

Viabilidade do concentrado de hemácias de cães armazenado em bolsas com soluções conservantes CPDA-1 ou CDP/SAG-M durante 35 dias.

Maria Carolina Heredia Crespo ¹, Ana Paula Massae Nakage Canesin ^{1 2}

¹ Centro Universitário Barão de Mauá

² HEMOLABVET - Hemocentro Veterinário, Ribeirão Preto, SP

¹ carolherediaa@gmail.com, ² apnkg@hotmail.com

Resumo

A utilização de hemocomponentes seguros é primordial para reduzir os danos aos eritrócitos e manter a viabilidade dos hemocomponentes. O objetivo deste estudo foi averiguar a viabilidade dos concentrados de hemácias de cães armazenados em bolsas contendo CPD/SAG-M ou CPDA-1 durante 35 dias. Os concentrados de hemácia foram submetidos às análises laboratoriais de taxa de hemólise e morfologia celular.

Introdução

A transfusão sanguínea é amplamente executada pelo mundo tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária devido à sua extrema importância. É uma terapia emergencial servindo como um transplante tecidual temporário (COSTA JUNIOR *et al.*, 2008). Entretanto, como em qualquer procedimento, podem ocorrer reações adversas, diante disso técnicas são empregadas a fim de manter a qualidade das bolsas de sangue, e novos estudos buscam aperfeiçoar cada vez mais essas técnicas (SCOTT *et al.*, 2005). Dessa maneira, é primordial a utilização de componentes seguros com o propósito de reduzir os danos aos eritrócitos e manter a viabilidade de todos os componentes sanguíneos (MARCHI *et al.*, 2015).

Durante o século XX, grandes avanços ocorreram na medicina transfusional humana e a descoberta de conservantes viabilizou maior tempo útil das bolsas. A inclusão do Citrato como anticoagulante em bolsas de sangue possibilitou o armazenamento do sangue coletado, assim, podendo mantê-lo estocado durante um curto período até a transfusão, e promovendo a criação de bancos de sangue (SOUSA, 2012). Estudos foram realizados posteriormente a fim de manter a integridade das células e prolongar o período de estocagem do sangue. A viabilidade do sangue armazenado está relacionada com a técnica de coleta, o anticoagulante utilizado, a temperatura

adequada e a frequência de homogeneização durante o período (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2008). Os estudos desenvolvidos buscaram aumentar a conscientização do método de coleta, armazenamento das bolsas de sangue e utilização adequada. Porém, na medicina veterinária poucos estudos foram apresentados, cujo objetivo é desenvolver progressos na conservação de bolsas de sangue canino.

Na medicina veterinária, a principal solução conservadora para coleta e armazenamento do sangue é o Citrato, Fosfato, Dextrose e Adenina (CPDA-1), que promove a conservação do sangue canino por até 35 dias sob refrigeração. Além dessa solução conservadora, ainda se encontram bolsas com soluções aditivas, como a Salina, Adenina, Glicose e Manitol (SAG-M), a fim de prolongar o período de viabilidade da bolsa e melhor conservação dos componentes (FERREIRA *et al.*, 2014).

O tempo de armazenamento e viabilidade do sangue dependem do conservante utilizado, sendo que as bolsas tipo CPD/SAG-M possuem na solução preservativa maior quantidade de glicose, quando comparada às bolsas tipo CPDA-1 (SOUSA *et al.*, 2012).

Anticoagulantes e Conservantes sanguíneos

As bolsas de sangue atuais possuem um anticoagulante que mantém a fluidez do sangue para que possa ser transfundido. Da mesma maneira deve manter a integridade da hemácia proporcionando benefício e segurança ao paciente transfundido. Já os conservantes sanguíneos preservam melhor as hemácias, previnem mudanças deletérias, mantendo o pH, glicose e ácido 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), e promovem a produção de adenosina trifosfato (ATP), assim mantendo a viabilidade durante o armazenamento da bolsa. O anticoagulante é o citrato e os conservantes são soluções de fosfato-dextrose (FELDMAN; SINK, 2007).

