

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS DO SANGUE TOTAL FELINO
ARMAZENADO EM BOLSAS PLÁSTICAS
CONTENDO CPDA-1 E CPD/SAG-M**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bianca Bertoletti

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS
DO SANGUE TOTAL FELINO ARMAZENADO EM BOLSAS
PLÁSTICAS CONTENDO CPDA-1 E CPD/SAG-M**

Bianca Bertoletti

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Dr. Alceu Gaspar Raiser

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO
SANGUE TOTAL FELINO ARMAZENADO EM BOLSAS PLÁSTICAS
CONTENDO CPDA-1 E CPD/SAG-M**

elaborada por
Bianca Bertoletti

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Alceu Gaspar Raiser, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Anne Santos do Amaral, Dr. (UFSM)

Adriano Carregaro, Dr. (USP)

Santa Maria, 01 de março de 2011.

Dedico esta dissertação aos meus amores:

Fabricio Freitas da Silva;

Meus pais Alberto e Irene;

Minhas irmãs Dardane e Roberta;

E à minha Pitica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFSM, instituição responsável pela minha formação e da qual tenho imenso orgulho.

Ao meu orientador, Prof. Alceu Gaspar Raiser, por que tenho enorme admiração. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos desde a minha graduação, pela confiança, pelas idéias e principalmente pelas oportunidades.

À minha fantástica equipe de trabalho: Patrícia Wolkmer, Jorge Luiz Costa Castro, Verônica Souza Paiva Castro, Francieli Marconato e André Vasconcelos Soares, sem os quais nada disso seria possível. Muito obrigada por tudo! Esse trabalho é de vocês.

Às estagiárias Fernanda Cátia Müller e Jaíne Soares de Paula Vasconcellos por toda ajuda, dedicação e carinho com que trataram os animais desse experimento.

À funcionária Nelci Valcanover Albanio de Souza, que diariamente homogeneizava as bolsas de sangue, obrigada pela ajuda não só durante a realização deste projeto, mas durante todo o mestrado.

A todos os professores funcionários, colegas e amigos do HVU e LACE, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

À Dr^a Anne Santos do Amaral por toda a atenção, tempo e ajuda que me foi dada. Obrigada por “abraçar” comigo todos os casos clínicos difíceis, e pelo enorme aprendizado transmitido nesses dois anos de convivência.

À secretária do PPGMV, a querida Maria Moro da Rosa, por toda ajuda desde que iniciei no mestrado.

A toda equipe do LacVet, em especial à Dr^a Cíntia Melazzo Mazzanti pela disponibilidade e pelo auxílio no desenvolvimento desse estudo.

Ao Dr. Adriano Bonfim Carregaro pelas contribuições para a melhoria deste trabalho.

Ao colega Márcio Machado Costa e ao Prof. Paulo pela ajuda com a análise estatística.

À Adriane, Vera e Diogo do Hemocentro de Santa Maria pela selagem das bolsas de transferência.

À Dr^a Marta Duarte e ao LABIMED pela realização de alguns exames para esse estudo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa e auxílio financeiro para realização desse experimento.

Aos meus pais, Irene Leite Bertoletti e Alberto Bertoletti que, da sua maneira, sempre fizeram de tudo para ajudar e incentivar o meu crescimento profissional e pessoal

Ao meu namorado, melhor amigo e companheiro Fabricio Freitas da Silva, obrigada pela paciência, compreensão, incentivo, por estar comigo em todos os momentos que mais

precisei. Obrigada pela alegria e tranquilidade que me transmite e principalmente por me fazer acreditar que tudo é possível.

À grande amiga Marina Gabriela M. C. Mori da Cunha, pela torcida, pela ajuda e pela amizade.

À querida amiga e farmacêutica Gabriela de Moraes Barbosa, obrigada pela amizade pela disponibilidade de me ouvir e sempre ajudar em tudo que estava ao seu alcance.

À amiga e ex-estagiária Renata de Gaspari pela ajuda, incentivo e pelo enorme carinho e dedicação prestados aos animais deste experimento e aos meus pacientes de rotina.

À minha Pitica, pela companhia durante todas as madrugadas de estudo, alegria e brilho nos olhos com que me recebe sempre.

Obrigada aos cães Flape, Chuleta e Granita, e aos demais animais utilizados em aula por terem trazido ensinamentos não apenas técnicos, mas também humanitários.

A todos os gatos e gatas que fizeram parte do meu experimento: Manga, Pitanga, Caqui, Mamão, Melão, Lima, Laranja, Uva, Pêra, Figo, Goiaba, Limão, Cacau e Cereja, os quais procurei tratar com máximo de ética, respeito, amor e afeição. E também aos demais com quem tive o prazer de conviver e aprender: Amora, Carambola, Bergamota, Maçã, Açaí, Ninoca, Meg, Tigrão. A todos minha eterna gratidão!

Muito obrigada!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SANGUE TOTAL FELINO ARMAZENADO EM BOLSAS PLÁSTICAS CONTENDO CPDA-1 E CPD/SAG-M

AUTORA: BIANCA BERTOLETTI
ORIENTADOR: ALCEU GASPAR RAISER
Santa Maria, 01 março de 2011

Esse estudo teve por objetivo avaliar a influência da peroxidação lipídica sobre a diminuição da viabilidade eritrocitária no sangue total de gatos, armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrose, adenina) e CPD/SAG-M (citrato, fosfato, dextrose, salina, adenina glicose, manitol) durante de 28 dias. Também se buscou analisar os parâmetros bioquímicos e hematológicos do sangue felino durante todo o período de armazenamento. Para tal, foram utilizados 12 gatos, adultos, hípidos, de ambos os sexos, sem raça definida (s.r.d.), pesando em média $3,5 \pm 0,6$ kg. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais, denominados G1 e G2, dos quais se coletou em média 15 mL/kg de sangue, e armazenou-se em bolsas para transferência de hemoderivados. Para a conservação do sangue do G1 foi utilizado CPDA-1 e, para o G2, utilizou-se CPD/SAG-M. O sangue foi mantido sob refrigeração (1 a 6°C) durante 28 dias e foram retiradas amostras para análise semanalmente. Essas alíquotas foram avaliadas quanto à peroxidação lipídica, medida através de TBARS (substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico), peroxidação de eritrócitos *in vitro* concentrações de potássio (K^+), lactato, glicose e hemoglobina extracelular, contagem total de eritrócitos, hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), e proteínas plasmáticas totais (PPT) Por meio dessas avaliações constatou-se que os níveis de lactato, potássio e hemoglobina extracelular são eficientes parâmetros para avaliação da qualidade do sangue estocado para a espécie felina e que a análise de TBARS é válida para comprovar a associação da peroxidação lipídica à diminuição da viabilidade sanguínea, também para a espécie felina. Além disso, CPD/SAG-M mostrou-se mais eficiente que CPDA-1 na manutenção da viabilidade do sangue felino a partir do 14^o dia, em um período de estocagem de 28 dias.

Palavras-chave: gatos, transfusão sanguínea, radicais livres, hemólise.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

LIPID PEROXIDATION AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF FELINE WHOLE BLOOD STORED IN PLASTIC BAGS CONTAINING CPDA-1 AND CPD / SAG-M

AUTHOR: BIANCA BERTOLETTI
ADVISER: ALCEU GASPAR RAISER
Santa Maria, March 01th, 2011

This study aimed to evaluate the influence of lipid peroxidation on decrease of erythrocyte viability in total blood of cats stored in plastic bags containing CPDA-1 (citrate phosphate dextrose adenine) and CPD / SAG-M (citrate, phosphate, dextrose, saline, adenine, glucose, mannitol) for 28 days. It was also analyzed the biochemical and hematological parameters of feline blood throughout the storage period. To this end, were used 12 cats, adult, healthy, male and female, mixed breed, weighing on average 3.5 ± 0.6 kg. The animals were randomly divided into two experimental groups, designated G1 and G2, which was collected on average 15 mL/kg of blood, and stored in bags for shipment of blood products. For the preservation of blood it was used to G1 and G2 CPDA-1 and CPD / SAG-M, respectively. The blood was kept under refrigeration ($1-6^{\circ}$ C) for 28 days and samples were taken for analysis weekly. These rates were evaluated for lipid peroxidation measured by TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), erythrocytes peroxidation *in vitro*, concentrations of potassium (K^{+}), lactate, glucose and extracellular hemoglobin, erythrocyte count, hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb) and total plasma protein (TPP) Through these evaluations it was found that the lactate, potassium and extracellular hemoglobin are effective parameters to evaluate the quality of stored blood to felines and the analysis of TBARS applies to prove the association of lipid peroxidation decreased the viability of blood, also for the felines. Moreover, CPD/SAG-M was more efficient than CPDA-1 in maintaining the viability of the feline blood after 14 days in a storage period of 28 days.

