

## **Avaliação do concentrado de hemácias de cães após leucorredução.**

**Autores: Marília Ribeiro Garcia<sup>1</sup>, Ana Paula Massae Nakage Canesin<sup>1,2</sup>**

**Colaborador: Cesar Augusto Sangaletti Terçariol<sup>1</sup>**

**<sup>1</sup> Centro Universitário Barão de Mauá**

**<sup>2</sup> Hemolabvet – Laboratório de Patologia Clínica, Microbiologia e Hemocentro Veterinário**

*<sup>1</sup>mazaribeirog@gmail.com – Medicina Veterinária, <sup>2</sup>anapaula.nakage@baraodemaua.br*

### **Resumo**

A leucorredução é um procedimento da medicina transfusional realizado para redução do número de leucócitos do concentrado de hemácias (CH). No estudo, foram coletadas dez bolsas de sangue de cães doadores aptos que foram processadas para obtenção do CH após filtragem (G1) e sem filtragem para leucorredução (G2) do mesmo doador, sendo avaliadas e analisadas estatisticamente a contagem total de leucócitos e a taxa de hemólise em diferentes momentos.

### **Introdução**

A medicina transfusional tem fundamental importância no tratamento de algumas doenças médicas e cirúrgicas em animais de companhia. A transfusão de hemoderivados está se tornando cada vez mais comum devido à sua crescente disponibilidade, além da descoberta do conservante de hemácias e soluções anticoagulantes que prolongam o armazenamento desses produtos (WILSON *et al.*, 2017).

Quando o sangue é estocado para fins transfusionais pode ocorrer alterações que são conhecidas como “lesões de armazenamento”, que podem contribuir para a mortalidade de pacientes críticos (LACERDA *et al.*, 2014).

A leucorredução tornou-se uma técnica importante para melhorar a qualidade do sangue armazenado (LACERDA *et al.*, 2014), sendo um procedimento que reduz o número de leucócitos de um hemocomponente, visando evitar algumas reações adversas provocadas pelos leucócitos do doador no receptor (NOTOMI *et al.*, 2017), uma vez que os leucócitos são células metabolicamente ativas e produzem citocinas inflamatórias (ANTOGNONI *et al.*, 2021), que podem causar lesões de armazenamento e reações transfusionais (STEFANI *et al.*, 2021). Na medicina transfusional humana, foi identificada a qualidade do sangue armazenado como uma

das principais questões que contribuem com as possíveis implicações clínicas para os receptores de transfusão sanguínea, entretanto, na medicina veterinária as alterações bioquímicas do eritrócito canino e o efeito da leucorredução na qualidade *in vitro* das hemácias ainda é pouco investigado (STEFANI *et al.*, 2021).

### **Objetivos**

O presente estudo teve como objetivo avaliar a contagem leucocitária e taxa de hemólise em bolsas CPD/SAG – Manitol–1 com e sem filtro para leucorredução em diferentes momentos, comparando a contagem total de leucócitos do concentrado de hemácias filtrado (G1) e não filtrado (G2) de um mesmo doador, a taxa de hemólise entre os dois grupos e a viabilidade do uso de bolsas com filtro para leucorredução.

### **Materiais e Métodos**

Foram coletadas dez bolsas de sangue de cães aptos, acima de 25kg, com idade entre 1 a 8 anos, saudáveis, dóceis, devidamente vacinados e vermifugados, livres de ectoparasitas, sem histórico prévio de doenças transmissíveis pelo sangue, transfusões recentes e sem o uso de quaisquer medicações contínuas. Após a antisepsia do local, foi realizada a coleta de sangue por meio de venopunção única da veia jugular em bolsa com CPD (JP Indústria Farmacêutica). A bolsa com sangue total foi centrifugada para obtenção do concentrado de hemácias, sendo retirada uma alíquota de 20mL em bolsa estéril para análises posteriores do G2. Em seguida, o restante do CH foi filtrado e foi separado 20mL em bolsa estéril para análise do G1. As bolsas de CH do G1 (filtrado) e G2 (não filtrado) de cada doador foram armazenadas sob refrigeração (1°C a 6°C).