Um dos anticoagulantes-conservantes mais utilizados é o Citrato fosfato dextrose adenina (CPDA-1), que proporciona fatores nutricionais às hemácias (SOUSA *et al.*, 2012). Em sua composição, o fosfato auxilia no controle do pH sanguíneo e a dextrose é uma fonte energética que colabora na manutenção dos níveis de ATP. A adenina propicia o aumento do ATP e o citrato auxilia na manutenção do pH intracelular (KURUP *et al.*, 2003).

Soluções aditivas foram incorporadas às bolsas de sangue com a finalidade de fornecer nutrientes para as células e prolongar o tempo de armazenamento. O SAG, constituída de solução salina, adenina e glicose foi a primeira solução aditiva a ser utilizada. Entretanto, ainda assim, acontecia ampla hemólise nas bolsas. Diante disso, adicionou-se o manitol às bolsas (CPD/SAG-M), reduzindo pela metade essa hemólise devido ao manitol ser um estabilizador de membranas, conseqüentemente aumentando o tempo de armazenamento (HESS, 2006).

Hemocomponentes

Durante anos, a terapia transfusional resumia-se apenas no uso do sangue total do doador, porém atualmente sabe-se que a utilização adequada dos subprodutos traz mais benefícios aos receptores que necessitem de apenas um componente sanguíneo, reduzindo os riscos de reações transfusionais. Além de um único doador consegue ajudar mais de um receptor (LACERDA, 2011).

O concentrado de hemácias é utilizado em casos de anemias severas e auxilia na restauração do transporte do oxigênio. As bolsas devem ser mantidas entre 1 e 6°C, e seu tempo de armazenamento também dependerá do anticoagulante-conservante utilizado. Pode-se acrescentar soluções aditivas que prolongam o tempo de vida das hemácias em até 42 dias. Essa solução está presente em uma bolsa satélite ligada à bolsa principal, e será adicionada ao concentrado (FELDMAN; SINK, 2007).

Lesões de armazenamento

Durante o armazenamento das bolsas de sangue ocorrem lesões de armazenamento, as quais incluem alterações bioquímicas, morfológicas e ocorrência de lesões celulares (OBRADOR *et al.*, 2015; VERONA; NAKAGE, 2018). Além da formação de radicais livres e desgaste de enzimas antioxidantes, ocorre a rigidez e deformação das hemácias, o que aumenta ainda mais a chance de hemólise (MORAES *et al.*, 2015), reduzindo a viabilidade dos hemocomponentes (WARDROP *et al.*, 1994).

As alterações que ocorrem durante a estocagem do sangue levam a um acúmulo do ácido láctico, potássio e cálcio, redução do 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DGP) e ATP, alterações morfológicas, diminuição do pH e da glicose, e hemólise (ROA *et al.*, 2017).

A principal função da hemoglobina é carrear o oxigênio para os tecidos. O 2,3-DPG é um fosfato orgânico encontrado dentro das hemácias, e controla a afinidade da hemoglobina com o oxigênio. Baixos valores de 2,3-DPG são acompanhados pela maior afinidade da hemoglobina (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2006). Essa afinidade da hemoglobina depende da temperatura e do pH sanguíneo. Quando o sangue é resfriado, a hemoglobina passa a ter mais afinidade com o oxigênio, já em temperaturas mais altas a hemoglobina possui menos afinidade, liberando mais facilmente o oxigênio para os tecidos. Já em relação ao pH, quando o valor está elevado (alcalino) a hemoglobina possui mais afinidade, e quando reduzido (ácido) menos. Em condições de anaerobiose, como ocorre em bolsas de sangue armazenadas, os níveis de 2,3-DGP são reduzidos e com isso a hemoglobina passa a possuir mais afinidade com o oxigênio. Uma redução do 2,3-DPG dificultará na entrega do oxigênio aos tecidos após a transfusão (KLEIN, 2014). Segundo Hess e Greenwalt (2002), para um armazenamento eficaz o limite superior do pH intracelular é provavelmente próximo a 7,2, valores acima levam a regeneração do 2,3-DPG, à custa da síntese de ATP.

