ferrets* e da maior parte dos cães, não possuem atividade da bomba de sódio-potássio e apresentam concentrações de Na⁺ e K⁺ próximas daquelas definidas por Donnan para o equilíbrio com o plasma. A concentração intra-eritrocitária de sódio e potássio em felinos é de aproximadamente 105,8 ± 14,4 mmol/L e 5,9 ± 1,9 mmol/L, respectivamente⁽²⁸⁾. Os níveis de potássio mais baixos e a manutenção da concentração de sódio podem estar relacionados com a composição da solução CPD/SAGM, a qual contém cloreto de sódio em sua formulação, auxiliando no equilíbrio entre o meio intra e extracelular de Na⁺ e K⁺.

Com relação à amônia, assim como relatado em um estudo realizado em concentrado de eritrócitos canino os valores aumentaram significativamente até o 35º dia de armazenamento. A adenina, componente de ambas as soluções, pode ser o principal substrato para a formação *in vitro* de amônia⁽²⁹⁾. No presente estudo foi observado um aumento significativo de amônia ao longo do tempo de armazenamento, porém a concentração foi menor na solução CPD/SAGM ao final do armazenamento e apresentou menor variação ao longo do período, o que pode estar relacionado com uma menor lesão de armazenamento nesta solução.

O grau de saturação da hemoglobina depende da pressão de oxigênio circulante, que pode ser demonstrado por uma curva sigmoide, também chamada de curva de dissociação do oxigênio. O ponto de inflexão desta curva é onde a hemoglobina (Hb) está 50% saturada por oxigênio (p50). Os fatores que potencialmente influenciam a p50 são pH e 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). À medida

que o pH reduz, a curva de dissociação da oxigênio é deslocada para a direita, o que significa que a afinidade da Hb pelo oxigênio é reduzida e este é prontamente liberado para os tecidos. Na circulação periférica o pH é menor do que nos pulmões o que favorece a liberação do oxigênio para os tecidos⁽¹⁸⁾. Porém, a molécula de 2,3 DPG se liga a cadeia β da hemoglobina, o que resulta em uma mudança conformacional e reduz a afinidade da Hb pelo oxigênio, porém, apesar de gatos também terem cadeia β , a afinidade da hemoglobina nestas espécies é apenas minimamente afetada pela adição de 2,3 DPG⁽³⁰⁾.

Em gatos, bovinos, ovinos e caprinos o cloreto é o principal regulador da afinidade do oxigênio. O cloreto e o 2,3-DPG parecem competir pelos mesmos sítios de ligação na desoxihemoglobina. O cloreto tem um efeito mínimo sobre a afinidade do oxigênio pela Hb nas espécies com alta concentração de 2,3-DPG intra-eritrocitário, mas atua como o principal regulador em espécies em que a concentração de 2,3-DPG é baixa, como em gatos⁽³⁰⁻³¹⁾. Em nosso estudo as concentrações de cloreto foram mantidas sem alterações nos eritrócitos conservados em CPD/SAGM, ao contrário da solução CPDA-1, na qual houve um aumento significativo. Este fato provavelmente se deve à composição do CPD/SAGM que possui cloreto de sódio em sua formulação, portanto o equilíbrio deste íon com o plasma pode ser mantido com mais facilidade.

Um dos objetivos da conservação de sangue, além de manter a qualidade e viabilidade das células armazenadas é evitar a proliferação bacteriana⁽¹⁸⁾, em virtude dos eritrócitos armazenados servirem como meio de cultura para bactérias. A maioria das bactérias não sobrevive às baixas temperaturas de armazenamento (1 a 6°C), no entanto, existem algumas tolerantes, como *Aeromonas sp* e algumas espécies de *Serratia sp*⁽³³⁾. Neste estudo, as unidades não apresentaram crescimento bacteriano, comprovando a eficácia do sistema fechado adaptado utilizado neste estudo.

Conclusão

Os resultados *in vitro* obtidos durante o armazenamento de concentrado de eritrócitos felino em

CPDA-1 e CPD/SAGM por 35 dias foram satisfatórios quando comparado a outros estudos^(20- 27-26).