As análises laboratoriais foram realizadas com cerca de 1 mL de CH retirado das bolsas em cada momento do estudo: D0 (dia da coleta),

D7 (sete dias após a coleta), D14 (quatorze dias após a coleta), D21 (vinte e um dias após a coleta), D28 (vinte e oito dias após a coleta) e D35 (trinta e cinco dias após a coleta). Em todos os momentos foi avaliada a contagem total de leucócitos realizada no analisador hematológico veterinário Poch 100- iV e a taxa de hemólise que foi determinada pela concentração de hemoglobina total (HbT) e hemoglobina plasmática livre (HbL). Para mensurar a taxa de hemólise, 2,5mL do reagente para hemoglobina (Labtest) foi adicionado de 5uL de sangue para determinação da HbT e 2,5mL do reagente foi adicionado de 5uL de plasma para determinação da HbL. Após 5 minutos protegidos da luz, as amostras foram lidas no analisador bioquímico semiautomático Bio-2000. A taxa de hemólise (Tx) foi calculada pela fórmula:

$$Tx (\%) = \frac{(100-Ht) \times HbL}{HbT}$$

Tx – taxa de hemólise (%)

Ht – hematócrito (em %)

HbT – hemoglobina total (em g/dL)

HbL – hemoglobina livre plasmática (em g/dL)

A análise estatística foi realizada pelo método não paramétrico de Friedman e Wilcoxon pareado para comparar a contagem de leucócitos e a taxa de hemólise entre o grupo filtrado (G1) e não filtrado (G2) nos diferentes momentos de avaliação. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPAN) no processo 450/22.

## Resultados e Discussão

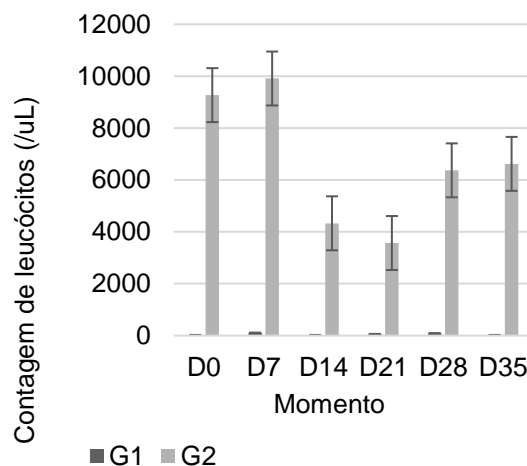
Os valores médios e erro-padrão, que foram analisados pelo teste não paramétrico Wilcoxon pareado (teste de sinais), da contagem total de leucócitos e da taxa de hemólise (Tx), dos CH filtrados (G1) e não filtrados (G2) nos diferentes momentos estão representados nas tabelas e figuras 1 e 2, a seguir.

**Tabela 1 – Valores médios e erros-padrão da contagem de leucócitos totais contabilizadas nos CHs filtrado (G1) e não filtrado (G2) nos diferentes momentos da avaliação (D0 – dia da coleta, D7-7ºdia, D14-14º dia, D21 – 21º dia, D28 – 28º dia e D35 – 35º dia).**

Ribeirão Preto (SP), 2023.