O ATP é encontrado dentro das células servindo como fonte energética. Níveis adequados de ATP são vitais para processos celulares como a estabilização da membrana da hemácia, mecanismo de defesa do estresse oxidativo, vasodilatação regional em condições de hipóxia e transporte de glicose (KOR *et al.*, 2009).

Uma das principais mudanças que ocorrem durante o armazenamento é a formação de esferócitos. (HESS; GREENWALT, 2002; SOUSA, 2012). Outra alteração na membrana plasmática encontrada durante o armazenamento é o aumento da fragilidade osmótica, com isso algumas hemácias poderão sofrer hemólise, aumentando o valor da hemoglobina livre (SOUSA, 2012). A infusão de constituintes hemolisados poderá ser prejudicial aos rins, uma vez que o excesso de hemoglobina livre leva a lesão renal (WARDROP *et al.*, 1994).

A hemólise pode ocorrer pela ruptura completa da hemácia ou pela perda das microvilosidades superficiais, resultando na liberação da hemoglobina, e é um importante marcador da falha do armazenamento. Diante disso estabilizadores

XII Encontro de Iniciação Científica do Centro Universitário Barão de Mauá

de membrana, como o Manitol têm se demonstrado eficaz para a redução de hemólise (HESS; GREENWALT, 2002).

OBJETIVO

Verificar se as bolsas de concentrado de hemácias de cães, armazenadas com solução aditiva CPD/SAG-M são mais viáveis do que CPDA-1 em diferentes momentos durante 35 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pela Comitê de Ética em pesquisa animal (CEPan) sob o Nº 370/19 e pelo Conselho do Comitê de Ética em Pesquisa e experimentação Animal CEUA-CEPan-B.M.

Foram selecionados oito cães saudáveis provindo de tutores particulares, com temperamento dócil, entre um a oito anos, com peso superior a 23 kg. Determinou-se a veia jugular para realização da venopunção, devido ao seu grande calibre e alta pressão, promovendo tempo hábil para coleta das bolsas de sangue e menor estresse aos animais. O temperamento dócil dos cães possibilitou a contenção física, com isso não sendo necessárias múltiplas venopunções, assim minimizando a possibilidade de contaminação.

Para minimizar os fatores extrínsecos à amostra analisada foi coletado sangue da veia jugular do mesmo doador sendo armazenado 250mL na bolsa com CPDA-1 e 250mL na bolsa com CPD/SAG-M, sendo que o volume de anticoagulante foi proporcional à quantidade de sangue para evitar hemodiluição. No grupo 1, após a obtenção do sangue total a bolsa foi centrifugada para obtenção do concentrado de hemácias (CH) com CPDA-1 (grupo 1). Já no grupo 2, o sangue total foi coletado em uma bolsa principal contendo CPD, posteriormente foi centrifugada, obtendo o CH, e posteriormente foi adicionado à solução aditiva SAG-M em uma bolsa satélite, obtendo bolsas de CH com CPD/SAG-M.

Para realização das análises, 30mL do CH das bolsas de CPDA (G1) e CPD/SAG-M (G2) de cada doador foi inserido em novas bolsas e armazenada entre 1° a 6°C. A cada momento de avaliação retirou-se 2 mL de sangue dessas bolsas para realização das análises laboratoriais: Taxa de hematócrito, taxa de hemólise e morfologia celular. Os momentos de avaliação foram logo após a coleta (D0), sete dias após a coleta (D7), quatorze dias após a coleta (D14), vinte e um dia após a coleta (D21) e trinta e cinco dias após a coleta (D35).