A solução CPD/SAGM apresentou alguns benefícios em relação à solução CPDA-1, como a manutenção das concentrações de cloreto e sódio, e menor variação das concentrações de pH, HCO₃, glicose e potássio. Os autores acreditam que mais estudos são necessários, juntamente com a avaliação da viabilidade pós-transfusional do concentrado de eritrócitos felino em ambas soluções para confirmar estes resultados.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos do concentrado de eritrócitos felino em CPDA-1 e CPD/SAGM durante 35 dias

Variável	Dia 1		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28		Dia 35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Hemólise* (%)												
CPDA-1	0,033	(0,019)	0,148	(0,067)	0,327	(0,153)	0,445	(0,228)	0,536	(0,267)	0,671	(0,351)
CPD/SAGM	0,026	(0,019)	0,143	(0,055)	0,292	(0,177)	0,483	(0,287)	0,618	(0,441)	0,755	(0,513)
Ht (%)												
CPDA-1	52,6	(2,07)	52,8	(1,643)	52,6	(2,4)	53,2	(1,79)	53,6	(1,52)	53,8	(1,64)
CPD/SAGM	52,66	(3,61)	51,83	(3,06)	51,83	(3,06)	51,83	(3,37)	52,16	(3,18)	52,5	(4,08)
pH												
CPDA-1	7,053	(0,044)	6,97	(0,054)	6,86	(0,061)	6,78	(0,089)	6,66	(0,105)	6,62	(0,076)
CPD/SAGM	7,137	(0,22)	6,98	(0,08)	6,84	(0,113)	6,69	(0,16)	6,67	(0,151)	6,66	(0,155)
Cloretos (mmol/L)												
CPDA-1	114,1	(2,86)	116,4	(1,51)	116,6	(2,19)	120,8	(2,77)	119,8	(2,28)	119	(2,0)
CPD/SAGM	117,8	(1,47)	119,67	(1,5)	119	(2,6)	120,67	(1,96)	120,7	(2,16)	120,5	(1,97)
HCO₃ (mmol/L)												
CPDA-1	10,88	(0,97)	6,2	(0,55)	3,52	(0,61)	2,4	(0,43)	1,46	(0,33)	0,95	(0,65)
CPD/SAGM	7,67	(0,68)	4,73	(0,85)	2,92	(0,98)	1,85	(0,89)	1,06	(1,08)	0,93	(1,11)
Amônia (mmol/L)												
CPDA-1	187,0	(46,5)	417,0	(79,2)	516,6	(98,0)	620,4	(119,1)	713,2	(123,7)	828,2	(142,7)
CPD/SAGM	135,2	(46,7)	359,0	(59,9)	439,7	(92,6)	570,3	(100,8)	637,5	(194,3)	706,0	(272,5)
Glucose (mg/dL)												
CPDA-1	392,2	(47,56)	315,2	(50,8)	273,8	(59,4)	181,6	(61,57)	113,6	(62,8)	75	(48,83)
CPD/SAGM	383,6	(59,4)	349,3	(68,8)	290,3	(96,4)	235,7	(115)	158,66	(108,27)	170	(92,21)
Lactato (mmol/L)												
CPDA-1	5,14	(0,52)	12,88	(1,15)	18,04	(1,23)	23,06	(2,2)	23,86	(2,08)	25,68	(1,88)
CPD/SAGM	3,95	(1,12)	10,27	(2,49)	14,41	(3,49)	19,6	(4,4)	21,29	(5,73)	22,51	(6,95)
Na⁺ (mmol/L)												
CPDA-1	150,6	(0,894)	149,4	(1,14)	150	(1,732)	152,4	(1,14)	155	(2,738)	157	(1,224)
CPD/SAGM	152,1	(3,544)	150,3	(1,032)	153,3	(3,881)	152,8	(1,834)	153,6	(2,338)	154,8	(2,79)
K⁺ (mmol/L)												
CPDA-1	2,88	(0,356)	3,66	(0,357)	4,2	(0,356)	4,38	(0,327)	4,58	(0,237)	4,76	(0,313)
CPD/SAGM	2,65	(0,251)	3,27	(0,535)	3,68	(0,487)	3,88	(0,462)	3,99	(0,534)	4,00	(0,529)