MOMENTOS	G1	G2
D0	10±10/uL	9270±517/uL
D7	100±78/uL	9910±603/uL
D14	10±10/uL	4330±1546/uL
D21	50±40/uL	3570±1240/uL
D28	80±80/uL	6370±777/uL
D35	10±10/uL	6620±400/uL

**Figura 1 – Valores médios e erros-padrão da contagem de leucócitos totais dos CHs filtrado (G1) e não filtrado (G2) nos diferentes momentos da avaliação (D0 – dia da coleta, D7- 7ºdia, D14-14º dia, D21 – 21º dia, D28 – 28º dia e D35 – 35º dia).**



Os valores da contagem de leucócitos verificados na tabela e figura 1 foram, em todos os momentos, maiores nos CHs não filtrados (G2) do que nos filtrados (G1), como já esperado, devido à função do filtro para leucorredução. Na avaliação de cada momento da estocagem, observou-se que o D0 e o D7 contêm os maiores valores de contagem de leucócitos no G2. No G1, os valores não ultrapassaram a contagem de 100 leucócitos, provando a funcionalidade do filtro. Em relação à contagem global leucocitária houve diferença estatisticamente significativa nos CH filtrados (43±38 leucócitos/uL) e não filtrados (6678±847 leucócitos/uL).

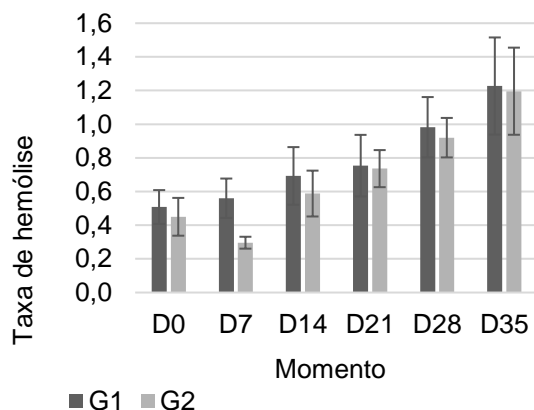
A análise estatística da contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos segmentados, linfócitos, neutrófilos bastonetes, eosinófilos e monócitos) foi realizada comparando o número de células dos grupos filtrado (G1) e não filtrado (G2) pelo teste paramétrico de Wilcoxon não pareado. Houve diferença estatisticamente significativa

nos neutrófilos segmentados e linfócitos do G1 e G2.

**Tabela 2 – Valores médios e desvios-padrão da taxa de hemólise (Tx) nos CH filtrados (G1) e não filtrados (G2) nos diferentes momentos da avaliação (D0 – dia da coleta, D7- 7ºdia, D14-14º dia, D21 – 21º dia, D28 – 28º dia e D35 – 35º dia). Ribeirão Preto (SP), 2023.**

MOMENTOS	G1 (%)	G2 (%)
D0	0,508±0,100	0,450±0,112
D7	0,560±0,117	0,296±0,035
D14	0,693±0,170	0,588±0,136
D21	0,754±0,182	0,736±0,110
D28	0,982±0,179	0,920±0,117
D35	1,227±0,288	1,196±0,258

**Figura 2 – Valores médios e desvios-padrão da taxa de hemólise (Tx) nos CHs filtrado (G1) e não filtrado (G2) nos diferentes momentos da avaliação (D0 – dia da coleta, D7- 7ºdia, D14-14º dia, D21 – 21º dia, D28 – 28º dia e D35 – 35º dia).**



Observando a tabela e figura 2, foi possível observar que os valores da taxa de hemólise (Tx), tanto nos CH filtrados (G1) e não filtrados (G2), se elevaram no decorrer do tempo de avaliação, sendo o grupo filtrado com valores maiores desde o dia da coleta (D0). Entretanto, não houve diferença significativa na taxa de hemólise entre G1 (0,79±0,17) e G2 (0,70±0,12).

Foi realizada a correlação entre a contagem total de leucócitos com as taxas de hemólise nos diferentes momentos de avaliação pelo coeficiente de correlação de Spearman e os dados não foram estatisticamente significativos, ou seja, a filtração não provocou hemólise dos CH em relação aos CHs não

filtrados, assim como relatado por Antognoni *et al.* (2021).