A taxa de hematócrito foi determinada com o auxílio do analisador hematológico (poch-100iV Diff).

Para taxa de hemólise é preciso determinar a concentração de hemoglobina total e plasmática. A hemoglobina total foi obtida através da adição de 20 µL de sangue do CH em 5 mL do reagente da hemoglobina (Drabkin – Labtest), com intervalo de cinco minutos e leitura no analisador bioquímico semiautomático (BIO-200) com reação colorimétrica de ponto final. Em seguida, os tubos com CH conservados em CPDA-1 e CPD/SAG-M foram balanceados e centrifugados (Centerbio 80 2b) 10 minutos a 2500 rpm, para obtenção do plasma, sendo que 20µL do plasma foi diluído em 5 mL do reagente da hemoglobina e, após cinco minutos, as amostras foram submetidas ao analisador bioquímico para obtenção da hemoglobina plasmática.

Posteriormente a taxa de hemólise foi determinada utilizando os valores obtidos, através do cálculo da fórmula (WARDROP *et al*, 1994):

$$(1) \text{Taxa de hemólise} = \frac{(100 - Ht) \times Hb \text{ plasmática}}{Hb \text{ total}}$$

Em que:

Ht – Hematócrito (%)

Hb plasma – Hemoglobina plasmática (g/dL)

Hb total – Hemoglobina total (g/dL)

A análise morfológica dos eritrócitos do CH conservado em CPDA-1 e CPD/SAG-M de cada doador nos diferentes momentos de avaliação foi realizada no esfregaço sanguíneo corado com panótico rápido (Laborclin) e analisado em microscopia óptica (microscópio Nikon eclipse E200) no aumento de 100X

ANÁLISE DOS DADOS

Após coleta dos dados, foi realizada análise estatística utilizando a análise de variância (ANOVA) e o teste t-Student bicaudal pareado ($p < 0,05$) para comparar a taxa hemólise das bolsas de CH contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M nos diferentes momentos de avaliação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Taxa de hemólise:

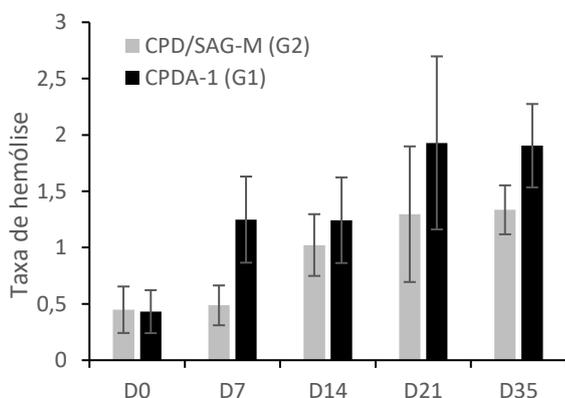
Na tabela 1 e figura 1 estão descritas médias e erros-padrão da taxa de hemólise dos CH conservados em CPDA-1 e CPD/SAG-M durante 35 dias.

Tabela 1 - Os valores médios e os erros-padrão da taxa de hemólise, obtidos nos concentrados de hemácias de cães armazenados em bolsas contendo CPDA-1 (G1) e CPD/SAG-M (G2), durante os momentos de avaliação D0, D7, D14, D21 E D35, estão representados na tabela de forma subsequente.

Momento	CPDA-1	CPD/SAG-M
D0	0,43±0,19 Aa	0,45±0,21 Aa
D7	1,25±0,38 Aab	0,49±0,18 Aa
D14	1,24±0,38 Aab	1,02±0,27 Aa
D21	1,93±0,77 Bb	1,29±0,60 Aa
D35	1,90±0,37 Ab	1,33±0,22 Aa
Média	1,35±0,41	0,91±0,29

- (1): Médias de uma mesma linha seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si ($p>0,05$).
 (2): Médias de uma mesma coluna seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre si ($p>0,05$).

