



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAQUEL REIS MARTINS

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E OXIDATIVOS DE
CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS DE CÃES, ARMAZENADOS EM BOLSAS
PLÁSTICAS DE CPD/SAG-M**

RAQUEL REIS MARTINS

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E OXIDATIVOS DE
CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS DE CÃES, ARMAZENADOS EM BOLSAS
PLÁSTICAS DE CPD/SAG-M**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina como requisito para a obtenção do título
de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Mendes Pereira
Co-orientadora: Profa. Dra. Danielle Venturini

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M386 **Martins, Raquel Reis.**
Parâmetros hematológicos, bioquímicos e oxidativos de concentrados de hemácias de cães, armazenados em bolsas plásticas de CPD/SAG-M / Raquel Reis Martins. - Londrina, 2019.
84 f. : il.

Orientador: Patrícia Mendes Pereira
Coorientador: Danielle Venturini.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Medicina transfusional - Tese. 2. Concentrado de hemácias - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. 4. Controle de qualidade - Tese. I. Pereira, Patrícia Mendes. II. Venturini, Danielle. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619

RAQUEL REIS MARTINS

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E OXIDATIVOS DE
CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS DE CÃES, ARMAZENADOS EM BOLSAS
PLÁSTICAS DE CPD/SAG-M**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina como requisito para a obtenção do título
de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Mendes Pereira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Karina Keller M.C. Flaiban
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fábio Nelson Gava
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ellen de Souza Marquez
Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Londrina, de 23 de setembro de 2019.

Dedico a tese à minha família e a todos os doadores de sangue

AGRADECIMENTOS

1
2
3
4 À Deus pelo benefício da vida, pela força nos momentos de dificuldade, por me
5 levantar as vezes que eu caí e iluminar meu caminho quando tudo parecia escuridão; e a
6 mãezinha do céu que me acalentou em seu colo nos momentos de dor e solidão e nunca negou
7 um pedido meu.

8 Aos meus pais, Leda Maria Reis Martins, que sempre acreditou em mim, me
9 apoiando, dando suporte e amor; e a meu pai, Olímpio Beleza Martins, que mesmo não mais
10 entre nós é um grande exemplo de que sonhos são sempre possíveis.

11 Ao meu companheiro da vida, Daniel Dias Fagundes, meu porto seguro e maior
12 incentivador sempre. Obrigada por acreditar e sonhar cada um dos meus sonhos comigo,
13 mesmo que para isso você tenha que ter mudado tantas vezes de cidade e de emprego.

14 À minha filha, Maria Laura Martins Fagundes, pessoa que mais amo no mundo, meu
15 principal motivo por sempre querer lutar. Obrigada pelo esforço em entender minha ausência
16 como mãe durante sua fase de crescimento e perdão por todo tempo que tive que abdicar de
17 sua companhia para estar em frente ao computador. Você é a razão de tudo que eu faço!

18 À professora Dra. Patrícia Mendes Pereira, pela oportunidade de trabalhar no
19 laboratório de medicina transfusional.

20 À minha coorientadora professora Danielle Venturini, que é um modelo de
21 profissional, exemplo de que o trabalho realmente vale à pena. Obrigada pela oportunidade
22 oferecida, por confiar em mim, pelo aprendizado proporcionado e por todo acolhimento que
23 me foi tão necessário nos momentos de desespero.

24 À professora Sandra Simonelli, por tantas vezes ter me ajudado. Obrigada pelos
25 conselhos, pela paciência, pela amizade e por também de levar suas filhas Lana e Lola para
26 participarem do experimento como doadoras.

27 À professora Dra. Karina Keller Flaiban, por permitir carinhosamente que grande parte
28 das minhas análises fossem realizadas no Laboratório de Patologia Clínica, disponibilizando
29 aparelhos e reagentes, além de toda ajuda e disponibilidade sempre que precisei.

30 À Melca Altoé, minha afilhada de casamento e a filha que a vida me deu. Obrigada
31 por sempre ter paciência (que não lhe é peculiar) em ouvir minhas murmurações, ter uma
32 palavra confortante e me ajudar a sair do fundo do poço quando eu mais precisei. Obrigada
33 por não me julgar mesmo tendo visto tão de perto a transformação da Raquel tão forte que
34 veio de Umuarama na Raquel tão frágil que chegou em Londrina. Sem sua ajuda essa

1 conquista não seria possível!

2 À querida Helenice, secretária da pós-graduação que com sua doçura sempre acalmou
3 meu coração com uma palavra amiga nos momentos que eu mais precisei.

4 A todos os funcionários (José Roberto Magalhães e Inês Germano) e residentes
5 (Amanda Hasuda, Yuri Pereira, Thuany Moreira e Matheus Goes) do Laboratório de
6 Patologia Clínica, especialmente ao querido Joãozinho (João Cardoso), que tanto me ajudou
7 com minhas análises madrugada à dentro, sempre me fazendo companhia nessa parte tão
8 solitária do experimento, me ensinando a operar os aparelhos e otimizando meu trabalho tão
9 cansativo. Nunca esquecerei tudo que fez por mim!

10 Ao Marcos e a Juliana, do Laboratório de Virologia, pela ajuda e por abrirem as portas
11 do laboratório para mim.

12 Ao amado Luiz (enfermeiro), que tantas coletas de bolsas de sangue fez por mim.
13 Aquela veia que ninguém nem imaginava onde estava.....você nunca errou! Me sinto muito
14 privilegiada por ter passado quase todas as noites do seu último ano antes da aposentadoria
15 trabalhando em sua companhia. Quantas vezes de madrugada, após mais de 18 horas ali na
16 UEL, no frio, sem comer, eu nem sentia vontade de ir embora graças aos nossos papos e
17 risadas. Não posso me esquecer também que nessas madrugadas estavam Paulo (secretaria) e
18 Amauri (enfermeiro), meus companheiros noturnos que transformavam todo meu cansaço em
19 momentos agradáveis. Meninos, se tem uma coisa no meu doutorado que sentirei falta,
20 certamente são vocês. Já estou com saudades!

21 Ao pessoal da secretaria que tanto colaborou com meu projeto, anotando telefone de
22 doadores e passando meu contato, me anunciando no microfone do hospital cada vez que um
23 doador chegava, abrindo as fichas sempre na correia pois os doadores se acumulavam no final
24 da tarde. Rosane, Aleteia, Pereira e todos os outros que passaram pela secretaria durante esses
25 quatro anos, meu muito obrigada.

26 A todos os estagiários que passaram pelo Projeto Vida durante o tempo que dele
27 participei. Foram muitos dias e noites de transfusão, onde eu ensinei, aprendi, ri, me comovi,
28 esbravejei, aconselhei e principalmente quanto carinho eu recebi. São tantas pessoas especiais
29 que entraram, saíram ou ainda permanecem no projeto, que na tentativa de colocar todos os
30 nomes, corro um enorme risco de esquecer algum e ser injusta. Porém devo agradecimento
31 especial às líderes, Marina Maringueti e Hillary Honório; Rhuany Santos que por muitas
32 vezes que precisei viajar segurou as pontas sozinha do experimento; e a Érika Lopes que me
33 ajudava no trabalho exaustivo de marcar as coletas com os tutores e com a equipe. Meninas,
34 vocês são incríveis!

1 Agradecimento especial também a todas as “crianças” que passaram pelo banco e
2 tanto me ajudaram nas coletas e nas transfusões. Vocês moram no meu coração e nem
3 imaginam, mas me ajudaram a suprir a enorme falta que senti de ter alunos. Letícia Terkeli,
4 Akemi, Pedrinho, Amanda, Matheus Crema, Natália, Karol Cassanho, Maria Alice Duarte,
5 Maria Antônia, Dessa, Luiza Corrêa, Thabata, Carol Ruiz, Carol Mitie, Olivia Fernandes,
6 Patrick.Luz.....

7 A Andressa Keiko Matsumoto, que resolveu as análises estatísticas e os fez gráficos
8 desse trabalho por várias vezes.

9 Aos muitos tutores pela paciência e disponibilidade em levar seus cães para doação de
10 sangue e indiretamente à realização deste trabalho. Agradecimento especial a Camila Olaio
11 (Golden Universe Canil) que de tutora se tornou uma amiga. Obrigada por sempre estar
12 disposta a ajudar, seja com doações, com cães para aula prática, por nos dar o prazer de
13 conviver com seus doces cães, especialmente o Milan, por quem eu sou apaixonada e
14 principalmente por ter me presenteado com meu amado e novo doador Augusto.

15 Aos doadores que forneceram de forma involuntária o material necessário à pesquisa,
16 contribuindo desta forma com a ciência, e também por tornarem esse árduo trabalho tão
17 prazeroso. Vocês com certeza foram a melhor parte.

18 À Universidade Estadual de Londrina por ser palco da realização desse meu sonho e
19 todos os seus funcionários que de alguma forma participaram para que ele se tornasse
20 realidade.

21 À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa
22 de doutorado que tornou possível esse trabalho.

23 A todos os docentes, funcionários (especialmente Verônica e Neusa) e residentes do
24 Hospital Veterinário da UEL, por qualquer tipo de ajuda direta ou indiretamente todo tempo
25 que estive na UEL.

26

27

28

29

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

“Toda vitória oculta abdições”

18

(Simone de Beauvoir)

19

1 MARTINS, Raquel Reis. **Parâmetros hematológicos, bioquímicos e oxidativos de**
2 **concentrados de hemácias de cães, armazenados em bolsas plásticas de CPD/SAG-M.**
3 2019. 84f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina,
4 Londrina, 2019.

6 RESUMO

7
8 Durante o armazenamento das bolsas de sangue, pode ocorrer deterioração progressiva das
9 hemácias, comprometendo sua viabilidade pós-transfusional. Por serem células ricas em
10 oxigênio, as hemácias se tornam alvos de espécies reativas, resultando nas chamadas
11 "lesões de estoque". O objetivo deste estudo foi descrever as alterações hematológicas,
12 bioquímicas e oxidativas que ocorreram durante o armazenamento por 42 dias em bolsas
13 de concentrados de hemácias (CH), refrigeradas entre 2°C e 6°C e preservadas em
14 CPD/SAG-M. Foram selecionados 48 doadores de sangue com peso superior a 28 kg, com
15 idades entre 2 a 8 anos, saudáveis, de comportamento dócil para coletar de 350 a 450mL de
16 sangue. Os parâmetros de hemograma (número total de hemácias, hemoglobina, volume
17 globular, volume corpuscular médio e leucócitos totais), o grau de hemólise, os
18 bioquímicos (glicose, lactato, pH, concentração de bicarbonato, sódio, potássio, cloretos e
19 excesso de base) e o estresse oxidativo (superóxido dismutase, catalase, produtos
20 avançados de oxidação de proteínas e hidroperóxidos lipídicos iniciados por tert-butil)
21 foram analisados logo após a centrifugação (T0) e a cada sete dias até 42 dias após o
22 armazenamento (T7, T14, T21, T28, T35 e T42). Inicialmente, foram verificadas a
23 distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade da variância (teste de
24 Levene). Quando esses critérios foram atingidos ($p>0.05$), para comparar o T0 entre si, seis
25 diferentes tempos de coleta foram avaliados por Wilcoxon. O número de hemácias (HE) e
26 os leucócitos totais (LT) diminuíram durante o armazenamento, enquanto o volume
27 globular (VG), o volume corpuscular médio (VCM) e o grau de hemólise aumentaram. Os
28 níveis de glicose, bicarbonato e pH diminuíram significativamente ao longo dos tempos
29 experimentais. Já os níveis de potássio, lactato e o *déficit* do excesso de base (BE)
30 aumentaram com o tempo. Houve uma diminuição na atividade da enzima SOD dos CH
31 durante o período de armazenamento e um aumento dos produtos avançados de oxidação
32 de proteínas (AOPPs) e dos hidroperóxidos lipídicos iniciados por tert-butil (CL-LOOH).
33 Os resultados obtidos permitiram concluir que o armazenamento de CH de cães produz
34 alterações hematológicas, bioquímicas e de estresse oxidativo na qualidade do sangue
35 durante o período estudado. No entanto, é possível afirmar que houve um ambiente
36 favorável para a manutenção da viabilidade das hemácias, sendo seu uso seguro até os 28
37 dias de armazenamento.

38
39
40 **Palavras-chave:** medicina transfusional, caninos, hemocomponentes, estresse oxidativo,
41 espécies reativas de oxigênio

1 MARTINS, Raquel Reis. **Hematological, biochemical and oxidative parameters of red**
2 **blood cell concentrates stored in CPD / SAG-M plastic bags.** 84f. Thesis (Master's
3 Degree in Animal Science) – State University of Londrina, Londrina, 2019.

4 5 6 **ABSTRACT**

7
8 During storage of blood bags, progressive deterioration of red blood cells may occur,
9 compromising their post-transfusion viability. Because they are oxygen-rich cells, red
10 blood cells become targets of reactive species, resulting in so-called "stock lesions". The
11 aim of this study was to describe the hematological, biochemical and oxidative changes
12 that occurred during storage for 42 days in packed red blood cells (RBC), refrigerated
13 between 2°C and 6°C and preserved in CPD / SAG-M. Forty-eight healthy blood donors
14 weighing more than 28 kg, aged 2 to 8 years, with docile behavior to collect 350 to
15 450mL of blood were selected. Blood count parameters (total number of red blood cells,
16 hemoglobin, globular volume, mean corpuscular volume and total leukocytes), degree of
17 hemolysis, biochemicals (glucose, lactate, pH, bicarbonate concentration, sodium,
18 potassium, chlorides and base excess) and oxidative stress (superoxide dismutase,
19 catalase, advanced protein oxidation products and tert-butyl-initiated lipid
20 hydroperoxides) were analyzed immediately after centrifugation (T0) and every seven
21 days up to 42 days after storage (T7, T14 , T21, T28, T35 and T42). Initially, normal
22 distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test) were
23 verified. When these criteria were met ($p > 0.05$), to compare T0 to each other, six
24 different collection times were evaluated by Wilcoxon. The number of red blood cells
25 (HE) and total leukocytes (LT) decreased during storage, while the globular volume
26 (VG), the average corpuscular volume (MCV) and the degree of hemolysis increased.
27 Glucose, bicarbonate and pH levels decreased significantly over experimental times.
28 Potassium, lactate levels and the base excess deficit (BE) increased with time. There was
29 a decrease in RBC SOD enzyme activity during storage and an increase in advanced
30 protein oxidation products (AOPPs) and tert-butyl-initiated lipid hydroperoxides (CL-
31 LOOH).The results obtained allowed to conclude that the storage of canine RBC
32 produces hematological, biochemical and oxidative stress alterations in the blood quality
33 during the studied period. However, it can be said that there was a favorable
34 environment for maintaining the viability of RBC, and their safe use until 28 days of
35 storage.

36
37 **Key words:** Transfusion medicine, canines, blood components, oxidative stress, reactive
38 oxygen species.
39
40

LISTA DE FIGURAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

Figura 1 – Separação do sangue total em hemocomponentes18

ARTIGO A

Figura 1. Grau de hemólise (%) do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.....51

Figura 2. Valores de glicose do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.....54

Figura 3. Valores de lactato do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.....55

ARTIGO B

Figura 1. Valores da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) para determinação do estresse oxidativo obtidos do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.....71

Figura 2. Valores da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) para determinação do estresse oxidativo obtidos do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.....72

Figura 3. Valores dos produtos de oxidação proteica (AOPP) para determinação do estresse oxidativo obtidos do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.....73

Figura 4. Valores da peroxidação lipídica (CL-LOOH) para determinação do estresse oxidativo obtidos do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.....76

LISTA DE TABELAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

ARTIGO A

Tabela 1 – Valores de contagem total de hemácias, volume globular, hemoglobina total, volume corpuscular médio, percentual de hemólise e leucócitos totais do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.....51

Tabela 2 - Valores de potencial hidrogeniônico, bicarbonato, potássio, sódio, cloreto e excesso de base do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.....56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1
2
3

AOPP	Produtos da Oxidação Avançada de Proteínas
BE	Excesso de Base
CAT	Catalase
CH	Concentrado de hemácias
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPD	Citrato-Fosfato-Dextrose
CPDA-1	Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina
DEHP	<i>2-diethylhexyl phthalate</i>
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
HB	Hemoglobina
HBe	Hemoglobina extracelular
HCO ₃ ⁻	Íon Bicarbonato
HE	Hemácias
HEMÓLISE%	Grau de hemólise
HO ₂	Radical hidroperoxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
K ⁺	Íon potássio
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malondialdeído
MS	Ministério da Saúde
Na ⁺	Íon sódio
OH ⁻	Radical hidroxila
O ₂ ⁻	Radical superóxido
pCO ₂	Pressão parcial de CO ₂
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
pO ₂	Pressão de oxigênio
PUFAs	Ácidos graxos poliinsaturados
PVC	Cloreto de polivinil
RPM	Rotação por minuto
SAG-M	Cloreto de sódio, manitol, dextrose monoidratada e adenina
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VG	Volume Globular
VCM	Volume Corpuscular Médio
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato

4
5

SUMÁRIO

1		
2		
3		
4	1.INTRODUÇÃO.....	15
5	2.REFERENCIAL TEÓRICO	17
6	2.1. Transfusão sanguínea.....	17
7	2.2. Concentrado de hemácias.....	18
8	2.3. Armazenamento.....	19
9	2.4. Lesões de estoque.....	21
10	2.5. Estresse oxidativo.....	24
11	2.5.1. Radicais livres	25
12	2.5.2. Formação de espécies reativas de oxigênio.....	25
13	2.5.3. Defesas antioxidantes.....	27
14	2.5.4. Avaliação do dano oxidativo.....	29
15	3.OBJETIVOS.	43
16	3.1. Objetivo geral.....	43
17	3.2. Objetivos específicos.....	43
18	4.ARTIGO A – Monitoramento dos parâmetros hematológicos e bioquímicos,	
19	durante o armazenamento do concentrado de hemácias de cães, por 42 dias, em	
20	bolsas plásticas contendo CPD/SAG-M	44
21	5.ARTIGO B – Determinação do estresse oxidativo do concentrado de hemácias de	
22	cães, armazenados em bolsas com CPD/SAG-M, por 42 dias.....	65
23	6.CONCLUSÃO	81
24	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
25	ANEXOS.....	83
26	ANEXO I - Valores de referência para hemograma de	
27	cão.....	83
28	ANEXO I – Valores de referência para exames bioquímicos de	
29	cão.....	83
30	ANEXO II – Ofício do comitê de ética.....	84
31		
32		
33		
34		
35		

1. INTRODUÇÃO

Desde os primeiros relatos no século XVII, quando se transfundia sangue heterólogo na tentativa de se alterar o comportamento de quem o recebia, a transfusão sanguínea progrediu de forma significativa, tornando-se uma importante ferramenta na clínica médica e cirúrgica de cães e gatos, principalmente no que diz respeito a terapia emergencial (BARFIRLD, ADAMANTOS, 2011; NELSON E COUTO, 2015; NETO, 2016).

O controle rigoroso dos doadores, a separação dos componentes sanguíneos e o desenvolvimento de recipientes adequados e substâncias conservadoras que possibilitaram maior vida útil dos componentes sanguíneos, estão entre os principais avanços dessa prática (COSTA-JUNIOR et al., 2008).

Utilizar hemocomponentes é consensualmente vantajoso, minimizando os riscos de reações transfusionais, além de aumentar o tempo de validade de todos os componentes obtidos (HOHENHAUS, 2012).

Os componentes sanguíneos são obtidos a partir da coleta de aproximadamente 450 mL de sangue total (ST) de um doador acondicionados em uma bolsa contendo 63 ml de solução anticoagulante. A bolsa é então submetida a processos de centrifugação podendo gerar vários componentes sanguíneos como concentrado de hemácias (CH), plasma fresco, plasma fresco congelado, concentrado de plaquetas e crioprecipitado (ALVES et al., 2018).

O CH é o hemocomponente obtido após a primeira centrifugação e posterior retirada do plasma, sendo que o volume final do CH pode variar de 220 a 280 mL e sua utilização é indicada para aumentar a massa eritrocitária em pacientes anêmicos (BRASIL, 2011), uma vez que a principal razão para realização de uma transfusão sanguínea é a necessidade de aumento da capacidade de transporte de oxigênio (TRIULZI, 2002).

Hemácias são ricas em oxigênio (O_2), por isso facilmente tornam-se alvos da ação de radicais livres que são átomos ou moléculas que tem um elétron não pareado na camada de valência, o que os torna reativos (KALYANARAMAN, 2013). Como a maioria dos radicais livres é derivada do metabolismo do oxigênio, usa-se o termo “Espécies Reativas de Oxigênio” (EROs) para denominá-los (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

EROs se originam naturalmente por meio de processos metabólicos oxidativos, porém quando em excesso, podem interagir com moléculas como lipídios, proteínas e o DNA, provocando a transferência de um elétron da molécula para o radical livre, produzindo uma nova molécula instável. O processo de oxidação danifica a molécula, ao

1 alterar suas conformações e funções, cria-se, assim, uma reação em cadeia prolongando o
2 dano oxidativo (LENAZ, 2012; GUTOWSKI; KOWALCZYK, 2013).

3 O organismo dispõe de um sistema antioxidante composto por antioxidantes
4 enzimáticos e não-enzimáticos para manter as concentrações de radicais livres abaixo de
5 níveis tóxicos (GUTOWSKI; KOWALCZYK, 2013). As hemácias, quando estão na
6 circulação sanguínea *in vivo*, contam com um sistema antioxidante natural que minimiza
7 ou elimina os radicais livres, principalmente a vitamina E, por estar ligada a membrana da
8 hemácia. Além disso, diversas substâncias solúveis no plasma também agem como
9 antioxidante (dentre elas a albumina, ácido úrico e bilirrubinas) (TEDESCO et al., 2000,
10 MACHADO, 2006). Entretanto, para a obtenção de CH é necessário remover o plasma e,
11 com isso, perde-se grande parte do suprimento energético e da capacidade antioxidante
12 nativa associada a esse fluido biológico (CORTES-PUCH, 2014).

13 Mesmo conservando em soluções aditivas como Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina
14 (CPDA1) e Citrato-Fosfato-Dextrose e Salina-Adenina-Glicose-Manitol (CPD/SAG-M), as
15 hemácias ficam em condições muito diferentes da circulação sanguínea e, ao longo do
16 período de armazenamento, as células tornam-se então suscetíveis aos danos oxidativos
17 gerando as chamadas “lesões de estoque”. Na tentativa de proteger-se, minimizando as
18 lesões causadas pelos radicais livres nas células, limitando os níveis intracelulares e
19 impedindo a indução de danos, o organismo produz antioxidantes, o que não ocorre no CH
20 (SIES, 1993; BUICO et al., 2009).

21 Estudos sobre a conservação das hemácias usadas na hemoterapia visam estabelecer
22 a melhor maneira para manter sua integridade física e funcional, preservando sua
23 viabilidade pós transfusional (TOMCZACK, 2008; ANDRETTA et al., 2018). Nas duas
24 últimas décadas, novas soluções aditivas têm sido testadas com sucesso, no intuito de
25 diminuir as lesões de armazenamento e aumentar o tempo de conservação dos CH. Nesse
26 contexto, é de extrema importância que os CH armazenados passem por um controle de
27 qualidade para avaliação de sua viabilidade e sucesso do procedimento (ANDRETTA et
28 al., 2018).

29 A hipótese deste estudo é que mesmo utilizando bolsas de sangue com substâncias
30 conservantes adequadas, ocorram as lesões de estoque, que são deletérias aos receptores. O
31 estudo visa identificar algumas as alterações hematológicas, bioquímicas e de estresse
32 oxidativo ocorridas no CH de cães durante o período de 42 dias, avaliando-os
33 semanalmente.

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TRANSFUSÃO SANGUÍNEA

A transfusão sanguínea é uma forma de transplante e muitas são suas indicações. Entre elas a necessidade de restabelecimento da capacidade de transporte de oxigênio, deficiências na hemostasia, transferência de imunidade passiva e hipoproteïnemia, além da hipovolemia não responsiva ao tratamento convencional (BRASIL 2015; BAETA et al., 2015; MORAES et al., 2016).

Graças à sua capacidade de salvar vidas, a transfusão sanguínea tornou-se um procedimento imprescindível na medicina de animais de companhia (HOHENHAUS, 2012).

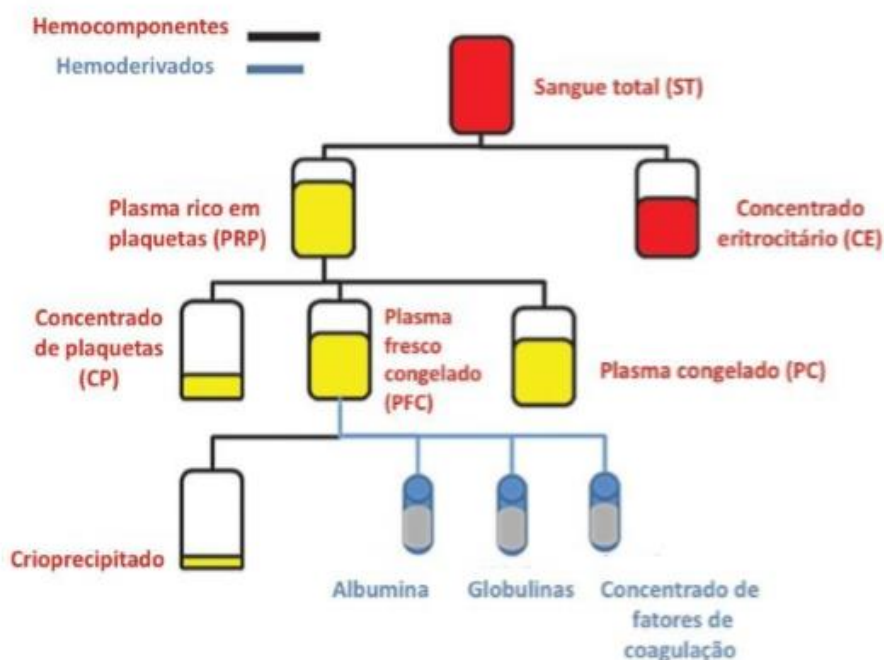
O sangue total é composto por hemácias, leucócitos, plaquetas, fatores de coagulação e proteínas plasmáticas, incluindo albumina e imunoglobulinas (TRENT, 2010; THRALL, 2014).