DP = desvio padrão. * Determinada por concentração de hemoglobina

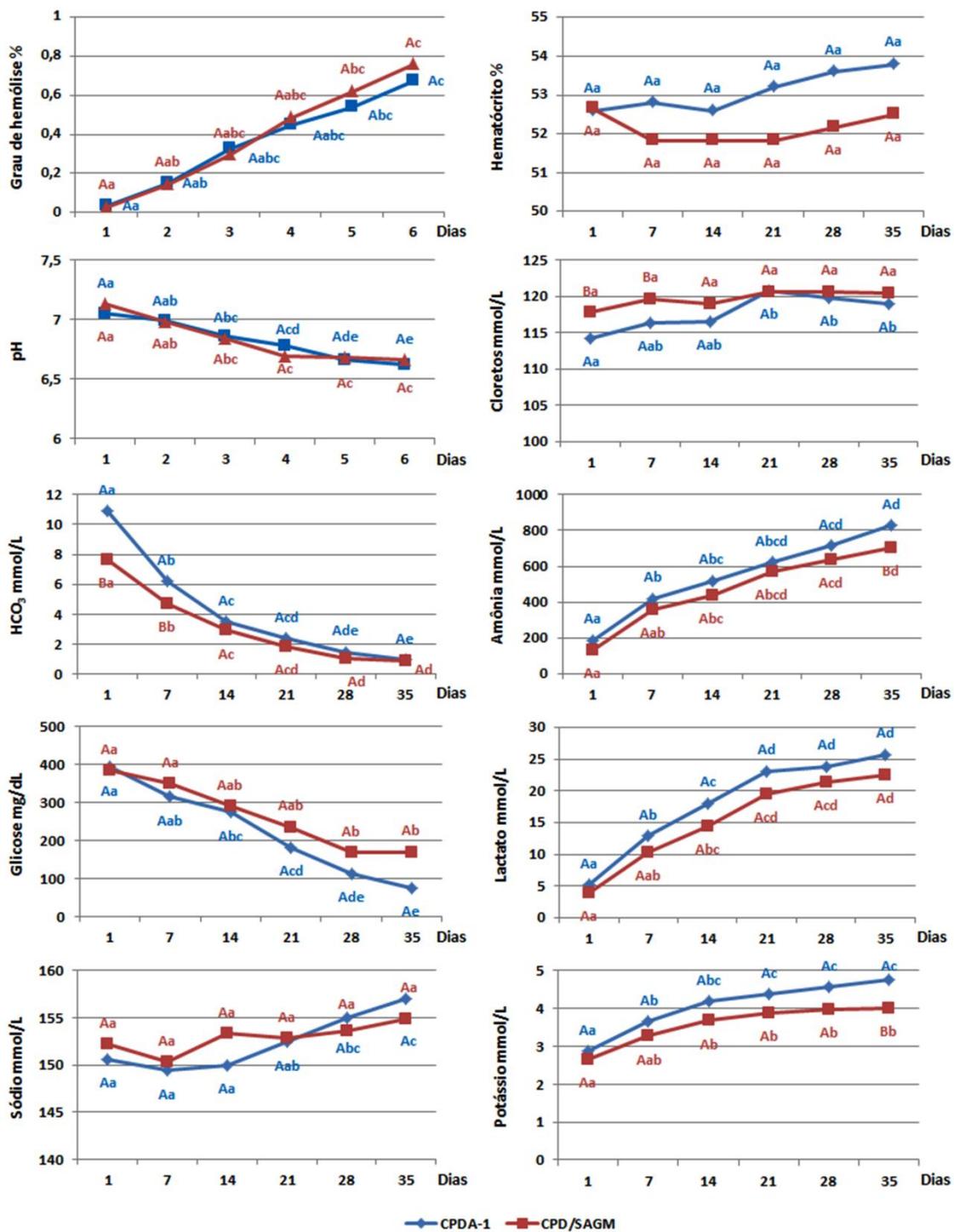


Figura 3: Alterações no grau de hemólise, hematócrito, pH, cloreto, bicarbonato, amônia, glicose, lactato, sódio, potássio, + no concentrado de eritrócitos felino armazenado em duas soluções (■ CPD/SAGM, ◆ CPDA-1) por 35 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença ao longo

do tempo ($p < 0,05$) e letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre as soluções a cada dia ($p < 0,05$).