Keywords: cats, blood transfusion, free radicals, citrate, hemolysis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Esquema representativo da geração de radicais livres. | 18 |
| Figura 2 – Sistema adaptado para coleta e armazenamento de sangue de felinos, utilizando torneira de três vias acoplada a bolsa plástica para transferência de hemoderivados, seringa de 20 ml contendo anticoagulante e <i>Scalp</i> 19G. | 21 |
| Figura 3 – Acondicionamento do sangue de gatos, armazenado em bolsas plásticas, em geladeira com temperatura controlada por termômetro de máxima e mínima. | 22 |
| Figura 4 – Representação gráfica da correlação linear entre hemoglobina extracelular e íon K^+ . Observa-se uma correlação positiva, sendo que a medida que aumentam os níveis de K^+ , elevam-se também os níveis de hemoglobina no meio extracelular. | 27 |
| Figura 5 – Representação gráfica da correlação linear entre hemoglobina extracelular e lactato. Observa-se uma correlação fortemente positiva, sendo que a medida que aumentam os níveis de lactato, elevam-se os níveis de hemoglobina no meio extracelular. | 29 |
| Figura 6 – Representação gráfica da correlação linear entre TBARS e hemoglobina extracelular. Nota-se correlação positiva, e a medida aumenta a peroxidação lipídica medida através de TBARS, há um aumento também nos níveis de hemoglobina extracelular. | 30 |
| Figura 7 – Representação gráfica da Correlação linear entre TBARS e Susceptibilidade ao peróxido de hidrogênio. Nota-se que a medida que há uma tendência a aumentar a suscetibilidade dos eritrócitos ao peróxido de hidrogênio a medida que aumenta a peroxidação lipídica (TBARS).. | 31 |

APÊNDICES

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Parâmetros hematológicos: Médias (X) obtidas em cada tempo para os grupos 1 (CPDA-1) e (CPD/SAG-M), com respectivo desvio padrão (S).. | 39 |
| Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos e peroxidação lipídica: Médias (X) obtidas em cada tempo para os grupos 1 (CPDA-1) e (CPD/SAG-M), com respectivo desvio padrão (S).. | 40 |
| Tabela 3 - Peroxidação lipídica e Peroxidação de eritrócitos <i>in vitro</i> : Médias (X) obtidas em cada tempo para os grupos 1 (CPDA-1) e (CPD/SAG-M), com respectivo desvio padrão (S). | 41 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 Conservação do sangue para transfusão | 14 |
| 2.2 Lesões de estocagem do sangue..... | 15 |
| 2.3 Peroxidação lipídica | 17 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 ANIMAIS UTILIZADOS | 20 |
| 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS..... | 20 |
| 3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 20 |
| 3.4 MENSURAÇÃO DOS PARÂMETROS | 22 |
| 3.4.1 Peroxidação lipídica | 23 |
| 3.4.2 Peroxidação de eritrócitos <i>in vitro</i> | 23 |
| 3.4.3 Avaliação hematológica | 23 |
| 3.4.4 Avaliação bioquímica..... | 23 |
| 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 24 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 25 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 33 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |
| APÊNDICES | 38 |

1 - INTRODUÇÃO

É notável em medicina veterinária o avanço da terapia transfusional nas últimas décadas. Sendo assim, medidas como a identificação de doadores, o reconhecimento de doenças infecciosas, e o uso de componentes do sangue, vêm progredindo significativamente (CHIARAMONTE, 2004). Desta maneira, as transfusões sanguíneas tornaram-se um componente importante do cuidado médico e cirúrgico intensivo também na medicina de felinos (BARFIELD, ADAMANTOS, 2011).

Utiliza-se para coleta de sangue felino, sobretudo, seringas contendo anticoagulante, conectadas a um *scalp*, para venopunção (FELDMAN, SINK; 2006; HALE, 2006). A coleta de sangue para transfusão nesta espécie é considerada mais desafiadora que em cães (CHIARAMONTE, 2004), principalmente pelo pequeno volume a ser seguramente retirado e pela necessidade de sedação (FELDMAN, SINK, 2006).

Embora as técnicas para separação dos componentes sanguíneos já estejam bem estabelecidas, o uso de sangue total ainda se destaca principalmente para gatos. E nessa espécie observa-se que o sangue total fresco ainda é mais frequentemente utilizado que sangue total conservado (FELDMAN, SINK; 2006). Um dos fatores que contribui para isso é a indisponibilidade de bolsas próprias para coleta de pequenos volumes de sangue, as quais têm a comercialização restrita a bancos de sangue de poucos países (SIMAS, 2009).

As soluções conservantes foram desenvolvidas e aprimoradas para manter o metabolismo energético eritrocitário através da glicólise e assegurar a viabilidade celular durante a estocagem do sangue. (SECCHI, 2010). Medidas como a escolha da solução conservante mais adequada, o controle da temperatura de armazenamento, o tipo de embalagem e o manuseio apropriado durante o período de estocagem, visam minimizar as lesões decorrentes de armazenamento do sangue. Essas injúrias, que ocorrem *in vitro*, alteram os componentes sanguíneos e diminuem a sobrevivência dos eritrócitos, tanto durante o seu armazenamento, quanto após a transfusão no paciente (HALE, 2006)

Em humanos, estudos demonstram haver relações entre as lesões sofridas pelos eritrócitos durante o seu armazenamento e a produção de radicais livres. Considera-se ainda que a peroxidação lipídica seja a principal causa do envelhecimento dos eritrócitos sanguíneos em bolsas para transfusão (CHIU et al., 1989).

Tendo em vista as poucas informações disponíveis sobre o armazenamento do sangue de felinos, este estudo objetivou avaliar os parâmetros bioquímicos e hematológicos do

sangue de gatos armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M, pelo período de 28 dias. Também se buscou verificar se o processo de peroxidação lipídica está associado à diminuição da viabilidade sanguínea, já que para a espécie em questão esses dados são praticamente inexistentes até o presente.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

As transfusões sanguíneas tornaram-se uma prática frequente em medicina humana a partir do século 19, mesmo sendo consideradas, naquela época, um procedimento de alto risco. Já no século 20, houve grandes avanços que tornaram essa prática segura e mais difundida, dentre elas a descoberta dos anticoagulantes e conservantes para hemoderivados, a descrição dos grupos sanguíneos humanos e o desenvolvimento dos testes de compatibilidade sanguínea (BIRD, 1971). Na medicina veterinária, a terapia transfusional emergiu como uma forma prática a partir de 1950 (HOSGOOD, 1990).

Nos últimos anos, grande ênfase tem sido dada à terapêutica felina, isso porque a popularidade do gato como animal de companhia vem aumentando significativamente (SOUZA, 2002). Em decorrência disso, houve um aumento na casuística de atendimentos clínicos, intervenções cirúrgicas e procedimentos emergenciais nesta espécie, sendo que muitas vezes esses animais requerem a reposição volêmica, devido à hemorragia aguda ou crônica (SOARES, 2008).

Nos gatos em particular, as transfusões de sangue se tornaram um componente importante de cuidado clínico e cirúrgico intensivo por parte dos profissionais (WEINGART et al., 2004; ROUX et al., 2008). As transfusões sanguíneas são usualmente praticadas nos casos de anemia severa devido à perda de sangue, hemólise ou falha medular (WEINGART et al., 2004). Para essas transfusões, o uso de sangue total fresco é mais comum, e o anticoagulante de eleição é geralmente o citrato com fosfato dextrose e adenina, CPDA-1 (FELDMAN, SINK; 2006).

A seleção dos doadores é um passo importante da medicina transfusional e deve-se considerar que um doador ideal apresente média entre dois e cinco anos de idade e, no mínimo, 4 kg de peso (LOPES et al., 2007). A coleta de sangue felino é considerada trabalhosa e, salvo raras exceções, exige sedação (CHIARAMONTE, 2004).

A coleta também se difere no volume total a ser retirado. Em comparação com cães, o volume retirado de felinos representa uma maior porcentagem do volume sanguíneo (LOPES et al., 2007). PRITTIE (2003) afirma que para gatos não se deve exceder o total de 40 a 50 mL de sangue coletados por animal, e para esse volume recomenda-se o uso de 5-9 mL de anticoagulante, respectivamente. Já para LANEVSKI, WARDROP (2001), a dose máxima a ser coletada é de 15 mL/kg de peso, e o intervalo mínimo entre as coletas é de 21 dias.

Na medicina humana, a estocagem sanguínea vem sendo realizada desde 1943. A partir daí, estudos vêm sendo realizados com o objetivo de manter a viabilidade e a capacidade funcional dos constituintes sanguíneos (AUTHMENT, 1986). O interesse na terapia transfusional na medicina veterinária vem aumentando cada vez mais. Em paralelo, há um crescente conhecimento das técnicas de processamento dos subprodutos sanguíneos do cão e do gato (BOOTHE, 2001).

WEINGART et al. (2004) citam que o armazenamento de sangue felino raramente é praticado, devido ao volume, dificuldade de coleta, e possibilidade de contaminação quando utilizados sistemas abertos para coleta.

2.1 Conservação do sangue para transfusão

A manutenção da fisiologia normal dos eritrócitos é uma consideração importante para a escolha do anticoagulante mais apropriado para conservação do sangue, pois os eritrócitos sofrem alterações significativas durante o armazenamento. A capacidade de carrear oxigênio muda, assim como a quantidade de adenosina trifosfato (ATP) e ácido 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) diminuem (BOOTHE, 2001).

O 2,3-DPG é uma molécula que está presente no interior dos eritrócitos e se liga à subunidade β da hemoglobina. Esse ácido é o responsável pela liberação do oxigênio para os tecidos. Quanto menores os níveis de 2,3-DPG, maior será a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, e, conseqüentemente menos oxigênio será entregue aos tecidos (BOOTHE, 2001). O 2,3-DPG está diretamente relacionado ao pH sanguíneo e sabe-se que quando o pH é inferior a 7,0, sua degradação é favorecida, o que prejudica de forma significativa o carregamento do O_2 pelo eritrócito (HESS, GREENWALT, 2002).

Hoje em dia, diversas soluções estão disponíveis, a fim de evitar a coagulação e conservar o sangue destinado à transfusão, sendo a maior parte delas à base de citrato. O citrato de sódio isoladamente não contribui para a preservação dos componentes sanguíneos, e o sangue total coletado com esse anticoagulante deve ser utilizado dentro de 24h (LANEVSKI, WARDROP, 2001). Ele age sobre as fases cálcio-dependentes na cascata de coagulação (AUTHMENT et al., 1986). Além disso, possui um efeito de estabilização de membrana celular, promovendo a manutenção do pH intracelular (HÖGMAN et al., 2002).