Durante o armazenamento, podem ocorrer várias alterações físico-químicas nos eritrócitos que podem ser classificadas em três categorias, sendo elas bioquímica, biomecânica e imunológica que afetam a sobrevivência e a função celular podendo, conseqüentemente, afetar a resposta do receptor após a transfusão (WILSON *et al.*, 2017). Porém resultados demonstraram uma boa qualidade durante os 35 dias de armazenamento podendo ser utilizado em todos os casos de anemia (STEFANI *et al.*, 2021).

Dentre as técnicas existentes de leucorredução do sangue, a filtração vem sendo a mais eficiente retendo aproximadamente 99,9% dos leucócitos (NOTOMI *et al.*, 2017). Na literatura, estudos justificam o uso da leucorredução na redução da hemólise durante o armazenamento dos CH, sendo que alguns autores sugerem que o filtro poderia remover glóbulos vermelhos deformáveis e frágeis que estavam presentes no momento da coleta (ANTOIGNONI *et al.*, 2021). Já outros, sugerem que em unidades não leucorreduzidas, os leucócitos contribuem para o consumo rápido de substratos de energia para produzir ATP para seu metabolismo e isso poderia causar uma redução na produção de ATP pelas hemácias que afeta a membrana eritrocitária, causando um aumento da hemólise (ANTOIGNONI *et al.*, 2021). Contrariando as fontes citadas anteriormente, no nosso estudo, a leucorredução dos CHs (G1) não influenciou significativamente na taxa de hemólise, a qual foi crescente conforme o tempo de armazenamento.

## Conclusão

No presente estudo concluímos que, além do filtro cumprir a sua finalidade de leucorredução, a filtração não causou a hemólise dos concentrados de hemácias (CH). O filtro de leucócitos nas bolsas de CH não promove alterações que prejudiquem a qualidade das bolsas e deve ser utilizado para evitar reações transfusionais nos receptores.

## Referências

ANTOIGNONI, Maria Teresa *et al.* Effect of Leukoreduction on Hematobiochemical Parameters and Storage Hemolysis in Canine Whole Blood Units. **Animals**, [S.L.], v. 11, n. 4,

p. 925, 24 mar. 2021. MDPI AG.  
<http://dx.doi.org/10.3390/ani11040925>.

FERREIRA, Rui R. F. *et al.* In vitro hemolysis of stored units of canine packed red blood cells. **Journal Of Veterinary Emergency And Critical Care**, [S.L.], v. 28, n. 6, p. 512-517, 9 out. 2018. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/vec.12770>.

KUO, Kendon W. *et al.* Small Animal Transfusion Medicine. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**, [S.L.], v. 50, n. 6, p. 1203-1214, nov. 2020. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.001>.

LACERDA, Luciana A. *et al.* Effects of four additive solutions on canine leukoreduced red cell concentrate quality during storage. **Veterinary Clinical Pathology**, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 362-370, 18 ago. 2014. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12163>.

NOTOMI, Marcia Kikuyo *et al.* Leucorredução de hemocomponentes na medicina veterinária. **Veterinária Notícias**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 16-32, 30 dez. 2017. EDUFU - Editora da Universidade Federal de Uberlândia.  
<http://dx.doi.org/10.14393/vtn-v23n2-2017.3>.

RODRIGUES, Renata R. *et al.* Evaluation of hematologic, biochemical, and blood gas variables in stored canine packed red blood cells, and the impact of storage time on blood recipients. **Veterinary Clinical Pathology**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 198-206, jun. 2020. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12865>.

STEFANI, Annalisa *et al.* Effects of leukoreduction on storage lesions in whole blood and blood components of dogs. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 936-945, 16 fev. 2021. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/jvim.16039>.

WILSON, C. R. *et al.* Biochemical evaluation of storage lesion in canine packed erythrocytes. **Journal Of Small Animal Practice**, [S.L.], v. 58, n. 12, p. 678-684, 25 jul. 2017. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/jsap.12713>.