Um grande avanço da medicina transfusional, desde a década de 80 foi o fracionamento dos hemocomponentes, gerando produtos por meio de processos físicos ou químicos, a partir da coleta do sangue total de um doador saudável (HELM; KNOTTENBELT, 2010; BRASIL, 2014; BOULTON, 2017).

Quando a bolsa de sangue total, com volume que varia de 350 a 450mL, é submetida à centrifugação refrigerada, as hemácias irão se depositar ao fundo da bolsa e o plasma ficará no sobrenadante em função da diferença de tamanho e densidade dos seus elementos (Figura 1) (MARCHI et al., 2019).

A terapia com hemocomponentes minimiza a exposição desnecessária do paciente a alguns fatores sanguíneos e reduz o risco de reações transfusionais (KENICHIRO; HOLOWAYCHUK, 2016; DUTRA, 2019). No entanto, mesmo com tantas vantagens, o uso de hemocomponentes é restrito devido à escassez no número de bancos de sangue no país (MARCHI, MARTINS, PEREIRA, 2015), sendo a utilização do sangue total uma realidade em grande parte dos centros veterinários. Porém, os serviços de hemoterapia veterinária estão em crescente desenvolvimento com aumento de pesquisas neste campo, bem como na criação de serviços especializados (DUTRA, 2019).

1 **Figura 1** – Etapas da separação do sangue total em hemocomponentes
 2



3
 4 Fonte: Adaptado de BRASIL (2014)
 5
 6

7 Uma transfusão sanguínea bem-sucedida depende de muitos fatores como: escolha do
 8 doador, uso do componente sanguíneo adequado, tipificação sanguínea, realização da
 9 prova de reação cruzada, volume e velocidade de infusão corretos e do monitoramento do
 10 paciente durante o procedimento, entre outros. A escolha do hemocomponente está entre
 11 os principais fatores que colaboram para o sucesso da terapia (FIUMARI, 2017).
 12

13 2.2 CONCENTRADO DE HEMÁCIAS (CH)

14
 15 Revestidas por uma membrana permeável e flexível feita de lipídeos, proteínas e
 16 carboidratos, e com o citoplasma repleto de hemoglobina, as hemácias são células
 17 anucleadas (THRALL, 2014).

18 A maioria das células atende às suas necessidades metabólicas pela fosforilação
 19 oxidativa da glicose, porém por não possuírem mitocôndrias, as hemácias têm capacidade
 20 sintética diminuída, o que impede a realização do ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa.
 21 Utilizam, portanto, da glicólise anaeróbica para produzir energia, principalmente adenosina
 22 trifosfato (ATP), 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) e nicotinamida adenina dinucleotídeo
 23 reduzido (NADH). O ATP é a fonte de energia para as numerosas reações bioquímicas das

1 hemácias. Já o 2,3-DPG regula a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, enquanto o
2 NADH é um co-fator importante que reverte a oxidação espontânea da oxihemoglobina em
3 metahemoglobina no interior das hemácias (GREER, 2014).

4 Desta forma, há necessidade do uso de soluções conservadoras que forneçam
5 nutrientes para manutenção da integridade celular por meio da glicólise (KORTE;
6 VERHOEVEN, 2004; THRALL, 2014).

7 Uma unidade de sangue total proveniente de um doador canino, contém
8 aproximadamente 450 mL de sangue e 63 mL de anticoagulante, e resulta em um volume
9 de aproximadamente 220 a 280 mL de CH (HELM; KNOTTENBELT, 2010).

10 A principal razão para realização de uma transfusão sanguínea é a necessidade de
11 aumento da capacidade de transporte de oxigênio (O₂), devido a estados anêmicos. Nesses
12 casos está indicado o uso do CH para elevar a massa eritrocitária. As anemias podem ter
13 diferentes causas, e podem ser categorizadas em três grupos principais: a anemia causada
14 por hemorragia, por destruição de hemácias (hemólise), ou devido a uma não produção ou
15 diminuição da produção de hemácias (TRIULZI, 2002; HELM; KNOTTENBELT, 2010;
16 DAVIDOW et al., 2017).

17 A utilização deste subproduto resulta na diminuição dos riscos de reações
18 imunológicas (GONÇALVES, 2009; TRENT, 2010; AYALA et al., 2014), além de ser
19 ideal para cardiopatas, nefropatas, pacientes anêmicos e normovolêmicos reduzindo o risco
20 de sobrecarga circulatória, e também pela considerável diminuição do tempo da transfusão
21 sanguínea (LANEVSKI; WARDROP, 2001; HOHENHAUS, 2007).

22 23 2.3 ARMAZENAMENTO

24
25 A preservação de hemácias para fins transfusionais iniciou-se com o
26 armazenamento em refrigeração para inibição dos processos metabólicos dependentes de
27 temperatura, que esgotam metabólitos celulares críticos e acumulam danos às células
28 (HÖGMAN et al., 1991, GAMBERO et al., 2004). A refrigeração das hemácias de 2 a 6°C
29 ajuda a manter a sua funcionalidade e viabilidade por meio da redução da sua taxa
30 metabólica. Estima-se que para cada grau a menos na temperatura de armazenamento, há
31 uma diminuição de aproximadamente 10% na taxa metabólica das hemácias (HESS, 2014).
32 Portanto a 4°C, a taxa metabólica é dez vezes menor do que a 25°C (RUDELLE et al.,
33 1998; ORLOV; KARKOUTI, 2015).

34 A partir do século XX, uma verdadeira revolução na hemoterapia se iniciou, com o

1 desenvolvimento de soluções conservadoras e aditivas para CH, possibilitando o processo
2 de armazenamento deste produto (GAMBERO et al. 2004; HESS, 2014, TISSOT et al.,
3 2017).

4 Iniciou-se por volta dos anos 60, o desenvolvimento de bolsas plásticas de cloreto
5 de polivinil (PVC), porém o contato das hemácias com o PVC causava adesão, aumentava
6 a formação de coágulos e o risco de hemólise. Para evitar o contato das hemácias com o
7 PVC, as bolsas foram recobertas com o plástico 2-diethyl-hexyl-phthalate (DEHP), que
8 diminui os danos causados pelo PVC (HESS; GREENWALT, 2002, BICALHO et al.,
9 2016). As bolsas de PVC facilitaram o transporte e centrifugação do sangue, e permitiram
10 a sobrevivência de diversos componentes sanguíneos após a transfusão. Esse sistema é
11 amplamente utilizado até a atualidade (DORNELES, 2018).

12 A solução precursora anticoagulante e conservante foi o citrato ácido acompanhado
13 de dextrose (ACD) e desde então, muitos outros meios para manter a viabilidade e a
14 capacidade funcional do sangue foram desenvolvidos. Entre eles estão: CPD (ácido cítrico-
15 citrato de sódio, fosfato e dextrose) e CPDA-1 (citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina)
16 (HESS, 2010; DORNELES, 2018).

17 O CPD é a solução de ACD com adição de fosfato de sódio monobásico
18 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$). O fosfato, além de ser substrato para formação do 2,3-DPG, atua como
19 um tampão ligando-se aos íons H^+ produzidos durante a glicólise e impedindo a queda do
20 pH (principal fator relacionado à degradação do 2,3-DPG). Conseqüentemente tem-se uma
21 menor taxa de hemólise e uma maior viabilidade celular (HESS, 2010, ANDRETTA et al.,
22 2018).

23 O CPDA-1 é um anticoagulante muito utilizado devido às suas propriedades
24 conservantes de hemácias melhores que o ACD. O fosfato, além de ser um importante
25 substrato na produção de ATP, também ajuda no controle do pH sanguíneo (KURUP et al.,
26 2003). A adição de 24% a mais de dextrose como fonte de energia, baseia-se no lento
27 consumo desse carboidrato pelo metabolismo celular em baixas temperaturas, o que
28 contribui, inclusive, com a manutenção de níveis adequados de ATP (AUTHEMENT et al.,
29 1986). A adição de adenina está fundamentada no fato de que, com a queda do pH durante
30 a conservação do sangue, há inativação de enzimas que participam da via glicolítica,
31 levando a uma menor produção de ATP, e prevê um aumento de adenilato que servirá de
32 substrato, combinando-se com a fosforibose-pirofosfato, para nova síntese de ATP
33 (SECCHI, 2010).

1 Mesmo com as soluções conservantes mantendo o metabolismo energético das
2 hemácias pela glicólise, assegurando a viabilidade celular durante o período de estocagem,
3 a quantidade de nutrientes ainda é restrita (COSTA-JUNIOR et al., 2008; SECCHI, 2010).

4 Para melhores resultados de conservação de hemácias, podem ser adicionadas
5 diretamente ao CH, soluções conhecidas como aditivas. Elas contêm elementos como:
6 dextrose, adenina, manitol e solução salina, que mantém a energia e uma maior viabilidade
7 das hemácias durante o armazenamento. As soluções aditivas estão presentes em bolsas
8 satélites ligadas à bolsa principal. São conhecidas por Cloreto de sódio, manitol, dextrose
9 monoidratada e adenina (SAG-M) e algumas variações como Adsol[®], Nutricel[®] e Optisol[®]
10 (SECCHI, 2010, CANCELAS et al., 2015). As mais comumente utilizadas são a Adsol[®]
11 (Fenwal Laboratories, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Il), composta por
12 dextrose, adenina, manitol e cloreto de sódio e Nutricel[®] (Cutter Biological, Miles
13 Laboratories, Emeryville, CA) que contém ácido cítrico, citrato de sódio, dextrose,
14 adenina, cloreto de sódio (FELDMAN; SINK, 2007; MARCHI et al., 2019).

15 Porém, mesmo quando se opta pelo tipo de embalagem e solução conservantes mais
16 adequadas, há necessidade do controle ideal da temperatura e manuseio a bolsa de forma
17 apropriada (D'ALESSANDRO et al., 2015).

18 Durante o período de armazenamento o sangue sofre alterações morfológicas
19 causadas por reações oxidativas, bioquímicas e metabólicas que resultam em danos
20 irreversíveis na membrana da hemácia (MUSTAFA et al., 2016). São modificações tempo-
21 dependentes que prejudicam sua capacidade de liberação de oxigênio e desencadeiam
22 reações secundárias, que em conjunto são conhecidas como lesões de armazenamento ou
23 “lesões de estoque” (SOUSA et al., 2012; SILVA, 2013; D'ALESSANDRO et al., 2015).

24 25 2.4 LESÕES DE ESTOQUE

26
27 Métodos de aperfeiçoamento no controle de qualidade em bancos de sangue
28 multiplicaram os estudos envolvendo morfologia, metabolismo e sobrevida das hemácias
29 em condições de armazenamento (HOGMAN, 1999; ALMIZRAQ et al., 2013;
30 OBRADOR et al., 2015).

31 As lesões de estoque que incluem alterações bioquímicas, biomecânicas e
32 imunológicas (ALMIZRAQ et al., 2013; OBRADOR et al., 2015, BARDYN et al., 2017),
33 podem ser minimizadas ou retardadas quando manejadas adequadamente durante o
34 armazenamento (MARTINS, 2011). Dentre as lesões biomecânicas estão: deformações

1 celulares, perda da biconcavidade, aumento de hemoglobina e ferro livres no plasma,
2 extravasamento do conteúdo de microvesículas como substâncias pró-coagulantes e pró-
3 inflamatórias (WINTROBE, 1999; MUSTAFA et al., 2016).

4 Também ocorrem alterações da função bioquímica como: diminuição de ATP,
5 diminuição na concentração de glicose por consumo, diminuição do óxido nítrico, e 2,3-
6 DPG. Pode haver um aumento na concentração de potássio (K^+) e na concentração de
7 ácido lático devido à glicólise anaeróbica. Além disso, ocorre um aumento dos danos
8 oxidativos e enzimáticos a proteínas, lipídios e carboidratos, diminuição da capacidade de
9 transporte de O_2 aos tecidos e morte celular precoce (ANTONELOU et al., 2012; KOCH,
10 2013; NAGABABU et al., 2016; NEDZI et al., 2016).

11 Como a atividade metabólica das hemácias não cessa completamente durante o
12 armazenamento, glicose ou dextrose são adicionados ao anticoagulante. A adição permite
13 às hemácias continuarem a produzir ATP, 2,3-DPG e NADH suficientes para manter a
14 funcionalidade e viabilidade adequadas durante o armazenamento, pela glicólise (GEER,
15 2014).

16 Mesmo com a adição de glicose, com o passar do tempo de armazenamento os
17 níveis de ATP sofrem depleção lenta e gradativa (BARON, 2012), levando a formação de
18 poiquilócitos, resultando em danos diretos e prejudicando sua capacidade de
19 deformabilidade, fator importante na redução da sobrevivência pós transfusional. Essas
20 alterações impedem a adaptação morfológica necessária para circular nos pequenos vasos,
21 prejudicando o fornecimento de O_2 e remoção de dióxido de carbono dos tecidos, gerando
22 assim uma série de metabólitos, dentre eles o lactato (TOMCZACK, 2008; WAN,
23 FORSYTH, STONE, 2011; MUSTAFA et al., 2016).

24 O acúmulo do ácido lático acidifica ainda mais o meio, que já tem seu pH reduzido
25 quando entra em contato com as soluções conservadoras (REYNOLDS, 2007; SOUSA et
26 al., 2012). A acidose ativa a atividade da enzima que desfosforila o 2,3-DPG, fazendo com
27 que seus níveis diminuam de forma progressiva. Moléculas de 2,3-DPG modulam o
28 transporte de oxigênio pela ligação preferencial à desoxihemoglobina e, assim, facilita a
29 liberação de oxigênio nos tecidos. (FLATT et al., 2014; GEER, 2014).

30 O resfriamento durante o armazenamento também causa alterações prejudiciais na
31 bomba de sódio/potássio (Na^+/K^+) da membrana da hemácia. O K^+ é um íon
32 predominantemente intracelular, sendo encontrado em pequena quantidade (2%) no meio
33 extracelular, enquanto o sódio (Na^+) é um íon prioritariamente extracelular. A manutenção
34 do equilíbrio desse gradiente no CH é realizada pela bomba de Na^+/K^+ que é dependente

1 do ATP e sensível à mudança de temperatura (SOUSA et al., 2012; FLATT et al., 2014).

2 Com o aumento das concentrações intracelulares de Na^+ há um acúmulo de água no
3 interior das hemácias. Isso afeta o volume e a forma da célula, de tal maneira que o volume
4 corpuscular médio (VCM) das hemácias armazenadas se eleva consideravelmente. Tal
5 efeito é mais pronunciado em hemácias mais velhas, prejudicando sua deformabilidade e
6 viabilidade (SALZER et al., 2008).

7 As alterações descritas resultam em hemólise na bolsa de CH ou após
8 administração no paciente, decorrente do aumento da fragilidade da membrana celular
9 (SCOTT et al., 2005; BOSMAN, 2013). Isso resulta em diminuição no número de
10 hemácias, diminuição do VG, aumento da hemoglobina extracelular (HBe) durante o
11 armazenamento e aumento da concentração de K^+ extracelular (WARDROP et al., 1994;
12 DONADEE et al., 2011; WURLOD et al., 2015). Assim como a hemoglobina, o aumento
13 da concentração de K^+ extracelular indica redução da qualidade das hemácias armazenadas
14 (KORTE & VERHOEVEN, 2004).

15 No CH, a diminuição do pH é mais rápida que no sangue total, pois a retirada de
16 plasma elimina parte da solução de conservação utilizada e, sobretudo, os substratos, como
17 glicose e fosfatos (GENETET; MANNONI, 1980). Além disso, as bolsas devem ser
18 mantidas em baixas temperaturas para redução do metabolismo e menor produção de
19 metabólitos. A refrigeração leva a uma significativa queda no pH e com isso diminui
20 drasticamente os níveis do 2,3-DPG (HESS et al., 2002).

21 O 2,3-DPG possui capacidade de liberar O_2 , e seu decréscimo aumenta a afinidade
22 da hemoglobina pelo O_2 , que reduz conseqüentemente a oxigenação dos tecidos. No
23 entanto, os defeitos são reversíveis após a transfusão, pois o pH sanguíneo acima de 7,0 é
24 capaz de promover regeneração do 2,3-DPG e menor afinidade da hemoglobina pelo O_2
25 (KURUP et al., 2003). Porém a total restauração pode demorar de 24 até 48 horas pós
26 transfusão, o que torna este produto inviável para pacientes críticos, já que estes
27 necessitam de entrega rápida de O_2 (HESS, 2009). Portanto, a utilização de sangue
28 armazenado por longo período é um fator limitante para tais pacientes (SCOTT et al.,
29 2005).

30 O controle de qualidade das bolsas de sangue é de extrema importância, pois o
31 acúmulo de substâncias nocivas influenciará diretamente no produto transfundido elevando
32 a chance de reações transfusionais, além de reduzir a sobrevida pós-transfusional das
33 hemácias e a efetividade da transfusão (CHIN-YEE et al., 1997, FU, 2016). A real relação
34 entre as lesões de estoque e a função das hemácias com a sobrevivência pós-transfusional

1 do paciente não é bem conhecida, e a relevância clínica dessas alterações ainda é um tópico
2 muito debatido e motivo de intensa investigação (ORLOV; KARKOUT, 2015; TISSOT et
3 al., 2017).

4 Embora seja necessário armazenar o sangue para suprir a demanda, o tempo de
5 armazenamento, bem como as características das soluções conservadoras utilizadas,
6 influenciam diretamente no grau de destruição das hemácias transfundidas (COSTA-
7 JUNIOR et al., 2008), o que evidencia uma forma de transfundir hemácias que preservem
8 sua integridade e que não provoquem efeitos deletérios ao receptor (GIANGRANDE,
9 2000, PRUDENT et al., 2015).

10 De acordo com a RDC N°34 de 11 de junho de 2014 do Ministério da Saúde, um
11 serviço de hemoterapia deve realizar um controle de qualidade sistemático de todos os
12 hemocomponentes produzidos. Segundo a mesma resolução, entre os fatores a serem
13 avaliados para a qualidade de CH estão: teor de hemoglobina, VG e grau de hemólise. O
14 controle de qualidade do CH tem como principal objetivo garantir que as hemácias
15 transfundidas sobrevivam e circulem após transfusão, e se mantenham funcionais, quanto
16 às suas características morfológicas e de liberação de O₂ e dióxido de carbono (HOGMAN,
17 1999; HAMASAKI; YAMAMOTO, 2000; LUTEN et al., 2008).

18 O hemocomponente é considerado adequado quando o teor de hemoglobina for
19 maior que 45 g/unidade, o VG esperado entre 50% a 70% para os CH com soluções
20 aditivas e o grau de hemólise se apresentar menor que 1% no último dia de validade
21 (BRASIL, 2014).

22 Embora na medicina humana existam muitos estudos sobre padronização do
23 controle indicativo de qualidade (TOMCZAK et al., 2010; FLATT et al., 2014), na
24 medicina veterinária ainda não há parâmetros estabelecidos para os hemocomponentes de
25 cães (FONSECA et al., 2018). Trabalhos recentes continuam levando em consideração
26 parâmetros humanos, principalmente como o VG do CH e grau de hemólise inferior a 1%
27 (MARCHI; MARTINS; PEREIRA, 2015; MARCHI et al., 2019).

28 29 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

30
31 Entende-se por estresse oxidativo o excesso de formação de radicais livres e/ou
32 diminuição da capacidade antioxidante com aumento concomitante de substâncias
33 oxidantes (SIES, 1993).

2.5.1. RADICAIS LIVRES

Radicais livres são átomos, íons ou moléculas altamente instáveis e reativas, que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica e tendem a ligar o elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação (GRUPTA et al., 2005). A geração de radicais livres constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes (BARBOSA et al., 2010; GUTOWSKI, KOWALCZYK, 2013).

Como a maioria dos radicais livres são derivados do metabolismo do O_2 , usa-se o termo “Espécies Reativas de Oxigênio” (EROs) para denominá-los (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). As EROs são produzidas de forma natural e contínua pelas células, principalmente na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, durante a produção de energia a partir da glicose e do O_2 (BARBOSA et al., 2010).

O O_2 é reduzido nas mitocôndrias para produção de moléculas de ATP, processo pelo qual há transporte de elétrons. No entanto, uma pequena porcentagem (um a 2%) dos elétrons se dissipam resultando na formação de compostos intermediários altamente reativos. Entre eles o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), seguido de outras numerosas EROs, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^{\cdot}) (HIRATA et al., 2004, VIÑA et al., 2013).

Outra importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases, cuja função é transferir elétrons por meio das membranas celulares (BARBOSA et al., 2010). Múltiplas são as fontes endógenas e exógenas que geram EROs nas células de mamíferos. Entre as endógenas além da respiração mitocondrial está a inflamação e a biotransformação metabólica provocando a redução incompleta do O_2 (LOFT et al., 2008).

2.5.2 FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

A formação de EROs é uma reação necessária ao organismo, pois há evidências de que uma determinada quantidade é imprescindível para muitas funções fisiológicas essenciais, tais como: produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, ativação do sistema imunológico, defesa celular e síntese de substâncias biológicas (CELI, 2010; OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010). No entanto, a produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos resulta na produção excessiva de EROs, gerando a condição conhecida como estresse oxidativo (BRITO et al.,

1 2007).

2 Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação dos EROs, porém a
3 membrana celular é um dos mais atingidos. Há grande quantidade de fosfolipídios presente
4 nas membranas celulares, tornando-as alvo fácil quando as EROs são formadas;
5 principalmente por serem muito abundantes e responsáveis pelos processos funcionais das
6 células (SPANVELLO et al., 2010; ANTONELLOU, 2012).

7 As EROs reagem com ácidos graxos poliinsaturados, formando lipoperóxidos que
8 compõem uma cascata de reações degenerativas dos lipídeos, processo denominado de
9 peroxidação lipídica (LPO) (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2007).

10 Hemácias são células transportadoras de O₂, por isso facilmente tornam-se alvos da
11 ação das EROs que se originam naturalmente por meio de processos metabólicos
12 oxidativos (TEDESCO et al., 2000).

13 EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), podem modificar proteínas direta
14 ou indiretamente, geralmente de forma irreversível, podendo causar inibição da atividade
15 de enzimas, aumento na suscetibilidade de agregação e proteólise (HOPPS; CAIMI, 2013).
16 As EROs provenientes das hemácias causam danos a si próprias e a outros componentes do
17 sangue (ÇIMEN et al., 2008).

18 A hemoglobina é a principal fonte de radicais livres nas hemácias por produzir
19 ânion O₂⁻, quando se auto oxida, transformando-se em metahemoglobina (na qual o estado
20 de oxidação do ferro é o Fe³⁺), uma proteína que não liga ou transporta O₂ (ÇIMEN et al.,
21 2008).

22 Para a obtenção de CH utilizados para fins transfusionais é necessário remover
23 aproximadamente 80% do plasma de uma unidade de sangue total. Com isso, perde-se
24 grande parte do suprimento energético e da capacidade antioxidante natural associada a
25 esse fluido biológico. As soluções conservantes e aditivas atuais de CH tais como CPDA1
26 e CPD/SAG-M suprem apenas as necessidades energéticas garantindo a produção de ATP.
27 Portanto no caso do CH, as hemácias estão em condições desfavoráveis, e o nível de
28 oxidação ultrapassa o limite aceitável, elevando a porcentagem de elétrons
29 desemparelhados sobrecarregando o sistema de defesa antioxidante, que resultará na
30 formação de mais EROs, culminando no estresse oxidativo (KANG, 2002).

31 O metabolismo antioxidante demanda gasto energético e possui uma relação
32 intrínseca com o sistema glicolítico. Desta forma, com a capacidade antioxidante
33 diminuída, as hemácias do CH permanecem em condições diferentes da circulação
34 sanguínea e, ao longo do período de armazenamento, estas células ficam suscetíveis aos

1 danos oxidativos (SILVA, 2013, DOLOBEL et al, 2016; PRUDENT et al., 2017;
2 ROUSSEL et al., 2017).

3 4 2.5.3. DEFESAS ANTIOXIDANTES

5
6 Os antioxidantes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares das espécies
7 reativas e controlar a ocorrência de danos (BARBOSA et al., 2010). Desta forma,
8 antioxidantes nada mais são que substâncias que ajudam a reduzir os efeitos do estresse e
9 da falta de O₂, formando assim, complexos que atenuam as reações produtoras de radicais
10 livres (KALYANARAMAN, 2013).

11 O intuito dos sistemas antioxidantes é limitar ou inativar a produção das EROs,
12 além de reparar o dano celular ou até mesmo adaptar o organismo à condição do estresse
13 oxidativo (DOTAN et al., 2004; GRUPTA et al., 2005). Isso é possível, pois esses sistemas
14 antioxidantes são capazes de manter as concentrações de radicais livres abaixo dos níveis
15 tóxicos (VIÑA et al., 2013).