A adição de suplementos, denominados de soluções aditivas (AS) melhora consideravelmente os valores bioquímicos e hematológicos do sangue conservado. Existe uma

série de combinações de anticoagulantes com soluções aditivas para conservação de sangue em bolsas, porém a mais utilizada em medicina veterinária é CPDA-1, composta por citrato, fosfato, dextrose e adenina (LANEVSKI, WARDROP, 2001).

Na composição de CPDA-1, o fosfato, além de ser um importante substrato, também ajuda no controle do pH sanguíneo (KURUP et al., 2003). A adição de dextrose como fonte de energia, baseia-se no lento consumo desse carboidrato pelo metabolismo celular em baixas temperaturas, o que contribui, inclusive, com a manutenção de níveis adequados de ATP (AUTHEMENT et al., 1986). A adição de adenina está fundamentada no fato de que, com a queda do pH durante a conservação do sangue, há inativação de enzimas que participam da via glicolítica, levando a um maior consumo de ATP. Essa adição de adenina promove um aumento do adenilato, que servirá de substrato para nova síntese de ATP, aumentando as reservas desse nucleotídeo no interior das células (AUTHEMENT et al., 1986; HÖGMAN et al., 2002).

O uso de soluções contendo CPD/SAG-M (citrato, fosfato dextrose, salina adenina, glicose e manitol) mantém a energia e a viabilidade dos eritrócitos durante o armazenamento e preservam hemácias humanas por até 42 dias. Suas vantagens são a redução na taxa de hemólise, melhora na fluidez durante a transfusão com diminuição no desconforto do receptor, aumento no volume de plasma recuperado, diminuição de reações alérgicas às proteínas do plasma, e também facilita a filtração de leucócitos (FELDMAN, SINK, 2006). HOHENHAUS (2007) afirma que pouco se sabe sobre a conservação de sangue felino em CPD/SAG-M, principalmente quanto ao tempo de armazenamento.

Em estudo realizado por COSTA JÚNIOR et al. (2008), bolsas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M foram utilizadas para armazenagem de sangue total de caninos e avaliadas pelo período de 42 dias, e, ao término das avaliações, essa solução mostrou-se mais indicada para a conservação da viabilidade sanguínea que CPDA-1.

Deve-se sempre lembrar que as soluções anticoagulantes e conservantes não inibem o crescimento de contaminantes microbiológicos, sendo necessário o emprego de refrigeração com temperatura controlada (FELDMAN, SINK, 2006).

2.2 Lesões de estocagem do sangue

BENNETT-GUERRERO et al. (2007) identificaram severas alterações durante o armazenamento sanguíneo, tais como o aumento nos níveis de potássio, lactato e saturação de

oxigênio da hemoglobina. Além dessas, também notaram concomitante diminuição no pH, 2,3-DPG e na deformabilidade nos eritrócitos. Algumas dessas alterações se iniciavam nas primeiras horas de armazenamento, e outras poucos dias após. Não surpreendentemente, as alterações eram acompanhadas por mudanças celulares e moleculares, que alteravam a integridade dos eritrócitos. A esse conjunto de alterações sofridas pelo sangue armazenado, que é responsável por minimizar a taxa de sobrevivência das células após a transfusão, deu-se o nome de lesões de armazenamento ou estocagem (CHIN-YEE et al., 1997). A importância do conhecimento dessas lesões está na evidência de que o período de armazenamento influi nos valores dos componentes na bolsa de sangue (BENNETT-GUERRERO et al., 2007).

O tempo de conservação pode contribuir com a diminuição da eficiência do sangue basicamente de três formas: diminuindo a capacidade de oxigenação, causando danos aos constituintes (ação da hemoglobina livre como fonte de radicais livres), ou ainda dificultando a capacidade circulatória (por adesão à superfície endotelial e acompanhada de propriedades pró-inflamatórias, por exemplo) (ANNIS; SPARROW, 2007).

Além do tempo, a temperatura de armazenamento, o tipo de embalagem e manuseio durante os períodos de conservação também estão diretamente relacionadas às lesões de armazenamento do sangue (HALE, 2006). Como resultado dessas lesões, ocorrerão principalmente hemólise, variações de pH e concentração eletrólitos, principalmente K^+ (HALE, 2006; SECCHI, 2010).

Quando o sangue passa ao recipiente onde será armazenado *in vitro*, este local de armazenamento representa uma condição muito diferente da encontrada no organismo vivo. Para produção de ATP é utilizado o metabolismo celular anaeróbico, que tem como produto final o lactato, levando ao acúmulo de íons H^+ (AUTHEMENT et al., 1986). O aumento do dióxido de carbono (CO_2) é resultado da ação tampão do bicarbonato (HCO_3^-) sanguíneo na neutralização do lactato. A rápida elevação na concentração de lactato e CO_2 , com conseqüente diminuição no pH está condicionada à taxa metabólica, que por sua vez depende da temperatura, da composição do meio de armazenamento e do meio intra-celular (HÖGMAN, MERYMAN, 1999). A refrigeração, variando em torno de um a seis graus Celsius, tem como função desacelerar essas reações bioquímicas, possibilitando maior período de conservação do sangue (AUTHEMENT ET al., 1986).

O K^+ é um íon presente principalmente no fluido intracelular, sendo que apenas 2% dele encontra-se no meio extracelular, já o sódio (Na^+) apresenta maiores concentrações no fluido extracelular. O equilíbrio entre esses íons é mantido, principalmente, pela bomba Na^+/K^+ da membrana plasmática, e é diretamente influenciado por baixos valores de pH

(BUSH, 2004) e temperatura (BENNET-GUERRERO et al., 2007). O conteúdo de potássio K^+ dos eritrócitos varia entre as espécies de mamíferos e a hemólise pode resultar em hipercalemia nas espécies com altas concentrações desse íon em seus eritrócitos. Geralmente os eritrócitos normais de cães e gatos adultos contêm concentrações de potássio semelhantes às do plasma e a hemólise não ocasiona hipercalemia (PRICE et al., 1988). Durante o armazenamento do sangue, os níveis de ATP eritrocitário regridem e, em associação com o pH baixo, as células sofrem hemólise, resultando em extravasamento de potássio do eritrócito para o meio extracelular. Esse aumento nos níveis de potássio pode contribuir para o desenvolvimento de hipercalemia em pacientes que recebem grandes volumes transfusionais, ou em pacientes com insuficiência renal, agravar uma hipercalemia preexistente (HOHENHAUS, 2007).

Estudos realizados com unidades de eritrócitos humanos demonstram que a homogeneização intermitente pode minimizar as lesões de conservação e ter efeitos benéficos na manutenção e recuperação do 2,3-DPG eritrocitário *in vivo*. Também foi evidenciado que, quando a bolsa é homogeneizada gentilmente uma vez ao dia, há melhora significativa na morfologia dos eritrócitos, hemólise e ATP (HÖGMAN, MERYMAN, 1999).

Lesões físicas nos eritrócitos decorrem principalmente de temperaturas inadequadas, tais como congelamento ou aquecimento do sangue e resultam em hemólise. No paciente, quando esse sangue é transfundido, há manifestação de hemoglobinúria ou hemoglobinemia, sem demais evidências de reação hemolítica aguda (HOHENHAUS, 2007).

2.3 Peroxidação lipídica

O oxigênio (O_2), que é necessário para diversas funções consideradas vitais, quando sofre redução gera subprodutos altamente reativos, os quais podem ocasionar dano a proteínas, lipídios e DNA. A reatividade desses subprodutos deve-se ao desemparelhamento de elétrons na sua última camada eletrônica, o que permite que reajam com diversos compostos e estruturas celulares (Figura 1). Estes subprodutos são denominados espécies reativas de oxigênio, conhecidos pela sigla ERO (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

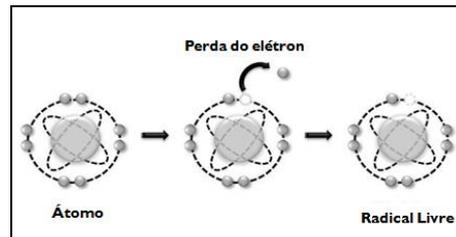


Figura 1- Esquema representativo da geração de radicais livres (WOLKMER, 2009).

Na respiração, a maior parte do O_2 consumido é reduzido à água na mitocôndria, durante a passagem pela cadeia respiratória, possibilitando a síntese do ATP pela fosforilação oxidativa. No entanto, quase 5% do oxigênio sofre redução incompleta, produzindo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A partir dele, uma série de reações ocorrem, gerando compostos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o mais reativo e danoso dos radicais formados (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

As defesas antioxidantes existem para proteger o organismo contra a ação dos radicais livres. Antioxidantes intracelulares incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT), bem como a ferritina (SIES, 1997). Entre as extracelulares encontram-se as transferrinas, as ceruloplasminas, as hemopexinas, as haptoglobinas e as albuminas. O alfa-tocoferol (vitamina E) e o ácido ascórbico (vitamina C) estão localizados tanto intra como extracelular, constituindo-se em agentes antioxidantes importantes para o organismo (KIM et al., 1996).

As ERO são geradas em diversos sistemas biológicos, sendo os ácidos graxos insaturados encontrados na dupla camada de lipídeos das membranas celulares considerados uma fonte importante desses elétrons. Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação dos ERO, porém a membrana celular é um dos mais atingidos (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

Quando ocorre um desequilíbrio metabólico, as ERO atacam os ácidos graxos insaturados das membranas celulares num processo chamado de peroxidação lipídica. Essa peroxidação faz com que a membrana perca suas características arquitetônicas, tornando-se mais firme e menos flexível. Como consequência da mudança estrutural, há alteração também na sua permeabilidade, favorecendo o fluxo indiscriminado de metabólitos e detritos celulares. Este desequilíbrio hidroeletrolítico leva a ruptura e lise com necrose (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000).

