



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**AVALIAÇÃO HEMOGASOMÉTRICA, BIOQUÍMICA E
HEMATOLÓGICA DO SANGUE EQUINO
ARMAZENADO EM BOLSA CPDA-1**

TAGOR EDUARDO ANDREOLLA DORNELES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

MARÇO/2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**AVALIAÇÃO HEMOGASOMÉTRICA, BIOQUÍMICA E
HEMATOLÓGICA DO SANGUE EQUINO
ARMAZENADO EM BOLSA CPDA-1**

TAGOR EDUARDO ANDREOLLA DORNELES

ORIENTADOR: ANTÔNIO RAPHAEL TEIXEIRA NETO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

MARÇO/2018

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DORNELES, T.E.A. Avaliação hemogasométrica, bioquímica e hematológica do sangue equino armazenado em bolsa CPDA-1. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2018, 49 p. Dissertação de mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos; foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e achase arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Dorneles, Tagor Eduardo Andreolla
Avaliação hemogasométrica, bioquímica e hematológica do sangue equino armazenado em bolsa CPDA-1. / Tagor Eduardo Andreolla Dorneles
Orientação de Antônio Raphael Teixeira Neto
Brasília, 2018. 47 p.:il
Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2018.
1.Hemoterapia 2. Sangue Equino 3. CPDA-1 4 I. Teixeira Neto, A. R. II. Doutor

Agris/FAO

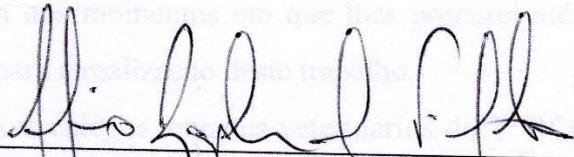
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

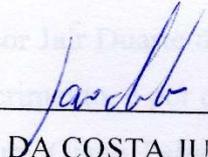
AVALIAÇÃO HEMOGASOMÉTRICA, BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA DO
SANGUE EQUINO ARMAZENADO EM BOLSA CPDA-1

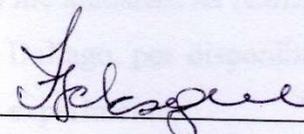
TAGOR EDUARDO ANDREOLLA DORNELES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:


ANTÔNIO RAPHAEL TEIXEIRA NETO, DOUTOR (UnB)
(ORIENTADOR)


JAIR DUARTE DA COSTA JUNIOR, DOUTOR (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)


FERNANDA GOMES VALASQUE GAMA, DOUTORA (CitoPet)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 26 de abril de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, senhor de todos os exércitos, que me mandou a este mundo com a missão mais nobre que existe, e me presenteou com o dom de cuidar dos animais.

À minha família, pelo carinho e apoio incondicionais em toda a minha longa caminhada profissional, em especial aos meus pais, os maiores exemplos e espelho de todas minhas ações.

À minha namorada Marcelle, pela compreensão dos momentos de ausência e apoio afetivo nos momentos de dificuldade.

Ao meu orientador, professor Antônio Raphael Teixeira Neto, um agradecimento especial pela paciência, comprometimento, dedicação, além de todo o conhecimento repassado.

Ao Exército Brasileiro, nas pessoas de meus comandantes Cel Marcelo Teodoro de Siqueira, Cel Alexandre Pfaender Júnior e TC Meryonne Moreira, por me permitirem realizar o mestrado concomitantemente às minhas funções na caserna, por sempre me apoiarem nos momentos em que lhes procurei além da contribuição com os animais reúnos para a realização deste trabalho.

Aos colegas tenentes veterinários do 1º RCG pela amizade e apoio profissional que me permitiram realizar este trabalho.

À médica veterinária Ana Beatriz Veltri, que foi imprescindível para realização deste trabalho em todas as suas etapas, além de todos os ensinamentos compartilhados.

Ao professor Jair Duarte da Costa Júnior, pelos ensinamentos e conselhos para a realização do experimento, e por disponibilizar a estrutura do banco de sangue.

À professora Giane Paludo, do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, assim como à sua equipe de residentes e pós graduandos que muito me ajudaram na realização das análises em suas instalações.

Ao Dr. Bruno Dallago, por disponibilizar a utilização de seu laboratório para a realização de parte do experimento.

Ao laboratório de Bacteriologia do HVET Unb pelo apoio na realização dos ensaios microbiológicas do experimento deste trabalho.

À professora Sonia Terezinha dos Anjos Lopes que me proporcionou estágio de iniciação científica há mais de 10 anos atrás no LacVet da UFSM, aonde obtive conhecimentos que me foram de extrema importância para eu conseguir executar este experimento.