16 O sistema de defesa antioxidante pode atuar em duas linhas. O sistema enzimático
17 (enzimas catalase, superóxido dismutase e peroxidases) que atua como detoxificador do
18 agente antes que ele cause lesão; enquanto o não enzimático tem a função de reparar a
19 lesão já ocorrida sem degradar diretamente os radicais livres (RATNAN et al., 2006;
20 VINA et al., 2013).

21 Os processos não enzimáticos dividem-se em antioxidantes hidrofílicos (incluem a
22 glutathiona, vitamina C, indóis e catecóis) e os antioxidantes lipofílicos (vitaminas A, E e as
23 bioflavonas) (EDEAS, 2011; HANAFY & SELIM, 2012).

24 O sistema antioxidante enzimático e a glutathiona agem predominantemente no meio
25 intracelular. Já o sistema não enzimático predomina no meio extracelular, ou seja, no
26 plasma. Tal informação evidencia o importante papel do meio plasmático na prevenção do
27 estresse oxidativo das hemácias (SILVA, 2013).

28 Os dois sistemas reduzem os danos causados pelo estresse oxidativo,
29 interrompendo a cadeia de peroxidação e removendo as EROs (BROWN, 2008).

30 Entre as enzimas antioxidantes destacam-se a superóxido dismutase (SOD),
31 catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), sendo que cada uma possui função
32 específica (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007; BARBOSA et al., 2010).

33 A SOD tem a função de transformar dois ânions radicais O₂^{•-}, em um H₂O₂, que é
34 menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas (OLIVEIRA & SCHOFFEN,

1 2010). Em pH fisiológico isto caracteriza uma reação normal, porém a SOD tem grande
2 capacidade de acelerá-la (OTERO et al., 1983, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

3 Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na
4 última camada, o H_2O_2 é um metabólito do O_2 extremamente deletério, por participar da
5 reação que produz o OH^\cdot . Além disso, o H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar
6 camadas lipídicas. Pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao
7 Fe^{++} , sendo altamente tóxico para as células (FERREIRA, 1997).

8 Por isso, a SOD trata-se de uma enzima essencial para a sobrevivência das
9 hemácias, devido à produção de radical O_2^\cdot durante a auto oxidação da hemoglobina
10 (HALLIWELL; GUTTEIDGE, 2001) e à participação deste na formação de OH^\cdot , de maior
11 potencial lesivo (FRIDOVICH, 1983; CHRISTIAN, 2000).

12 As enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, o de impedir o acúmulo de
13 H_2O_2 , pois é a partir desta espécie que se origina o OH^\cdot , iniciador da peroxidação lipídica.
14 Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das
15 reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre,
16 culmina na geração do radical OH^\cdot (AYALA et al., 2014).

17 A CAT é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e
18 O_2 , principalmente quando os níveis de H_2O_2 estão baixos (VIÑA et al., 2013). Localizada
19 nos peroxissomas, tem ação reduzida em órgãos que pouco os possuem, como coração,
20 cérebro e pulmões, sendo assim, nas hemácias, a ação antioxidante se dá pela catalase
21 eritrocitária. Já a glutathione é um dos mais importantes antioxidantes endógenos, e que em
22 sua forma reduzida, a glutathione peroxidase (GPx), age com os radicais, formando
23 glutathione oxidada e água. A GPx atua sobre os peróxidos lipídicos e o H_2O_2 , reduzindo-os
24 na presença de glutathione (fornecedora de hidrogênio) (YU, 1994; LOCATELLI, 2003;
25 HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

26 Independentemente da forma de atuação, o efeito protetor ocorre por meio da
27 neutralização dos radicais antes que estes reajam com os alvos biológicos, para que possam
28 prevenir as reações em cadeia e/ou a ativação das EROs ou ainda transformando-as em
29 compostos menos reativos (AZZI et al., 2004).

30 Porém nas situações em que surge um desequilíbrio entre os sistemas pró e
31 antioxidante com predomínio dos pró-oxidantes, conseqüentemente resultará no aumento
32 na peroxidação lipídica (LPO) (RAHMAN, BISWAS, KODE, 2006). Danos na camada
33 lipídica provocam a formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), resultando
34 em perda da integridade da membrana que culminam com a ruptura e conseqüentemente

1 morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; MAFRA et al., 1999; DE MOFFARTS
2 et al., 2005).

3 O efeito cumulativo dessa lesão contribui para o envelhecimento das células
4 normais. A senescência resulta em uma vida mais curta e precoce remoção das hemácias
5 da circulação (HARVEY, 1997; SHIVA, 2007).

6 Em humanos, estudos demonstram haver relações entre as lesões sofridas pelas
7 hemácias durante o seu armazenamento e a produção de radicais livres. Considera-se
8 ainda que a LPO seja a principal causa do envelhecimento das hemácias em bolsas para
9 transfusão sanguínea (CHIU et al., 1989, AYALA et al., 2014).

11 2.5.4. AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO

12
13 A identificação e quantificação direta das EROs seria a forma lógica de analisar a
14 presença de estresse oxidativo. No entanto, devido à meia-vida biológica muito curta,
15 altíssima reatividade e concentrações muito baixas, a quantificação das EROs não é
16 praticável. Devido aos problemas analíticos relacionados ao estresse oxidativo e ao
17 mecanismo de lesão dos radicais livres, opta-se pela análise de metabólitos ou produtos
18 finais das reações de oxidação (BARDYN, et al., 2018). Os metabólitos são mais estáveis
19 que as EROs e, portanto, podem ser usados como biomarcadores, uma vez que
20 correspondem ao resultado da ação do estresse oxidativo sobre biomoléculas importantes,
21 como proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA (TEIXEIRA, 2010; SPAVANELO et al.,
22 2010). Graças a composição principalmente lipídica e proteica da membrana que reveste as
23 hemácias, estas células estão altamente sujeitas ao estresse oxidativo (SPAVANELO et al.,
24 2010; THRALL, 2014).

25 As lesões decorrentes do processo de LPO e inativação de proteínas de membrana
26 das hemácias dos CH acarretam alterações na estrutura e na permeabilidade das mesmas
27 (TEDESCO et al., 2000; MONTINE et al., 2004). Entre as alterações estão a oxidação dos
28 grupamentos sulfidríla da hemoglobina, promovendo lesão da membrana e,
29 conseqüentemente, hemólise (FERREIRA et al., 1997; DOLOBEL et al., 2016;
30 PRUDENT et al., 2017; ROUSSEL et al., 2017).

31 Uma maneira eficaz de se estimar o grau de dano proteico, é por meio da avaliação
32 dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP). AOPP são considerados marcadores
33 fidedignos para estimar a extensão do dano oxidativo em proteínas, especialmente
34 albumina (BRAGA, 2004; GUTOWSKI; KOWALCZYK, 2013).

1 Descritos pela primeira vez por Witko-Sarsat e colaboradores, em 1996, os AOPP
2 são gerados através da ação de EROs sobre proteínas e aminoácidos, pela ação de
3 oxidantes clorados, principalmente o ácido hipocloroso e cloraminas (KALOUSOVÁ,
4 SKRHA, ZIMA, 2002). Resultam no aumento da atividade das mieloperoxidases durante
5 ação inflamatória, principalmente em neutrófilos e monócitos. Definidos como produtos
6 proteicos interligados contendo ditirosina, são importantes biomarcadores da oxidação de
7 proteínas e tornam possível estimar o grau de oxidação destas (CAKATAY et al., 2005;
8 CAKATAY, KAYALI, UZUN, 2009; KORKMAZ et al., 2013).

9 Atualmente, a LPO é considerada como o principal mecanismo molecular
10 envolvido no dano oxidativo às estruturas celulares e no processo de toxicidade que leva à
11 morte celular (DIANZANI & BARRERA, 2008).

12 Os lipoperóxidos formados podem acumular-se em órgãos ou tecidos e atingem
13 principalmente a membrana celular alterando sua estrutura e permeabilidade, reduzindo
14 irreversivelmente sua fluidez e aumentando sua permeabilidade. A fluidez da membrana
15 está relacionada com a presença de uma bicamada lipídica (cadeias insaturadas de
16 fosfolipídios e colesterol) que formam um mosaico fluido com receptores e proteínas de
17 transporte. Como consequência da LPO, há perda da seletividade na troca iônica e
18 liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e
19 formação de produtos citotóxicos, culminando em morte celular (FERREIRA et al., 1997).

20 A LPO ocorre como uma reação em cadeia dividida em etapas. A etapa de iniciação
21 que corresponde ao sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturados da membrana
22 celular pelo radical hidroxila ou alcóxila formando o radical lipídico (FLATT et al., 2014).

23 A participação do ferro também é considerada fator determinante, ressaltando-se a
24 importância da relação equimolar entre Fe^{3+}/ Fe^{2+} , para possibilitar a iniciação desse
25 processo (BARBOSA et al., 2010).

26 Em seguida vem a etapa de propagação, no qual o radical lipídico reage
27 rapidamente com o O_2 , resultando em radical peróxila que por sua vez sequestra H^+ do
28 novo ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o radical lipídico. Por fim a etapa
29 de terminação, que ocorre quando os radicais lipídicos e peróxila produzidos anulam-se
30 (DOTAN et al., 2004).

31 O processo de LPO forma produtos como gases de hidrocarbonetos e aldeídos,
32 como o malondialdeído (MDA). Portanto o MDA trata-se de um metabólito que é utilizado
33 como biomarcador de LPO (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; PANDEY; RIZVI,

1 2011). Mesmo sendo considerado por muito tempo como um importante e útil biomarcador
2 plasmático para o estresse oxidativo, o MDA praticamente não é tóxico (CATALA, 2006).

3 Para estimar a concentração de MDA no plasma ou soro, o método mais popular é
4 baseado na reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que é mensurado por
5 espectrofotometria. O ensaio detecta substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS),
6 que são subprodutos resultantes da peroxidação lipídica causada pelo estresse oxidativo
7 (MUSTAFA et al., 2016). Geralmente analisados por aparelho de cromatografia líquida de
8 alta eficiência (HPLC) e detectado fluorometricamente (MACHADO, 2006; MUSTAFA et
9 al., 2016). No entanto, o teste das TBARS apresenta muitas interferências analíticas
10 (DOYLE, 2015), sendo o MDA considerado um marcador de baixa especificidade
11 (JUNQUEIRA et al., 2004).

12 Por conta disso, outros testes mais sensíveis e específicos têm sido utilizados para
13 avaliação da LPO. Alguns lipoperóxidos são espécies emissoras de luz e sua luminescência
14 é usada como um marcador de estresse oxidativo (REPETTO, 2008). A
15 quimioluminescência iniciada por hidroperóxido de tert-butil (t-butil) é um exemplo de
16 quimiluminescência sensibilizada (GONZALEZ-FLECHA, LLESUY, BOVERIS, 1991).

17 O aumento da quimioluminescência iniciada por hidroperóxido de t-butil é indicativo
18 de que alfa-tocoferol é o antioxidante consumido nas hemácias, e sugere que EROs e
19 peroxidação lipídica catalisadas por metais de transição reduzidos, podem ser responsáveis
20 pelo aparecimento de danos oxidativos e pela ocorrência de estresse oxidativo (AYALA et
21 al., 2018).

22 Há evidências sobre alterações morfológicas, funcionais e oxidativas das hemácias
23 que progridem com o tempo (ANDRETTA et al., 2018; DORNELES, 2018). No entanto
24 ainda existem aspectos das alterações das hemácias armazenadas a serem explicados.
25 Investigar lesões de armazenamento e estresse oxidativo das bolsas de sangue é essencial
26 para avaliar a extensão do dano às células, pois esse dano reduz a funcionalidade, a
27 viabilidade e sobrevivência das hemácias após a transfusão. Além disso, o acúmulo de
28 substâncias biorreativas que podem influenciar a qualidade do sangue transfundido,
29 contribuem para reações pós-transfusionais (MUSTAFA et al., 2016).

30 Embora não seja um consenso que unidades de CH próximas ao vencimento não
31 apresentem um risco inerente, o tempo de armazenamento do CH deve ser motivo de
32 preocupação em casos específicos. A escassez de trabalhos relacionados ao tema na
33 medicina veterinária demonstra a necessidade desse estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

AEBI, H.E. Catalase *in vitro*. in: PACKER, Lester. **Methods Enzymology**, Elsevier, v.105, p.121-126, 1984.

ALMIZRAQ R; TCHIR, J.D.; HOLOVATI, J.L.; ACKER, J.P. Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and *in vitro* quality. **Transfusion**, v.53, n.10, p.2258–2267, 2013.

ALVES, J.L.; GUERRA NETO, C.L.B.; HÉKIS, H.R.; CONTRERAS, R.C.; LINS, H.W.C.; MELO, A.S.P. Proposta de um novo protocolo de reservas de hemocomponentes para cirurgias em um Hospital Universitário de Recife-Pernambuco. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde, On-Line**, p.1-30, 2018.

ANTONELOU, M.H.; TZOUNAKAS, V.L.; VELENTZAS, A.D.; STAMOULIS, K.E.; KRIEBARDIS, A.G.; PAPASSIDERI, I.S. Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: A time course evaluation from shape shape to proteome. **Journal of Proteomics**, v.76, p.220-238, 2012.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.2014, p.31, 2014.

BAETA, J. S. V.; COSTA, P. R. dos S.; FONSECA, L. A.; JUNIOR, J. D. da C.; NONATO, I. dos A.; VALENTE, F. L. Recuperação do hematócrito após a doação de sangue. **Revista CFMV**, Brasília, DF. Ano XXI. N.67, 2015.

BARBOSA, K.B.F.B.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição Campinas**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BARDYN, M.; TISSOT, J.-D.; PRUDENT, M. Oxidative stress and antioxidant defenses during blood processing and storage of erythrocyte concentrates. **Transfusion Clinique et Biologique**, v.25, p.96–100, 2018.

BARFIELD, D.; ADAMANTOS, S. Feline blood transfusions a pinker shade of pale. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.13, n.1, p.11-23, 2011.

BARON, D.M.; YU, B.; LEI, C., et al. Pulmonary hypertension in lambs transfused with stored blood is prevented by breathing nitric oxide. **Anesthesiology**, v.116, p.637-47, 2012.

BICALHO, B.; SERRANO, K.; DOS SANTOS PEREIRA, A.; DEVINE, D.V.; ACKER, J.P. Blood bag plasticizers influence red blood cell vesiculation rate without altering the lipid composition of the vesicles. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v.43, p.19–26, 2016.

BOSMAN, G.J. Survival of red blood cells after transfusion: processes and consequences. **Frontiers in Physiology**, v.4, p.376, 2013.

1
2 BOULTON, F. Blood transfusion and the World Wars. **Medicine, Conflict and Survival**,
3 v.31, n.1, p.57–68, 2017.

4
5 BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.353, de 13 de jun. 2011. Aprova o
6 Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. **Diário Oficial da República**
7 **Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 jun. 2011.

8
9 BRASIL. Ministério da saúde. **Guia para uso de hemocomponentes**. 2.ed. Brasília:
10 Ministério da Saúde, 2015.

11
12 BRASIL. Ministério da Saúde. Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue.
13 Resolução RDC nº34, de 11 de junho de 2014. Disponível
14 em:http://www.saude.rs.gov.br/upload/1418735690_Resolucao%20_%20RDC%20ANVIS%20034_%20de%2011%20de%20junho%20de%202014.pdf. Acesso em: 20 de novembro
15 de 2016.
16

17
18 BUICO, A.; CASSIANO, C.; RAVERA, M.; BETTA, P.G.; OSELLA, D. Oxidative stress
19 and total antioxidante capacity in humam plasma. **Redox Report**, v.14, n.3, p.125-131,
20 2009.

21
22 CANCELAS, J.A.; DUMONT, L.J.; MAES, L.A.; et al. Additive solution-7 reduces the
23 red blood cell cold storage lesion. **Transfusion**, v.55, p.491-8, 2015.

24
25 CARSON, J.L., GROSSMAN, B.J., KLEINMAN S., et al; Clinical Transfusion Medicine
26 Committee of the AABB: Red blood cell transfusion: A clinical practice guideline from the
27 AABB. **Annals of Internal Medicine**, v.157, p.49–58, 2012.

28
29 ÇAKATAY, U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and
30 poor glycaemic control. **Diabetes Metabolism**, v.31, p.551–557, 2005.

31
32 ÇAKATAY, U.; KAYALI, R.; UZUN, H. Relation of plasma protein oxidation parameters
33 and paraoxonase activity in the ageing population. **Clinical and experimental medicine**,
34 84:705-712, 2009.

35
36 CATALA, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of
37 photoreceptors and the chemiluminescence assay. **The International Journal of**
38 **Biochemistry and Cell Biology**, v.38, p.1482-1495, 2006.

39
40 ÇİMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**,
41 v.390, p.1-11, 2008.

42
43 CHIN-YEE, I.; ARYA, N.; D'ALMEIDA, M.S. The red cell storage lesion and its
44 implication for transfusion. **Transfusion Science**, v.18, n.3, p.477-453, 1997.

45
46 CORTES-PUCH, I.; WANG, D.; SUN, J.; SOLOMON, S.B.; REMY, K.E.;
47 FERNANDEZ, M.; FENG, J.; KANIA, T.; BELLAVIA, L.; SINCHAR, D.; PERLEGAS,
48 A.; SOLOMON, M.A.; KELLEY, W.E.; POPOVSKY, M.A.; GLADWIN, M.T.; KIM-
49 SHAPIRO, D.B.; KLEIN, H.G. & NATANON, C. Washing older blood units before
50 transfusion reduces plasma iron and improves outcomes in experimental canine

- 1 pneumonia. **Blood**, 123 (in press), 2014.
- 2
- 3 COSTA JÚNIOR, J.; VIANA, J.A.; RIBEIRO FILHO, J.D.; FAVARATO, E.S.; MATA,
4 L.C.; ARGÔLO NETO, N. Parâmetros bioquímicos e hemogasométricos do sangue total
5 canino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M. **Ciência**
6 **Rural**, v.38, n.2, p. 378-383, 2008.
- 7
- 8 COSTA JUNIOR, J.D. **Avaliações bioquímicas, hemogasométricas e morfológicas do**
9 **sangue canino conservado em bolsas CPD/SAG-M e CPD/SAG-M acrescidas de**
10 **fosfato dissódico**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG
11 Brasil, 2010.
- 12
- 13 DAVIDOW, B. Blood Transfusions in Anemic Pets. *Veterinary Clinics of North America -*
14 **Small Animal Practice**, v.25, n.6, p.101–106, 2017.
- 15
- 16 D'ALESSANDRO A, KRIEBARDIS AG, RINALDUCCI S, et al. An update on red blood
17 cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies.
18 **Transfusion**, v.55, p.205-19, 2015.
- 19
- 20 DE MOFFARTS, B. et al. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant
21 status in trained thoroughbred horses. **Veterinary Journal**, v.169, n.1, p.65-74, 2005.
- 22
- 23 DIANZANI, M. & BARRERA, G. Pathology and physiology of lipid peroxidation and its
24 carbonyl products, in Alvarez S and Evelson P (ed), Free Radical pathophysiology.
25 **Transworld Research Network**, Kerala, India, p.19-38, 2008.
- 26
- 27 DELOBEL, J.; PRUDENT, M.; CRETZAZ, D.; ELHAJJ, Z.; RIEDERER, B.M.; et al.
28 Cysteine redox proteomics of the hemoglobin-depleted cytosolic fraction of stored red
29 blood cells. **Proteomics Clinical Apply**, v.10, p.883–93, 2016.
- 30
- 31 DONADEE, C.; RAAT, N.J.; KANIAS, T. et al. Nitric oxide scavenging by red blood cell
32 microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion.
33 **Circulation**, v.124, p.465-76, 2011.
- 34
- 35 DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as
36 universal criterion of stress oxidative. **Progress in Lipid Research**, v.43, p.200-227, 2004.
- 37
- 38 DOYLE, R.L. 2015. **Marcadores de estresse oxidativo e atividade das colinesterases**
39 **em bovinos experimentalmente infectados por Babesia bovis, Babesia bigemina e**
40 **Anaplasma marginale**. 25f. Santa Maria, RS. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) -
41 Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa
42 Maria.
- 43
- 44 DUTRA, L.S. 2019. **Hemoterapia em caninos: Análise e indicações de 2.736 casos**. 41f.
45 Santa Maria, RS. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-

- 1 Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
2
- 3 EDER, A.F. & CHAMBERS, L.A. Noninfectious complications of blood transfusion.
4 **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.131, p.708–718, 2007.
5
- 6 ELFATH, M. D. Is it time to focus on preserving the functionality of red blood cells during
7 storage. **Transfusion**, v.46, p.1469-1470, 2006.
8
- 9 FELDMAN, B.F.; SINK, C.A. **Hemoterapia para o clínico de pequenos animais**. São
10 Paulo: Roca, 2007. 104p.
11
- 12 FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças
13 relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica**
14 **Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.
15
- 16 FIUMARI, T.; CANESIN, V. A.P. M. N; MORAES, B.M. Avaliação hematológica pré e
17 pós transfusional dos cães receptores de bolsas de sangue total ou hemocomponentes de
18 Ribeirão Preto e região. **XI Encontro de Iniciação Científica do Centro Universitário**
19 **Barão de Mauá**, 2017.
20
- 21 FLATT, J.F.; BAWAZIR, W.M.; BRUCE, L.J. The involvement of cation leaks in the
22 storage lesion of red blood cells. **Frontiers in Physiology**, v.5, p.214, 2014.
23
- 24 FLEGEL, W.A.; NATANSON, C.; KLEIN, H.G. Does prolonged storage of red blood
25 cells cause harm? **British Journal of Haematology**, v.165, p.3 –16, 2014.
26
- 27 FONSECA, N.B.S.; GAMELEIRA, J.S; CAVALCANTE, J.M.; OLIVEIRA, F.L.C.;
28 MORI, C.S.; SOUSA, R.S.; MINERVINO, A.H.H.; BARRÊTO-JÚNIOR, R.A.
29 Biochemical responses, blood gas, oxidative stress and lipid peroxidation of goats
30 transfused with fresh or stored whole homologous blood. **Pesquisa Veterinária**
31 **Brasileira**, v.38, n.11, p.2070-2079, 2018.
- 32 FONTEQUE, J. H. **Estresse oxidativo e lipoperoxidação devido à anemia induzida por**
33 **perda aguda de sangue em ovinos**. 2005. Tese (doutorado) – Universidade Estadual
34 Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.
- 35 FRIDOVICH, I., **The discovery of superoxide dismutases: a history, in Superoxide**
36 **Dismutase**, Vol. I, Oberley. L. W., Ed., CRC Press, Boca Raton, MA., 1983.
- 37 FU, X.; FELCYN, J.R.; ODEM-DAVIS, K.; ZIMRING, J.C. Bioactive lipids accumulate
38 in stored red blood cells despite leukoreduction: a targeted metabolomics study.
39 **Transfusion**, v.56, p.2560-70, 2016.
- 40 GAMBERO, S. Anti-A and anti-B hemolysin frequencies in blood donors from the
41 Hemotherapy Center of Unesp, Botucatu. **Revista Brasileira de Hematologia e**
42 **Hemoterapia**, São José do Rio Preto. v. 26, n. 1, p.28-34, 2004.