Os eritrócitos são notadamente susceptíveis ao dano oxidativo devido à elevada concentração de ácidos graxos polissaturados em sua membrana, às altas concentrações de oxigênio e hemoglobina e a presença de ferro, o qual é considerado um potente agente oxidante (AGUIRRE et al., 1998, SATO et al., 1998).

A susceptibilidade da hemoglobina oxigenada em se auto-oxidar está relacionada à capacidade de um elétron do ferro ligado ao grupo heme tornar-se desemparelhado. A molécula da hemoglobina, em especial a região não polar que contém o grupo heme, necessita que o ferro esteja no estado ferroso (Fe^{2+}) para que o mesmo exerça o transporte reversível do oxigênio. Qualquer modificação neste complexo químico que protege o grupo heme pode permitir o acesso de pequenos íons ou moléculas de água, com deslocamento de elétrons do grupo heme e, conseqüentemente, dar origem à formação de radicais superóxido (O_2^-), desencadeando o processo de oxidação da hemoglobina (NAOUM, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Gatos possuem dois tipos de hemoglobina no sangue, chamadas HbA e HbB. As hemoglobinas felinas contêm pelo menos oito grupos sulfidríla oxidáveis, enquanto as espécies canina e humana apresentam quatro e dois grupamentos, respectivamente. Essa grande quantidade de grupamentos sulfidríla torna a hemoglobina felina mais sensível ao dano oxidativo quando comparada às outras espécies (HARVEY, 1997).

A lesão oxidativa na membrana do eritrócito é confirmada pelo aumento na formação de malondialdeído (MDA), um aldeído de cadeia curta, e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica medida pelo teste reação com o ácido tiobarbitúrico - TBARS (YOSHIOKA et al., 1979).

Em bolsas de sangue humano tem-se evidenciado que a hemólise progressiva é acompanhada por um aumento na concentração de MDA nas hemácias (CHIU et al., 1989, JAIN, 1988; KNIGHT et al., 1992). O MDA demonstra injúria oxidativa na membrana celular, é o método mais utilizado para avaliar a peroxidação lipídica e, portanto, pode ser utilizado para determinar a extensão do dano oxidativo de membranas celulares (ESTERBAUER, 1993).

Considera-se ainda que a peroxidação lipídica seja a principal causa do envelhecimento dos eritrócitos sanguíneos em bolsas para transfusão (JAIN, 1988; CHIU et al., 1989, KNIGHT et al., 1992; JOZWIK et al., 1997), sendo os processos peroxidativos facilitados por um alto conteúdo de substratos de lipídios insaturados, condições aeróbicas e presença de íons metálicos nessas bolsas (MAY et al., 1998).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à aprovação pela Comissão de Ética e de Bem Estar Animal da Universidade do Federal de Santa Maria, processo nº 23081.019429/2010-01.

Para realização deste experimento, obteve-se auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), projeto 300885/2008-3.

3.1 – ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 12 gatos adultos, sem raça definida, de ambos os sexos, pesando $3,5 \pm 0,6$ kg, provenientes de doações, comprovadamente hígidos. Essa comprovação se deu através de exame clínico, físico e laboratorial (avaliação bioquímica sérica e hemograma completo). Os animais foram alocados em um gatil, em boxes individuais com enriquecimento ambiental, onde passaram por um período mínimo de adaptação humana e ambiental de 15 dias, receberam água e ração comercial de boa qualidade *ad libitum*, e tiveram acesso diário a um solário.

3.2 – GRUPOS EXPERIMENTAIS

A distribuição dos animais em dois grupos experimentais, denominados G1 e G2, ambos contendo seis animais, deu-se aleatoriamente. Para a conservação do sangue do G1 foi utilizado CPDA-1 como anticoagulante, na proporção 1:9 mL de sangue. Para o G2, utilizou-se a mesma proporção, porém de CPD, e acrescentou-se previamente o aditivo SAG-M (0,4:1 mL de sangue). O CPDA-1 e CPD/SAG-M foram retirados de bolsas para estocagem de sangue (Bolsa Simples CPDA-1, Bolsa Tripa SAGM – Fresenius Kabi® - São Paulo –SP- BR).

3.3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Previamente ao início do experimento, os animais foram submetidos a e sólido de oito horas, realizou-se ampla tricotomia na região ventral do pescoço e membros torácicos para acessar a veia cefálica.

Para sedação, foram aplicados, por via intramuscular, 8 mg/kg de cetamina e 0,4 mg/kg de midazolam. Em seguida, os gatos foram encaminhados ao bloco cirúrgico, onde se

procedeu a cateterização de uma das veias cefálicas com auxílio de cateter 22 G para fluidoterapia de manutenção (Ringer lactato de sódio, 10 mL/kg/h).

Cada animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo, submetido a antissepsia ampla com clorexidina 0,5% em solução alcoólica e venopunção da jugular no sentido crânio-caudal e de maneira asséptica. Para tal, utilizou-se *Scalp* 19G, previamente lavado com CPDA-1 ou CPD/SAG-M, devidamente conectado a uma torneira de três vias. Na mesma torneira, em uma das extremidades *Luer lock* fêmea, foi inserido o equipo de uma bolsa plástica para transferência para hemoderivados e com capacidade para 150 mL e, na outra, uma seringa de 20 mL contendo anticoagulante (Figura 2).



Figura 2 - Sistema adaptado para coleta e armazenamento de sangue de felinos utilizando torneira de três vias acoplada a bolsa plástica para transferência de hemoderivados, seringa de 20 ml contendo anticoagulante e *Scalp* 19G.

Para a coleta, foi feito o garroteamento da jugular, seguido da venopunção. O sangue foi lentamente aspirado a fim de evitar o colapamento da veia, e, ao mesmo tempo, homogeneizou-se o esse sangue ao anticoagulante, com movimentos circulares. Após o preenchimento da seringa, a comunicação desta com *Scalp* foi ocluída e a comunicação com a bolsa aberta. O sangue foi direcionado pra dentro da bolsa e seringa vazia foi imediatamente substituída por outra contendo anticoagulante. Nesse momento, passou-se a movimentar a bolsa até o final do processo. Retirou-se em média $45 \pm 5,0$ mL de sangue por animal e o tempo estimado para essa coleta foi de 15 a 20 minutos. Ao final procedimento, soltou-se o

garrote, retirou-se o *Scalp* e foi feita compressão manual, no local, com auxílio de uma gaze estéril por cinco minutos.

Os felinos permaneceram sob observação até completa recuperação da sedação e manteve-se a fluidoterapia até que os animais tivessem recebido um volume de fluido igual a três vezes o volume de sangue retirado (LOPES, 2007).

Imediatamente após o término da coleta, as bolsas foram acondicionadas em geladeira, com temperatura controlada através de termômetro de máxima e mínima, variando entre 2-6°C (Figura 3). A retirada das alíquotas para avaliação ocorreu no bloco cirúrgico, de maneira asséptica e após homogeneização, nos tempos 0 (T0 – imediatamente após a coleta), 7 (T7), 14 (T14), 21 (T21) e 28 (T28) dias após a coleta. Independentemente das coletas de sangue, fez-se diariamente a homogeneização de todas as bolsas individualmente.



Figura 3 – Acondicionamento do sangue de gatos, armazenado em bolsas plásticas, em geladeira com temperatura controlada por termômetro de máxima e mínima.

3.4. – MENSURAÇÃO DOS PERÂMETROS

Realizou-se, para todas as amostras coletadas a análise da peroxidação lipídica, susceptibilidade dos eritrócitos ao peróxido de hidrogênio *in vitro*, avaliação hematológica e bioquímica. Para tal foi retirado um total de 6,5ml de sangue de cada bolsa, nos tempos pré-determinados.

3.4.1 - Peroxidação lipídica

A partir de 5 mL de sangue coletados da bolsa para transfusão, obteve-se o plasma após 10 minutos de centrifugação em temperatura ambiente. A peroxidação lipídica foi determinada pelos níveis de TBARS, de acordo com o método descrito por JENTZSCH et al. (1996). Para isso, 0,5 mL do plasma separado foram adicionados a um tubo contendo uma mistura de reação com ácido ortofosfórico e ácido tiobarbitúrico. A mistura foi então incubada a 95°C por 45 minutos em banho-maria. Na sequência, os tubos foram resfriados em água, para interromper a reação. Em seguida, fez-se a leitura em 535 nanômetros e esta foi expressa em nanomoles de malondialdeído (MDA) por litro.

3.4.2 – Peroxidação de eritrócitos *in vitro*

Foi medida de acordo com o método descrito por IGBOKWE et al. (1994). Os eritrócitos lavados foram incubados em solução salina fisiológica contendo peróxido de hidrogênio a 1,5% (1:1) e, posteriormente, os subprodutos da peroxidação lipídica foram medidos espectrofotometricamente como TBARS e, expressos em unidades de absorvância.

3.4.3 - Avaliação hematológica

Utilizou-se 0,5 mL de sangue armazenados em microtubos tipo *Eppendorf* nos tempos pré-determinados. Foi realizada contagem de eritrócitos, e concentração de hemoglobina (Hb) com contador celular eletrônico (Vet Auto Hematology Analyzer, modelo BC 2800). O hematócrito (Ht) foi determinado pelo método de centrifugação, utilizando microcentrífuga (Sigma) a 1.710 g durante cinco minutos e, a análise das proteínas plasmáticas totais (PPT) deu-se por refratometria.

3.4.4 - Avaliação bioquímica

A parte restante do plasma, não utilizada para peroxidação lipídica, foi então empregada para as provas bioquímicas. A quantificação de hemoglobina extracelular deu-se através de kits comerciais (Labtest® Diagnóstica S.A., Lagoa Santa/MG, Brasil). Potássio (K^+), glicose e lactato foram avaliados através do método de química seca de forma

quantitativa. Para tal, utilizou-se autoanalisador de multicanais Vitros[®] 950 (Johnson & Johnson – Wayne, PA – USA).