Ao cavalo, nobre amigo do homem, cuja saúde e bem estar é o principal objetivo deste trabalho, e que com simplicidade me passa sabedoria e força todos os dias.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE ABREVIACES

Kg	Quilograma
pH	Potencial de hidrognio
PVC	Cloreto de Polivinil
DEHP	2-diethylhexyl phtalate
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPDA-1	Citrato Fosfato Dextrose Adenina
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
ATP	Trifosfato de Adenosina
HCO ₃ ⁻	ion Bicarbonato
VCM	Volume Corpuscular Médio
PCO ₂	Pressão parcial de CO ₂
PO ₂	Pressão de oxigênio
BE	Excesso de Base
K ⁺	ion potássio
g/dL	Gramas por decilitro
He	Hemácias
HT	Hematócrito
mmHg	Milímetros de Mercúrio
Na ⁺	ion sódio
mmol/L	Milimol por Litro
fL	Fentolitros
mg/dL	Miligramas por decilitro

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores médios (\pm desvio padrão) de variáveis hemogasométricas, hematológicas e bioquímicas do sangue total de equinos (n=20), no momento da coleta. 13
- Tabela 2.** Valores médios (\pm desvio padrão) de variáveis hemogasométricas, hematológicas e bioquímicas do sangue total de equinos (n=20), armazenado em bolsas CPDA-1 por 28 dias. 14

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do pH no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração 16
- Figura 2.** Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) da pO₂ (mmHg) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração. 18
- Figura 3.** Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) da PCO₂ (mmHg) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração. 19
- Figura 4.** Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do HCO₃⁻ (mmol/L) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração. 21
- Figura 5.** Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do Excesso de Base (mmol/L) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração. 22
- Figura 6.** Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) de potássio (mmol/L) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.24
- Figura 7.** Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) de cloreto (mmol/L) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.25
- Figura 8.** Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) de glicose (mg/dL) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.26
- Figura 9.** Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) de lactato no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração. 27

- Figura 10.** Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do Valor Corpuscular Médio (VCM) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.28
- Figura11** Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do Percentual de Hemólise no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.30

RESUMO

A clínica de equinos atletas no Brasil está em constante evolução e tem grande importância no complexo agronegócio do cavalo. A utilização de hemoterapia é uma importante ferramenta dentro da clínica e cirurgia desses animais, sendo indicada para recuperação rápida da volemia em casos de hemorragias graves e anemias hemolíticas severas, causadas por hemoparasitas ou imunomediadas e em cirurgias com grande risco de hemorragia. A conservação de sangue para transfusão vem sendo desenvolvida e aprimorada durante o último século, com grandes avanços em todas as espécies animais. As alterações que acometem o sangue durante o período de armazenamento já são bem conhecidas especialmente em humanos e cães, com alguns trabalhos desenvolvidos em ovinos e na espécie equina. De maneira geral, o metabolismo anaeróbico das células durante o seu armazenamento ocasiona uma série de mudanças estruturais e fisiológicas que acabam por comprometer a sua viabilidade pós transfusional, diminuindo a segurança da utilização do sangue armazenado por período prolongado. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar as características hemogasométricas, bioquímicas e hematimétricas do sangue equino armazenado em bolsas CPDA-1 por um período de 28 dias. Foram utilizados 20 equinos (9 machos e 11 fêmeas), com 8 anos de idade da raça Brasileiro de Hipismo. Foi realizada a coleta de 450 ml de sangue total em bolsas CPDA-1 e armazenamento em banco de sangue, com temperatura entre 2 e 6 °C. Foram retiradas amostras nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento, e realizadas análises de hemogasometria (pH, PO₂, PCO₂, HCO₃, BE, K e Na), bioquímicas (glicose e lactato) e hematológicas (He, Ht, VCM, % hemólise). Após a análise estatística dos dados foram encontradas alterações com diferenças significantes (P<0,05) em vários parâmetros tais como pH, PO₂ e PCO₂, bicarbonato, déficit de bases, potássio, glicose e lactato. Não foram constatadas alterações hematimétricas, embora tenha ocorrido um aumento no VCM. As alterações encontradas demonstram que o sangue equino armazenado em bolsas CPDA-1 sofre mudanças importantes durante o armazenamento e tem características diferentes de outras espécies. Foi possível afirmar que houve um ambiente favorável para a manutenção de sua viabilidade durante a maior parte do período de armazenamento. Mais estudos devem ser realizados para elevar o conhecimento sobre fatores específicos do sangue equino que garantam sua viabilidade após armazenamento prolongado.

Key Words: Hemoterapia, Sangue Equino, Bolsas CPDA-1.