- 1 GEER, P. **Wintrobe's Clinical Hematology**, 13th edn. Philadelphia, PA: Lippincott
2 Williams & Wilkins Publishers, 2014.
- 3 GIAGRANDE, P. L. F. The history of blood transfusion. **Brasilian Journal**
4 **Haematology**, v.4, n.4, p.758767, 2000.
- 5 GONÇALVES, S. **Reações transfusionais após a administração do concentrado de**
6 **plaquetas em cães.** [http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10137/tde-23042007-](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10137/tde-23042007-164841/en.php)
7 [164841/en.php](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10137/tde-23042007-164841/en.php)> Acesso em 15 de janeiro 2017.
- 8 GONZALEZ-FLECHA, B.G.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated
9 chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle.
10 **Free Radical Biology and Medicine**, v.10, p.93-100, 1991.
- 11 GUTOWSKI, M., KOWALCZYK, S. "A study of free radical chemistry: their role and
12 pathophysiological significance," **Acta Biochimica Polonica**, v.60, n.1, p.1-16, 2013.
- 13 HALDANE, S.J.; ROBERTS, J.; MARKS, S.L.; RAFFE, M.R. **Transfusion medicine.**
14 **Compendium Continuing Education for Veterinarians**, v.26, n.7, p. 502-518, 2004.
- 15 HALLIWELL, B.; GUTERIDGE, J.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4th ed.
16 New York: Oxford University, v.851, p.8, 2007.
- 17 HAMASAKI N, YAMAMOTO M. Red blood cell function and blood storage. **Vox**
18 **Sanguinis**, v.79, p.191-197, 2000.
19
- 20 HARDWICK, J. Blood storage and transportation. **ISBT Science Series**, v.3, p.177-96,
21 2014.
22
- 23 HARVEY, J. W. The erythrocyte: Physiology, Metabolism and Biochemical disorders. In:
24 Kaneko, J.J., Harvey, J.W. & Bruss, M.L. (Eds.), **Clinical Biochemistry of Domestic**
25 **Animals**, 5^a ed. p.175-240, 2010.
- 26 HASHIMOTO, M.C.T. **Estudo da preservação de sangue em diferentes bolsas de**
27 **coleta com di-octil-ftalato e anticoagulante citrato-fosfato-dextrose-adenina.** 1997.
28 Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade
29 Estadual de Campinas.
- 30 HELM, J.; KNOTTENBELT, C. Blood transfusions in dogs and cats 2. Practicalities of
31 blood collection and administration. In: **Practice**, v.32, p.231-237, 2010.
32
- 33 HESS, J.R. red cell stored. **Journal of Proteomics**, v.73, n.3, p.368-373, 2009.
34
- 35 HESS, J.R. Measures of stored red blood cell quality. **Vox Sanguinis**, v.107, n.1, p.1-9,
36 2014.
37
- 38 HO, J.; SIBBALD, W.J.; CHIN-YEE, I.H. Effects of storage on efficacy of red cell
39 transfusion: when is it not safe? **Critical Care Medicine**, v31, p.687-697, 2003.
40
- 41 HOD, E.A.; BRITTENHAM, G.M.; BILLOTE, G.B.; et al. Transfusion of human

- 1 volunteers with older, stored red blood cells produces extravascular hemolysis and
2 circulating non-transferrin-bound iron. **Blood**, v.118, p.6675-82, 2011.
- 3 HOGMAN, C. F.; ERIKSSON, L.; ERICSON, A.; REPPUCI, A. J. Storage of saline -
4 adenine - glucose - mannitol - suspended red cells in a new plastic container. **Transfusion**,
5 v.31, p.26-29, 1991.
- 6 HÖGMAN, C.; MERYMAN, H. T. Storage parameters affecting red blood cell survival
7 and function after transfusion. **Transfusion Medicine Reviews**, Hamilton, v.13, n.4, p.275
8 – 296, 1999.
- 9
- 10 HOHENHAUS, A. F. Transfusão e substitutos do sangue. In: DIBARTOLA, S. P.
11 **Anormalidades de fluidos, eletrólitos e equilíbrio ácido-básico na clínica de pequenos**
12 **animais**. Roca: São Paulo, Cap.24, p.549 – 565, 2007.
- 13 HOHENHAUS, A. E. Blood Transfusion and Blood Substitutes In: DIBARTOLA, S. P.
14 **Fluid, Electrolyte and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice**. 4. ed. St Louis:
15 WB Saunders, p.85-604, 2012.
- 16
- 17 HOPPS, E.; CAIMI, G. Protein oxidation in metaolic syndrome. **Clinical Investigation**
18 **Medicine**, v.36, n.1, p.1-8, 2013.
- 19 JUNQUEIRA, V.; BARROS, S.; CHAN, S.; RODRÍGUEZ, L.; GIAVAROTTI, L.;
20 ABUD, R. & DEUCHER, G. Aging and oxidative stress. **Molecular Aspects of Medicine**,
21 Vol. 25, p.5–16, 2004.
- 22 KALOUSOVĚ M, ZIMA T, TESAŘ V, ĀKRHA J, ĀTŔPEK S: Determination of advanced
23 glycation end-products and advanced oxidation protein products. **Klin Biochemistry**
24 **Metabolism**, v.10, p.11-16, 2002.
- 25
- 26 KALYANARAMAN B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate
27 students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v.1, n.1, p.244-
28 57, 2013.
- 29
- 30 KANG, D. H. Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. **American Association**
31 **of Critical-Care Nurses Clinical Issues**, v.13, p.540-9, 2002.
- 32
- 33 KENICHIRO, Y; HOLOWAYCHUK, M. K. **Manual of veterinary transfusion**
34 **medicine and blood banking**. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2016. 928p.
- 35
- 36 KOCH, C.G., FIGUEROA, P.I.; Li, L.; SABIK, J.F.; 3RD; MIHALJEVIC, T.;
37 BLACKSTONE, E.H. Red blood cell storage: how long is too long? **The Annals of**
38 **Thoracic Surgery**, v.96, n.5, p.1894-9, 2013.
- 39
- 40 KORKMAZ, G.G.; ALTINOGLU, E.; CIVELEK, S.; SOZER, V.; EERDENE, F.;
41 TABAK, O.; UZUN, H. The association of oxidative stress markers with conventional risk
42 factors in metabolic syndrome. **Metabolism**, p.829-35, 2013.
- 43
- 44 KORTE, D.; VERHOEVEN, A. J. Quality determinants of erythrocyte destined for
45 transfusion. **Cell and Molecular Biology**, v.50, n.2, p.187-195, 2004.

- 1 LANEVSCHI, A.; WARDROP, K.J. Principles of Transfusion medicine in Small Animals.
2 **Canadian Veterinary Journal**, v.42, p.447- 454, 2001.
- 3 LENAZ G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and
4 pathology? **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.942, p.93-136, 2012.
- 5
6 LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; ECKARDT, K.U. et al. Oxidative stress in end-stage
7 renal disease: na emerging threat to pacient outcome. **Nephrology Dialysis**
8 **Transplantation**, v.18, n.7, p.1272-1280, 2003.
- 9
10 LOFT, S. et al. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. **Biochemical**
11 **Society Transactions**, v.36, n.5, p.1071-6, 2008.
- 12
13 LUTEN, M., ROERDINKHOLDER-STOELWINDER, B., SCHAAP, N. P., DE GRIP, W.
14 J., BOS, H. J., & BOSMAN, G. J. Survival of red blood cells after transfusion: a
15 comparison between red cells concentrates of different storage periods. **Transfusion**. v.4,
16 n.7, p.1478-1485, 2008.
- 17
18 MACHADO, L.P. **Eritrograma, glutationa reduzida e superóxido dismutase**
19 **eritrocitários e metahemoglobina em equinos da raça Árabe submetidos a exercício**
20 **em esteira. Efeito da suplementação com vitamina E (DLAlfa-tocoferol)**. Dissertação
21 de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
- 22
23 MARCHI, M.N.; MARTINS, R.R.; PEREIRA, P.M. Controle de qualidade de bolsas de
24 sangue total e concentrado de hemácias de cães. **Revista Ciência Veterinária de Saúde**
25 **Pública**, v.2, n.2, p.131-141, 2015.
- 26
27 MARCHI, M.N.A.; LUZ, P.E.; MARTINS, R.R., SIMONELLI, S.M.; PEREIRA, U.P.;
28 PEREIRA, P.M. Quality control in the different stages of producing red blood cell
29 concentrate from dogs. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.1,
30 p.93-101, 2019.
- 31
32 MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide dismutase anion
33 radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase.
34 **European Journal of Biochemistry**, v.47 p.469-471, 1974.
- 35
36 MARTINS, S. B. **Medicina transfusional em cães e gatos: colheita, processamento e**
37 **armazenamento de sangue total e hemocomponentes**. 2011. Seminário. Programa de
38 Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade
39 Federal de Goiás.
- 40
41 MCLELLAN, S.A.; WALSH, T.S.; MCCLELLAND, D.B. Should we demand fresh red
42 blood cells for perioperative and critically ill patients? **Brasilian Journal**
43 **Anaesthesiology**, v.89, p.537-9, 2002.
- 44
45 MOHANDAS, N.; CHASIS, J. A. Red blood cell deformability, membrane material
46 properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and
47 lipids. **Semin Hematology**, v.30, n.3, p.171-192, 1993.
- 48
49 MORAES, B. T.; WOLKMER, P.; SIQUEIRA, L. **Importância da Transfusão**

- 1 **sanguínea em cães e lesões de armazenamento do sangue.** Seminário Interinstitucional
2 de Ensino, Pesquisa e Extensão. Universidade de Cruz Alta. 2016.
- 3
- 4 MUSTAFA I, AL MARWANI A, MAMDOUH NASR K, et al. Time dependent
5 assessment of morphological changes: leukodepleted packed red blood cells stored in
6 SAGM. **BioMed Research International**, 4529434, 2016.
- 7
- 8 NAGABABU, E.; SCOTT, A.V.; JOHNSON, D.J. et al. Oxidative stress and rheologic
9 properties of stored red blood cells before and after transfusion to surgical patients.
10 **Transfusion**, v.56, p. 1101–1111, 2016.
- 11
- 12 NEDZI, M.; CHABOWSKA, A.M.; ROGOWSKA, A. et al. Leucoreduction helps to
13 preserve activity of antioxidant barrier enzymes in stored red blood cell concentrates. **Vox**
14 **Sanguinis**, v.110, p. 126–133, 2016.
- 15
- 16 NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Anemia. **In: Medicina interna de pequenos animais.**
17 5.ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p.3525-3530.
- 18
- 19 NETO, T. **Avaliação Externa da Qualidade em Imuno-hematologia de Serviços**
20 **Transfusoriais da Área de Abrangência da Grande São Paulo.** 2016
- 21
- 22 NG, M.S.; NG, A.S.; CHAN, J.; et al. Effects of packed red blood cell storage duration on
23 post-transfusion clinical outcomes: a meta-analysis and systematic review. **Intensive Care**
24 **Medicine**, v.41, p.2087-97, 2015.
- 25
- 26 NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. Measurement of
27 plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in
28 conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, v.220, p.403-409, 1994.
- 29
- 30 OBRADOR, R.; MUSULIN, S.; HANSEN, B. Red blood cell storage lesion. **Journal of**
31 **Veterinary Emergency and Critical Care**, v.25, n.2, p.187–199, 2015.
- 32
- 33 ORLOV, D.; KARKOUTI, K. The pathophysiology and consequences of red blood cell
34 storage. **Anaesthesia**, v.70, p.29–37, 2015.
- 35
- 36 PANDEY, K.; RIZVI, S. “Biomarkers of oxidative stress in red blood cells,” **Biomedical**
37 **Papers**, v.155, n. 2, p.131–136, 2011.
- 38
- 39 PANZETTA, O.; COMINACINI, L.; GARBIN, U. et al. Increased susceptibility of LDL
40 to *in vitro* oxidation in patients on maintenance hemodialysis: effects of fish oil and
41 vitamin E administration. **Clinical Nephrology**, v.44, n.5, p.303-309, 1995.
- 42
- 43 PRUDENT M, TISSOT J-D, LION N. *In vitro* assays and clinical trials in red blood cell
44 aging: lost in translation. **Transfusion and Apheresis Science**, v.52, p.270–6, 2015.
- 45
- 46 RAHMAN, A.; KODE, S.K.; BISWAS. Assay for quantitative determination of
47 glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **National**
48 **Protocol**, v.1, p.3159-3165, 2006.
- 49
- 50 REYNOLDS, J. D.; AHEARN, G.S.; ANGELO, M.; ZHANG, J. et al. S-

- 1 nitrosohemoglobin deficiency: a mechanism for loss of physiological activity in banked
2 blood. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.104, n.43, p.17058-
3 17062, 2007.
- 4
- 5 REPETTO, M.G. Clinical use of chemiluminescence assays for the determination of
6 systemic oxidative stress. In: Popov, I.; Lewin, G. (ed.), Handbook of chemiluminescent
7 methods in oxidative stress assessment. **Transworld Research Network: Kerala, India**;
8 p.163-194, 2008.
- 9
- 10 RIBEIRO FILHO, J.D., ALMEIDA, C.T., GONÇALVES, R.C.; et al. Alterações
11 hemogasométricas de sangue bovino durante a conservação em frascos de vidro com ACD
12 e bolsas plásticas com CPDA-1, por 35 dias. **Veterinária Zootecnia**, v.6, p.77-84, 1994.
- 13
- 14 ROUSSEL, C.; DUSSIOT, M.; MARIN, M.; MOREL, A.; NDOUR, P.A.; DUEZ, J. et al.
15 Spherocytic shift of red blood cells during storage provides a quantitative whole cell-
16 based marker of the storage lesion. **Transfusion**, v.57, p.1007-18, 2017.
- 17
- 18 ROZANSKI, E; LAFORCADE, A.M. Transfusion medicine in veterinary emergency and
19 critical care medicine. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.19, n.2, p.83-87,
20 2004.
- 21
- 22 RUDDELL, J.P. Lippert LE, Babcock JG, Hess JR. Effect of 24-hour storage at 25 degrees
23 C on the in vitro storage characteristics of CPDA-1 packed red cells. **Transfusion**, v.38,
24 p.424 - 8, 1998.
- 25
- 26 SALZER, U.; ZHU, R.; LUTEN, M. et al. Vesicles generated during storage of red cells
27 are rich in the lipid raft marker stomatin. **Transfusion**, v.48, p.451-62, 2008.
- 28
- 29 SCOTT, K.L.; LECAK, J.; ACKER, J.P. Biopreservation of blood cells: past, present, and
30 future. **Transfusion Medicine Reviews**, v.19, n.2, p.127-142, 2005.
- 31
- 32 SECCHI, P. **Bioquímica dos conservantes sanguíneos**. Disponível em: http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/restrito/pdf/conservantes_secchi.pdf. Acesso em: 30.03.2017.
- 33
- 34
- 35 SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione
36 disulfide release in chronically ethanol treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.
- 37
- 38 SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82,
39 p.291-295, 1997.
- 40
- 41 SILVA, C.A.L. Avaliação da atividade antioxidante da vitamina E em eritrócitos-
42 aplicações em hemoterapia. 2013.
- 43
- 44 SOUSA, R. S.; JÚNIOR, R. A. B.; BARROS, I. O.; TAVARES, M. D.; OLIVEIRA, G.
45 B.; SOUSA, I. K. F. & MINERVINO, A. H. H. Lesões de armazenamento durante a
46 conservação de sangue nas diferentes espécies: uma revisão. **Acta Veterinaria**
47 **Brasilica**, v.6, n.2, p.68-79, 2012.
- 48
- 49 TESDESCO, I.; RUSSO, M.; RUSSO, P.; JACOMINO, G.; RUSSO, G. L.;

- 1 CARRATURO, A.; FARULO, C.; MOIO, L.; PALUMBO, R. Antioxidant effect of red
2 wine polyphenols on red blood cells. **The journal of Nutritional Biochemistry**, v.11,
3 p.114-119, 2000.
4
- 5 TISSOT, J.-D.; BARDYN, M.; SONEGO, G.; ABONNENC, M.; PRUDENT, M. The
6 storage lesions: From past to future. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 24, p. 277–
7 284, 2017.
- 8 TOCCI, L. J. Transfusion Medicine in Small Animal Practice. **Veterinary Clinics of**
9 **North America: Small Animal Practice**, v.40, p.485–494, 2010.
10
- 11 TOMCZAK, A.C.T.Q.; GRILO, K.T.M.; CASTRO, J.M.; et al. Estudo de métodos
12 laboratoriais para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias no
13 centro de hematologia e hemoterapia do Paraná (Hemepar), Brasil. **Revista Brasileira**
14 **Hematologia e Hemoterapia**, v.3, n.3, p.209-2014, 2010.
15
- 16 THRALL, A. M. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**, São Paulo: Roca, 2ed,
17 p.65, 2014.
18
- 19 TRENT, K. Transfusion Medicine: componente therapy. **Veterinary Technician**, p. E1-
20 E8, 2010.
21
- 22 TRIULZI, D. J. et al. Terapêutica Transfusional. In: TRIULZI, D. J. **Terapêutica**
23 **Transfusional – Manual para Médicos**. 7nd ed., Bethesda: American Association of
24 Blood Banks, 2002, 142p.
25
- 26 VAN DEWATERING, L.; LORINSER, J.; VERSTEEGH, M.; WESTENDORD, R.;
27 BRAND, A. Effects of storage time of red blood cell transfusions on the prognosis of
28 coronary artery bypass graft patients. **Transfusion**, v.46, p.1712-8, 2006.
29
- 30 VIÑA, J.; BORRAS, C.; ABDELAZIZ, K.M.; GARCIA-VALLES, R.; GOMEZ-
31 CABRERA, M.C. The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption
32 theory of aging. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.19, n.8, p.779-87, 2013.
33
- 34 WAN J., FORSYTH A. M., AND STONE H. A. Red blood cell dynamics: From cell
35 deformation to ATP release. **Integrative Biology**, v.3, n.10, p.972–981, 2011.
36
- 37 WARDROP, K. J.; YOUNG, J.; WILSON, E. Na in vitro evaluation of storage media for
38 the preservation of canine packed red blood cells. **Veterinary Clinical Pathology**, v.23,
39 p.83-88, 1994.
40
- 41 WINTROBE, M.M.; LEE, G.R. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10th ed. Baltimore:
42 Lippincott Williams & Wilkins; p.196-217, 1999.
43
- 44 WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPELLERE-BLANDIN, C.; NGUYEN-
45 KHOA, NGUYEN, T.; ZINGRAFF, J.; JUNGERS, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.
46 Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia.
47 **Kidney International**, v.49, p.1304–1313, 1996.
48
- 49 WURLOD, V. A., S. A. SMITH, M. A. MCMICHAEL, M. O'BRIEN, J. HERRING AND

- 1 K. S. SWANSON. "Iron metabolism following intravenous transfusion with stored versus
- 2 fresh autologous erythrocyte concentrate in healthy dogs. **American Journal Veterinary**
- 3 **Research**, v.76, n.11, p.996-1004, 2015.
- 4

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar possíveis alterações hematológicas, bioquímicas e oxidativas em bolsas de concentrados de hemácias de cães, durante o período de 42 dias de armazenamento, em CPD/SAG-M.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever as alterações hematológicas, por meio das variáveis: número total de hemácias, volume globular, volume corpuscular médio e leucócitos totais;
- Avaliar as alterações bioquímicas pela dosagem de glicose, lactato; pH, bicarbonato, potássio, sódio, cloreto e excesso de base, ocorridas durante o período de armazenamento;
- Verificar o grau de hemólise através da dosagem da hemoglobina extracelular;
- Avaliar a peroxidação lipídica e oxidação proteica por meio da determinação de hidroperóxidos lipídicos iniciados por t-butil (CL-LOOH) e da determinação dos produtos avançados da oxidação proteica (AOPPs), respectivamente;
- Verificar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), durante o período de armazenamento.

1 **4 ARTIGO A – Artigo redigido sob as normas de publicação do periódico Arquivo Brasileiro de**
2 **Medicina Veterinária e Zootecnia. Disponível em:**
3 **<http://www.scielo.br/revistas/abmvz/iinstruc.htm#006>. acesso: 15/03/2019.**
4
5

6 **MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E**
7 **BIOQUÍMICOS, DURANTE ARMAZENAMENTO DE CONCENTRADOS DE**
8 **HEMÁCIAS DE CÃES, POR 42 DIAS EM BOLSAS PLÁSTICAS CPD/SAG-M**
9

10 **MONITORING OF HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS,**
11 **DURING STORAGE OF RED BLOOD CELLS IN DOGS, FOR 42 DAYS IN**
12 **PLASTIC BAGS CPD/SAG-M**
13

14 R.R. Martins¹, M.N.A. Marchi¹; R.A.O. Santos²; A. K., Matsumoto³; K.K.C.M. Flaiban⁴, D. Venturini⁵;
15 P.M. Pereira⁴
16

17 ¹Aluno de pós-graduação do programa de Ciência Animal - Universidade Estadual de Londrina -
18 Londrina, PR

19 ²Aluno de graduação do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina -
20 Londrina, PR

21 ³Aluno de pós-graduação do programa de Ciências da Saúde - Universidade Estadual de Londrina -
22 Londrina, PR

23 ⁴Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR

24 ⁵Docente do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR
25

26 **Resumo**
27

28 A terapia transfusional é uma modalidade de tratamento comum na prática médica
29 contemporânea. As hemácias sofrem alterações durante o armazenamento, o que pode
30 comprometer sua funcionalidade e viabilidade após a transfusão. O objetivo deste estudo
31 foi descrever alterações hematológicas como: número de hemácias (HE), volume globular
32 (VG), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina (HB), leucócitos totais (LT) e grau
33 de hemólise (hemólise %); e bioquímicos como: glicose, lactato, pH, concentração de
34 bicarbonato, sódio, potássio, cloro e excesso de base (BE); em bolsas de concentrados de
35 hemácias (CH) de cães, refrigeradas entre 2°C e 6°C e preservadas em CPD/SAG-M por 42
36 dias. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram analisados logo após a
37 centrifugação (T0) e a cada sete dias, até 42 dias após o armazenamento (T7, T14, T21,
38 T28, T35 e T42). Foram selecionados 48 doadores de sangue com peso superior a 28 kg,
39 com idades entre 2 a 8 anos, saudáveis, de comportamento dócil para coletar de 350 a
40 450mL de sangue. Inicialmente, foram verificadas a distribuição normal (teste de Shapiro-
41 Wilk) e a homogeneidade da variância (teste de Levene). Se esses critérios fossem
42 atingidos ($p > 0.05$), para comparar o T0 entre si, seis diferentes tempos de coleta foram
43 avaliados por Wilcoxon. O número de hemácias (HE) e os leucócitos totais (LT)
44 diminuíram durante o armazenamento, enquanto o volume globular (VG), o volume
45 corpuscular médio (VCM) e o grau de hemólise aumentaram. Os níveis de glicose,
46 bicarbonato e pH diminuíram significativamente ao longo dos tempos experimentais. Já os
47 níveis de potássio, lactato e o *déficit* do excesso de base (BE) aumentaram com o tempo.
48 Os resultados obtidos permitiram concluir que o armazenamento de CH caninos produz
49 alterações hematológicas e bioquímicas na qualidade do sangue durante o período
50 estudado, porém essas alterações não parecem inviabilizar seu uso até os 28 dias de
51 armazenamento.
52

1 **Palavras chave:** banco de sangue, hemocomponentes, medicina transfusional, controle de
2 qualidade

6 **Abstract**

8 Transfusion therapy is a common treatment modality in contemporary medical practice.
9 Red blood cells undergo changes during storage, which may compromise their
10 functionality and viability after transfusion. The aim of this study was to describe
11 hematological alterations such as: red blood cell count (HE), globular volume (GV), mean
12 corpuscular volume (MCV), hemoglobin (HB), total leukocytes (LT) and degree of
13 hemolysis (hemolysis%); and biochemicals such as glucose, lactate, pH, bicarbonate
14 concentration, sodium, potassium, chlorine and base excess (BE); in canine packed red
15 blood cells (RBC), refrigerated at 2°C to 6°C and preserved in CPD/SAG-M for 42 days.
16 Hematological and biochemical parameters were analyzed immediately after centrifugation
17 (T0) and every seven days, up to 42 days after storage (T7, T14, T21, T28, T35 and
18 T42). Forty-eight healthy blood donors weighing more than 28 kg, aged 2 to 8 years, with
19 docile behavior to collect 350 to 450mL of blood were selected. Initially, normal
20 distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test) were verified.
21 If these criteria were met ($p > 0.05$), to compare T0 to each other, six different collection
22 times were evaluated by Wilcoxon. The number of red blood cells (HE) and total
23 leukocytes (LT) decreased during storage, while the globular volume (GV), the average
24 corpuscular volume (MCV) and the degree of hemolysis increased. Glucose, bicarbonate
25 and pH levels decreased significantly over experimental times. Potassium, lactate levels
26 and the base excess deficit (BE) increased with time. The results obtained allowed us to
27 conclude that the storage of canine RBC produces hematological and biochemical changes
28 in blood quality during the study period, but these changes do not seem to make it
29 impossible to use until 28 days of storage.

31 **Key words:** blood bank, blood components, transfusion medicine, quality control

34 **Introdução**

35 A terapia transfusional é a base do tratamento de suporte para cães, com diminuição
36 de oxigenação tecidual (Hess, 2009, Ferreira *et al.*, 2014). A medicina transfusional tem-se
37 aprimorado significativamente, com a separação de hemocomponentes e controle de
38 qualidade dos mesmos (Marchi *et al.*, 2015). Além da preocupação com o receptor, há o
39 cuidado na seleção de doadores, pois destes fatores depende o sucesso da transfusão
40 (Marchi *et al.*, 2019).

41 Durante o armazenamento, mesmo com presença das soluções conservadoras, as
42 células ficam em condições muito diferentes da circulação sanguínea, decrescendo
43 substancialmente os níveis de glicose, diminuindo a produção de ATP. Desta forma a
44 bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+) da membrana celular começa a falhar, promovendo
45 efeitos deletérios como alterações morfológicas e bioquímicas progressivas (Bertoletti,

1 2011, Bardyn et al., 2017), que comprometem a sobrevivência da hemácia durante o
2 armazenamento, além de sua qualidade e viabilidade no período pós-transfusional
3 (Dorneles, 2018). Tais mudanças são chamadas de “lesões de armazenamento” ou “lesões
4 de estoque” (Proffitt et al., 2015; Lei, Xiong, 2015).

5 A diminuição na produção de ATP pode levar à hemólise, fator limitante para
6 utilização da bolsa de sangue, devido à redução significativa da capacidade das hemácias
7 de transportar e fornecer oxigênio (O₂) aos tecidos hipóxicos. Além disso, pode
8 desencadear reações transfusionais, comumente descritas como não imunomediadas e
9 causar importantes efeitos vasoativos e oxidativos, que podem levar a lesão renal aguda e
10 disfunção vascular no paciente que recebe a transfusão (Ferreira *et al.*, 2018).

11 Na medicina humana o tempo de armazenamento máximo para bolsas com
12 CPD/SAG-M é de 42 dias (BRASIL, 2014), enquanto na medicina veterinária ainda não há
13 uma regra estabelecida, sendo indicado 28 a 35 dias, e dependendo do refrigerador
14 utilizada, chegando aos 41 dias de armazenamento (Costa Junior *et al.*, 2008; Kessler *et*
15 *al.*, 2010; Obrador *et al.*, 2015). Os critérios para avaliação da viabilidade de sangue
16 armazenado se baseiam na medicina humana, que consideram parâmetros como grau de
17 hemólise (hemólise %) e volume globular (VG) muito importantes para estimar a
18 qualidade do CH (Barros, 2011; Sousa *et. al.*, 2012; Dorneles, 2018; Marchi *et al.*, 2019).

19 Diante do exposto, fica claro que os estudos sobre as lesões de armazenamento
20 ainda são contraditórios na literatura (TISSOT, et al., 2017; ANDRETTA, et al., 2018),
21 havendo necessidade de constantes estudos para garantir a segurança transfusional. O
22 presente trabalho teve como objetivo avaliar a cada sete dias parâmetros hematológicos
23 como: número de hemácias (HE), volume globular (VG), volume corpuscular médio
24 (VCM), hemoglobina total (HB), leucócitos totais (LT) e grau de hemólise (hemólise %);
25 e bioquímicos como: glicose, lactato, pH, concentração de bicarbonato, sódio, potássio,
26 cloro e excesso de base (BE); de CH de cães por 42 dias conservados em CPD/SAG-M.