3.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por apresentarem distribuição normal, comprovada pelo teste de Kolmogorov Smirnov, os dados foram submetidos ao teste T de Student para amostras independentes, para comparação entre grupos. Já a avaliação das variáveis no decorrer do tempo foi efetivada através de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. O teste de correlação de Pearson foi aplicado para verificar relação linear, para algumas das variáveis avaliadas. Os dados foram considerados significativamente diferentes com uma probabilidade (P) menor que 5%. O programa SPSS[®] (*Statistical Package for the Social Sciences* - IBM[®], Chicago, IL USA), versão 15.0 foi utilizado para a realização de todos os testes estatísticos.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Optou-se pelo uso de CPDA-1 e CPD/SAG-M por ter como objetivo a conservação do sangue felino, tendo em vista que podem ser utilizadas para estocagem de sangue ou eritrócitos por longos períodos. Bolsas contendo CPD-SAG/M são comercializadas na forma tripla, e utilizadas para separação de hemoderivados. Neste estudo não foi efetuada a separação apenas em decorrência do pequeno volume de sangue coletado, mas principalmente pela ausência de equipamento adequado para fazê-la.

O protocolo adotado no presente estudo para o uso de CPD/SAG-M na conservação de sangue total foi o mesmo descrito por Costa Júnior et al. (2008) para sangue total canino,. Conforme o que foi descrito por esses autores, neste estudo também se realizou a homogeneização do CPD à solução aditiva SAG-M antes de se realizar a coleta do sangue.

Quanto a análise hematológica (Hb, Ht, contagem de eritrócitos e PPT), quando considerados os tempos dentro do mesmo grupo, não houve diferença significativa (Tabela 1 dos apêndices) para os parâmetros avaliados. Sendo esses resultados semelhantes aos descrito por Costa Júnior et al. (2008) , o qual não evidenciou diferença entre os valores da contagem de eritrócitos no sangue total canino armazenado por 42 dias em bolsas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M. Já na comparação entre G1 e G2 para esses mesmos parâmetros, houve significância (Tabela 1 dos apêndices), sendo os valores obtidos no G2 inferiores aos obtido no G1. Acredita-se que esses valores inferiores devam-se a diluição dos componentes sanguíneos na solução aditiva, pois no total, para os 50 mL de sangue coletados, foram acrescidos em média 5,5 mL de CPD e 20 mL de SAG-M.

Na avaliação da concentração de hemoglobina extracelular foi observada diferença significativa (Tabela 2 dos Apêndices) tanto para as médias obtidas na comparação entre os grupos, quanto para a variação individual de cada grupo no decorrer do tempo. No G1 notou-se um aumento gradual nas médias com o passar dos dias. Já no G2, os níveis de hemoglobina extracelular mantiveram-se iguais até o 14^o dia de armazenamento. A partir daí foi percebida uma elevação nesses níveis, porém também não houve diferença quando comparados o 21^o dia e 28^o dias de armazenamento no G2. O aumento nos níveis de hemoglobina extracelular pode demonstra hemólise espontânea na amostra ou, de acordo com Secchi (2010), estar relacionado à liberação da hemoglobina contida em microvesículas, as quais são consideradas resultado de injúrias físicas à membrana celular eritrocitária, decorrente da diminuição na produção de ATP.

As menores concentrações de hemoglobina extracelular no G2 podem ser atribuídas ao efeito protetor do manitol sobre os eritrócitos. Esse mecanismo ainda não está bem esclarecido, porém sabe-se que o manitol funciona como um eliminador de ERO e estabilizador de membranas. Além disso, é descrito na literatura que sua adição as soluções aditivas é capaz de reduzir a taxa de hemólise e aumentar o tempo de conservação dos eritrócitos (HÖGMAN et al., 1991; SECCHI 2010). Considera-se a mensuração da hemoglobina extracelular um marcador simples, porém fundamental na avaliação da qualidade da preservação dos eritrócitos (HEATON et al., 1981; GREENWAL et al., 1990; ALMAC, INCE, 2007).

Os níveis de K^+ no sangue felino mostraram diferença significativa (Tabela 2 dos Apêndices) na comparação entre os grupos desde a primeira coleta, sendo que os valores obtidos no G1 foram sempre superiores aos do G2, porém as médias se mantiveram dentro dos valores de referência para a espécie (3,5 a 5,1 mmol/L) no G1 e inferiores a eles no G2. Para Bennett-Guerrero et al. (2007), as concentrações de K^+ sanguíneo podem apresentar alterações logo nas primeiras horas de estocagem e por ser um íon intracelular, seu aumento pode indicar uma falha na membrana celular, ou ainda hemólise. Costa Júnior et al. (2008), atribuíram a inferioridade nos valores iniciais de potássio obtidos em seu estudo, à diluição ocasionada pela solução aditiva e, acredita-se que isso também tenha ocorrido nesse caso.

Na comparação entre os tempos foi percebido um acréscimo significativo (Tabela 2 dos Apêndices) em ambos os grupos. O K^+ é considerado um importante marcador da integridade da membrana plasmática, sendo seus níveis intracelulares mantidos pela bomba Na^+/K^+ . Com a diminuição nos níveis de ATP decorrente da conservação do sangue, a bomba Na^+/K^+ tem sua atividade reduzida, ocasionando aumento do K^+ extracelular (TOMCZAC et al., 2010). Para Secchi (2010) essa alteração de conservação deve ser analisada considerando-se as diferentes concentrações desse íon intra-eritrócito nas diferentes espécies, sendo que na espécie felina há um baixo conteúdo de potássio dentro dos eritrócitos. Considera-se ainda que as variações nos níveis de K^+ estejam relacionadas às baixas temperaturas de armazenamento do sangue (em média quatro graus Célsius), ocorrendo inativação da bomba Na^+/K^+ e resultando em perda de potássio K^+ para o meio extracelular (HÖGMAN, MERYMAN, 1999). Tendo em vista que a diminuição nos níveis de ATP favorece a liberação de hemoglobina para o meio extracelular (SECCHI 2010), e também da saída de K^+ para este meio (TOMCZAC et al., 2010), a correlação entre esse dois fatores, no presente estudo, pode ser ilustrada através da Figura 4, onde a significativa correlação positiva ($R= 0,78$) demonstra que o aumento na concentração de hemoglobina extracelular foi diretamente proporcional a

liberação de K^+ para o meio extracelular.

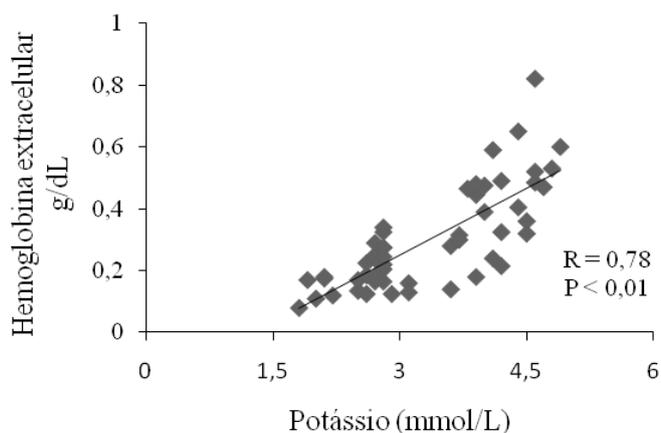


Figura 4 Representação gráfica da correlação linear entre hemoglobina extracelular e íon K^+ . Observa-se uma correlação positiva, sendo que a medida que aumentam os níveis de K^+ , elevam-se também os níveis de hemoglobina no meio extracelular.

Leonart (2010) cita que, dentre as principais análises realizadas para controle de qualidade de bolsas eritrocitárias, estão a determinação do grau de hemólise, as concentrações de glicose e íons K^+ extracelulares.

A avaliação da glicose plasmática demonstrou que, quando comparadas as se comparou as médias dos grupos G1 e G2 obteve-se significância (Tabela 2 dos apêndices) para todos os tempos. Essa diferença pode ser explicada pela maior concentração de glicose contida em CPD/SAG-M, observada desde a primeira avaliação. Quando os tratamentos (CPDA-1 e CPD/SAG-M) foram avaliados independentemente, considerando-se a variação do tempo, não houve diferença significativa (Tabela 2 dos Apêndices) para o G1 quanto a análise estatística, mas mesmo assim houve uma sutil redução nos níveis de glicose até o 21º dia. Avaliando-se G2 isoladamente, percebeu-se um pequeno decréscimo nos valores da glicose a partir do 7º dia, indicando que houve ativação do metabolismo anaeróbico.

Quanto aos níveis de lactato, comparando-se os grupos, houve diferença significativa entre as médias (Tabela 2 dos Apêndices) para todos os tempos avaliados com uma formação de ácido lático consideravelmente maior no G1. Também houve significância (Tabela 2 dos Apêndices) quando os grupos foram considerados individualmente. No G1, observou-se um aumento gradual nos níveis de lactato com o decorrer do tempo e, no G2, até o 14º dia de

estocagem foi observado aumento na produção de lactato, sendo que dos 14 aos 28 dias essa produção pareceu não diferir. A análise dos níveis de lactato, neste estudo, foi de maior utilidade no entendimento das alterações celulares ocorridas que a glicose. Sendo o lactato um produto da degradação da glicose, seu aumento está diretamente relacionado a um aumento no consumo da glicose do meio, que ocorre para a formação de ATP (TOMCZAK et al., 2010). Com base nos resultados obtidos nesse estudo, a menor formação de lactato nas bolsas do G2 pode ser utilizada para ilustrar uma melhor conservação do sangue, pois, de acordo com Högman et al. (2002), um menor consumo da glicose celular resulta em melhores níveis de ATP, o qual é necessário para que ocorra a manutenção da forma e flexibilidade dos eritrócitos, e manutenção do balanço eletrolítico, além de possuir uma ação importante na produção de energia. Com melhores níveis de ATP, também se espera uma menor taxa de hemólise, tanto durante a conservação, quanto após a administração do sangue no paciente (KURUP et al., 2003). Isso pode ser ilustrado através da correlação positiva entre níveis de lactato com a concentração de hemoglobina extracelular, a qual se mostrou altamente significativa (Figura 5; $R=0,85$), corroborando com os dados de literatura.