REFERÊNCIAS

1. Kohn B, Weingart C. Feline transfusion medicine. In: Day M, Kohn B. (Eds) *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*, 2 ed. Gloucester: BSAVA, 2012. cap.35. p.308-318.
2. Pimenta M, Lanini M, Rabelo R. Terapia transfusional em felinos. *Journal Latinoamericano de medicina transfusional de emergência y cuidados intensivos*, 2 (4), 2010, p. 420-446.
3. Kristensen At, Feldman Bf. General principles of small animal blood component administration. In: *The veterinary clinics of North America small animal practice – Transfusion*. WB Saunders. v.25,n 6, 1995.
4. Barfield D, Adamantos S. Feline Blood Transfusions: A Pinker Shade of Pale. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2011 13: p.11-23.
5. Chin-Yee I, Arya N, D'Almeida MS. 1997. The red cell storage lesion and its implication for transfusion. *Transfusion Science*, 18:447-458.
6. Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A et al. Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (43):17063-17068.
7. Hale A, Safety of blood products for feline patient. In: August JR. *Consultations in Feline Internal Medicine*. Elsevier Saunders: Missouri, 2006. Cap. 57, p. 549-551.
8. Wardrop JK. Selection of anticoagulant-preservatives for canine and feline blood storage. In: *The veterinary clinics of North America small animal practice – Transfusion*. WB Saunders. v.25,n 6, 1995.
9. Bücheler J, Cotter S. Storage of feline and canine whole blood in CPDA-1 and determination of post-transfusion viability. *Journal Veterinary Intern Medicine*. 1994 8: 172

10. Gibson G. Transfusion medicine. In: King LG, Boag A. (Eds) *Manual of Canine and Feline Emergency and critical care*, 2. ed. Hampshire: BSAVA, 2007.
11. Abrams-Ogg ACG. Practical Blood Transfusion. In: Day M, Mackin A, Littlewood J. (Eds) *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*, 1 ed. Hampshire: BSAVA, 2000. cap.15. p.263-303.
12. Natalini CC, *Teoria e técnicas em anestesiologia veterinária*. Artmed: Porto Alegre, 293 p. 2007.
13. Fantoni DT, Cortopassi SRG. *Anestesia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, 2002. 389 p.
14. Wardrop KJ, Tucker RL, Mugnai K. Evaluation of canine red blood cells stored in a saline, adenine, and glucose solution for 35 days. *Journal Veterinary Intern Medicine*. 1997 Jan-Feb;11(1):5-8.
15. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Guia para o uso de hemocomponentes. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. – Brasília. 2008. 140 p.Série A. *Normas e Manuais Técnicos*. ISBN 978-85-334-1531-7.
16. Roback JD, Grossman BJ, Harris T, Hillyer CD. *AABB Technical Manual*, 17th Ed. Bethesda, AABB Press, 2011.
17. Authement J, Wolfsheimer K, Catchings S, Canine blood component therapy: Product preparation, storage, and administration. *Journal of the American Animal Hospital Association* v.23, p.489–491, 1986.
18. HögmanCF, Löf H, Meryman HT. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate. *Transfusion*, v.26, n.9, p.1543-1552, 2006.
19. Wardrop KJ, OWEN TJ, MEYERS KM. 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.