27 **Material e Métodos**

28 O projeto foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Estadual de
29 Londrina (UEL-CEUA), registrado sob nº 17632.2015.23. As colheitas e o armazenamento
30 do sangue foram realizados no Laboratório de Medicina Transfusional do Hospital
31 Veterinário da UEL (HV-UEL). Foram contactados tutores de 142 cães inicialmente
32 triados de acordo com idade (2 a 8 anos) e peso (acima de 28 kg, não obesos).
33 Posteriormente os animais foram avaliados de acordo com comportamento (dóceis, que
34
35

1 aceitavam contenção física), anamnese (sem queixas de doenças pelos guardiões), exame
2 físico (fisicamente saudáveis) e com os exames laboratoriais como hemograma, ureia,
3 creatinina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, albumina, proteína total, colesterol,
4 triglicerídeos e glicose, realizados no Laboratório de Patologia Clínica do HV-UEL,
5 dentro dos parâmetros de referência.

6 Exames de reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Ehrlichia sp.* e *Babesia sp.*,
7 realizados no Laboratório de Protozoologia do HV-UEL; e sorologia para *Leishmania sp.*,
8 realizados por imunofluorescência indireta no Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública,
9 do HV-UEL, foram negativos.

10 Os critérios de exclusão foram cães que não cumpriam os requisitos supracitados
11 para a inclusão no estudo, bem como os que apresentaram VG abaixo de 40% ou doadores
12 que se agitaram perdendo o acesso venoso. Bolsas que levaram tempo superior a 15
13 minutos para serem preenchidas ou que apresentaram coágulos foram excluídas do estudo.

14 Sobre uma mesa de atendimento, realizou-se a contenção física e tricotomia na
15 região da veia jugular seguida da antissepsia descrita por Marchi *et al.*, (2018). Foram
16 colhidas 48 bolsas com volume mínimo de 350 mL e máximo de 450 mL de sangue. As
17 colheitas ocorreram em uma única punção, utilizando-se bolsa tripla contendo 63 mL de
18 CPD (ácido cítrico-citrato de sódio, fosfato e dextrose) da marca Fresenius® (Barueri, SP,
19 Brasil).

20 Terminada a colheita, as bolsas de sangue total ficaram em repouso em superfície
21 fria e limpa e, após uma hora foram centrifugadas. O protocolo de centrifugação e
22 separação dos hemocomponentes e a preparação do CH foi realizada segundo Marchi *et*
23 *al.*, (2019).

24 Foram avaliados parâmetros hematológicos como: número de hemácias (HE),
25 volume globular (VG), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina total (HB),
26 leucócitos totais (LT), pelo aparelho automático de hematologia veterinária pocH-100 iV
27 Diff®, (Roche, São Paulo, SP, Brasil) no Laboratório de Patologia Clínica, do HV-UEL.
28 No mesmo laboratório também foram realizados os bioquímicos como: glicose e lactato
29 determinados no aparelho Siemens Dimension RXL® (Siemens Healthcare
30 Diagnostics, Eschborn, Germany) por kits específicos da marca Siemens; e determinados
31 os parâmetros de pH, concentração de bicarbonato, sódio, potássio, cloro e excesso de base
32 (BE), no gasômetro OMNI C (Cobas-Roche®, Rotkreuz,
33 Switzerland).

34 Para determinar a hemoglobina extracelular (HBe), foi utilizado o aparelho de

1 espectrofotometria Evolution 60S – Thermo Scientific® (Madison, WI, USA) do
2 Laboratório de Virologia, HV-UEL, utilizando-se a técnica descrita por Toulmond, *et al.*,
3 (1990). A determinação do grau de hemólise (hemólise %), em unidades de CH foi
4 realizada pela fórmula proposta por Tomczak (2008).

5 O CH foi armazenado, em refrigerador comum (Pratice 230 - Consul®), entre 2 a
6 6°C, exclusivo para esta finalidade até os 42 dias. As bolsas só saíram do refrigerador para
7 retirada das amostras nos momentos pré-determinados de análise, não permanecendo
8 tempo superior a 10 minutos fora do refrigerador.

9 O material foi analisado imediatamente após a centrifugação e nos sete, 14, 21, 28,
10 35 e 42 dias de armazenamento, sendo os tempos T0, T7, T14, T21, T28, T35 e T42
11 respectivamente. As amostras para as análises, foram colhidas do segmento da bolsa de
12 sangue. Antes da obtenção da amostra, o sangue contido no segmento da bolsa foi
13 ordenhado em sentido retrógrado e a bolsa então homogeneizada 60 vezes. Esse
14 procedimento foi repetido por três vezes.

15 Os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS Statistic® 20 (IBM,
16 Armonk, NY, EUA). Inicialmente foram verificadas a distribuição normal (teste de
17 Shapiro-Wilk) e a homogeneidade da variância (teste de Levene). Os dados que não
18 atingiram distribuição normal e homogeneidade dos critérios de variância foram analisados
19 pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Foi considerado estatisticamente significativo
20 quando $p < 0.05$.

21 Os resultados foram expressos em forma de mediana, máxima e mínima,
22 comparando-se os tempos analisados com o tempo imediatamente pós-centrifugação (T0).

23

24 **Resultados e Discussão**

25

26 A média de idade dos doadores foi de 4,3 anos ($\pm 2,6$) e o peso médio 37,2 kg
27 ($\pm 9,4$). As raças dos 48 cães que participaram do estudo foram: Golden Retriever (70%),
28 Labradores (10%), Rottweiler (6%), Pit Bull (6%), Pastor Alemão (4%), Boxer (2%) e
29 Husky (2%). A maior parte de doadores da raça Golden se deu devido ao seu tamanho,
30 além do comportamento dócil e tranquilo.

31 Os resultados encontrados no hemograma estão demonstrados na tabela 1. Os
32 valores de T0 foram considerados como valores de referência, pois foram determinados
33 logo após a preparação do CH.

34 No presente estudo o número de hemácias (HE) apresentou diferença significativa à

1 partir do T28 quando comparado ao T0 durante o período de armazenamento, conforme
2 mostrado na tabela 1. Sousa *et al.* (2013), trabalhando com sangue total ovino, e Sobreira
3 *et al.* (2013) que estudaram CH de cães, também observaram uma diminuição no número
4 de total de HE durante a estocagem e atribuem ao fato de que há uma destruição das
5 hemácias ao longo do período de armazenamento.

6 Quanto ao VG houve uma diminuição significativa em T7 e T14, quando
7 comparado ao T0 ($p < 0.05$), no entanto esse parâmetro aumentou nos momentos
8 subsequentes (T21-T42). O VG aumentou 9,2% nos 42 dias de armazenamento (T42)
9 quando comparados ao CH no T0 (Tabela 1). Tais resultados corroboram os estudos
10 prévios realizados por Sousa *et al.* (2013) com ovinos, Tavares (2011), asininos e Brugué e
11 colaboradores (2018), com felinos. Os autores justificam tal alteração, pois, com o passar
12 do tempo de armazenamento há alteração no tamanho das hemácias, relacionada à falha da
13 bomba Na^+/K^+ . O influxo de Na^+ e o extravasamento de K^+ para o meio extracelular leva à
14 entrada de líquido para dentro das células, promovendo variações no tamanho das
15 hemácias, que reflete na mudança do volume corpuscular médio (VCM) durante o tempo
16 de armazenamento (Hess e Greenwalt, 2002). No presente estudo, o VCM acompanhou as
17 alterações do VG, diminuindo em T7 e aumentando significativamente em T42. O mesmo
18 foi observado por Tavares, (2011) e Sousa *et al.* (2013). Hess e Greenwalt (2002), afirmam
19 que este efeito edemaciante sobre as células é desejável, pois reduz alterações
20 morfológicas como a formação de equinócitos.

21 Observando alterações nas hemácias por microscópio eletrônico de varredura,
22 Mustafa *et al.* (2016), explicam que hemácias armazenadas perdem parte de sua membrana
23 resultando na diminuição da proporção área-superfície e volume e culminando com a
24 formação de esfero-equinócitos.

25 Trabalhos realizados com equinos por Mudge *et al.*, (2004), Niinisto (2008) e
26 Dorneles (2018); em cães por Costa Junior (2010); e em caprinos por Tavares, (2013) não
27 encontraram alterações nos valores de VG e VCM durante o período de armazenamento,
28 que chegou a ser de 60 dias. O aumento do tamanho das células nem sempre é constatado
29 provavelmente devido a ruptura de espículas e saída de material citosólicos das hemácias
30 (Costa Junior, 2010; Dorneles 2018).

31 A HB não se alterou durante o armazenamento corroborando os resultados de
32 Mudge (2004) e Niinisto (2008) e Sobreira *et al.* (2013).

33 O grau de hemólise (hemólise %), estimado pela HBe, aumentou durante o
34 armazenamento de forma significativa ($p < 0.05$) (Figura 1), semelhante ao ocorrido nos

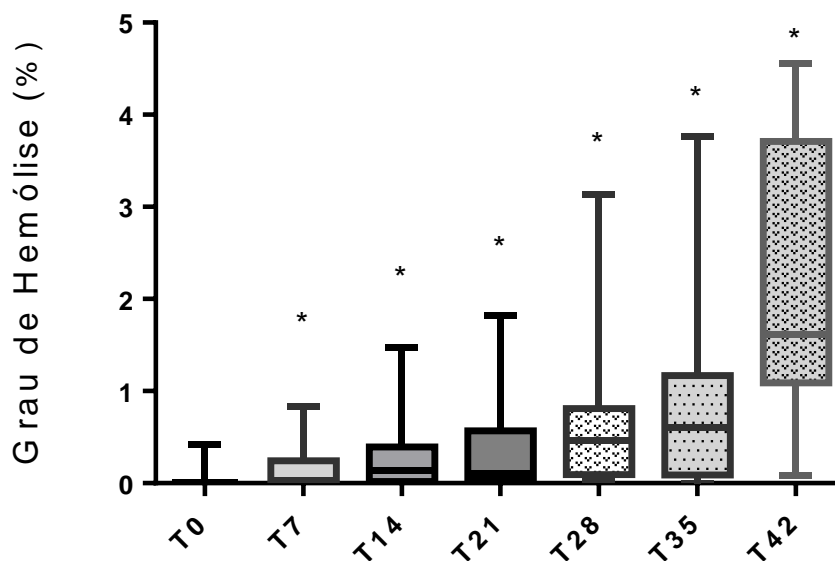
1 estudos realizados por Souza *et al.* (2009), Hess *et al.* (2009), Tomczak *et al.* (2010), Costa
2 Junior (2010), Gkoumassi *et al.* (2012), Brugué *et al.*, (2018), Ferreira *et al.* (2018) e
3 Marchi *et al.* (2019), que avaliaram sangue humano e de animais. O aumento da HBe
4 provavelmente se dá pelo efeito cumulativo de substâncias pró-inflamatórias, em sua
5 maioria liberadas por leucócitos e plaquetas, juntamente com a depleção de ATP que reduz
6 a integridade das membranas de hemácias (Corsi *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2018).
7 Estudos de Blasi *et al.*, (2012) e Mustafa *et al.*, (2016), demonstraram que o tempo de
8 armazenamento aumenta a fragilidade osmótica das hemácias, por perderem a morfologia
9 normal, o que favorece a hemólise e, conseqüentemente o aumento nos níveis de HBe.

10 A hemólise é um fator limitante para a vida útil do CH, não apenas porque diminui
11 significativamente a capacidade das hemácias de transportar e fornecer O₂ aos tecidos
12 hipóxicos, mas também porque pode ser responsável por reações transfusionais,
13 comumente descritas como hemolíticas não imunomediadas, que contribuem para uma
14 menor eficácia transfusional (Harrell e Kristensen, 1995; Ferreira *et al.*, 2018). Além disso,
15 quando a HBe aumenta sua concentração livre causa importantes efeitos vasoativos e
16 oxidativos que podem levar a disfunção vascular e lesão renal aguda (Hess e Greenwalt,
17 2002; Korte e Verhoeven, 2004).

18 Devido às evidências científicas dos efeitos deletérios de Hbe, os bancos de sangue
19 humanos estipulam que a porcentagem máxima de hemólise da unidade seja de 1% no
20 último dia de armazenamento (Garraud *et al.*, 2017; Heddle *et al.*, 2017), segundo a
21 legislação brasileira (BRASIL, 2014). Na falta de parâmetros para basear valores limítrofes
22 nas espécies de interesse veterinário, tem-se utilizado uma analogia com a exigência para
23 humanos (Ferreira *et al.*, 2018; Marchi *et al.* (2019). Desta forma, seguindo os padrões
24 preconizados em bancos de sangue humanos, o grau de hemólise ocorrido em 8% dos CH
25 no T28, 16% dos CH no T35 e 39% dos CH no T42 deste estudo, descartariam o uso do
26 CH. Até o T21 nenhum CH apresentou grau de hemólise superior a 1%.

27 Quanto a contagem de leucócitos (LT), há um decréscimo significativo a partir do
28 T14 até o T42 ($p < 0.05$) (Tabela 1), que possivelmente esteja relacionado à degranulação
29 dos polimorfonucleares (Souza *et al.*, 2009), podendo levar a lesões da membrana
30 plasmática das hemácias, culminando em alterações na conformação e elasticidade normal
31 das hemácias, acelerando a hemólise durante o armazenamento (Bain, 2006, Sawant *et al.*,
32 2007), salientando a importância da utilização de CH leucorreduzidos (Racek *et al.*, 2001).

- 1 **Figura 1.** Grau de hemólise (hemólise %) do concentrado de hemácias de cães (n=48),
2 conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.



3

- 4 Os dados são apresentados como mediana (máximo e mínimo). * $p < 0.05$ comparado ao T0. Teste de
5 Wilcoxon. T0 (imediatamente após a centrifugação), no T7 (sete dias de armazenamento), T14 (14 dias),
6 T21 (21 dias), T28 (28 dias), T35 (35 dias) e T42 (42 dias).

Tabela 1 – Valores de HE, VG, HB, VCM e leucócitos totais do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.

<i>Variáveis</i>	T0	T7	T14	T21	T28	T35	T42
HE ($\times 10^6 \text{ cel}/\mu\text{l}$)	8.46 (6.70-10.15)	8.39 (6.94-9.74)	8.36 (6.75-9.38)	8.37 (6.79-9.53)	8.34* (6.95-9.20)	8.34* (6.63-9.34)	8.32* (6.78-9.24)
VG (%)	52.62 (42.50-62.50)	50.24* (41.20-59.60)	51.02* (40.40-63.40)	52.25 (41.80-65.30)	53.62 (44.50-66.00)	55.69* (46.20-69.70)	57.48* (47.00-71.40)
HB (g/dl)	18.20 (14.30-21.80)	18.10 (14.40-21.50)	18.18 (14.20-21.10)	18.20 (14.30-22.10)	18.09 (14.30-22.00)	18.08 (14.40-22.00)	18.07 (14.20-21.90)
VCM (fL)	62.23 (47.70-66.50)	60.26* (57.20-63.60)	60.57* (57.10-65.50)	61.56 (57.60-69.10)	63.45 (59.20-70.30)	65.61* (59.50-73.50)	67.43* (60.60-74.50)
Leucócitos Totais ($\times 10^3 \text{ cel}/\mu\text{l}$)	12.79 (7.30-20.90)	13.86 (8.20-23.20)	12.68 (7.00-21.10)	11.69* (5.00-19.7)	10.15* (4.90-15.30)	8.89* (4.50-12.50)	8.45* (4.50-12.80)

HE - contagem total de hemácias; VG - volume globular; HB - hemoglobina total; VCM - volume corpuscular médio; hemólise (%) - percentual de hemólise, LT - leucócitos totais. Os dados são apresentados como mediana (máximo e mínimo). * $p < 0.05$ comparado ao T0. Teste de Wilcoxon. T0 (imediatamente após a centrifugação), no T7 (sete dias de armazenamento), T14 (14 dias), T21 (21 dias), T28 (28 dias), T35 (35 dias) e T42 (42 dias).

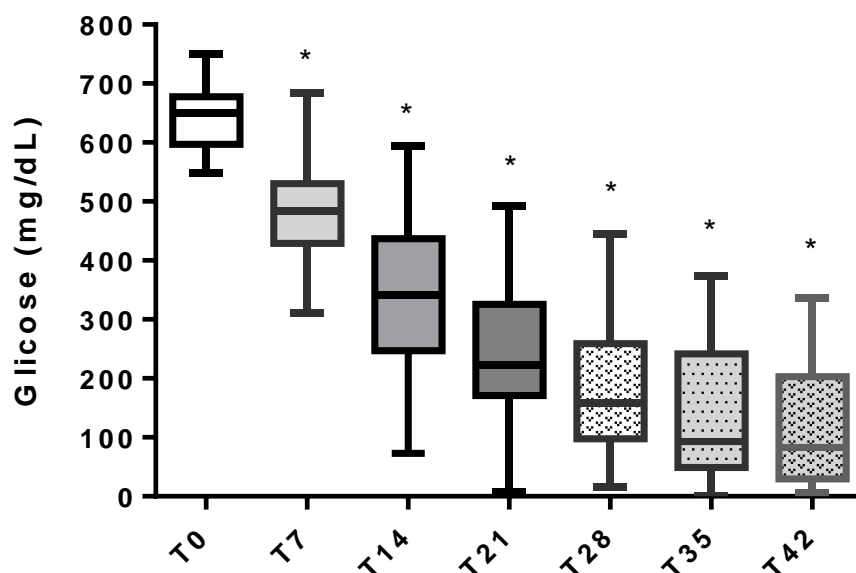
1 Devido à presença de dextrose na solução conservadora, elevados níveis de
2 glicose foram encontrados no T0 dos CH [640.41(548.00-751.00)]. Os níveis de glicose
3 do CH diminuíram significativamente ($p<0.05$) ao longo do estudo quando comparados
4 aos valores obtidos no momento inicial (T0), chegando a 18% no T42 [115.37(5.00-
5 337.00)], conforme demonstrado na figura 2. Resultados similares foram apresentados
6 por Costa Junior (2010), que também estudou CH de cães conservadas em CPD/SAG-
7 M. Costa Junior *et al.* (2008), que compararam o sangue total conservado em CPDA-1 e
8 CPD/SAG-M, houve uma menor redução desta variável ao final do período de 40 dias
9 no grupo CPD/SAG-M. Laposy e Nogueira (2011), que avaliaram sangue total,
10 armazenado em CPDA-1 até os 30 dias, também observaram uma diminuição
11 significativa dessa variável ao longo do tempo, corroborando os resultados obtidos no
12 presente estudo. Provavelmente esta diminuição foi reflexo do consumo da dextrose
13 para obtenção de ATP e manutenção do metabolismo celular.

14 A glicose é um parâmetro normalmente utilizado na rotina dos bancos de sangue
15 humanos para avaliar sua qualidade, onde ao final do período de conservação os níveis
16 desse carboidrato devem ser superiores a 50mg/dL. (Sousa *et al.*, 2012; Dorneles,
17 2018). Ao final do tempo experimental a mediana dos valores de glicose se manteve
18 superior a 50 mg/dL demonstrando a viabilidade dos CH (Tomczak, 2008; Sousa *et al.*,
19 2012; Andretta *et al.*, 2018). No entanto, 60% desses CH apresentaram valores
20 inferiores a 50mg/dL no T42, 52% no T35, 20% no T28, reforçando assim a
21 necessidade da verificação do controle de qualidade dos CH antes do uso.

22 Houve um aumento dos níveis de lactato no decorrer do tempo de
23 armazenamento do T0 [2.10(0.90-5.70)] a T42 [35.66(21.00-43.80)] (Figura 3). Estudos
24 anteriores realizados verificaram aumento da concentração de lactato. Ribeiro Filho *et*
25 *al.* (1994), que avaliaram sangue bovino conservado em bolsas CPDA-1, Mudge *et al.*,
26 (2004) com sangue total de equinos e Niinisto *et al.* (2008) e Dorneles (2018) com CH
27 de equinos, mencionam o aumento nos níveis de lactato, correlacionando-o ao longo do
28 período de armazenamento. Durante o armazenamento das hemácias a glicose é
29 consumida para produção de ATP, ocorrendo simultaneamente a produção de uma série
30 de metabólitos, entre eles o lactato.

31
32
33

1 **Figura 2.** Valores de glicose do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado
 2 em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.
 3



4

5 Os dados são apresentados como mediana (máximo e mínimo). * $p < 0.05$ comparado ao T0. Teste de
 6 Wilcoxon. T0 (imediatamente após a centrifugação), no T7 (sete dias de armazenamento), T14 (14
 7 dias), T21 (21 dias), T28 (28 dias), T35 (35 dias) e T42 (42 dias).
 8

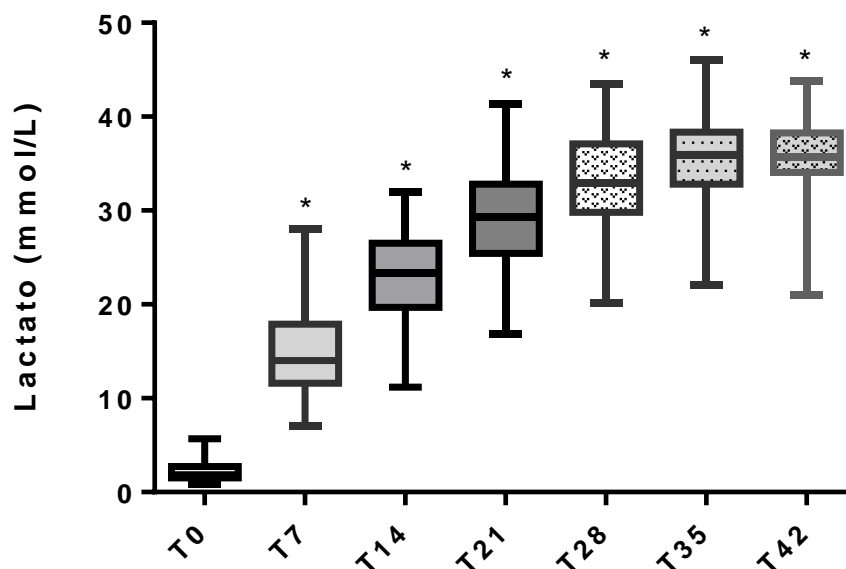
8

9 No presente estudo logo após a centrifugação da bolsa o pH foi inferior ao
 10 fisiológico, provavelmente devido à presença de ácido cítrico na solução conservadora
 11 (Costa Junior *et al.*, 2008). Mesmo abaixo do valor de referência para sangue, o pH no
 12 T0, manteve-se acima de sete, semelhante ao encontrado por Ribeiro Filho *et al.* (1994),
 13 Hess *et al.* (2002), Kurup *et al.* (2003), Costa Junior (2010) e Laposy e Nogueira
 14 (2011). Porém, Costa Junior *et al.* (2008), Patel *et al.* (2013) e Moroz (2015), que
 15 estudaram sangue canino e suíno, obtiveram níveis do pH abaixo de sete (variando de
 16 6,75 a 6,99) no seu primeiro dia de conservação.

17 Assim como nos trabalhos supracitados, os valores do pH do presente estudo
 18 apresentaram uma diminuição significativa durante o armazenamento (T7 ao T42)
 19 quando comparados ao T0 (< 0.05), (Tabela 2), representando um aumento na acidez do
 20 meio.
 21

21

1 **Figura 3.** Valores de lactato do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado
 2 em bolsas CPD-SAG/M, durante 42 dias de armazenamento.
 3



4

5 Os dados são apresentados como mediana (máximo e mínimo). * $p < 0.05$ comparado ao T0. Teste de
 6 Wilcoxon. T0 (imediatamente após a centrifugação), no T7 (sete dias de armazenamento), T14 (14
 7 dias), T21 (21 dias), T28 (28 dias), T35 (35 dias) e T42 (42 dias).
 8

9 Fisiologicamente, na corrente sanguínea, existem inúmeros mecanismos
 10 responsáveis por manter o pH dentro de um estreito limite de normalidade 7,31 a 7,42
 11 (anexo1) (Kaneko, 2008). A queda do pH nessas circunstâncias é descrita como
 12 decorrência do acúmulo de ácido láctico proveniente da glicólise promovida pelas
 13 hemácias (Moroz, 2015). Mesmo em baixas temperaturas (2 e 6 °C), as hemácias
 14 continuam produzindo ácido láctico como metabólito, reduzindo o pH e,
 15 conseqüentemente, sua viabilidade (Costa Junior *et al.*, 2008; Kisielewicz e Self, 2014).

16 A diminuição do pH observada nesse estudo provavelmente se deu pelos
 17 metabólitos ácidos provenientes do metabolismo anaeróbico das hemácias durante a
 18 conservação, principalmente o lactato. Quando retirado de seu ambiente *in vivo* e
 19 armazenado em condições extracorpóreas, o sangue possui poucos recursos para
 20 compensar o contínuo metabolismo celular e eliminar o acúmulo de metabólitos que,
 21 invariavelmente, levam a diminuição constante do pH (Genetet e Mannoni, 1980;
 22 Dorneles, 2018).

1 **Tabela 2** - Valores de pH, cHCO_3 , K^+ , Na^+ , Cl^- , BE do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante 42
 2 dias de armazenamento.