Considerando o metabolismo celular, é sabido que aumento no lactato indica um aumento no metabolismo anaeróbico, o que acarreta em redução do NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida). O NADPH produzido na via das pentoses é o principal agente redutor intracelular, é o principal fornecedor de átomos de hidrogênio (elétrons) no citoplasma e o seu papel fundamental é manter a glutatona em seu estado reduzido (GSH) o que protege os radicais sulfidril (-SH) e a integridade celular do excesso de ERO. Contudo diversos trabalhos com estocagem de sangue humano, principalmente em meio CPDA-1, têm demonstrado que a oxidação do GSH forma glutatona oxidada (GSSG), que pode exaurir os níveis de NADPH e NADH, principais carreadores de elétrons na célula (HÖGMAN et al., 1991; JÓZWIK et al., 1997; TOMEZACK et al., 2010). Com isso a falta do agente redutor NADPH inibe a ação da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) acarretando em dano oxidativo aos componentes da membrana plasmática de eritrócitos, levando à destruição das células. Neste trabalho, a peroxidação lipídica das amostras foi determinada pela quantificação de MDA, um dos principais produtos finais da peroxidação dos ácidos graxos, medido através (TBARS) (YOSHIOKA et al., 1979).

As médias de G1 e G2 quanto aos níveis plasmáticos de TBARS, obtidos a partir da concentração de MDA, indicam uma diferença significativa (Tabela 3 dos Apêndices) entre G1 e G2 quanto à peroxidação lipídica do plasma no período de tempo estudado. Foram também observadas diferenças significativas (Tabela 3 dos Apêndices) quando se analisou o

tempo em cada grupo individualmente, e apesar dos níveis mais elevados no G1, para ambos os grupos, a peroxidação lipídica acentuou-se a partir do 21^o dia. Acredita-se que essa diferença entre G1 e G2 se deva a composição do meio mais energético e a capacidade do manitol em eliminar radicais livres (HÖGMAN et al., 1991) tornando essa solução mais estável e adequada para conservação do sangue. Porém, o notável aumento do TBARS em ambos os grupos, a partir do 21^o dia, pode ser explicado pelos achados de Józwik et al. (1997), os quais evidenciaram que, com o passar do tempo, os ERO continuam a ser produzidos, porém, o potencial antioxidante do plasma vai se esgotando. Com isso, percebe-se o aumento na peroxidação lipídica e também na hemólise.

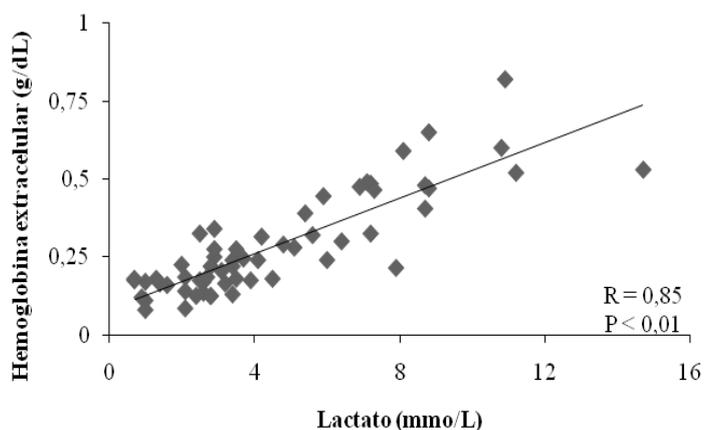


Figura 5 – Representação gráfica da correlação linear entre hemoglobina extracelular e lactato. Observa-se uma correlação fortemente positiva, sendo que a medida que aumentam os níveis de lactato, elevam-se os níveis de hemoglobina no meio extracelular.

A correlação positiva ($R=0,7$; Figura 6.) entre TBARS e os níveis de hemoglobina extracelular demonstram que, quanto maior peroxidação lipídica, maior a taxa de hemólise sofrida pelos eritrócitos susceptibilidade dos eritrócitos ao peróxido de hidrogênio *in vitro*. Esses dados corroboram com a literatura, pois segundo Aguirre et al. (1998), os eritrócitos são especialmente susceptíveis ao dano oxidativo devido à alta concentração de ácidos graxos polissaturados em sua membrana e à alta concentração de oxigênio e hemoglobina, cujo poder do oxigênio é conhecido na geração de ERO. Para Janero (1990) e Harvey (1997) esses processos oxidativos afetam a molécula de hemoglobina oxigenada (oxi-Hb), propiciando a

formação de corpúsculos de Heinz. Além disso, o aumento da peroxidação lipídica em bolsas sangue felino estocado com CPDA-1 pode estar relacionado com alterações na integridade da membrana dos eritrócitos, e conseqüente maior taxa de hemólise.

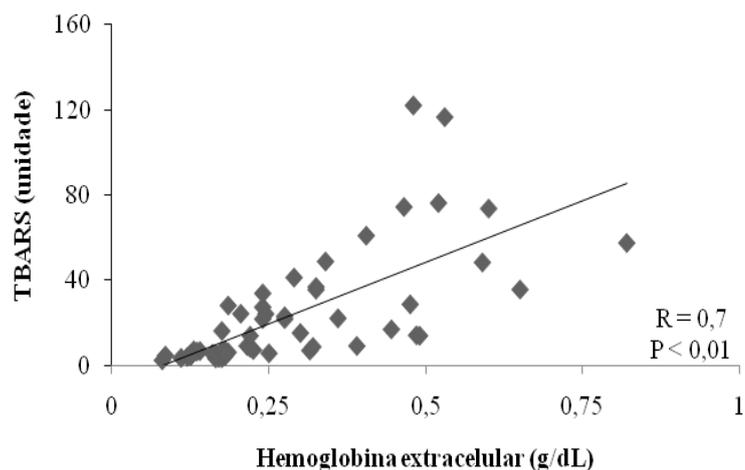


Figura 6 - Representação gráfica da correlação linear entre TBARS e hemoglobina extracelular. Nota-se que a medida aumenta a peroxidação lipídica medida através de TBARS há um aumento também nos níveis de hemoglobina extracelular.

Buscando-se comprovar uma maior fragilidade das membranas eritrocitárias em consequência do aumento da peroxidação lipídica no período avaliado, os eritrócitos de ambos os grupos foram desafiados *in vitro* com peróxido de hidrogênio, o qual é um potente agente oxidante, após, foram medidos espectrofotometricamente como TBARS e, expressos em unidades de absorvância (DUTHIE et al., 1989). Neste teste, o comportamento de ambos os grupos até o 14^o dia foi semelhante e não houve diferença estatística significativa entre eles, porém, a partir do 21^o, a susceptibilidade dos eritrócitos do G1 aumentou, e sua progressão também foi observada aos 28 dias. Quando avaliados os tempos dentro do mesmo grupo, notou-se que as diferenças foram significativas (Tabela 3 dos Apêndices), e que no G2 houve uma menor variação nas unidades de absorvância, o que provavelmente se deva ao poder antioxidante do manitol citado por Högman et al. (1991) e Beutler e Kuhl (1988) presente em CPD/SAG-M. Nesse grupo, notou-se que a peroxidação lipídica das membranas eritrocitárias por ação das ERO foi mais branda que no G1, e, dessa maneira, o menor dano

sofrido pela membrana eritrocitária tornou os eritrócitos menos susceptíveis à ação do peróxido de hidrogênio quando desafiados *in vitro*. Já no G1, houve uma limitada capacidade em proteger a membrana eritrocitária da peroxidação lipídica, sendo essa membrana o alvo principal das reações envolvendo ERO, tornando os eritrócitos mais vulneráveis (MAY et al., 1998).

A correlação positiva que ocorre entre a susceptibilidade a peroxidação de eritrócitos e TBARS ($R=0,701$; Figura 7) ilustra que proporcionalmente ao aumento da peroxidação lipídica, os eritrócitos tornam-se mais frágeis e rompem-se mais facilmente. Isto é consistente com a resposta hemolítica, que está associada com o estresse oxidativo intracelular (COHEN e HOCHSTEIN, 1964). Como os as médias obtidas para TBARS e susceptibilidade a peroxidação de eritrócitos foram significativamente superiores no G1 e após 14 dias de estocagem também se elevaram no G2, acredita-se que o meio contendo CPD/SAG-M (G2) seja mais estável e adequado para conservação dos eritrócitos felinos em bolsas de sangue.

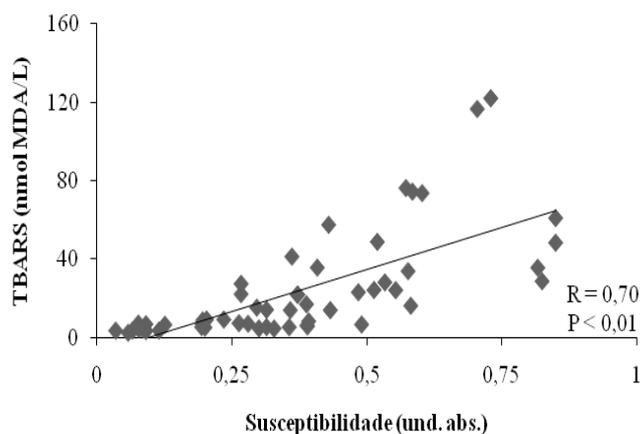


Figura 7 – Representação gráfica da Correlação linear entre TBARS e Susceptibilidade ao peróxido de hidrogênio. Nota-se que a medida que há uma tendência a aumentar a suscetibilidade dos eritrócitos ao peróxido de hidrogênio a medida que aumenta a peroxidação lipídica (TBARS).