Figura 1 - Representação gráfica dos valores médios e erros-padrão da taxa de hemólise obtidos nos concentrados de hemácias de cães armazenados em bolsas contendo CPDA-1 (G1) e CPD/SAG-M (G2), durante os momentos de avaliação D0, D7, D14, D21 E D35.



Ao comparar a taxa de hemólise dos conservantes do CH, verificou-se que, a partir do D7 (sete dias após a coleta da bolsa), essa taxa foi sempre maior com CPDA-1 do que CPD/SAG-M, sendo estatisticamente significativa no D21.

O aumento progressivo da hemólise no decorrer do tempo de estocagem do CH pode estar associado às lesões de armazenamento das bolsas, que promovem alterações bioquímicas e lesões celulares (OBRADOR *et al.*, 2015), devido ao acúmulo do ácido lático, potássio e cálcio, redução do 2,3-Difosfoglicerato (2,3-DPG) e do pH; aumento do consumo de glicose e redução nos níveis de ATP (KOR *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2014). Além disso, o armazenamento do CH causa alterações na membrana plasmática devido a fragilidade osmótica promovendo ruptura

completa da hemácia inteira ou perda das microvilosidades superficiais, resultando na liberação da hemoglobina, que é um importante marcador da falha do armazenamento (HESS; GREENWALT, 2002; SOUSA, 2012)

No presente trabalho, a menor taxa de hemólise foi no CH com CPD/SAG-M como relatado por Wardrop *et al.* (1997) e pode ter ocorrido devido à ação do manitol como estabilizador de membrana (HESS, 2006). O agente poderia então reduzir a formação de radicais livres, desgaste de enzimas antioxidantes, rigidez e deformação das hemácias (MORAES *et al.*, 2015).

Ao analisar os diferentes momentos de avaliação houve elevação estatisticamente significativa na hemólise do CPDA-1 no D0 em relação ao D21 e D35. Entretanto, não se verificou variação estatística do CPD/SAG-M no decorrer de 35 dias. Portanto, o CPD/SAG-M promoveu melhor qualidade ao CH, já que a hemólise reduz a preservação dos eritrócitos e viabilidade dos hemocomponentes (WARDROP *et al.*, 1994; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2008).

Morfologia das hemácias

Na análise morfológica dos esfregaços de CH por microscopia óptica observou-se raras hemácias com microvesículas a partir do D14 e um significativo aumento no D35 dos CH com CPDA-1 e CPD/SAG-M, assim como Corazza (2016) e Verona e Nakage (2018), verificaram em sangue total com CPDA-1 e CH com CPDA-1 respectivamente.

As principais lesões de armazenamento visualizadas microscopicamente demonstraram mudanças da forma discoide da hemácia levando à formação de esferócitos conforme ocorrem danos na membrana celular. Em seguida a célula pode “ingurgitar” e a superfície da membrana torna-se irregular formada por espiculas distribuídas, resultando na formação do equinócito (HESS; GREENWALT, 2002; LION *et al.*, 2009; SOUSA, 2012). Kor *et al.*, (2009), acreditam que níveis reduzidos de ATP promovem alterações morfológicas nas hemácias.

CONCLUSÃO

Concentrados de hemácias de cães armazenados em bolsas conservadas com CPD/SAG-M revelaram menor taxa de hemólise e menos equinócito do que aquelas com CPDA-1. Portanto, a solução aditiva CPD/SAG-M promove maior viabilidade do CH no período armazenamento de 35 dias.

REFERÊNCIAS

CORAZZA, A. C.; NAKAGE, A.P.M. **Avaliação hematológica das bolsas de sangue total canino contendo CPDA-1 sob refrigeração durante 35 dias.** 2016. 14 f. Relatório (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, 2016.