ABSTRACT

The equine medicine in Brazil is in constant evolution and it has a big importance in the horses agribusiness complex. The utilization of hemotherapy is an important implement inside of clinic and surgery of those animals, being indicated for fast recovery of the volemy in the cases of severe bleeding and severe hemolytic anemias, caused by hemoparasites or immune-mediated and in surgeries with high risk of hemorrhage. The blood's conservation for transfusion is being developed and improved during all the last century, with big advances in all animal species. The changes that affect the blood during the period of storage are well known especially in humans and dogs, with some jobs have already advanced in the knowledge of equine's blood. In resume, the cells' anaerobic metabolism during storage causes an series of structure, hemogasometric, biochemical and hematological changes that compromising its post transfusion viability, reducing the safety of the blood use for a long period. In this context, the aim of this study was to investigate the hemogasometric, biochemical and hematologic features of equine blood stored in CPDA-1 bags in a blood bank. It was took 20 eight years old, Brasileiro de Hipismo Breed horses (9 males and 11 females). It was performed a collection of 450 ml of blood in CPDA-1 bags and stored or 28 days on a blood bank, at controlled temperature between 2 and 6 °C. It was sampled in days 0, 7, 14, 21 and 28, and performed blood gas (pH, PO₂, PCO₂, HCO₃, BE, K and Na), biochemical (glucose and lactate), and hematologic (Red Blood Cell Count, Packed Cell Volume, Medium Cell Volume, hemolysis rate) analysis. After the statistical data analysis were found statistic differences (P<0,05) in many parameters, like pH, PO₂, bicarbonate, Basis Deficit, potassium, glucose and lactate. There was not found many hematologic changes, besides the MCV showed an increase. The changes demonstrate that the equine blood stored in CPDA-1 bags suffered important changes through the storage and has different features from other species. In general way, it was possible to say that there was a good environment for the viability maintenance through almost all the storage time. However, other studies must be performed to improve the knowledge about specific factors of equine blood that guarantee their viability to be used in equine medicine practice after long storage times.

Key Words: Hemotherapy, Equine Blood, CPDA-1 Bags.

INTRODUÇÃO

A equideocultura é um segmento importante do agronegócio brasileiro. Em tempos de baixo crescimento do PIB brasileiro e dificuldades em diversos setores da economia, o setor agropecuário brasileiro mantém-se com altas de rendimento sucessivas, sustentando o desenvolvimento da economia brasileira. Dentro deste contexto, o complexo do agronegócio cavalo aparece como um importante setor. A sua cadeia produtiva é relativamente mais complexa que as demais, e não pode ser visualizada de uma maneira linear, e sim de uma forma bem mais ampla, considerando que há várias cadeias de mão dupla dentro do complexo. Com um efetivo estimado de mais de 5 milhões de animais, sendo que 1,1 milhão de indivíduos são dedicados ao esporte, a cadeia produtiva somente ligada ao cavalo atleta ou de lazer movimentava 5,84 bilhões de reais por ano (BRASIL, 2016).

Os animais atletas foram os principais responsáveis pelo crescimento do setor nos últimos anos. Ao contrário dos animais considerados “de lida”, o cavalo de esporte requer maiores cuidados e conseqüentemente maiores gastos, movimentando com maior intensidade desde a indústria de medicamentos e ferrageamento até os cosméticos e acessórios relacionados à atividade. No total o complexo agronegócio do cavalo movimentava mais de 16,5 bilhões de reais anualmente, sendo responsável por empregar diretamente mais de 600 mil pessoas, e indiretamente outros 2,4 milhões de brasileiros. Frente a esses números, é indiscutível a importância da equideocultura para a economia brasileira (BRASIL, 2016).

No centro do complexo do agronegócio do cavalo estão os animais de uso militar, ao lado de criadores, jockeys, centros de treinamento, hípicas e mercado externo interligado a todos estes outros ramos. É importante lembrar que estes agentes centrais são os responsáveis pela movimentação de uma ampla gama de setores dependentes do sucesso desta atividade econômica. Desta forma, selarias, empresas de nutrição animal, indústrias farmacêuticas, profissionais ferrageadores, clínicas veterinárias, laboratórios diagnósticos, frigoríficos, entre outros, são diretamente dependentes das atividades centradas nos equinos (BRASIL, 2016).

O Exército Brasileiro possui mais de 2500 equinos para uso militar. Mais do que simples companheiros de trabalho, o cavalo está encrustado na história do Exército e do País, estando presente nas principais passagens e acontecimentos de nossa história, como na Batalha de Guararapes e na Proclamação da Independência. Desta forma, os equinos ainda hoje são importantes símbolos das tradições cultuadas pelos militares, estando presentes em diversas organizações militares (OM), espalhadas por todo o Brasil (BRASIL, 2013).