Apesar dos melhores resultados obtidos com o armazenamento do sangue total felino em bolsas contendo como solução conservante CPD/SAG-M, para quase todos os parâmetros avaliados observou-se considerável diluição das amostras. Questiona-se então, se a diluição pode ter influenciado esses resultados, ou se o manitol realmente foi o fator responsável por

um menor dano aos eritrócitos do G2. Logo, sugere-se que em estudos futuros seja realizada a avaliação concomitantemente da ação diluidora da solução CPDA-1 em solução salina, seguindo as mesmas proporções utilizadas em CPD/SAG-M, em frente às lesões de conservação do sangue estocado.

Sugere-se ainda, que aos se estabelecer a solução mais adequada para a conservação do sangue de felinos *in vitro*, estudos *in vivo*, que avaliem o efeito do sangue conservado após a transfusão também sejam realizados.

5 – CONCLUSÕES

Os níveis de potássio, lactato e hemoglobina extracelular mostraram-se indicadores eficientes da viabilidade sanguínea para a espécie felina, e podem vir a ser estabelecidos como parâmetro de avaliação para sangue de felino sob conservação. No presente estudo, consideraram-se essas avaliações como indicativos de um decréscimo na atividade metabólica celular, com perda na qualidade do sangue. Desta maneira, CPDA-1 mostra-se menos eficiente na conservação de sangue felino a partir de 14 dias de conservação, em comparação com CPD/SAG-M.

O uso do TBARS seguido do teste de susceptibilidade dos eritrócitos ao peróxido de hidrogênio é válido para comprovar a que a peroxidação lipídica está associada à diminuição da viabilidade sanguínea, também para a espécie felina. Através desse testes pode-se comprovar que CPD/SAG-M é mais eficiente que CPDA-1, na manutenção da viabilidade do sangue felino, em um período de estocagem de 28 dias.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, F.; MARTIN, I.; GRINSPON, D.; RUIZ, M.; HAGER, A.; DE, T.; PAOLI, J.; IHLO, J.; FARACH, H.A.; POOLE, C. P. Oxidative damage, plasma antioxidant capacity and glycemic control in elderly NIDDM patients. **Free Radicals. Bioolyl. Medicine**, v.24, p.580–585, 1998.

ALMAC, E., INCE, C. The impact of storage on red cell function in blood transfusion. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 21, n. 2, p. 195-208, 2007.

ANNIS, A. M., SPARROW, R. L., Variable adhesion of different red blood cell products to activated vascular endothelium under flow conditions. **American Journal of Haematology**, v.82, p.439-445, 2007.

AUTHEMENT, J., WOLFSHEIMER, K., CATCHINGS, S., Canine blood component therapy: Product preparation, storage, and administration. **Journal of the American Animal Hospital Association** v.23, p.489–491, 1986.

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.

BENNETT-GUERRERO, E., VELDMAN, T. H., DOCTOR, A., TELEN, M. J., ORTEL, T. L., REID, T. S., MULHERIN, M. A., ZHU, H.,BUCK, R.D., CALIFF, R. M., MCMAHON, T. J. Evolution of adverse changes in stored RBCs. **Proceedings of the National Academy Science of the USA**, v. 104, n. 43, p. 17063–17068, 2007.

BEUTLER, E., KUHL, W. Volume control of erythrocytes during storage. The role of mannitol. **Transfusion**, v.28, p.353–357, 1988 (abstract).

BIRD, G. W. The history of blood transfusion. **Injury** , v.3, n.1 p. 40-44, 1971.

BOOTHE, D. M. Therapy with blood and blood components, In:_____ **Smal Animal Clinics Pharmacology and Therapeutics**. Sounders:Philapelpia, 2001, Cap. 6, p.97-106.

BUSH, B. M. Eletrólitos e metais. In:_____ **Interpretação de Resultados Laboratório para Clínicos de Pequenos Animais**, Roca: São Paulo, 2004, p. 262-289.

CHIARAMONTE, D. Blood-Component Therapy: Selection, administration and monitoring. **Clinical Technics in Small Animal Practice**, v.9, p.63-67, 2004.

CHIU, D., KUYPERS, F., LUBIN, B. Lipid peroxidation in human red cells. **Seminars in Hematology**, v.26, p. 257-276, 1989.

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

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents. **Biochemistry**, v.3, p.895–900, 1964.

COSTA JÚNIOR, J., VIANA, J. A., RIBEIRO FILHO, 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, n.2, p. 378-383, 2008.

DUTHIE, G. G. Increased peroxidation of erythrocytes of stress-susceptible pigs. An improved diagnostic test for porcine stress syndrome. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, p.84-87, 1989.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.779-785, 1993.

FELDMAN, B. F., SINK, C. A. Collection, processing, storage and shipment. In: _____ **Practical Transfusion Medicine for the Small Animal Practitioner**. Teton New Media:Jackson, 2006. Cap. 2, p. 16-42.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

GREENWALT, T. J., ZEHNER, S.C., DUMASWALA, U.J. Studies in red blood cell preservation. Comparison of vesicle formation, morphology, and membrane lipids during storage in AS-1 and CPDA-1. **Vox Sanguinis**, v.58, n.2, p. 90-93, 1990.

HALE, A. Safety of blood products for feline patient. In: AUGUST, J. R. **Consultations in Feline Internal Medicine**. Esvier Saunders: Missouri, 2006. Cap. 57, p. 549-551.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4.ed. New York: Clarendon Press, 2007, p.880.

HARVEY, J. W. The erythrocyte: Physiology, Metabolism and Biochemical disorders. In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, fifth ed. Academic Press, London, p.157-203, 1997.

HESS, J. R., GREENWALT, D.J. Red stored blood cell: new approaches. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 16, n.4, p. 283-295, 2002.

HOHENHAUS, A. F. Transfusão e substitutos do sangue. In: DIBARTOLA, S. P. **Anormalidades de fluidos, eletrólitos e equilíbrio ácido-básico na clínica de pequenos animais**. Roca:São Paulo, 2007. Cap. 24, p. 549 – 565.

HOSGOOD, G. Blood transfusion: a historical review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, p. 998-1000, 1990.

HEATON, A., MIRIPOL. J., GRAPKA, B., et al. Improved storage of high hematocrit cell concentrates using a mannitol, adenine, saline, glucose solution. **Transfusion**, v.21, p.600-601, 1981.

HÖGMAN, C. F., ERIKSSON, L., ERICSON, A., REPPUCCI, A. J. Storage of saline-adenine-glucose-mannitol-suspended red cells in a new plastic container: polyvinylchloride plasticized with butyryl-n-trihexylcitrate. **Transfusion**, v.31, n. 1, p.26-29, 1991.

HÖGMAN, C. F., KNUTSON, F., LÖÖF, H., PAYRAT, M.. Improved maintenance of 2,3-

DPG and ATP in RBCs stored in a modified additive solution. **Transfusion**, v.42, n. 1, p.824-829, 2002.

HÖGMAN, C. F., MERYMAN, H. T. Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion. **Transfusion Medicine Reviews**, v.13, n. 4, p.257–296, 1999.

IGBOKWE, I.O., ESIEVO, K.A., SAROR, D.I., OBAGAIYE, O.K., 1994. Increased susceptibility of erythrocytes to *in vitro* peroxidation in acute *Trypanosoma brucei* infection of mice. **Veterinary Parasitology**, v.55, p.279–286.

JAIN, S. K. Evidence for membrane lipid peroxidation during the *in vivo* aging of human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.937, p.205–210, 1988.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**. v.9, p.515-540, 1990.

JENTZSCH, A.M.; BACHMANN, H.; FÜRST, P.; BIESALSKI, H.K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.20, n.2, p.251- 256, 1996.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**, New York: Oxford University Press, 1997, p.368 .

JÓZWIK, M., JÓZWIK, M., JÓZWIK, M., SZCZYPKA, M., GAJEWSKA, J., LASKOWSKA-KLITA, T. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. **Clinica Chimica Acta**, v.267, n.2, p. 129-142, 1997.

KIM, J. D. et al. Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. **Free Radical Biology and Medicine**, v.20, p.83-88, 1996.

KNIGHT, J. A., VOORHEES, R. P., MARTIN, L., ANSTELL, H. Lipid peroxidation in stored red cells. **Transfusion**, v.32, p. 354-357, 1992.

KURUP, P. A., ARUN, P., GAYATHRI, N. S., 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.

LANEVSKI, A.; WARDROP, K. J.N. Principles of transfusion medicine in small animals. **Canadian Veterinary Journal**, v.42, n.6, p.447-454, 2001.

LEONARD, M. S. S. Controle de qualidade na preservação de eritrócitos para transfusão. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 3, p. 192-193, 2010.

LOPES, S. T. A. Hemoterapia. In: _____ **Manual de Patologia Clínica Veterinária** 3.ed. – Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. Cap. 4, p. 98-107.

MAY, J. M.; QU, Z. C.; MENDIRATTA, S. Protection and recycling of alfa-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.349, p.281–289, 1998.

NAOUM, P. C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.18, p.75-81, 1996.

PRICE, G. S., ARMSTRONG, P. J., MC LEOD, D.A., et al. Evaluation of citrate-phosphate-dextrose-adenine as a storage medium for packed canine erythrocytes. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 2, p.126, 1988.

PRITTIE, E. J. Triggers for use, optimal dosing, and problems associated with red cell transfusions. **The Veterinary Clinics - Small Animal Practice**, v. 33, p. 1261–1275, 2003.