20. Costa Júnior J, Viana JA, Ribeiro Filho JD. et.al. Parâmetros bioquímicos e hemogasométricos do sangue total canino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M. *Ciência Rural*, v. 38, n.2, p. 378-383, 2008.
21. D'Alessandro A, Liembruno G, Grazzini G, Zolla L. Red blood cell storage: the story so far. *Blood Transfus* 2010; 8:82-8.
22. Wardrop KJ, Owen, TJ, Meyers KM. 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.
23. Hess JR. An update on solutions for red cell storage. *Vox Sanguinis*.2006; 91(1):13-9.
24. Ribeiro Filho JD, Almeida CT, Gonçalves RC. Alterações hemogasométricas de sangue bovino durante a conservação em frascos de vidro com ACD e bolsas plásticas com CPDA-1, por 35 dias. *Veterinária Zootecnia*, 1994. p.77-84.
25. Randall D, Burggren W, French K. *Fisiologia animal: mecanismos e adaptações*. Editora Guanabara Koogan, 4ªed. 2008. p. 453-460.
26. Bertoleti B. Peroxidação lipídica e parâmetros bioquímicos do sangue total felino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAGM. 2011.42 f. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Santa Maria.
27. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis OE, Economou-Petersen E, Argaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. *Transfusion*.Volume 50, February 2010.
28. Harvey JW. The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6 ed. San Diego: Academic Press USA, 2008. Cap.7, p.173-240.
29. Waddell LS, Holts DE, Hughes D, Giger U, 2001: The effect of storage on ammonia concentration in canine packed red blood cells. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 11(1): 23-26.

30. Harvey JW. The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. (eds.). SanDiego: Academic Press, 1997. 157-203 p.
31. Wong C, Haskins SC. The effect of storage on the P 50 of feline blood. *Veterinary Emergency and Critical Care Society*, p. 1-5, 2005.
32. Hess JR. An update on solutions for red cell storage. *Vox Sanguinis*.2006;91(1):13-9.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização deste trabalho pode-se observar a escassez de informações sobre a conservação e coleta de bolsas de sangue e concentrado de eritrócitos felino. Quando se trata de coleta de sangue em felinos encontram-se muitas dificuldades, inclusive no acesso a doadores. Os dispositivos para a coleta devem ser adaptados e nem sempre são utilizados de uma maneira em que se possa armazenar este sangue, o que pode inutilizar o banco de sangue nesta espécie. Por isso são importantes pesquisas que possam comprovar que existe possibilidade de coleta, separação e armazenamento do sangue felino facilitando o acesso e o aproveitamento do sangue coletado.

Nota-se que muitas vezes as informações de pesquisas em humanos e caninos são adaptadas para felinos sem serem comprovadas cientificamente. Em nosso estudo avaliamos o metabolismo eritrocitário in vitro em duas soluções amplamente utilizadas em cães e seres humanos, e como nestes observamos que a solução de CPD/SAGM demonstrou uma menor variação das concentrações de pH, HCO₃, glicose e potássio. Nossos achados são apenas o início de pesquisas que podem expandir ainda mais a hematologia veterinária e sua utilização na rotina do médico veterinário de felinos.

REFERÊNCIAS

33. ABRAMS-OGG ACG. Practical Blood Transfusion. In: DAY M, MACKIN A, LITTLEWOOD J. (Eds) **BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine**, 1 ed. Hampshire: BSAVA, 2000. cap.15. p.263-303.
34. ALLEN MB. Component Preparation and Storage. In: HILLYER CD, SILBERSTEIN LE, NESS PM, ANDERSON KC, ROUSH KS. **Blood Banking and Transfusion Medicine**. 1. ed. Churchill Livingstone (Elsevier Science), 2003. 121-136 p.
35. ALMIZRAQ R, TCHIR JD, HOLOVATI JL, ACKER JP. Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and *in vitro* quality. **Transfusion**. 2013 Jan 16. doi: 10.1111/trf.12080
36. ANTONELLOU MH, KRIEBARDIS AG, STAMOULIS OE. ECONOMOU-PETERSEN E, ARGARITIS LH. PAPASSIDERI IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose–saline-adenine-glucose-mannitol. **Transfusion** Volume 50, February 2010.
37. AUBUCHON JP. Evolution to the 21st Century. In: HILLYER CD, SILBERSTEIN LE, NESS PM, ANDERSON KC, ROUSH KS. **Blood Banking and Transfusion Medicine**, 2003.1^a ed. Churchill Livingstone (Elsevier Science), cap.1. 3-7 p.
38. AUTHEMENT, J, WOLFSHEIMER, K, CATCHINGS, S, Canine blood component therapy: Product preparation, storage, and administration. **Journal of the American Animal Hospital Association** v.23, p.489–491, 1986.