O cavalo de uso militar possui características morfofisiológicas adequadas ao emprego e cerimonial militar, em condições de saúde, resistência, força e velocidade que o tornam apto para suportar trabalhos contínuos e variados. Os equinos do exército brasileiro são utilizados em missões de caráter peculiarmente militar, como em cerimonial para chefes de estado e operações de Garantia da Lei e da Ordem (GLO), além de estarem aptos a participarem de modalidades desportivas como salto, adestramento, concurso completo de equitação (CCE) e pólo. Não resta dúvida que um animal para estar pronto para estas diferentes atividades, deve estar sempre no ápice de sua higidez, podendo utilizar todo seu potencial de capacidade física (BRASIL, 2013).

A clínica médica de equinos é um mercado em franca ascensão e cada vez mais as tecnologias terapêuticas disponíveis devem ser utilizadas. A busca por novos métodos diagnósticos é necessária, visto que novos desafios surgem enquanto velhos problemas ainda carecem de soluções melhores, mais práticas, ou até mesmo mais baratas. A clínica médica de equinos no Brasil ainda atinge apenas a menor parcela da população de cavalos existentes, e é centrada basicamente nos cavalos atletas de rendimento desportivo.

Uma técnica terapêutica antiga, mas com utilização no Brasil ainda incipiente, é a transfusão de sangue em equinos, utilizando-se de sangue total armazenado. Algumas limitações da utilização do sangue equino armazenado, ou até mesmo o desconhecimento de veterinários a campo da possibilidade desta utilização, ainda são barreiras que devem ser ultrapassadas. Uma das barreiras a ser rompida é a segurança quanto a utilização clínica para transfusão de sangue armazenado por um longo período.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações hematológicas, hemogasométricas e bioquímicas do sangue equino coletado e armazenado em bolsas CPDA-1 por até 28 dias sob refrigeração.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O principal objetivo para a transfusão de sangue total em equinos é a recuperação da volemia e da capacidade de transporte de oxigênio em casos de anemia severa por perda aguda de sangue. Em casos de perda aguda de sangue, considera-se que animais com hematócrito abaixo de 20% tem indicação para transfusão (REICHMAN, 2001). É importante lembrar que a transfusão de sangue em equinos é considerada como terapia emergencial com efeito limitado e transitório, devido principalmente ao tempo de vida das hemácias transfundidas ser curto, de 2 a 6 dias em animais adultos. A limitação desse tempo de vida também coloca em cheque a utilização de transfusão sanguínea em casos de anemias crônicas (DURHAM, 1996; REICHMAN, 2001).

A transfusão de sangue total em equinos é indicada em casos de hemorragias graves e anemias hemolíticas severas, causadas por hemoparasitas ou imunomediadas. Talvez a principal indicação seja em cirurgias com grande risco de hemorragia, e nesses casos, pode-se realizar a coleta de sangue do próprio paciente com semanas de antecedência e armazená-lo para utilização no momento da cirurgia. A transfusão de sangue total também é indicada em casos de hipoalbuminemia e hipogamaglobulinemia, entretanto nessas situações a utilização de plasma congelado é a mais indicada (DURHAM, 1996, MUDGE, 2004).

Historicamente, na busca por conservar sangue humano por mais tempo, visando a transfusão, Rous e Turner (1916) utilizaram uma solução com anticoagulante citrato e glicose, e obtiveram êxito com o armazenamento por quatro semanas. Louit e colaboradores (1943), avançaram na técnica, ao adicionar ácido cítrico à solução de citrato e dextrose, permitindo a sua autoclavagem sem danos aos carboidratos, e assim conseguiram preservar sangue total por até 3 semanas com o mínimo de hemólise, entretanto, o pH do diluente e conseqüentemente do meio intracelular após a homogeneização com o sangue, tornou-se bastante ácido (COSTA JÚNIOR, 2008).

Na década de 60, iniciou-se a utilização de bolsas plásticas de cloreto de polivinil (PVC), recobertas com o plástico 2-diethylhexyl phthalate (DEHP), sistema amplamente utilizado até a atualidade. As bolsas de PVC facilitaram o transporte e centrifugação do sangue, e permitiram a sobrevida de diversos componentes sanguíneos após a transfusão.

Nessas bolsas, com o DEHP sendo utilizado para evitar o contato dos eritrócitos com o PVC, o sangue sofria menor adesão celular, formação de coágulos bem como baixos índices de hemólise (PIERRE, 1981, HESS & GREENWALT, 2002).