COSTA JÚNIOR, J. D. *et al.* Parâmetros bioquímicos e hemogasométricos do sangue total canino armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M. **Ciência Rural**, v. 38, n2. p.378-383, 2008.

COSTA JÚNIOR, J. D.; VIANA J. A. **Avaliação do sangue total de cães armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CDP/SAG-M.** 2006. 48 f. Tese (Pós-Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

FELDMAN, B. F.; SINK, C. A. Coleta, processamento, armazenamento e transporte do sangue: Secção 2. In: FELDMAN, Bernard F.; SINK, Carolyn A. **Hemoterapia para o clínico de pequenos animais.** São Paulo: Roca, 2007. p. 15-43.

FERREIRA, R.F.R. *et al.* Laboratory analysis of canine packed red blood cells – effects of collection and processing on haemolysis, haemoglobin concentration, haematocrit and blood culture. **Comparative clinical pathology**, v.23, n.5, p. 1395-1401, 2014.

HESS J. R. An update on solutions for red cell storage. **Vox Sang.** 2006; 91 p.13–19, Review

HESS, J. R.; GREENWALT, T. G. Storage of red blood cells: New Approaches. **Transfusion Medicine Reviews.**, p. 283-295. Out. 2002.

KLEIN B.G. Troca gasosa: Seção 8. In: KLEIN B.G. **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária**, 5ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 1293-1331.

KOR, D. J. *et al.* Red blood cell storage lesion. **Bosn J Basic Med Sci.** Bosnian, p. 21-27. 9 out. 2009.

KURUP, P. A. *et al.* Modified formulation of CPDA for storage of whole blood, and of SAGM for storage of red blood cells, to maintain the concentration of 2,3-diphosphoglycerate. **Vox Sanguinis**, v.85, p.253-261, 2003.

LACERDA, L. A.; GONZÁLEZ F. H. D. **Efeitos da leucorredução e de quatro soluções aditivas sobre a qualidade do concentrado de ritrócitos canino durante o armazenamento.** 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

LION, N. *et al.* Stored red blood cells: A changing universe waiting for its maps. **Journal of Proteomics**, 2009.

MARCHI, M. N. A. *et al.* Controle de qualidade de bolsas de sangue total e concentrado de hemácias em cães. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, Londrina, v. 2, n. 2, p.131-141, 2015.

MORAES, B. T. *et al.* Importância da Transfusão sanguínea em cães e lesões de armazenamento do sangue. **XX Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão.** Universidade de Cruz Alta. 2015.

OBRADOR, R. *et al.* Red blood cell storage lesion. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.25, n.2, p.187-199, 2015.

ROA, M. G. *et al.* Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives. **Blood Transfusion.**, p. 222-231. Maio 2017

SCOTT, K. L. *et al.* Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and future. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 19, n. 2, p. 127-142, 2005.

SOUSA, R. S. *et al.* Lesões de armazenamento durante a conservação de sangue nas diferentes espécies: Uma revisão. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 6, n. 2, p.68-79, out. 2012.

VERONA, A. C. M.; NAKAGE, A.P.M. **Avaliação laboratorial das bolsas estocadas de sangue total e concentrado de hemácias de cães.** XII Encontro de Iniciação Científica do Centro Universitário “Barão de Mauá”, 2018.

WARDROP, K. J. *et al.* An in vitro evaluation of storage media for the preservation of canine packed red blood cells. **Veterinary Clinical Pathology.** Washington, p. 83-88. 23 mar. 1994.

WARDROP, K. J. *et al.* Evaluation of an additive solution for preservation of canine red blood cells. **Jornal Of Veterinary Internal Medicine.**, p. 253-257. Jul. 1994.

WARDROP, K.J. *et al.* Evaluation of canine red blood cells store in a saline, adenine, and glucose solution for 35 days. **Journal of Veterinary Internal Medicin.** v.11, p.5-8, 1997.