3

<i>Variáveis</i>	T0	T7	T14	T21	T28	T35	T42
<i>pH</i>	7.03 (6.64-7.12)	6.76* (6.60-7.06)	6.59* (6.44-6.90)	6.43* (6.27-6.74)	6.33* (6.11-6.67)	6.25* (6.06-6.61)	6.21* (6.06-6.54)
<i>cHCO₃</i> (<i>mEq/L</i>)	11.56 (6.30-17.20)	9.45* (5.90-14.20)	7.10* (4.20-17.90)	6.74* (3.20-36.50)	4.36* (1.60-22.20)	3.20* (0.90-23.80)	2.44* (0.60-29.10)
<i>K⁺</i> (<i>mmol/L</i>)	1.86 (1.32-3.36)	3.77* (1.84-5.33)	4.47* (3.44-9.95)	4.79* (3.83-10.70)	5.00* (4.07-6.40)	5.17* (4.36-6.48)	5.27* (4.50-6.93)
<i>Na⁺</i> (<i>mmol/L</i>)	147.93 (135.90-288.70)	147.91* (143.30-156.80)	151.46* (143.80-164.30)	152.8* (143.50-163.50)	155.44* (148.50-170.40)	156.97* (149.60-195.90)	159.00* (151.10-171.60)
<i>Cl⁻</i> (<i>mmol/L</i>)	106.59 (97.00-111.40)	106.98 (97.00-141.50)	106.14 (94.00-113.00)	105.66 (94.00-112.80)	105.82 (96.00-113.80)	105.35 (94.00-115.70)	104.26* (94.00-116.50)
<i>BE</i> (<i>mmol/L</i>)	-18.66 (-23.10_-14.10)	-26.82* (-33.50_-17.00)	-32.98* (-38.20_-25.80)	-37.60* (-42.70_-28.90)	-41.48* (-51.20_-30.70)	-44.05* (-52.50_-33.30)	-45.50* (-50.00_-36.00)

4

5 pH - potencial Hidrogeniônico; cHCO_3 – Bicarbonato; K^+ – Potássio; Na^+ – Sódio; Cl^- - Cloreto; BE - excesso de base. Os dados são apresentados como mediana (máximo e
 6 mínimo). * $p < 0.05$ comparado ao T0. Teste de Wilcoxon. T0 (imediatamente após a centrifugação), no T7 (sete dias de armazenamento), T14 (14 dias), T21 (21 dias), T28
 7 (28 dias), T35 (35 dias) e T42 (42 dias).

1 A acidificação do meio constitui um dos grandes problemas na conservação das
2 hemácias (Tomczak *et al.*, 2010). De maneira geral, no contexto de constante queda do
3 pH, acredita-se que o valor limite de pH ao qual as células humanas podem ser
4 submetidas com continuidade da função metabólica é de 6,2 (Hess e Greenwalt, 2002;
5 Sousa *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2013).

6 Os níveis de pH e ATP em sangue armazenado estão diretamente relacionados à
7 sua viabilidade e efetividade pós transfusional, pois são os principais fatores
8 relacionados à disponibilidade de 2,3-DPG, sendo que quanto menor a disponibilidade
9 de 2,3-DPG, maior a afinidade da hemoglobina por O₂ e conseqüentemente menor
10 capacidade das hemácias liberarem O₂ aos tecidos (Scott *et al.*, 2005; Costa Junior *et al.*,
11 2008; Dorneles, 2018). Níveis de pH superiores a 7 favorecem a síntese de 2,3-
12 DPG, enquanto níveis menores, favorecem a sua degradação. Logo, é possível afirmar
13 que quanto mais rápido for a diminuição do pH durante o período de armazenamento,
14 mais rápido se dará a degradação e diminuição dos níveis de 2,3-DPG, comprometendo
15 a qualidade e viabilidade do sangue (KURUP, 2003; Dorneles, 2018).

16 Neste trabalho houve uma redução significativa ($p < 0.05$) nos níveis de
17 bicarbonato (HCO₃⁻) dos tempos T7 ao T42 quando comparados ao T0 (Tabela 2).

18 No sangue circulante o HCO₃⁻ é um sistema tampão no organismo, importante
19 para a manutenção do pH em valores fisiológicos extracelulares (Randall *et al.*, 2008;
20 Dorneles, 2018). Na tentativa de neutralizar os ácidos produzidos, há um aumento
21 gradativo na produção do HCO₃⁻, porém a diminuição se explica devido ao consumo
22 deste íon no controle da acidez, neutralizando o lactato produzido pelo metabolismo das
23 células (Ribeiro Filho *et al.*, 1994).

24 O mesmo padrão dos valores de HCO₃⁻ deste estudo (11,56 mmol/L), foi
25 encontrado nos experimentos com sangue de cães conduzidos por Costa Junior *et al.*
26 (2008), Costa Junior (2010), sendo os valores médios de 14 e 9,67 mmol/L de HCO₃⁻,
27 respectivamente. Por outro lado, Sousa *et al.* (2009) e Dorneles (2018) notaram uma
28 maior disponibilidade de HCO₃⁻ no sangue ovino e equino comparado ao canino, cujas
29 médias em T0 foram no sangue equino de 23 mmol/L e no ovino de 19,88 mmol/L,
30 respectivamente.

31 No presente estudo, analisando o K⁺, observou-se que os níveis aumentaram de
32 forma considerável e significativa, durante o armazenamento, quando comparados ao
33 T0 (Tabela 2). Os valores encontrados foram muito semelhantes aos de Costa Junior *et al.*
34 (2008) e Laposy e Nogueira (2011). No estudo conduzido por Costa Junior (2010)

1 com bolsas de CH de sangue canino, também houve um aumento significativo durante o
2 período de conservação, porém no 40º dia o nível de K^+ foi bem mais alto que no
3 presente trabalho. As concentrações de K^+ do sangue canino armazenado, não podem
4 ser comparadas às de outras espécies devido à diferença individual na concentração
5 intraeritrocitária desse eletrólito (Costa Junior, 2010). Para a espécie humana, são
6 aceitáveis níveis menores que 100 mmol/L de K^+ ao final do período de armazenamento
7 de CH (Tomzack, 2008; Andreatta *et al.*, 2018), enquanto nos cães embora não existam
8 valores considerados aceitos, os valores encontrados no último dia de armazenamento
9 variam entre 3,7-5,8 (Costa Junior *et al.* 2008; Laposy e Nogueira, 2011).

10 O aumento nos níveis de K^+ extracelular pode se dar pela redução da função da
11 bomba de Na^+/K^+ , já que as bolsas devem ser mantidas em baixas temperaturas,
12 permitindo assim a saída de íons citosólicos (Lion *et al.*, 2009, Sut *et al.*, 2017). No
13 entanto, Costa Junior *et al.* (2008) e Costa Junior (2010), mostraram que esse aumento
14 pode ser indício de hemólise, por isso o K^+ está entre os bioquímicos utilizados na rotina
15 dos bancos de sangue para avaliar a qualidade do produto armazenado (Chin-Yee *et al.*,
16 1997; Andreatta *et al.*, 2018).

17 Os valores do K^+ plasmático também podem ser correlacionados com os valores
18 do pH sanguíneo, sendo esses valores inversamente proporcionais, corroborando os
19 estudos de Bush (2004), Costa Junior *et al.* (2008) e Costa Junior em 2010. Segundo
20 esses autores, o pH tem influência na integridade da membrana plasmática, havendo
21 com a queda do pH, a migração do K^+ contido no fluido intracelular para o meio
22 extracelular.

23 Como o armazenamento prolongado de sangue causa o acúmulo de K^+ no meio
24 extracelular, tem-se associado à ocorrência de arritmia cardíaca em pacientes (Van de
25 Watering, 2011). Por isso, certos receptores, como pacientes pediátricos ou pacientes
26 que passaram por cirurgias de revascularização do miocárdio, não podem ser
27 transfundidos com unidades armazenadas sem que antes haja a remoção do K^+ liberado
28 das hemácias (Mustaffa *et al.*, 2016).

29 No que diz respeito aos níveis de Na^+ , pode-se observar um aumento
30 significativo durante o período de estocagem dos CH quando se compara ao T0 (Tabela
31 2). Estudos conduzidos por Sousa *et al.* (2013), observaram uma diminuição
32 significativa nos níveis de Na^+ conforme o aumento do tempo de armazenamento,
33 inferindo essa alteração a falha na bomba de Na^+/K^+ . Nos estudos de Mudge *et al.*
34 (2004), Costa Junior *et al.* (2008) e Dorneles (2018), os níveis de Na^+ na bolsa de CH

1 não sofreram alterações durante o tempo de armazenamento. Como o Na⁺ é um
2 eletrólito tipicamente extracelular, pode-se sugerir que não houve perda de água para o
3 exterior das bolsas, assim como no presente estudo.

4 As concentrações de íons cloreto foram estatisticamente menores que T0 apenas
5 no T42 (p<0.05), (Tabela 2). O estudo de Mudge (2004), que armazenou sangue total de
6 equino durante 31 dias, também não encontrou diferença significativa (p>0.05) nesse
7 parâmetro. O que pode ocorrer com o passar do tempo de armazenamento é um possível
8 esgotamento das reservas intracelulares (Dorneles, 2018).

9 Com relação ao BE houve uma diminuição significativa (<0.05) quando os
10 tempos foram comparados ao T0 (Tabela 2). Em caprinos, Tavares (2013) e em equinos,
11 Dorneles (2018) relatou um comportamento semelhante, com aumento do *déficit*
12 conforme o avanço do tempo de armazenamento. Sugere-se que os valores do BE são
13 influenciados pelo equilíbrio ácido-base, acompanhando a diminuição do pH e dos
14 níveis de bicarbonato. É importante observar que já há um aumento no BE desde T0,
15 provavelmente devido à acidez (íons H⁺) do diluente (Tavares, 2013).

17 **Conclusão**

18 Após a análise dos resultados obtidos e nas condições deste estudo, pode-se
19 concluir que as lesões de armazenamento provocam alterações hematológicas e
20 bioquímicas nos CH canino que se iniciam ainda na primeira semana de armazenamento
21 e progridem até os 42 dias, alterando assim a qualidade do sangue quando utilizadas
22 bolsas contendo CPD/SAG-M. No entanto, das alterações encontradas apenas o grau de
23 hemólise excedeu e a glicose diminuiu aos níveis conhecidos como seguro para
24 pacientes. As unidades de CH preservadas por mais de 28 dias só podem ser
25 administradas com segurança se testadas quanto ao grau de hemólise e glicose antes de
26 seu uso, uma vez que nesse experimento aos 28 dias de armazenamento algumas
27 unidades excederam o limite de 1% de grau de hemólise permitido pela legislação de
28 bancos humanos, assim como tiveram valores de glicose inferior a 50mg/dL.

30 **Referências**

- 31 BAIN, B.J. Morfologia das células sanguíneas. In: Células Sanguíneas: **Um guia**
32 **prático. Artmed**, 4 ed, p.73-187, 2006.
33
34
35 BARDYN, M; MAYE, S.; LESCH, A.; TISSOT, J.D.; CORTÉS-SALAZAR, F. et al. the
36 antiox- idant capacity of erythrocyte concentrates is increased during the first week of

1 storage and correlated with the uric acid level. **Vox Sanguinis**, 2017.
2 <http://dx.doi.org/10.1111/vox.12563>.

3
4 **BARROS, I.O. Avaliação da conservação do sangue total de jumentos (equus**
5 **asinus) acondicionado em bolsas de sangue do tipo CPDA-1 e CPD/SAG-M.**
6 2011.79f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural
7 do Semi-Árido.

8
9 BRASIL. Ministério da Saúde. Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue.
10 Resolução RDC nº34, de 11 de junho de 2014. Disponível
11 em:http://www.saude.rs.gov.br/upload/1418735690_Resolucao%20_%20RDC%20AN
12 [VIS%20_034_%20de%2011%20de%20junho%20de%202014.pdf](http://www.saude.rs.gov.br/upload/1418735690_Resolucao%20_%20RDC%20AN). Acesso em: 20 de
13 novembro de 2016.

14
15 **BERTOLETTI, B. Peroxidação lipídica e parâmetros bioquímicos do sangue total**
16 **felino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M. 2011. 42f.**
17 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa
18 Maria.

19
20 **BUSH, B. M. Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de**
21 **Pequenos Animais**, São Paulo: Roca, 2004.

22
23 CHIN-YEE, I.; ARYA, N.; D'ALMEIDA, M.S. The Red Cell Storage Lesion and its
24 Implication for Transfusion. **Transfusion Scienci**, v18, n.3, p.447-58, 1997.

25
26 CORSI, R.; MCMICHAEL, M.A.; SMITH, S.A, et al. Cytokine concentration in stored
27 canine erythrocyte concentrates. **Journal Veterinary Emergencial Critical Care**, v.24,
28 n.3, p. 59–263, 2014.

29
30 COSTA, E.J.; GUIMARÃES, T.M.P.D.; DE ALMEIDA, N.C.; et al. Comparison of
31 cytokine levels and metabolic parameters of stored platelet concentrates of the
32 Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Brazil. **Revista Brasileira Hematologia**
33 **Hemoterapia**, v.34, n.2, p94-9, 2012.

34
35 COSTA JÚNIOR, J.; VIANA, J.A.; RIBEIRO FILHO, J.D.; FAVARATO, E.S.;
36 MATA, L.C.; ARGÔLO NETO, N. Parâmetros bioquímicos e hemogasométricos do
37 sangue total canino armazenado em bolsas plásticas contendo. CPDA-1 e CPD/SAG-M.
38 **Ciência Rural**, v.38, n.2, p. 378-383, 2008.

39
40 COSTA JUNIOR, J.D. **Avaliações bioquímicas, hemogasométricas e morfológicas**
41 **do sangue canino conservado em bolsas CPD/SAG-M e CPD/SAG-M acrescidas de**
42 **fosfato dissódico**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG
43 Brasil, 2010.

44
45 **DORNELES, T.E.A. Avaliação hemogasométrica, bioquímica e hematológica do**
46 **sangue equino armazenado em bolsa CPDA-1**. Dissertação de mestrado (M) –
47 Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília,
48 2018.

1 EDER, A.F.; CHAMBERS, L.A. **Noninfectious complications of blood transfusion**
2 **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.131, p.708–718, 2007.

3
4 FERREIRA, R. F. R.; GOPEGUI, R. R.; MAIA, S.; MATOS, A. J. F. Laboratory
5 analysis of canine packed red blood cells effects of collection and processing on
6 haemolysis, haemoglobin concentration, haematocrit and blood culture. **Compendium**
7 **Clinical Pathology**, v. 23, n. 5, p. 1395–1401, 2014.

8
9 FERREIRA, R.R.F.; GRAÇA, R.M.C.; CARDOSO, I.M.; et al. In vitro hemolysis of
10 stored units of canine packed red blood cells. **Journal of Veterinary Emergency and**
11 **Critical Care**, v.0, n.0, p.1–6, 2018.

12
13 GARRAUD , O.; TISSOT, J.D.; VLAAR, A.P. Short-term *versus* long-term blood
14 storage. **New England Journal of Medicine**, v.376, p.1091, 2017.

15
16 GENETET, B.; MANONNI, P. Antecedentes históricos. In: **La transfusion ed em**
17 **espanhol**, Habana, Ministério de Cultura Editorial; Científico Técnico, 1980.

18
19 GKOU MASSI, E.; DIJKSTRA-TIEKSTRA, M.J.; HOENTJEN, D.; et al. Hemolysis of
20 red blood cells during processing and storage. **Transfusion**, v.52, n.3, p.489–492, 2012.

21
22 HARRELL, K.A.; KRISTENSEN, A.T. Canine transfusion reactions and their
23 management. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.25,
24 n.6, p.1333– 1364, 1995.

25
26 HARVEY, J. W. The erythrocyte: Physiology, Metabolism and Biochemical disorders.
27 In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), **Clinical Biochemistry of Domestic**
28 **Animals**, 5 ed. Academic Press, London, p.175–240, 2010.

29
30 HESS, J.R.; GREENWALT, T.J. Storage of blood cells: new approaches. **Transfusion**
31 **Medicine Review**, v.16, p. 283-295, 2002.

32
33 HESS, J.R.; SPARROW, R.L.; VAN DER MEER, P.F.; et al. Red blood cell hemolysis
34 during blood bank storage: using national quality management data to answer basic
35 scientific questions. **Transfusion**, v.49, n.12, p.2599–2603, 2009.

36
37 HOLME, S. Current issues related to the quality of stored RBCs. **Transfusion and**
38 **apheresis science**, v.33, p.55-61, 2005.

39
40 HOLOWAYCHUK, M.K.; LEADER, J.L.; MONTEITH, G. Risk factors for
41 transfusion-associated complications and non-survival in dogs receiving packed red
42 blood cell transfusions: 211 cases (2008-2011). **Journal American Veterinary**
43 **Medecine Association**, v.244, n.4, p.431–437, 2014.

44
45 JAIRATH, V.; KAHAN, B.C.; GRAY, A.; DORE, C.J.; MORA, A.; et al. Restrictive
46 versus liberal blood transfusion for acute upper gastrointestinal bleeding (TRIG-
47 GER): a pragmatic, open-label, cluster randomised feasibility trial. **Lancet**, v.386, p.137–44,
48 2015.

- 1 KESSLER, R.J.; RANKIN, S.; YOUNG, S.; et al. Pseudomonas fluorescens
2 contamination of a feline packed red blood cell unit and studies of canine units.
3 **Veterinary Clinical Pathology**, v.39, n.1, p.29–38, 2010.
- 4
5 KISIELEWICZ, C.; SELF, I. A. Canine and feline blood transfusions: controversies and
6 recent advances in administration practices. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**,
7 v.41, n.3, p.233–42, 2014.
- 8
9 KORTE, D.; VERHOEVEN, A.J. Quality determinants of erythrocyte destined for
10 transfusion. **Cell and Molecular Biology**, v.50, p.187-195, 2004.
- 11
12 KURUP, P. A.; ARUN, P.; GAYATHRI, C.R.; et al. Modified formulation of CPDA
13 for storage of whole, and of SAGM for storage of red blood cells, to maintain the
14 concentration of 2,3diphosphoglycerate. **Vox Sanguinis**, v.85, p.253-261, 2003.
- 15
16 LAPOSY, C.B.; NOGUEIRA, R.M.B. Avaliação bioquímica e hemogasométrica de
17 bolsas de sangue (CPDA-1) caninas mantidas sob refrigeração. **Colloquium Agrariae**,
18 v.7, n.2, p.08-13, 2011.
- 19
20 C. LEI AND L.-Z. XIONG, “Perioperative red blood cell transfusion: what we do not
21 know, **Chinese Medical Journal**, v.128, n.17, p.2383–2386, 2015.
- 22
23 LION, N.; CRETZAZ, D.; RUBIN, O.; et al. Stored red blood cells: A changing
24 universe waiting for its maps. **Journal of Proteomics**, v.73, p.374-385, 2010.
- 25
26 MARCHI, M.N.; MARTINS, R.R.; PEREIRA, P.M. Controle de qualidade de bolsas de
27 sangue total e concentrado de hemácias de cães. **Revista Ciência Veterinária Saúde
28 Pública**, v.2, n.2, p.131-141, 2015.
- 29
30 MARCHI, M.N.A.; SARGI, L.F.; MARTINS, R.R., LUZ, P.E.; TANAKA, C.Y.;
31 PEREIRA, U.P.; PEREIRA, P.M. Skin antisepsis protocols for the collection of blood
32 from donor dogs. **Ciência Rural**, v.48, p.05, 2018.
- 33
34 MARCHI, M.N.A.; LUZ, P.E.; MARTINS, R.R., SIMONELLI, S.M.; PEREIRA, U.P.;
35 PEREIRA, P.M. Quality control in the different stages of producing red blood cell
36 concentrate from dogs. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71,
37 n.1, p.93-101, 2019.
- 38
39 McMICHAEL, M.A.; SMITH, S.A.; GALLIGAN, A.; et al. Effect of leukoreduction on
40 transfusion-induced inflammation in dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**,
41 v.24, p.1131–1137, 2010.
- 42
43 MUDGE, M.C.; MACDONALD, M.H.; OWENS, S.D.; et al. Comparison of 4 Blood
44 Storage Methods in a Protocol for Equine Pre-operative Autologous Donation.
45 **Veterinary Surgery**, v.33, p.475– 486, 2004.
- 46
47 NIINISTO, K., RAEKALLIO, M.; SANKARI, S. Storage of equine red blood cells as a
48 concentrate. **The Veterinary Journal**, v.176, n.2, p.227–231, 2008.
- 49
50 OBRADOR, R.; MUSULIN, S.; HANSEN, B. Red blood cell storage lesion. **Journal**

- 1 **of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.25, n.2, p.187–199, 2015.
- 2
- 3 PROFFITT, S.; THOMAS, S.; SWANNETAL, I, Storage of washe dor irradiated red
4 cells in AS -7 improves their in vitro characteristics. **Vox Sanguinis**, vol.109, n.3,
5 p.203–213, 2015.
- 6
- 7 RACEK, J. et al. What is the source of free radicals causing hemolysis in stored blood?
8 **Physiological Research**, v.50, n.4, p.383-388, 2001.
- 9
- 10 RANDALL, D., BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e**
11 **adaptações**, Editora Guanabara Koogan,, 4ªed. p.453-460, 2008.
- 12
- 13 SCOTT, K.L.; LECAK, J.; ACKER, J.P. Biopreservation of blood cells: past, present,
14 and future. **Transfusion Medicine Reviews**, v.19, n.2, p.127-142, 2005.
- 15
- 16 SOBREIRA, M.F.R; AZENHA, E.S.; CASALE, R.V.P.; et al. Alterações bioquímicas
17 em bolsas de sangue total e de concentrado de hemácias de cães estocadas por 49 dias
18 **In: 34º Congresso Brasileiro da Anclivepa. Anais...** Natal, 2013. (Resumo)
- 19
- 20 SOUSA, R.; BARRETO-JÚNIOR, R.A.; SOUSA, I.K.F.; CHAVES, D.F.; SOARES,
21 H.S.; BARROS, I.O.; MINERVINO, A.H.H.; ORTOLANI, E.L. Evaluation of
22 hematologic, blood gas, and select biochemical variables in ovine whole blood stored in
23 CPDA-1 bags. **Veterinary Clinical Pathology**, v.42, n.1, p.27–30, 2013.
- 24
- 25 SOUSA, R.; BARROS, I.O.; TAVARES, M.D.; SOUSA, I.K.F.; OLIVEIRA, G.B.;
26 MINERVINO, A.H.H.; BARRETO JUNIOR, R.A. Lesões de armazenamento durante a
27 conservação de sangue nas diferentes espécies: uma revisão. **Acta Veterinaria**
28 **Brasilica**, v.6, n.2, p.68-79, 2012.
- 29
- 30 SAWANT, R.B.; JATHAR, S.K.; RAJADHYAKSHA, S.B.; et al. Red cell hemolysis
31 during processing and storage. **Asian Journal Transfusion Science**, v.1, n.2, p.47–51,
32 2007.
- 33
- 34 SUT, C.; TARIKET, S.; CHOU, M.L. et al. Duration of red blood cell storage and
35 inflammatory marker generation. **Blood Transfusion**, v.15, n.2, p.145-52, 2017.
- 36
- 37 TAVARES M.D.; BARROS, I.O.; SOUSA, R.; FIRMINO, P.R.; RÊGO, R.O.;
38 GAMELEIRA, J.S.; SOUZA, F.J.A.; ABRANTES, M.R.; MINERVINO, A.H.H.;
39 BARRETO-JÚNIOR, R.A. 2011. Avaliação hematológica de sangue total asinino
40 (*Equus asinus*) armazenado em bolsas cpda-1. **In: Anais do 38º Congresso Brasileiro**
41 **de Medicina Veterinária.** Disponível em
42 <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos>.
- 43
- 44 TAVARES, M.D. **Avaliação hematológica, bioquímica e hemogasométrica de**
45 **sangue caprino armazenado em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.** Dissertação
46 (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural do Semi-árido,
47 Mossoró – RN, 2013.
- 48
- 49 TOMCZAK, A.C.T.Q. **Estudos sobre o controle de qualidade de unidades**
50 **transfusionais eritrocitárias.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)

1 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da
2 Universidade Federal do Paraná.

3

4 TOMCZAK, A.C.T.Q.; GRILO, K.T.M.; CASTRO, J.M.; et al. Estudo de métodos
5 laboratoriais para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias no
6 centro de hematologia e hemoterapia do Paraná (Hemepar), Brasil. **Revista Brasileira**
7 **Hematologia e Hemoterapia**. v.3, n.3, p.209-214, 2010.

8

9 WAN J., FORSYTH A. M., AND STONE H. A. Red blood cell dynamics: From cell
10 deformation to ATP release, **Integrative Biology**, v.3, n.10, p.972–981, 2011.

11

12 WARDROP, K. J.; YOUNG, J.; WILSON, E. Na *in vitro* evaluation of storage media
13 for the preservation of canine packed red blood cells. **Veterinary Clinical Pathology**,
14 v. 23, p. 83-88, 1994.