Nas bolsas de PVC, outro aspecto importante para o aumento da sobrevivência dos eritrócitos era sua permeabilidade ao gás carbônico (CO₂). Durante o armazenamento do sangue total, a glicose era consumida para produção de ATP e nessa reação, ocorria produção de uma série de metabólitos, como o lactato e prótons. Devido à presença da enzima anidrase carbônica nos eritrócitos, os ácidos produzidos eram convertidos em água e CO₂. Com a permeabilidade das bolsas de PVC para o CO₂, ocorria a difusão desse gás para o ambiente, prevenindo a reversão dessa reação, e conseqüentemente o aumento dos níveis de metabólitos que podem ser prejudiciais à sobrevivência dos eritrócitos, principalmente pela diminuição do pH do meio (HESS & GREENWALT, 2002; COSTA JUNIOR 2010).

Atualmente são utilizados comercialmente 3 principais tipos de diluentes para a conservação de sangue: ACD (citrato-dextrose), CPD (citrato fosfato dextrose) e CPDA-1 (citrato fosfato dextrose e adenina), sendo a última a mais utilizada para conservação e transfusão de sangue equino. Há de se ressaltar que as bolsas utilizadas para coleta, conservação e transfusão em equinos são as mesmas utilizadas na medicina humana, geralmente com 63 ml de diluente para 450 ml de sangue total (SOUSA et al, 2012).

Os constituintes da solução de preservação têm funções específicas para manter o sangue viável por mais tempo. O citrato é um anticoagulante com capacidade de quelar o cálcio, impedindo assim a coagulação de maneira transitória, bem como tem ação de estabilização da membrana eritrocitária, auxiliando na manutenção do pH intracelular. O fosfato é adicionado para servir como substrato para produção de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) no interior das hemácias. A dextrose é utilizada como fonte de energia, sendo consumida lentamente pelas células em condições de baixas temperaturas (HOGMAN et al, 2002; SOUSA et al, 2012). No caso do CPDA-1, a adição de adenina permite uma maior concentração e disponibilidade de ATP para as células, o que é altamente benéfico para o metabolismo celular (MUDGE, 2004) e para a sobrevivência da célula após ser transfundida para um receptor (HOGMAN, 1998).

A retirada do sangue da circulação para o armazenamento *in vitro* acaba por causar uma série de alterações hematológicas, bioquímicas, morfológicas e hemogasométricas,

que em conjunto são conhecidas como lesões de armazenamento. Tais lesões podem resultar em danos irreversíveis e consequente menor sobrevivência das hemácias pós transfusão (CHIN-YEE et al., 1997; SOUSA et al, 2002). As mudanças estruturais, metabólicas e funcionais que ocorrem no sangue armazenado são refletidas na diminuição do pH, glicose e ATP, aumento no lactato e hemoglobina livre, alterações de eletrólitos, principalmente sódio e potássio, e depleção das concentrações de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) (MUDGE et al, 2004).

De acordo com Hess e Greenwalt (2002), a maioria dos trabalhos com sangue humano concluíram que o limite para conservação de hemácias é de 6 semanas de armazenamento, e que isso é imposto por uma lenta e estável deterioração das funções metabólicas destas.

Logo no início do período de conservação existe uma queda abrupta no pH sanguíneo, verificado desde o momento em que há o contato do sangue com a solução conservativa. Nas bolsas contendo CPDA-1, a queda do pH logo no primeiro dia de armazenamento ocorre devido à presença de ácido cítrico nesta solução conservadora. Fisiologicamente, na corrente sanguínea, existem inúmeros mecanismos responsáveis por manter o pH dentro de um estrito limite fisiológico, de 7,35 a 7,45, e muitas das funções fisiológicas normais dependem da manutenção desta neutralidade do pH. Entretanto, o sangue total retirado de seu ambiente *in vivo* e armazenado em condições extracorpóreas possui poucos recursos para compensar o contínuo metabolismo celular e acúmulo de metabolitos, que, invariavelmente, levam a diminuição constante do pH. Com o passar do tempo, as hemácias metabolizam glicose para produzir ATP, e nesse processo são gerados prótons, que levam a diminuição do pH do meio intercelular, e lactato, consequentemente interferindo no metabolismo e posterior sobrevivência pós transfusional. De maneira geral, nesse contexto de constante queda do pH, acredita-se que o valor limite de pH ao qual as células humanas podem ser submetidas com continuidade da função metabólica é de 6,2 (CHIN-YEE et al., 1997; HESS & GREENWALT, 2002; SOUSA et al., 2012).