39. BARFIELD, D ADAMANTOS, S. Assessment of feline blood for transfusion. **Veterinary record**. 2001. p. 350-351.
40. BENNETT-GUERRERO, E; VELDMAN, T H.; DOCTOR, A.; TELEN, M J.; ORTEL, TL.; REID, TS.; MULHERIN, MA.; ZHU, H.; BUCK, RD.; CALIFF, RM.; MCMAHON, TJ 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.
41. BOOTHE, DM. Therapy with blood and blood components, In:**Small Animal Clinics Pharmacology and Therapeutics**. Saunders: Philadelphia, 2001, Cap. 6, p.97-106.
42. BOTTEON, KD. Estruturação e padronização do banco de sangue para felinos no hospital veterinário da Universidade de São Paulo.2012.75f. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo.
43. BÜCHELER J, COTTER S. Storage of feline and canine whole blood in CPDA-1 and determination of post-transfusion viability. **Journal Veterinary Intern Medicine**. 1994 8: 172
44. CAMPBELL-LEE, SA.; NESS, PM. 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.
45. CASTELLANOS, I; COUTO, GRAY, CG. Clinical Use of Blood Products in Cats: A Retrospective Study (1997–2000), **Journal Veterinary Intern Medicine**,2004. 529–532 p.
46. CHIARAMONTE, D. Blood-component therapy: selection, administration and monitoring. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**.v.19, p.63-67, 2004.
47. DE KORTE, D.; VERHOEVEN, AJ. Quality determinants of erythrocyte destined for transfusion. **Cellular & Molecular Biology Research** (Noisy-le-grand), v.50 (março), n.2, p.187-95, 2004.

48. FANTONI, DT.; CORTOPASSI, SRG. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. 389p.
49. GABRIO BW, DONOHUE DM, FINCH CA. Erythrocyte preservation. V. Relationship between chemical changes and viability of stored blood treated with adenosine. **Journal clinical investigation**. 1955 Oct; 34(10): 1509-12.
50. GIBSON, G. In: KING, LG.; BOAG, A. (Eds) **Manual of Canine and Feline Emergency and critical care**, 2. ed. Hampshire: BSAVA, 2007.
51. 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.
52. HALE, A. Safety of blood products for feline patient. In: AUGUST, J. R. **Consultations in Feline Internal Medicine**. Esvier Saunders: Missouri, 2006. Cap. 57, p. 549-551.
53. HARVEY JW. The erythrocyte: physiology, metabolism and biochemical disorders. In: KANEKO JJ, HARVEY JW, BRUSS ML. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6 ed. San Diego: Academic Press USA, 2008. Cap.7, p.173-240.
54. HARVEY, JW. Erythrocyte metabolism. In: **Schalm's Veterinary Hematology**, 5. ed., B.F.
55. HARVEY, JW. 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.
56. HELM, J., KNOTTENBELT, C. Blood transfusions in dogs and cats – indications. **In practice**. 2010a .p.184-189. Disponível em: <http://inpractice.bmj.com>
57. HELM, J., KNOTTENBELT, C. Blood transfusions in dogs and cats – practilities of blood colletion and administration. 2010b. p.184-189. Disponível em: <http://inpractice.bmj.com/content/32/6/231.abstract>.
58. HESS JR. An update on solutions for red cell storage. **Vox Sanguinis**.2006;91(1):13-9.