15

16

1 **5 ARTIGO B – Artigo redigido sob as normas de publicação do periódico Pesquisa**
2 **Veterinária Brasileira, disponível em: <http://www.scielo.br/revistas/pvb/pinstruct.htm>**
3 **acesso: 05/04/2019.**
4

5 **DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO DO CONCENTRADO DE**
6 **HEMÁCIAS DE CÃES, ARMAZENADO EM BOLSAS COM CPD/SAG-M, POR**
7 **42 DIAS**
8

9 Raquel R. Martins¹, Melca N.A. Marchi¹; Andressa K. Matsumoto²; Daniele Venturini³; Patricia M.
10 Pereira⁴
11

12 ¹Aluno de pós-graduação do programa de Ciência Animal - Universidade Estadual de Londrina -
13 Londrina, PR

14 ²Aluno de pós-graduação do programa de Ciências da Saúde - Universidade Estadual de Londrina -
15 Londrina, PR

16 ³Docente do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR

17 ⁴Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR
18

19 **RESUMO**

20
21 Durante o armazenamento as hemácias sofrem progressiva deterioração, devido ao
22 metabolismo anaeróbico das células que ocasionam uma série de mudanças estruturais e
23 fisiológicas, resultando nas chamadas “lesões de estoque”. O objetivo deste estudo foi
24 avaliar o estresse oxidativo por meio de biomarcadores da peroxidação lipídica
25 (hidroperóxidos lipídicos iniciados por tert-butil - CL-LOOH) e oxidação proteica
26 (produtos avançados de oxidação de proteínas – AOPP), e da atividade das enzimas
27 antioxidantes (superóxido dismutase – SOD e catalase – CAT), de bolsas de
28 concentrado de hemácias (CH) de cães, refrigeradas entre 2°C e 6°C e preservadas em
29 CPD/SAG-M por 42 dias. Foram selecionados 48 doadores de sangue com peso
30 superior a 28 kg, com idades entre 2 a 8 anos, saudáveis, de comportamento dócil para
31 coletar de 350 a 450mL de sangue. Os parâmetros do estresse oxidativo foram
32 analisados logo após a centrifugação (T0) e a cada sete dias até 42 dias após o
33 armazenamento (T7, T14, T21, T28, T35 e T42). Inicialmente, foram verificadas a
34 distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade da variância (teste de
35 Levene’s). Se esses critérios fossem atingidos ($p>0.05$), para comparar o T0 entre si,
36 seis diferentes tempos de coleta foram avaliados por Wilcoxon. Houve diminuição na
37 atividade da enzima SOD nas bolsas de CH ao longo do período de armazenamento,
38 porém não houve variação significativa da CAT. Foi observado um aumento
39 significativo do estresse oxidativo, a partir de T7 até T42 quando comparados ao T0,
40 avaliado pelos níveis de AOPP e CL-LOOH. Os resultados obtidos permitiram concluir
41 que houve alterações na peroxidação lipídica, oxidação proteica e nas enzimas SOD,
42 evidenciando o estresse oxidativo nos CH de cães armazenados por 42 dias. No entanto,
43 as alterações encontradas não nos permitem determinar a até qual momento, as
44 hemácias dos CH estão viáveis, para tanto são necessários estudos *in vivo* que avaliem a
45 resposta pós-transfusional no que diz respeito a esses biomarcadores de estresse
46 oxidativo.
47

48 **Palavras chaves:** Peroxidação lipídica, oxidação proteica, catalase, superóxido
49 dismutase, canino, medicina transfusional.
50

ABSTRACT

During storage, red blood cells undergo progressive deterioration due to the anaerobic metabolism of cells that cause a series of structural and physiological changes, resulting in so-called “stock lesions”. The aim of this study was to evaluate oxidative stress by biomarkers of lipid peroxidation (tert-butyl-initiated lipid hydroperoxides - CL-LOOH) and protein oxidation (advanced protein oxidation products - AOPP), and the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase - SOD and catalase - CAT), from dog red blood cell concentrate (RBC), refrigerated at 2°C to 6°C and preserved in CPD/SAG-M for 42 days. Forty-eight healthy blood donors weighing more than 28 kg, aged 2 to 8 years, with docile behavior to collect 350 to 450mL of blood were selected. Oxidative stress parameters were analyzed immediately after centrifugation (T0) and every seven days up to 42 days after storage (T7, T14, T21, T28, T35 and T42). Initially, normal distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene test) were verified. If these criteria were met ($p > 0.05$), to compare T0 to each other, six different collection times were evaluated by Wilcoxon. There was a decrease in SOD enzyme activity in the RBC during the storage period, but there was no significant variation of CAT. A significant increase in oxidative stress was observed from T7 to T42 when compared to T0, as assessed by AOPP and CL-LOOH levels. The obtained results allowed to conclude that there were alterations in the lipid peroxidation, protein oxidation and SOD enzymes, evidencing the oxidative stress in the canine bags RBC stored for 42 days. However, the changes found do not allow us to determine the extent to which RBC are viable, so in vivo studies are needed to evaluate the post-transfusion response regarding these oxidative stress biomarkers.

key words: Lipid peroxidation, protein oxidation, catalase, superoxide dismutase, transfusion medicine.

Introdução

O concentrado de hemácias (CH) é um hemocomponente fundamental para o tratamento de pacientes com anemias graves de diferentes etiologias e para cumprir este propósito e evitar os efeitos adversos, é importante que as hemácias transfundidas preservem sua capacidade metabólica e suas funções mecânicas (Proffitt et al., 2015).

Quando retiradas da circulação, as hemácias sofrem lesões de armazenamento (Almizraq et al., 2013; Obrador et al., 2015, Prudent et al., 2017) e podem desencadear a liberação endógena de citocinas inflamatórias, ocasionando reações imunológicas transfusionais (McMichael et al., 2010; Callan et al., 2013, Jairath et al., 2015, Tissot et al., 2017). Há também evidências de que o estresse oxidativo desempenhe um papel importante para o desencadeamento dessas lesões (Sekeroglu et al., 2012; Dolobel et al., 2016; Whither et al., 2016).

1 O estresse oxidativo surge quando ocorre um desequilíbrio no balanço de
2 oxirredução (Poli et al., 2008; Santo et al., 2009), resultando em danos principalmente
3 nas membranas lipídicas e nas proteínas citosólicas das células (Delobel et al., 2016;
4 Wither et al., 2016). Conhecidas como lesão de estoque, tais alterações culminam com a
5 morte celular precoce (Antonelou et al., 2012; Koch, 2013; Al-Thani, et al., 2018).

6 As hemácias facilmente tornam-se alvos quando Espécies Reativas de Oxigênio”
7 (EROs), reagem com ácidos graxos poliinsaturados para formar lipoperóxidos que
8 compõem a cascata de reações degenerativas dos lipídeos. Mesmo possuindo alta
9 capacidade de defesa antioxidante, as hemácias são bastante sensíveis aos danos
10 causados pelas EROs durante o armazenamento (Racek et al., 2001; Hess, 2010). A
11 remoção do plasma para obtenção do CH agrava os danos pois perde-se grande parte do
12 suprimento energético e da capacidade antioxidante nativa associada a esse fluido
13 biológico (Silva, 2013, Bardyn et al, 2017b).

14 Os antioxidantes endógenos são compostos por uma variedade de enzimas,
15 dentre elas, a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Independentemente da
16 forma de atuação, a SOD e a CAT neutralizam os radicais antes que estes reajam com
17 os alvos biológicos, prevenindo as reações em cadeia e/ou a ativação das EROs ou ainda
18 transformando-as em compostos menos reativos (Azzi et al., 2004).

19 Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é um processo fisiológico de
20 deterioração oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) que fazem parte
21 estrutura das membranas celulares e alvos das EROs. A LPO ocorre em todas as células
22 aeróbicas e é considerada como o principal mecanismo molecular envolvido no dano
23 oxidativo que leva à morte celular (Dianzani & Barrera, 2008).

24 Os AOPP são os produtos proteicos formados durante o estresse oxidativo pela
25 reação da proteína plasmática com oxidantes clorados, por isso têm sido considerados
26 como ótimos marcadores de danos às proteínas mediadas por oxidantes (Zhou et al.,
27 2010).

28 Em razão do limitado número de doadores de sangue de cães, o controle do
29 armazenamento do produto faz-se totalmente necessário, garantindo que as hemácias
30 após a transfusão cumpram seu papel. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar
31 semanalmente o estresse oxidativo em CH de cães durante 42 dias de armazenamento.

32 **Material e Métodos**

33
34

1 O projeto foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Estadual de
2 Londrina (UEL-CEUA), registrado sob nº 17632.2015.23. As colheitas e o
3 armazenamento do sangue foram realizados no Laboratório de Medicina Transfusional
4 do Hospital Veterinário da UEL (HV-UEL). Foram contactados tutores de 142 cães
5 inicialmente triados de acordo com idade (2 a 8 anos) e peso (acima de 28 kg, não
6 obesos). Posteriormente os animais foram avaliados de acordo com comportamento
7 (dóceis, que aceitavam contenção física), anamnese (sem queixas de doenças pelos
8 guardiões), exame físico (fisicamente saudáveis) e com os exames laboratoriais como
9 hemograma, ureia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, albumina,
10 proteína total, colesterol, triglicérides e glicose, realizados no Laboratório de
11 Patologia Clínica do HV-UEL, dentro dos parâmetros de referência.

12 Exames de reação em cadeia da polimerase (PCR) para *Ehrlichia sp.* e *Babesia sp.*,
13 realizados no Laboratório de Protozoologia do HV-UEL; e sorologia para *Leishmania*
14 *sp.*, realizados por imunofluorescência indireta no Laboratório de Zoonoses e Saúde
15 Pública, do HV-UEL, foram negativos.

16 Os critérios de exclusão foram cães que não cumpriam os requisitos supracitados
17 para a inclusão no estudo, bem como os que apresentaram VG abaixo de 40% ou
18 doadores que se agitaram perdendo o acesso venoso. Bolsas que levaram tempo superior
19 a 15 minutos para serem preenchidas ou que apresentaram coágulos foram excluídas do
20 estudo.

21 Sobre uma mesa de atendimento, realizou-se a contenção física e tricotomia na
22 região da veia jugular seguida da antissepsia descrita por Marchi *et al.*, (2018). Foram
23 colhidas 48 bolsas com volume mínimo de 350 mL e máximo de 450 mL de sangue. As
24 colheitas ocorreram em uma única punção, utilizando-se bolsa tripla contendo 63 mL de
25 CPD (ácido cítrico-citrato de sódio, fosfato e dextrose) da marca Fresenius® (Barueri,
26 SP, Brasil).

27 Terminada a colheita, as bolsas de sangue total ficaram em repouso em
28 superfície fria e limpa e, após uma hora foram centrifugadas. O protocolo de
29 centrifugação e separação dos hemocomponentes e a preparação do CH foi realizada
30 segundo Marchi *et al.*, (2019).

31 O CH foi armazenado, em refrigerador comum (Pratice 230 - Consul®), entre 2
32 a 6°C, exclusivo para esta finalidade até os 42 dias. As bolsas só saíram do refrigerador
33 para retirada das amostras nos momentos pré-determinados de análise, não
34 permanecendo tempo superior a 10 minutos fora do refrigerador.

1 O material foi analisado imediatamente após a centrifugação e nos sete, 14, 21,
2 28, 35 e 42 dias de armazenamento, sendo os tempos T0, T7, T14, T21, T28, T35 e T42
3 respectivamente. As amostras para as análises, foram colhidas do segmento da bolsa de
4 sangue. Antes da obtenção da amostra, o sangue contido no segmento da bolsa foi
5 ordenado em sentido retrógrado e a bolsa então homogeneizada 60 vezes. Esse
6 procedimento foi repetido por três vezes.

7 Ao fim de todas as colheitas, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Pós-
8 Graduação do HU – UEL, e mantidas congeladas a -70°C , em tubos plásticos cônicos.
9 No momento da realização dos testes, as amostras foram deixadas em temperatura
10 ambiente até seu total descongelamento. Para determinação do estresse oxidativo foram
11 avaliadas as enzimas antioxidantes SOD e CAT, a peroxidação proteica pela AOPP e
12 lipídica pelo CL-LOOH, dos CH armazenados, pelos seguintes testes:

13 Determinação da superóxido dismutase (SOD), método do pirogalol (Marklund
14 e Marklund, 1974) e sua reação lida por espectrofotometria, marca ThermoSpectronic®,
15 modelo Helios- α (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 420 nm;

16 Determinação da catalase (CAT), se deu pela técnica descrita por Aebi et al. (1984), e a
17 leitura também foi realizada por espectrofotometria no comprimento de onda de 240nm.

18 Determinação dos produtos avançados da oxidação proteica (AOPP) foram
19 realizadas no plasma usando o método descrito por Witko-Sarsat e colaboradores
20 (1996).

21 A avaliação da formação de lipoperóxidos no plasma foi realizado pelo método
22 de quimiluminescência (QL), adaptando-se a técnica descrita por Gonzalez-Flecha e
23 colaboradores (1991). (contador β marca Beckman® modelo LS 6000, Fullerton,
24 Califórnia, EUA).

25 Os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS Statistic® 20 (IBM,
26 Armonk, NY, EUA). Inicialmente foram verificadas a distribuição normal (teste de
27 Shapiro-Wilk) e a homogeneidade da variância (teste de Levene). Os dados que não
28 atingiram distribuição normal e homogeneidade dos critérios de variância foram
29 analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Foi considerado estatisticamente
30 significativo quando $p < 0.05$.

31 Os resultados foram expressos em forma de mediana, máxima e mínima,
32 comparando-se os tempos analisados com o tempo imediatamente pós-centrifugação
33 (T0).

1 **Resultados e Discussão**

2
3 A média de idade dos doadores foi de 4,3 anos ($\pm 2,6$) e o peso médio 37,2 kg
4 ($\pm 9,4$). As raças dos 48 cães que participaram do estudo foram: Golden retriever (70%),
5 Labradores (10%), Rottweiler (6%), Pit Bull (6%), Pastor Alemão (4%), Boxer (2%) e
6 Husky (2%). A maior parte de doadores da raça Golden se deu devido ao seu tamanho,
7 além do comportamento dócil e tranquilo.

8 Em relação às enzimas antioxidantes, durante o armazenamento houve uma
9 diminuição significativa na atividade da SOD das bolsas de CH, do T7 ao T42 ($p < 0.05$)
10 quando comparada ao T0 (Figura 1). Esse resultado corrobora os dados achados por
11 Fonseca (2016) que avaliou o estresse oxidativo por meio da LPO de sangue total de
12 caprinos, submetidos a transfusão sanguínea homóloga de sangue fresco ou armazenado
13 por 15 e 35 dias. Nesse estudo Fonseca, (2016) observou a diminuição significativa das
14 defesas antioxidantes das hemácias armazenadas por mais tempo.

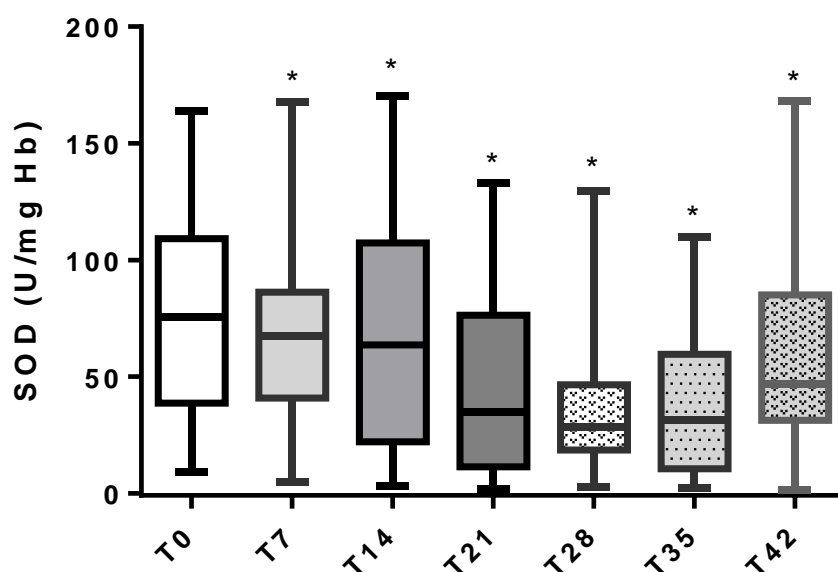
15 Sabe-se que a presença de enzimas como a SOD proporciona proteção das
16 hemácias contra hemólise. Desta forma, sugere-se que neste estudo a menor atividade
17 da SOD nas bolsas de CH está relacionada ao maior tempo de armazenamento que as
18 hemácias foram expostas às EROs, havendo assim maior consumo da enzima SOD e,
19 consequentemente reduzindo o potencial antioxidante da mesma (Hatherill *et al.*, 1991;
20 Fonseca, 2016).

21 A atividade das enzimas antioxidantes é um marcador sensível do estresse oxidativo.
22 Tanto o aumento quanto a diminuição na atividade das enzimas têm sido relatados em diferentes
23 condições clínicas como consequência da produção de EROs. Isso ocorre tanto pelo aumento da
24 regulação da atividade da enzima quanto pela utilização destas enzimas para combater as EROs.
25 A CAT catalisa a reação de conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um composto
26 tóxico, em oxigênio (O_2) e água (H_2O) (Valko *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2010), no
27 entanto, no presente estudo, não foi observada diferença estatística na atividade da CAT
28 nos tempos avaliados (T7 ao T42) quando comparados ao T0 ($p > 0.05$) (Figura 2).

29 Numerosos estudos demonstraram que, após a transfusão, as hemácias perdem
30 substancialmente sua viabilidade (aproximadamente 30%) (Sekeroglu *et al.*, 2012;
31 Mustafa *et al.*, 2016). Um fator contribuinte importante para a diminuição da vida útil
32 das hemácias armazenadas pode ser uma diminuição no sistema de defesa antioxidante
33 ou um aumento no estresse oxidativo que ocorrem durante o armazenamento.

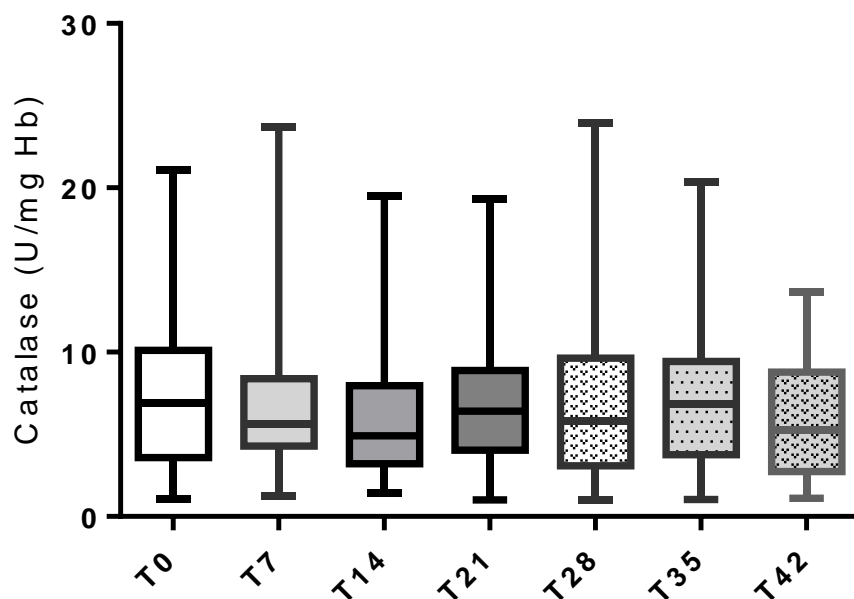
1 Em seus estudos Nedzi et al. (2016) e Huyut et al. (2018), demonstraram uma
 2 diminuição significativa na atividade da CAT conforme o aumento no tempo de
 3 armazenamento do CH, demonstrando dessa forma manifestações de estresse oxidativo.
 4 Sekeroglu e colaboradores (2012) e Huyut e colaboradores (2016), relataram que os
 5 níveis de SOD e catalase diminuíram conforme aumentou o tempo de armazenamento.
 6 Portanto, a ausência de alteração da atividade da CAT observada em nosso trabalho
 7 poderá estar relacionada ao comportamento dessa enzima em diferentes tecidos, bem
 8 como à metodologia empregada.

9
 10 **Figura 1.** Valores da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD)
 11 para determinação do estresse oxidativo obtidos do concentrado de hemácias de cães
 12 (n=48), conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante os 42 dias de armazenamento.



13 Os dados são apresentados como mediana (máximo e mínimo). *p<0.05 comparado ao T0. Teste de
 14 Wilcoxon. T0 (imediatamente após a centrifugação), no T7 (sete dias de armazenamento), T14 (14
 15 dias), T21 (21 dias), T28 (28 dias), T35 (35 dias) e T42 (42 dias).
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30

1 **Figura 2.** Valores da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) para
 2 determinação do estresse oxidativo obtidos do concentrado de hemácias de cães (n=48),
 3 conservado em bolsas CPD-SAG/M, durante os 42 dias de armazenamento.
 4



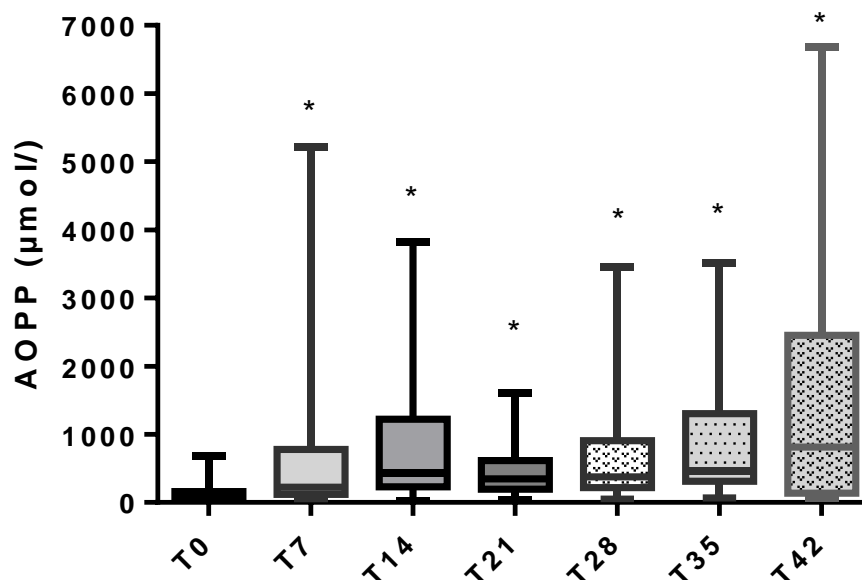
5 Os dados são apresentados como mediana (máximo e mínimo). * $p < 0.05$ comparado ao T0. Teste de
 6 Wilcoxon. T0 (imediatamente após a centrifugação), no T7 (sete dias de armazenamento), T14 (14
 7 dias), T21 (21 dias), T28 (28 dias), T35 (35 dias) e T42 (42 dias).
 8
 9

10 Os principais alvos das EROs são o DNA, as proteínas e os lipídeos. Os AOPP
 11 têm sido considerado um marcador do grau de dano proteico mediado por oxidação
 12 (Braga, 2004). O AOPP é gerado por meio da ação do estresse oxidativo sobre proteínas
 13 e aminoácidos, pela ação de oxidantes clorados, principalmente ácido hipocloroso e
 14 cloraminas (Kalousová, et al., 2002).

15 O AOPP apresentou um aumento significativo ($p < 0.05$) em todos os tempos
 16 comparados ao T 0 (Figura 3), indicando a presença de oxidação proteica nas bolsas de
 17 CH durante o período de armazenamento deste estudo. No entanto, o aumento não foi
 18 linear, havendo uma diminuição em M3 e M4 e aumento em M5. Resultados
 19 semelhantes foram encontrados por Tzounakas e colaboradores (2015) que avaliaram o
 20 AOPP de CH armazenados, de doadores com altos e baixos níveis de ácido úrico
 21 (Bardyn et al., 2018).

22
 23
 24

1 **Figura 3** – Valores dos produtos de oxidação proteica (AOPP) para determinação do
 2 estresse oxidativo obtidos do concentrado de hemácias de cães (n=48), conservado em
 3 bolsas CPD-SAG/M, durante os 42 dias de armazenamento.



4 Os dados são apresentados como mediana (máximo e mínimo). *p<0.05 comparado ao T0. Teste de
 5 Wilcoxon. T0 (imediatamente após a centrifugação), no T7 (sete dias de armazenamento), T14 (14
 6 dias), T21 (21 dias), T28 (28 dias), T35 (35 dias) e T42 (42 dias).
 7
 8

9 A oxidação contínua de cadeias de ácidos graxos e sua fragmentação para
 10 produzir aldeídos e hidrocarbonetos, acaba por levar à perda da integridade da
 11 membrana. A peroxidação das membranas eritrocitárias faz com que reduzam a
 12 capacidade de mudar de forma e se espremer pelos capilares mais delgados (Gutowski e
 13 Kowalczyk, 2013).

14 Na avaliação da LPO, observou-se maior formação de CL-LOOH nas bolsas de
 15 CH ao longo do período de armazenamento (Figura 4), em que há um aumento
 16 significativo até T42. A determinação desse parâmetro é utilizada para estimar a
 17 intensidade da LPO, onde quanto maior a lesão oxidativa na membrana da hemácia e
 18 subsequentemente hemólise, maior será a formação do CL-LOOH (Simão et al., 2008).

19 O dano oxidativo ocorre quando o equilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes
 20 é perdido e, no caso da LPO, os radicais hidroxila resultantes da reação de Fenton
 21 atacam os ácidos graxos na membrana eritrocitária, acabando por enfraquecer a
 22 integridade da membrana (Bardyn et al., 2018).

23 Glicolipídios, fosfolipídios e colesterol são alvos bem conhecidos de
 24 modificação peroxidativa prejudicial e potencialmente letal às células (Ayala et al.,
 25 2014). Os lipídios oxidados nas hemácias, e especialmente as microvesículas formadas

1 para removê-los, fornecem superfícies pró-coagulantes e pró-inflamatórias que podem
2 aumentar o risco de eventos trombóticos pós-transfusão (Hess, 2010, Mustafa et al.,
3 2016).