O plasma sanguíneo em condições normais possui uma boa capacidade tamponante do pH. Esta capacidade se mantém no sangue total armazenado, e, apesar de não conseguir a manutenção em níveis semelhantes aos encontrados *in vivo*, ao menos retarda a diminuição do pH, ficando claro esse efeito quando, ao retirar o plasma e boa

parte da solução conservadora, os concentrados de hemácias apresentam uma queda mais abrupta deste parâmetro. Por outro lado, é importante respeitar a proporção entre sangue coletado e solução de conservação, visto que quando o volume de sangue coletado é reduzido em relação ao volume de solução, haverá uma diminuição mais acentuada do pH, devido à já comentada acidez da solução (RIBEIRO FILHO et al, 1994; SOUSA et al., 2012).

O bicarbonato (HCO_3^-) é um dos principais agentes plasmáticos com papel tamponante importante para a manutenção do pH em valores fisiológicos no meio extracelular. O HCO_3^- liga-se aos íons H^+ resultantes do metabolismo anaeróbio, neutralizando-os e gerando H_2CO_3 . Além disso, no metabolismo *in vivo*, o bicarbonato é o principal responsável pelo transporte do CO_2 dos tecidos para os pulmões, onde é expelido. Durante o período de conservação, o ion HCO_3^- mantém-se responsável por compensar o aumento nas concentrações dos metabólitos ácidos. Desta forma observa-se uma diminuição nos valores do ion HCO_3^- durante o período de armazenamento. Apesar da constante diminuição do pH durante o período de armazenamento do sangue total, não resta dúvidas que o HCO_3^- , enquanto estiver em boa disponibilidade no meio extracelular, consegue neutralizar em parte os ácidos produzidos pelo metabolismo celular (RANDALL et al, 2008; SOUSA et al., 2012).

O metabolismo das hemácias para obtenção de energia é crucial tanto para a sobrevivência durante o armazenamento quanto para a qualidade e viabilidade das células no período pós-transfusional. Durante o armazenamento, as células obtêm energia primariamente através da glicólise, gerando ATP e lactato. Nesse processo, o pH do meio interfere de maneira determinante, sendo que soluções conservativas com o pH mais próximo da neutralidade melhoram o metabolismo das hemácias, e conseguem suportar melhor a glicólise para produção de ATP. Os níveis de ATP são importantes não só para manter o metabolismo celular, mas também para assegurar a integridade da membrana plasmática. Conforme o tempo de armazenamento aumenta, os níveis de ATP diminuem e a bomba de sódio-potássio da membrana celular começa a falhar, o que interfere na integridade e morfologia celular. A diminuição de 50% na disponibilidade de ATP tem correlação negativa com a taxa de sobrevivência pós transfusão (CHIN-YEE et al., 1997; HESS & GREENWALT, 2002).

Uma das características mais importantes das hemácias é sua flexibilidade e capacidade de deformação, para poder realizar a troca gasosa através de pequenos capilares teciduais. Com a perda da integridade da membrana celular, a sua capacidade de deformação também é afetada (CHIN-YEE et al., 1997). Portanto, quanto menor o pH, menor o metabolismo energético e menos ATP disponível, ocasionando menor integridade da membrana e então menor tempo de sobrevivência celular e menor capacidade funcional das hemácias (CHIN-YEE et al., 1997; HESS & GREENWALT, 2002; SOUSA et al., 2012).

Com o aumento do tempo de armazenamento também há alteração no tamanho das hemácias, relacionado à falha da bomba-sódio potássio. O influxo de sódio para o interior das células e o extravasamento de potássio para o meio extracelular leva à entrada de líquido para dentro das células, promovendo variações no tamanho das hemácias. O tamanho das hemácias é refletido na mudança do volume corpuscular médio (VCM) durante o tempo de armazenamento que varia entre as espécies. Diferentes estudos verificaram que em humanos e ovinos houve aumento do VCM, enquanto que em equinos tal aumento não ocorreu (MUDGE, 2004; HOGMAN, 1998).

O potássio é um ion predominantemente intracelular e a maior mudança na relação dos eletrólitos durante o armazenamento é o aumento do potássio sérico, causado pela falha da membrana sódio-potássio dependente de ATP e conseqüente extravasamento de potássio intracelular para o meio extracelular. Nesse processo também há a influência da diminuição do pH e temperatura de armazenamento. Altos valores de potássio também são dependentes da hemólise e da concentração intra-eritrocitária desse ion, que varia conforme a espécie, devendo haver cautela na comparação do aumento durante o armazenamento entre espécies. (HOGMAN, 1998; MUDGE, 2004; SOUSA et al., 2012)

Devido à diminuição do pH, depleção da fonte energética, comprometimento da membrana celular e acúmulo de metabólitos prejudiciais à sobrevivência eritrocitária, era de se esperar uma alta taxa de lise celular. Entretanto, a capacidade de sobrevivência das hemácias tem se mostrado alta e em estudos com equinos não há redução na contagem, hematócrito e hemoglobina total com o avançar do tempo de armazenamento (MUDGE, 2004; NIINISTO, 2008). Resultados divergentes foram encontrados com armazenamento de sangue total de asininos, onde foi verificado uma constante redução na contagem de

hemácias e hematócrito durante 42 dias de armazenamento (BARROS et al, 2013; TAVARES et al, 2013).