59. HÖGMAN, CF.; LÖF, H.; MERYMAN, HT. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate. **Transfusion**, v.26, n.9, p.1543-1552, 2006.
60. HOHENHAUS, AF. Transfusão e substitutos do sangue. In: DIBARTOLA, S. P. **Anormalidades de fluidos, eletrólitos e equilíbrio ácido-básico na clínica de pequenos animais**. Roca:São Paulo, 2007. Cap. 24, p. 549 – 565.
61. KARGER R, LUKOW C, KRETSCHMER V. Deformability of Red Blood Cells and Correlation with ATP Content during Storage as Leukocyte-Depleted Whole Blood. **Transfusion Medicine Hemotherapy**. 2012 Aug;39(4):277-282.
62. KNOTTENBELT, CM. The feline AB blood group system and its importance in transfusion medicine. **Journal of feline medicine and surgery**. 2002, 4, 69-76.
63. KNOTTENBELT, CM. BLACKWOOD, L. Sangue. In: Chandler, E. A.; Gaskell, C. J.; Gaskell, R. M. **Clinica e terapêutica em felinos**. São Paulo: ROCA; 2006. P. 194-230.
64. KOHN, B; WEIGART, C. Feline blood typing and transfusion – a practical approach. **World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA**. 2006. www.ivis.org.
65. KOHN, B; WEINGART, C. Feline transfusion medicine. In: DAY, M.; KOHN, B. (Eds) **BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine**, 2 ed. Gloucester: BSAVA, 2012. cap.35. p.308-318
66. KURUP, PA.; ARUN, P.; GAYATHRI, NS.; DHANYA, CR.; INDU, AR. 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.
67. LACERDA LA, OLIVEIRA ST, GUERRA TA, STEIN GG, GONZÁLEZ FHD. Prevalência dos tipos sanguíneos A, B e AB em gatos domésticos mestiços da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**. 2008. 45 (Supl.): 46-53

68. LANEVSCHI, A.; WARDROP, KJN. Principles of transfusion medicine in small animals. **Canadian Veterinary Journal**, v.42, n.6, p.447-454, 2001.
69. LLOHN, AH.; VETLESEN, A.; FAGERHOL, MK.; KJELDTSEN-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.
70. LUCAS RL, LENTZ KD, HALE AS. Collection and Preparation of Blood Products. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, Vol 19, No 2 (May), 2004: pp 55-62
71. MARION RS, SMITH JE. Posttransfusion viability of feline erythrocytes stored in acid-citrate-dextrose solution. **Journal American Veterinary Medicine Association**. 1983 Dec 15;183(12):1459-60.
72. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Guia para o uso de hemocomponentes. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. – Brasília. 2008. 140 p.Série A. Normas e Manuais Técnicos. ISBN 978-85-334-1531-7.
73. MOLLISON, PL. The introduction of citrate as an anticoagulant for transfusion and of glucose as a red cell preservative. **British Journal of Haematology**, 2000, 108, p. 13-18.
74. 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.
75. 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.
76. NATALINI, CC., **Teoria e técnicas em anestesiologia veterinária**. Artmed: Porto Alegre, 293 p. 2007.

77. PIMENTA, M; LANINI, M; RABELO R. Terapia transfusional em felinos. **Journal Latinoamericano de medicina transfusional de emergência y cuidados intensivos**, 2 (4), 2010, p. 420-446.
78. PRICE, GS.; ARMSTRONG, PJ.; MCLEOD, DA.; BABINEAU, CA.; METCALF, MR.; SELLETT, LC. 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.
79. ROBACK JD, GROSSMAN BJ, HARRIS T, HILLYER CD. **AABB Technical Manual**, 17th Ed. Bethesda, AABB Press, 2011.
80. ROUS, P.; TURNER, JR. The preservation of living red blood cells *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, v.23, p.219, 1916.
81. SARAIVA JCP, OTTA MI. Preservação do sangue. In: Hemoterapia fundamentos e prática. Atheneu SP, p.107-114.2007.
82. SIMON ER, CHAPMAN RG, FINCH CA. Adenine in red cell preservation. **Journal of Clinical Investigation**. 1962 Feb;41:351-9.
83. SPRINGER, T. HATCHETT, W, L.; OAKLEY, D. A.; NIGGEMEIR, A.; GIGER U. Feline blood storage and component therapy using a closed collection system. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v .12, p.248,1998.SOWEMIMO-COKER SO. Red blood cell hemolysis during processing. **Transfusion Medicine Reviews**, v.16, n.1 (janeiro), p.46-60, 2002.
84. ULATA, SK. 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.