4 Sob taxas fisiológicas ou de baixa LPO, os sistemas antioxidantes das células
5 estimulam sua manutenção e sobrevivência. No entanto, sob taxas de LPO médias ou
6 altas (condições tóxicas), o dano oxidativo excede a capacidade de reparo, e as células
7 induzem a morte celular programada por apoptose ou necrose (Ayala et al., 2014).

8 Em geral, os efeitos gerais da LPO são diminuir a fluidez da membrana, facilitar
9 a troca de fosfolipídios entre as duas monocamadas, aumentar o vazamento da bicamada
10 da membrana com substâncias que normalmente não a atravessam além de canais
11 específicos e inativar a membrana enzimas ligadas (Gutowski e Kowalczyk, 2013).
12 Desta forma, sugere-se que nesse estudo o período de armazenamento das bolsas
13 provocou danos à membrana as hemácias, resultando em danos oxidativos, tornando-as
14 menos estáveis (Repetto et al., 2012).

15 Resultados semelhantes foram encontrados na literatura por Chaudhary e
16 Katharia (2012), Mustafa et al. (2016), Fonseca et al. e Huyut et al., ambos em 2018,
17 porém utilizando a formação de malondialdeído (MDA). O MDA e o 4-hidroxinonal
18 (4HNE) foram extensivamente estudados por Esterbauer e colaboradores nos anos 80
19 (Ayala et al., 2014). O MDA parece ser o produto mais mutagênico da LPO, enquanto
20 o 4-HNE é o principal fator tóxico (Esterbauer, et al., 1980).

21 O MDA é um dos subprodutos resultantes da LPO de ácidos graxos
22 poliinsaturados (Catala, 2006). Essa substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, avaliada
23 pela metodologia de TBARS, é um marcador útil, por ser simples e sensível para a
24 avaliação da peroxidação lipídica (Pandey e Rizvi, 2011). No entanto, apesar de exercer
25 o mesmo papel do CL-LOOH, essa técnica é considerada de baixa especificidade
26 (Junqueira et al., 2004), uma vez que outras substâncias, que não o MDA, reagem com o
27 ácido tiobarbitúrico e absorvem no mesmo comprimento de onda, podendo superestimar
28 o resultado. Um exemplo é a superestimação da produção de dialdeído malônico
29 (Lorençoni, 2011).

30 No presente estudo, a metodologia utilizada (quimioluminescência) é mais
31 específica para mensurar a LPO do que a TBARS. O Hidroperóxido de tert-butilíco é
32 um agente oxidante orgânico que contém um grupo butil terciário, forte fonte de
33 radicais livres (Ayala et al., 2014). O CL-LOOH tem sido usado por vários
34 pesquisadores para suscitar oxi radicais livres e lipoperóxidos (Lorençoni, 2011).

1 Até o momento não foram encontrados estudos sobre a avaliação de AOPP e
2 CL-LOOH em bolsas de sangue de concentrado de hemácias caninas, sendo esse, o
3 primeiro estudo a avaliar oxidação lipídica e proteica em bolsas de sangue de cães por
4 meio desses dois componentes.

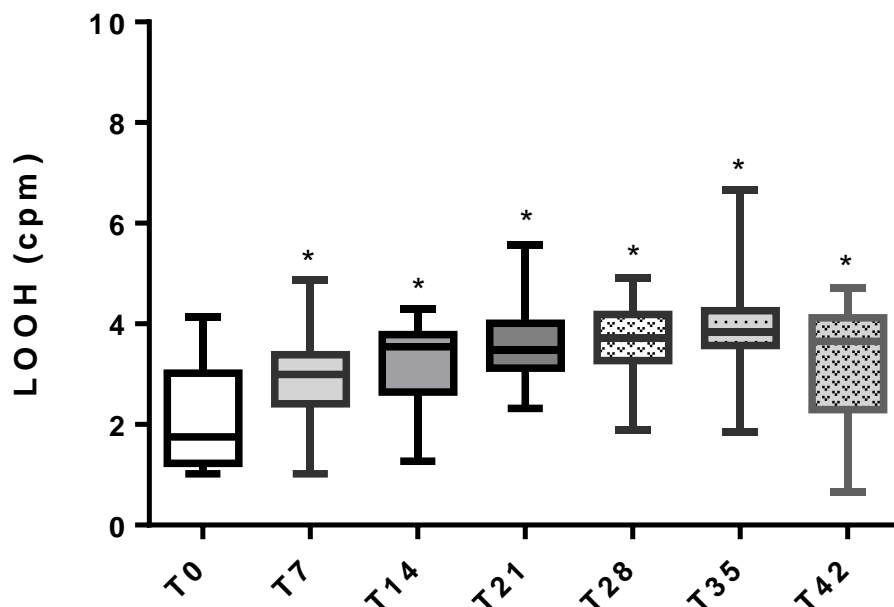
5 O impacto clínico do sangue transfundido com maior tempo de armazenamento
6 ainda não está totalmente esclarecido. A produção aumentada de EROs e a defesa
7 antioxidante diminuída causa degradação das proteínas que conectam o citoesqueleto à
8 membrana (espectrina, anquirina, proteína 4.2 e banda3 (Cluitmans et al., 2012a). Há,
9 portanto, um prejuízo à elasticidade e consequentemente a deformabilidade das
10 hemácias, reduzindo sua viabilidade (Cluitmans et al., 2012b) e levando a hemólise.

11 A hemoglobina livre pode reduzir a disponibilidade de óxido nítrico no receptor,
12 levando à perda da função vaso regulatória do óxido nítrico nos vasos. Para o receptor
13 tal fato também pode resultar em comprometimento da função renal, agregação
14 plaquetária e dano oxidativo (Orlov e Karkouti, 2015).

15 A identificação do efeito adverso associado à transfusão de sangue mais antigo é
16 considerada difícil, porém seu entendimento é necessário para correlacionar as lesões de
17 armazenamento e os possíveis efeitos adversos nos pacientes.

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

1 **Figura 4** – Valores da peroxidação lipídica (CL-LOOH) para determinação do estresse
 2 oxidativo obtidos do concentrado de hemácias de cães conservado em bolsas CPD-
 3 SAG/M, durante os 42 dias de armazenamento.



4

5 Os dados são apresentados como mediana (máximo e mínimo). * $p < 0.05$ comparado ao T0. Teste de
 6 Wilcoxon. T0 (imediatamente após a centrifugação), no T7 (sete dias de armazenamento), T14 (14
 7 dias), T21 (21 dias), T28 (28 dias), T35 (35 dias) e T42 (42 dias).

8

9 Conclusão

10 O estudo demonstrou por meio do aumento da peroxidação lipídica, oxidação
 11 proteica e diminuição da capacidade antioxidante, que há importantes lesões de
 12 armazenamento, provocadas pelo estresse oxidativo das hemácias nos CH armazenados
 13 em CPD/SAG-M. No entanto, as alterações encontradas não nos permitem determinar
 14 até que momento as hemácias dos CH estão viáveis, para tanto são necessários estudos
 15 *in vivo* em cães receptores para avaliar se essas alterações estariam implicadas no
 16 insucesso terapêutico das transfusões de CH.

17

18 Referências

19

20 Abonnenc, M.; Sonogo, G.; Kaiser-Guignard, J.; Crettaz, D.; Prudent, M. et al. 2011. *In*
 21 *vitro* evaluation of pathogen-inactivated buffy coat-derived platelet concentrates during
 22 storage: psoralen-based photochemical treatment step- by-step. *Blood Transfusion*.
 23 13:255–64.

24

25 Al-Thani, A.M.; Voss, S.C.; Al-Menhali, A.S.; Barcaru, A.; Horvatovich, P.; Al, Jaber,
 26 H.; Nikolovski, Z.; Latiff, A.; Georgakopoulos, C.; Merenkov, Z.; Segura, J.; Alsayrafi,
 27 M.; Jaganjac, M. Whole Blood Storage in CPDA1 Blood Bags Alters Erythrocyte

- 1 Membrane Proteome. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018. 2018(ID
2 6375379):12.
3
- 4 Almizraq, R.; Tchir, J.D.; Holovati, J.L.; Acker, J.P. 2013. Storage of red blood cells
5 affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality. *Transfusion*.
6 53(10):2258–2267.
7
- 8 Barbosa, K.B.F.B.; Costa, N.M.B.; Alfenas, R.C.G.; De Paula, S.O; Minim, V.P.R.;
9 Bressan, J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.
10 *Revista de Nutrição de Campinas*. 23(4):629-643.
11
- 12 Bardyn, M.; Rappaz, B.; Jaferjadeh, K.; Crettaz, D.; Tissot, J-D et al. 2017. Red blood
13 cells ageing markers:a multi-parametric analysis .*Blood Transfusion* 15:239-48.
14
- 15 Bardyn, M.; Maie, S.; Lesch, A; Tissot, J-D; Cortéz-Salazar, F., et al. 2017 The
16 antioxidant capacity of erythrocyte concentrates in increased during the first week of
17 stored and correlated with the uric acid level. *Vox sanguinis* (b).
18
- 19 Bertoletti, B. Peroxidação lipídica e parâmetros bioquímicos do sangue total felino
20 armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M. 2011. 42f.
21 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa
22 Maria.
23
- 24 Braga, C.Y.Y. Avaliação da concentração plasmática do produto proteico de oxidação
25 avançada (AOPP) e da proteína C-Reativa de alta sensibilidade (hs-PCR) em pacientes
26 com doença reumática valvar crônica. 2004. 74f. Dissertação Universidade Federal do
27 Paraná (UFPR).
28
- 29 Brasil I. 2015. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à Saúde. Departamento de
30 atenção especializada. Guia para o uso de hemocomponentes. Brasília.
31
- 32 Callan, M.B.; Patel, R.T., Rux, A.H.; Bandyopadhyay, S.; Sireci, A.N.; O'Donnell,
33 P.A.; Ruane, T.; Sikora; Marrayott, K.; Sachais; B.S.; Hod, E.A. 2013. Transfusion of
34 28-day-old leucoreduced or non-leucoreduced stored red blood cells induces an
35 inflammatory response in healthy dogs. *Vox Sanguinis*.105:319-327.
36
- 37 Catala, A. 2006. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of
38 photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of*
39 *Biochemistry and Cell Biology*. 38:1482-1495.
40
- 41 Cluitmans, J. C. A.; Hardeman, M. R.; Dinkla, S.; Brock, R.; Bosman, G. J. C. G. M.
42 2012a. Red blood cell deformability during storage: towards functional proteomics and
43 metabolomics in the Blood Bank. *Blood Transfusion*. 10(2): 12-18.
44
- 45 Cluitmans, J. C. A.; Hardeman, M. R.; Dinkla, S.; Brock, R.; Bosman, G. J. C. G.
46 M.2012b. Red blood cell deformability during storage: towards functional proteomics
47 and metabolomics in the Blood Bank. *Blood Transfusion*. 10(2): 12-18.
- 48 Chaudhary, R.; Katharia, R. 2012. Oxidative injury as contributory factor for red cells
49 storage lesion during twenty eight days of storage. 10(1): 59–62.

- 1
2 Delobel, J; Prudent, Tissot, J-D, Lion, N. 2016. Proteomics of the red blood cells
3 carbonylome during blood baking of erythrocyte concentrates. *Proteomics Clinical*
4 *Apply.* 10:257-66.
5
6 Esterbauer, H.; Eckl, P.; Ortner, A. Possible mutagens derived from lipids and lipid
7 precursors. 1990. *Mutation Research.* 238(3):223–233.
8
9 Hess, J. R. 2010. Red cell storage. *Journal of proteomics.* 73:368-373.
10
11 Hod, E.; Zhang, N.; Sokol, S.; Wojczyk, B.S.; Francis, R.O.; Ansaldi, D.; Francis, K.P.;
12 Della-Latta, P.; Whittier, S.; Sheth, S.; Hendrickson, J.E.; Zimring, J.C.; Brittenham,
13 G.M.; Spitalnik, S.L. 2010. Transfusion of red blood cells after prolonged storage
14 produces harmful effects that are mediated by iron inflammation. *Blood.* 115:4284–
15 4292.
16
17 Holowaychuk, M.K.; Leader, J.L.; Monteith, G. 2014. Risk factors for
18 transfusion-associated complications and nonsurvival in dogs receiving packed red blood
19 cell transfusions: 211 cases (2008-2011). *Journal American Veterinary Medicine*
20 *Association.* 244:431-437.
21
22 Huyut, Z.; Sekeroglu, M.R.; Balahoroglu, R.; Karakoyun, T; Çokluk, E. 2016. The
23 Relationship of Oxidation Sensitivity of Red Blood Cells and Carbonic Anhydrase
24 Activity in Stored Human Blood: Effect of Certain Phenolic Compounds. *Biomedicine*
25 *Research International.* 2016:8.
26
27 Jairath, V.; Kahan, B.C.; Gray, A.; Dore, C.J.; Mora, A.; et al. 2015. Restrictive versus
28 liberal blood transfusion for acute upper gastrointestinal bleeding (TRIG- GER): a
29 pragmatic, open-label, cluster randomised feasibility trial. *Lancet.* 386:137–44.
30
31 Kalousová, M.; Skrha, J.; Zima, T. 2002. Advanced Glycation End-Products and
32 Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Diabetes Mellitus. *Physiology*
33 *Research.* 51(2): 597-604.
34
35 Kalyanaraman B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate
36 students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology.*1(1):244-57.
37
38 Koch, C.G., Figueroa, P.I.; Li, L.; Sabik, J.F.; 3RD, Mihaljevic, T.; Blackstone, E.H.
39 2013. Red blood cell storage: how long is too long? *Annals Thoracic Surgery.*
40 96(5):1894-9.
41
42 Lelubre, C.; Piagnerelli, M.; Vincent, L. 2009. Association between duration of storage
43 of transfused red blood cells and morbidity and mortality in adult patients: myth or
44 reality? *Transfusion.* 49:1384–1394.
45
46 Lorençoni, R.M.R. 2011. Influência do treinamento físico e da restrição hídrica no
47 estresse oxidativo em ratos. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto –
48 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
49
50 Marchi, M.N.A.; Sargi, L.F.; Martins, R.R., Luz, P.E.; Tanaka, C.Y.; Pereira, U.P.;

- 1 Pereira, P.M. 2018. Skin antiseptics protocols for the collection of blood from donor
2 dogs. *Ciência Rural*. 48:05.
3
- 4 McMichael, M.A.; Smith, S.A. Galligan, A.; Swanson, K.S.; Fan, T.M. 2010. Effect of
5 leukoreduction on transfusion-induced inflammation in dogs. *Journal Veterinary*
6 *Internal Medicine*. 24:1131-1137.
7
- 8 Mustafa, I; Al Marwani, A.; Nasr, K. M.; Kano, N. A. and Hadwan, 2016. Time
9 dependent assessment of morphological changes: leukodepleted packed red blood cells
10 stored in SAGM. *Bio Med Research International*. 2016:& Article ID 4529434.
11
- 12 Nagababu, E.; Scott, A.V.; Johnson, D.J. et al. 2016. Oxidative stress and rheologic
13 properties of stored red blood cells before and after transfusion to surgical patients.
14 *Transfusion*. 56:1101–1111.
15
- 16 Nedzi, M.; Chabowska, A.M.; Rogowska, A. et al. 2016. Leucoreduction helps to
17 preserve activity of antioxidant barrier enzymes in stored red blood cell concentrates.
18 *Vox Sanguinis*. 110:126–133.
19
- 20 Obrador, R.; Musulin, S.; Hansen, B. 2015. Red blood cell storage lesion. *Journal*
21 *Veterinary Emergency Critical Care (San Antonio)*. 25:187-199.
22
- 23 Pandey, K.; Rizvi, S. 2011. Biomarkers of oxidative stress in red bloodcells.
24 *BiomedicalPapers*. 155(2):131–136.
25
- 26 Poli, G.; Schaur, R.J.; Siems, W.G.; Leonarduzzi G. 2008. 4-hydroxynonenal: a
27 membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Medicinal Research Reviews*.
28 28(4):569-631.
29
- 30 Proffitt, S.; Thomas, I.; Swannetal. 2015. Storage of washed or irradiated red cells in
31 AS-7 improves their in vitro characteristics. *Vox Sanguinis*. 10(3): 203–213.
32
- 33 Purcell, S.L.; Claus, M.; Hosgood, G.; Smart, L. 2015. Effect of leukoreduction on
34 concentrations of interleukin-8, interleukin1 β , and tumor necrosis factor- α in canine
35 packed red blood cells during storage. *American Journal of Veterinary Research*.76:
36 969-974.
37
- 38 Prudent, M.; Crettaz, D.; Delobel, J.; Seghatchian, J. et al. 2015. Differences between
39 calcium-stimulated and storage-induced erythrocytes-derived microvesicles.
40 *Transfusion Apheresis Science*. 53:153–8.
41
- 42 Prudent, M.; Tissot, J.D.; Lion, N. 2017. The 3-phase evolution of stored red blood
43 cells and the clinical trials: an obvious relationship. *Blood Transfusion*.15:188.
44
- 45 Racek, J.; Herynková, R.; Holeček, V.; Faltysová, J.; Krejčová, I. 2001. What is the
46 Source of Free Radicals Causing Hemolysis in Stored Blood? *Physiological Research*.
47 50:383-388.
48
- 49 Repetto, M.; Semprine, J.; Boveris, A. 2012. “Lipid peroxidation: chemical mechanism,
50 biological implications and analytical determination,” in *Lipid Peroxidation*, A. Catala,

- 1 Ed., chapter1, In Tech, Rijeka, Croatia.
2
- 3 Sekine, L.; Wirth, L.F.; Faulhaber, G.A.M.; Seligma, B.G.S. 2008. Análise do perfil de
4 solicitações para transfusão de hemocomponentes no Hospital de clínicas de Porto
5 Alegre no ano de 2005. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 30(3):208-
6 212.
7
- 8 Santos, C.X.; Tanaka, L.Y.; Wosniak, J.; Laurindo, F.R. 2009. Mechanisms and
9 implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein
10 response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron
11 transport, and NADPH oxidase. *Antioxidant Redox Signal*. 11(10):2409-27.
12
- 13 Sekeroğlu, M. R.; Huyut, Z.; Him, A. 2012. The susceptibility of erythrocytes to
14 oxidation during storage of blood: effects of melatonin and propofol. *Clinical
15 Biochemistry*. 45(45):315–319.
16
- 17 Silva, C. A. L. 2013. Avaliação da atividade antioxidante da vitamina e em eritrócitos–
18 aplicações em hemoterapia.
19
- 20 Simão, A.N.C.; Dichi, J.B.; Barbosa, D.S.; Cecchini, R.; Dichi, I. 2008. Influence of
21 uric acid and γ -glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in
22 patients with metabolic syndrome. *Nutrition*. 24:675-681.
23
- 24 Trevisan, M.; Browne, R.; Ram, M.; Muti, P.; Freudenheim, J.; Carosella, A. M.;
25 Armstrong, D. 2001. “Correlates of markers of oxidative status in the general
26 population, *American Journal of Epidemiology*. 154(4):348–356.
27
- 28 Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. 2007. Free
29 radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The
30 International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(1):4484.
31
- 32 Vincent, J.L.; Baron, J.F.; Reinhart, K.; Gattinoni, L.; Thijs, L.; Webb, A.; Meier-
33 Hellmann, A.; Nolle, G.; Peres-Bota, D. 2002. Anemia and blood transfusion in
34 critically ill patients. *Journal of the American Medical Association*. 288:1499-1507.
35
- 36 Waddell, L.S.H.D.; Hughes, D.; Giger, U. 2001. The effect of storage on ammonia
37 concentration in canine packed red blood cells. *Journal Veterinary Emergency Critical
38 Care (San Antonio)* 11:23-26.
39
- 40 Zhou, Q.G; Zhou, M; Lou, A.J.; Xie, D.; Hou, F.F. 2010. Advanced Oxidation Protein
41 Products Induce Inflammatory Response and Insulin Resistance in Cultured Adipocytes
42 via Induction of Endoplasmic Reticulum Stress. *Cellular Physiology and Biochemistry*.
43 26:775-786.
44

6. CONCLUSÃO

- O armazenamento do CH de cães produz alterações na qualidade do sangue, relacionadas a alterações hematológicas, bioquímicas e do estresse oxidativo até o 42º dia, quando utilizadas bolsas contendo CPD/SAG-M.
- As alterações hematológicas foram diminuição no HE e no LT e aumento no VG, VCM e grau de hemólise.
- Na mediana, após os 35 dias de armazenamento a taxa de hemólise ultrapassou os padrões utilizados para o controle de qualidade em banco de sangue humanos. Porém, seguindo os padrões preconizados em bancos de sangue humanos, o grau de hemólise ocorrido em 8% dos CH no T28, 16% dos CH no T35 e 39% dos CH no T42 deste estudo, descartariam o uso do CH. Até o T21 nenhum CH apresentou grau de hemólise superior a 1%.
- As alterações bioquímicas foram diminuição da glicose, do pH, do CHCO_3 e Cl^- ; e aumento no lactato, no K^+ , no Na^+ e no *déficit* de BE.
- Mesmo com a diminuição significativa da glicose, aos 42 dias a mediana da mesma se manteve acima dos 50 mg/dL. No entanto, 60% desses CH apresentaram valores inferiores a 50mg/dL no T42, 52% no T35, 20% no T28, reforçando assim a necessidade da verificação do controle de qualidade dos CH antes do uso.
- As alterações do estresse oxidativo foram aumento no AOPP e no CL-LOOH e diminuição na atividade da SOD.
- O AOPP pode ser considerado um marcador fidedigno para estimar o grau do dano proteico das hemácias dos CH de cães, bem como o CL-LOOH para determinar a lipoperoxidação.
- Os resultados obtidos possibilitaram concluir que há desequilíbrio redox nos CH armazenados, evidenciados pelo aumento da peroxidação lipídica e oxidação proteica, bem como pela diminuição na atividade da SOD a partir do sétimo dia de armazenamento.

1 **COSIDERAÇÕES FINAIS**

2

3 Embora as modificações encontradas não pareçam inviabilizar a utilização
4 terapêutica do CH armazenado até os 35 dias, os achados ressaltam a importância de um
5 programa regular de controle de qualidade, para melhorar a segurança transfusional,
6 tendo em vista o estado crítico do paciente que necessita da transfusão sanguínea.

7 Diante do exposto faz-se necessário o estabelecimento de padrões máximo e mínimo
8 dos componentes testados para garantir a qualidade dos CH a serem transfundidos
9 mantendo a integridade do hemocomponente para o sucesso terapêutico em cães.

10 Estudos *in vivo* em cães receptores deverão ser conduzidos para avaliar se essas
11 alterações estariam implicadas no insucesso terapêutico das transfusões de CH.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

Anexo I**Valores de referência para hemograma de cães**

Hemácias (x10⁶/μl)	5,5 - 8,5
Hemoglobina (g/dl)	12 – 18
VG (%)	37 – 55
VCM (fl)	60 – 77
Leucócitos (/μl)	6.000 - 17.000

Fonte: SCHALM's Veterinary Hematology (2000)

Valores de referência para bioquímicos de cães

pH Sanguíneo	7,31 a 7,42
HCO₃ (mmol/L)	19 a 21
Na⁺ (mEq/L)	140 a 155
K⁺ (mEq/L)	3,7 a 5,5
Cl⁻ (mEq/L)	105 a 117
EBase (mmol/L)	-3 a 3

Fonte: KANEKO, J.J. Clinical Biochemistry of Domestic Animals (2008)



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 125/2015

Londrina, 19 de Junho de 2015.


Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 16 de Junho de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Controle da qualidade de hemocomponentes em bolsas de concentrado de hemácias e sangue total dos cães**", registrado sob o processo CEUA nº **7489.2015.74**, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos, postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, estão respeitados.

Serão analisadas todas as bolsas de sangue total e concentrado de hemácias que serão colhidas dos cães doadores de sangue do Projeto Vida – UEL. As amostras das bolsas serão colhidas no momento da sua abertura para uso em cães que necessitem de transfusão sanguínea no Hospital Veterinário da UEL. O projeto tem como objetivo avaliar a qualidade do sangue de cães colhido e armazenado no Projeto Vida – UEL, através de testes laboratoriais, como grau de hemólise e contaminação bacteriana no sangue total fresco e concentrado de hemácias. Além disso, pretende formular e padronizar normas de controle de qualidade para o uso mais apropriado dos componentes sanguíneos de cães, através de técnicas simples, porém, seguras, para que o sangue transfundido chegue ao receptor com componentes viáveis, minimizando efeitos deletérios, contribuindo para o sucesso terapêutico. Serão utilizados 40 cães (machos e fêmeas), 1 a 8 anos de idade e pesando acima de 28 Kg, em boas condições de saúde, constatadas através de exame físico, hemograma e pesquisa de hematozoários. Estes animais são cães doadores de sangue do Projeto Vida - UEL (cadastrado na PROEX). Não serão utilizados relaxantes musculares ou anestésicos, nem haverá jejum, restrição hídrica ou cirurgia. Animais serão contidos fisicamente leve para a colheita de sangue que dura no máximo 10 minutos. A quantidade de sangue obtida será de 400 - 500mL, a cada 3 a 4 meses, através da veia cefálica ou jugular. Procedimento padrão como preconizado e usado na rotina do Projeto Vida -UEL. Este sangue ficará armazenado em bolsas de sangue total ou concentrado de hemácias até o momento do uso. Os animais utilizados não serão mortos ao final do experimento. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 16 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo de pesquisa aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Waldiceu Ap. Verrini Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrini Junior
Coord.  da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Patrícia Mendes Pereira

Coordenador do Projeto

Departamento de Clínicas Veterinárias

Centro de Ciências Agrárias

Com cópia para Sra Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Prof. Luiz Carlos Juliani (Diretor do Biotério Central do CCB) e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 FAX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86055-000