Critérios para a determinação da viabilidade de sangue armazenado ainda não foram bem determinados para as espécies de interesse veterinário, entre elas os equinos. Na medicina humana um critério importante é o percentual de hemólise, e esse dado é utilizado amplamente em trabalhos de diferentes espécies com armazenamento de sangue por longos períodos (MUDGE, 2004; NIINISTÖ, 2008; SOUSA et. al., 2012). A hemólise pode ser em forma da ruptura das células ou na ruptura de microvesículas da superfície de células ainda intacta, conseqüentemente aumentando os níveis de hemoglobina livre (HESS & GREENWALT, 2002).

Outro critério importante que pode estar relacionado à viabilidade do sangue armazenado é o 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) que é necessário para realizar a liberação do oxigênio ligado à hemoglobina e seus níveis estão diretamente associados à capacidade do sangue transfundido mobilizar oxigênio para os tecidos. O 2,3-DPG também está intimamente relacionado ao pH, necessitando um valor mais próximo do fisiológico para manter-se em níveis adequados. Portanto, quando há quedas mais acentuadas no pH sanguíneo durante o armazenamento, menores os níveis de 2,3-DPG e menor capacidade oxidativa do sangue a ser transfundido (COSTA JÚNIOR, 2008; NIINISTÖ, 2008).

Com o aumento do tempo de armazenamento observa-se o aumento na $p\text{CO}_2$ devido à neutralização do ácido láctico produzido pelo metabolismo celular, e isso interfere diretamente na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Com o aumento da $p\text{CO}_2$ há a redução do pH e o incremento na combinação direta entre CO_2 e hemoglobina. Combinado a tudo isso, altos níveis de $p\text{CO}_2$ promovem maior degradação de 2,3-DPG (SOUSA et al., 2012).

As conseqüências clínicas da transfusão de sangue considerado “velho” ainda são incertas. Em humanos, o armazenamento prolongado já tem impacto conhecido na sobrevivência pós-transfusão, mas outros efeitos adversos não são muito esclarecidos (CHIN-YEE et al., 1997). A capacidade orgânica do indivíduo receptor em lidar com células “defeituosas” e conseguir retirá-las através do sistema reticulo-endotelial é determinante. A questão é que normalmente os indivíduos que recebem transfusões sanguíneas encontram-se em situação de comprometimento de suas funções, dentre estas o sistema reticulo-endotelial. (CHIN-YEE et al., 1997) Alguns estudos têm demonstrado que hemácias provenientes de concentrado de eritrócitos, transfundidas após longo

período de armazenamento, tem capacidade limitada de oxigenar os tecidos, além de ser relatado o aprisionamento de eritrócitos com pouca capacidade de deformação na microcirculação de órgãos, como pulmões, baço e mucosa intestinal (CHIN-YEE et al., 1997).

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília sob protocolo nº 64/2017.

Foram utilizados 20 equinos saudáveis, 9 machos e 11 fêmeas, todos com 8 anos de idade, da raça Brasileira de Hipismo, com peso médio $504,6 \pm 40,02\text{Kg}$, pertencentes ao Exército Brasileiro, alojados no 1º Regimento de Cavalaria de Guardas, em Brasília-DF. Todos os animais passaram por acompanhamento clínico diário na última semana antes do início do estudo. Nessa fase, o histórico clínico de todos os animais foi avaliado, sendo excluídos animais com problemas sistêmicos, que passaram por cirurgia nos últimos 6 meses, ou aqueles com escore corporal muito baixo. Os animais ficaram alojados em baias de alvenaria, de 9m^2 . A alimentação de todos os animais era similar, comendo um total diário de 5 kg de ração balanceada, 3 kg de feno de capim tifton (*Cynodon sp.*) e 1 Kg de feno de alfafa, além de suplementação com 200g de sal mineral e água “*ad libitum*”.