85. WARDROP KJ, TUCKER RL, MUGNAI K. Evaluation of canine red blood cells stored in a saline, adenine, and glucose solution for 35 days. **Journal Veterinary Intern Medicine**. 1997 Jan-Feb;11(1):5-8.
86. WARDROP, JK. Selection of anticoagulant-preservatives for canine and feline blood storage. In: **The veterinary clinics of North America small animal practice – Transfusion**. WB Saunders. v.25,n 6, 1995.
87. WARDROP, KJ.; OWEN, TJ.; MEYERS, KM. 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.
88. WEINGART, C., GIGER, U., KOHN, B. Whole blood transfusions in 91 cats: a clinical evaluation. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 3, p. 139-148, 2004.
89. WINSLOW RM, INTAGLIETTA M. Red cell age and loss of function: advance or SNO-job? **Transfusion**, v.48, n.3, p.411-414, 2008.
90. WONG C, HASKINS SC. The effect of storage on the P 50 of feline blood. **Veterinary Emergency and Critical Care Society**, p. 1-5, 2005.
91. ZUCK TF, BENSINGER TA, PECK CC, CHILLAR RK, BEUTLER E, BUTTON LN, MCCURDY PR, JOSEPHSON AM, GREENWALT TJ. The *in vivo* survival of red blood cells stored in modified CPD with adenine: report of a multi-institutional cooperative effort. **Transfusion**. 1977 Jul-Aug;17(4):374-82.

ANEXO 6 – LAUDO MICROBIOLÓGICO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA
Av.: Bento Gonçalves, 9090, 91540-000 Porto Alegre –RS
Fone: (51) 3308-6123

Exame Bacteriológico

Requisitante: Franciele Sonaglio – Projeto Fran- CPD/SAGM

Material: Sangue

Data coleta: 21/08/2013

Registro Lab. R2028

Resultado

Amostra - Doador 3

Cultura Pura

Crescimento e cultura mista

Cultivo aeróbico: Sem crescimento bacteriano significativo em 72 horas.

(Metodologia utilizada: Semeadura em agar sangue, cultivo aeróbico a 36°C).

Amostra - Doador 4

Cultura Pura

Crescimento e cultura mista

Cultivo aeróbico: Sem crescimento bacteriano significativo em 72 horas.

(Metodologia utilizada: Semeadura em agar sangue, cultivo aeróbico a 36°C).

Amostra - Doador 7

Cultura Pura

Crescimento e cultura mista

Cultivo aeróbico: Sem crescimento bacteriano significativo em 72 horas.

(Metodologia utilizada: Semeadura em agar sangue, cultivo aeróbico a 36°C).

Amostra - Doador 8

Cultura Pura

Crescimento e cultura mista

Cultivo aeróbico: Sem crescimento bacteriano significativo em 72 horas.

(Metodologia utilizada: Semeadura em agar sangue, cultivo aeróbico a 36°C).

ANEXO 7 – LAUDO MICROBIOLÓGICO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
LABORATÓRIO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA
Av.: Bento Gonçalves, 9090, 91540-000 Porto Alegre –RS
Fone: (51) 3308-6123

Exame Bacteriológico

Requisitante: Franciele Sonaglio

Material: Sangue

Data coleta: 23/10/2013

Registro Lab. R2204

Resultado

Cultura Pura

Crescimento e cultura mista

Amostra 1 – Projeto CPDA 1 / Doador 1 Mol, vol:26,9 mL

Cultivo aeróbico: Sem crescimento bacteriano significativo em 72 horas.

Amostra 2 – Projeto CPD/ SAG M / Doador 2 Carvão, vol: 30 mL

Cultivo aeróbico: Sem crescimento bacteriano significativo em 72 horas.

Amostra 3 – Projeto CPDA 1/ Doador 5 Rascunho, vol: 25,3 mL

Cultivo aeróbico: Sem crescimento bacteriano significativo em 72 horas.

Amostra 4 – Projeto CPDA 1/ Doador 6 Mima, vol: 26,5 mL

Cultivo aeróbico: Sem crescimento bacteriano significativo em 72 horas.

Amostra 5 – Projeto CPD/SAG M/ Doador 9 Borges, vol: 32,4 mL

Cultivo aeróbico: Sem crescimento bacteriano significativo em 72 horas.

Amostra 7 – Projeto CPDA 1 / Doador 11 Fino, vol: 26 mL

Cultivo aeróbico: Sem crescimento bacteriano significativo em 72 horas.

(Metodologia utilizada: Semeadura em ágar sangue, cultivo aeróbico a 36°C).

Porto Alegre, 29 de outubro de 2013.

Marisa R. I. Cardoso
CRMV/RS 2907