ROUX, F. A., BAIS, M. C., DELAFORCADE-BURESS, A. M., ROZANSKI, E. A Multiple red cell transfusions in 27 cats (2003 e 2006): indications, complications and outcomes. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 213 e 218, 2008.

SATO, Y. et al. Mechanism of free radical induced hemolysis of human erythrocytes: II. Hemolysis by lipid soluble radical initiator. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.21, p.250–256, 1998.

SECCHI, P. Bioquímica dos conservantes sanguíneos. Disponível em: http://www6,UFRGS.br/favet/lacvet/restrito/pdf/conservantes_secchi.pdf. Acesso em : 12.01.2011.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82, p.291-295, 1997.

SIMAS, S. M.; LACERDA, L. A.; GONZÁLEZ, F. H. D. Feline Blood Storage for Five Weeks in ACD-A Glass Tubes: Biochemical and Hematological Parameters. In: **34th World Small Animal Veterinary Association Congress**, 2009, São Paulo. Proceedings WSAVA 2009. São Paulo : Guará, 2009. p. 203-203.

SOARES, A. V. Efeitos cardiovascular e metabólico da reposição volêmica com colóide em gatos com hipovolemia induzida, p. 22 – 23. **Dissertação de mestrado** – CAV/UEDESC, Lages, 2008.

SOUZA, H. J. Terapêutica de felinos. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. Roca, São Paulo, 2002. Cap. 24, p. 549 – 565.

TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**, 3ª ed, London: Taylor & Francis, 2000, 394p.

TOMEZACK, A. C. Q. T. Estudo de métodos laboratoriais para controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocotárias no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar), Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, n.3, p. 209-214, 2010.

WEINGART, C., GIGER, U., KOHN, B. Whole blood transfusions in 91 cats: a clinical evaluation. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 6, n. 3, p. 139-148, 2004.

WOLKMER, P. Estudo da peroxidação lipídica *in vivo* e *In vitro* em ratos infectados experimentalmente com *Trypanosoma evansi*, p. 18 -19 (FIGURA). **Dissertação de mestrado** – UFSM, Santa Maria, 2009.

YOSHIOKA, T. et al. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.135, p.372–376, 1979.

APÊNDICES

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos: Médias (X) obtidas em cada tempo para os grupos 1 (CPDA-1) e 2 (CPD/SAG-M), com respectivo desvio padrão (S).

| Parâmetros | Tempo (dias) | Grupo 1 | | Grupo 2 | |
|--|--------------|---------------------|-----------|---------------------|----------|
| | | X | S | X | S |
| PPT (g/dL) | 0 | 7,40 ^{Aa} | (±0,282) | 5,57 ^{Ba} | (±0,637) |
| | 7 | 7,33 ^{Aa} | (±0,273) | 5,10 ^{Ba} | (±0,328) |
| | 14 | 7,36 ^{Aa} | (±0,320) | 5,36 ^{Ba} | (±0,367) |
| | 21 | 7,23 ^{Aa} | (±0,234) | 5,04 ^{Ba} | (±0,089) |
| | 28 | 7,36 ^{Aa} | (±0,409) | 5,04 ^{Ba} | (±0,089) |
| Hematócrito (%) | 0 | 29,42 ^{Aa} | (±1,342) | 18,25 ^{Ba} | (±0,500) |
| | 7 | 25,83 ^{Aa} | (±2,639) | 17,00 ^{Ba} | (±1,414) |
| | 14 | 25,83 ^{Aa} | (±3,060) | 16,83 ^{Ba} | (±1,940) |
| | 21 | 26,00 ^{Aa} | (±3,521) | 16,83 ^{Ba} | (±1,940) |
| | 28 | 25,83 ^{Aa} | (±3,371) | 16,67 ^{Ba} | (±2,160) |
| Hemoglobina (g/dL) | 0 | 8,12 ^{Aa} | (±1,37) | 3,61 ^{Ba} | (±0,234) |
| | 7 | 7,84 ^{Aa} | (±1,87) | 5,90 ^{Ba} | (±0,585) |
| | 14 | 5,92 ^{Aa} | (±0,86) | 6,02 ^{Ba} | (±0,757) |
| | 21 | 7,82 ^{Aa} | (±2,01) | 23,50 ^{Ba} | (±0,633) |
| | 28 | 7,71 ^{Aa} | (±0,31) | 33,33 ^{Ba} | (±0,523) |
| Hemácias (x10 ⁶) | 0 | 6,02 ^{Aa} | (±0,780) | 4,391 ^{Ba} | (±0,426) |
| | 7 | 5,46 ^{Aa} | (±1,033) | 3,875 ^{Ba} | (±0,371) |
| | 14 | 5,05 ^{Aa} | (±0,227) | 3,450 ^{Ba} | (±0,611) |
| | 21 | 4,87 ^{Aa} | (±0,848) | 3,485 ^{Ba} | (±0,466) |
| | 28 | 5,3 ^{Aa} | (±0,0318) | 3,530 ^{Ba} | (±0,523) |

Letras diferentes correspondem a diferença significativa ($P < 0,05$); Letras maiúsculas correspondem ao teste T de Student; Letras minúsculas correspondem ao teste de Tukey.

Tabela 2 - Parâmetros Bioquímicos: Médias (X) obtidas em cada tempo para os grupos 1 (CPDA-1) e 2 (CPD/SAG-M), com respectivo desvio padrão (S).

| Parâmetros | Tempo (dias) | Grupo 1 | | Grupo 2 | |
|----------------------------------|--------------|----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| | | X | S | X | S |
| Glicose (mg/dL) | 0 | 452,67 ^{Aa} | (±44,482) | 574,33 ^{Bab} | (±18,683) |
| | 7 | 447,83 ^{Aa} | (±36,124) | 594,67 ^{Bc} | (±7,528) |
| | 14 | 410,67 ^{Aa} | (±53,133) | 585,17 ^{Bbc} | (±10,526) |
| | 21 | 407,17 ^{Aa} | (±40,789) | 580,83 ^{Bab} | (±9,042) |
| | 28 | 419,5 ^{Aa} | (±50,655) | 563,83 ^{Ba} | (±10,265) |
| Lactato (mmol/L) | 0 | 2,10 ^{Aa} | (±0,844) | 0,88 ^{Ba} | (±0,147) |
| | 7 | 5,45 ^{Ab} | (±1,313) | 2,30 ^{Bb} | (±0,268) |
| | 14 | 6,52 ^{Abc} | (±0,606) | 3,18 ^{Bc} | (±0,445) |
| | 21 | 8,37 ^{Acd} | (±1,616) | 3,08 ^{Bc} | (±0,608) |
| | 28 | 10,32 ^{Ad} | (±2,447) | 3,50 ^{Bc} | (±0,740) |
| Potássio (mmol/L) | 0 | 3,03 ^{Aa} | (±0,320) | 2,02 ^{Ba} | (±0,147) |
| | 7 | 3,98 ^{Ab} | (±0,331) | 2,56 ^{Bb} | (±0,155) |
| | 14 | 4,17 ^{Ab} | (±0,344) | 2,70 ^{Bbc} | (±0,000) |
| | 21 | 4,28 ^{Ab} | (±0,349) | 2,78 ^{Bc} | (±0,160) |
| | 28 | 4,45 ^{Ab} | (±0,394) | 2,76 ^{Bc} | (±0,155) |
| Hb extracelular (g/dL) | 0 | 0,15 ^{Aa} | (±0,022) | 0,14 ^{Aa} | (±0,042) |
| | 7 | 0,28 ^{Aab} | (±0,076) | 0,15 ^{Ba} | (±0,049) |
| | 14 | 0,39 ^{Abc} | (±0,103) | 0,19 ^{Bab} | (±0,044) |
| | 21 | 0,48 ^{Acd} | (±0,105) | 0,24 ^{Bb} | (±0,053) |
| | 28 | 0,57 ^{Ad} | (±0,142) | 0,26 ^{Bb} | (±0,052) |

Letras diferentes correspondem a diferença significativa ($P < 0,05$); Letras maiúsculas correspondem ao teste T de Student; Letras minúsculas correspondem ao teste de Tukey.

Tabela 3 - Parâmetros Bioquímicos: Médias (X) obtidas em cada tempo para os grupos 1 (CPDA-1) e 2 (CPD/SAG-M), com respectivo desvio padrão (S).

| Parâmetros | Tempo (dias) | Grupo 1 | | Grupo 2 | |
|---|--------------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
| | | X | S | X | S |
| Susceptibilidade (Unidade de absorbância) | 0 | 0,09 ^{Aa} | (±0,007) | 0,07 ^{Aa} | (±0,027) |
| | 7 | 0,21 ^{Aab} | (±0,041) | 0,25 ^{Ab} | (±0,093) |
| | 14 | 0,33 ^{Ab} | (±0,047) | 0,38 ^{Abc} | (±0,063) |
| | 21 | 0,63 ^{Ac} | (±0,163) | 0,43 ^{Bc} | (±0,122) |
| | 28 | 0,69 ^{Ac} | (±0,160) | 0,51 ^{Bc} | (±0,077) |
| TBARS (mmol MDA/L) | 0 | 5,45 ^{Aa} | (±1,415) | 3,61 ^{Ba} | (±0,653) |
| | 7 | 8,28 ^{Aa} | (±1,102) | 5,90 ^{Ba} | (±0,988) |
| | 14 | 17,45 ^{Aa} | (±3,721) | 6,02 ^{Ba} | (±1,303) |
| | 21 | 50,26 ^{Ab} | (±23,248) | 23,50 ^{Bb} | (±8,283) |
| | 28 | 80,07 ^{Ab} | (±31,741) | 33,33 ^{Bb} | (±10,204) |

Letras diferentes correspondem a diferença significativa ($P < 0,05$); Letras maiúsculas correspondem ao teste T de Student; Letras minúsculas correspondem ao teste de Tukey.