Por meio de venipunção jugular esquerda, após tricotomia e antissepsia com álcool e iodo no local, foi realizada a coleta de 450 ml de sangue em uma bolsa de transfusão CPDA-1 (JP Indústria Farmacêutica SA). Para padronizar a quantidade de sangue coletado, as bolsas de sangue foram pesadas em balança (Toledo Pnix 3/14), sendo interrompida a colheita quando o peso total alcançava 550g (472,5 g de sangue + 100 g da embalagem e diluente). Para calcular o peso do sangue total foi utilizada a convenção de que cada 1 ml de sangue é igual 1,05g (YAGI, 2016).

Ao mesmo tempo que foi realizada a coleta da amostra para a bolsa de sangue, também foram coletadas amostras da veia jugular oposta, diretamente para tubos com citrato de sódio. Tais amostras foram consideradas como Tempo -1 (D -1), para análises laboratoriais, e acondicionadas em caixa de isopor com gelo. Nessas amostras também foram imediatamente determinados os níveis de lactato e glicose sanguíneos, por meio de analisador portátil (Accutrend®, Roche) com tiras específicas. Os valores determinados foram considerados de referência para cada animal.

Após a coleta as bolsas foram acondicionadas imediatamente em um isopor com gelo descartável envolvido em papel pardo, para que se evitasse hemólise pelo contato da

bolsa diretamente com o gelo. Cerca de 1 hora após a coleta, as bolsas foram conduzidas até o laboratório do Hospital Veterinário da UnB, onde foram coletadas alíquotas de 10 ml de sangue de cada bolsa (D0), e em seguida foram transferidas para refrigerador Indrel RC 02D, do banco de sangue do HVet-UnB. As bolsas permaneceram no banco de sangue por 28 dias, sendo coletadas alíquotas nos dias 7, 14, 21 e 28 em capela de fluxo laminar. A temperatura do armazenamento das bolsas ficou entre 4 e 5°C. As bolsas eram homogeneizadas uma vez por dia, durante todo o período do experimento.

Três dias antes do início das coletas, em capela de fluxo laminar, adaptadores PRN (BD[®]) foram acoplados, de forma estéril, em um dos acessos superiores da bolsa. O adaptador foi fixado e a bolsa vedada utilizando-se cola de cianoacrilato (Super Bonder[®]). Após a cola secar, as bolsas foram esterilizadas, utilizando-se luz ultravioleta por 15 minutos.

Para as coletas seriadas (D0 a D28) a bolsa de sangue foi homogeneizada por cerca de 5 minutos e o adaptador PRN foi esterilizado com gaze e álcool 70°. Foram retirados 10 ml de sangue de cada bolsa através de seringa de 10 ml com agulha 30x08 mm. Em seguida a agulha foi retirada e acoplado na seringa um filtro de transferência de 20 µm (SFM GmbH, Wachttersbach, Alemanha). O sangue foi então transferido separadamente para 2 tubos de ensaio sem anticoagulante. Em um dos tubos foi retirada amostra de 0,8 ml de sangue em seringa de insulina, que foi rapidamente armazenada em isopor com água e gelo. Em todas as amostras foi mantida pequena amostra de sangue na seringa de 10 ml, utilizado para imediata determinação de lactato e glicose, por meio de analisador portátil (Accutrend[®], Roche) com tiras específicas.

As seringas com 0,8 ml de sangue foram utilizadas para análise hemogasométrica em hemogasômetro b 121 COBAS (ROCHE[®]). Foram obtidos dados de pH, pressão parcial de gás carbônico (PCO₂), HCO₃, excesso de base (BE), pressão total de oxigênio (PO_{2t}) e íons potássio (K⁺) e sódio (Na⁺).

Para a determinação de hemoglobina total, foi utilizado o método de cianometahemoglobina. Nesse método, 2,5 ml de reagente (reativo de Drabkin) contendo cianeto de potássio, e 10 µl de sangue total são misturados. Após 5 minutos é realizada a leitura em espectrofotômetro semiautomático (BioPlus[®]). O método para determinar hemoglobina livre foi o mesmo, sendo realizada a centrifugação das amostras de sangue por 5 min a 3500 rpm para a obtenção do plasma. 10 µl de plasma são adicionados aos

2,5 ml de reagente, e a determinação é realizada em espectrofotômetro semiautomático (BioPlus[®]), após 5 minutos. Após a obtenção desses 2 dados, foi utilizado o método de Wardrop (1997) para o cálculo da % de hemólise:

$$\%Hemólise = (100 - hematócrito) \times hemoglobina\ plasmática(g/dL) / hemoglobina\ total(g/dL)$$

O tubo com sangue que não passou por centrifugação para determinação de hemoglobina livre foi utilizado para análise de hemograma. Foi utilizado contador automático de células para hemograma, Sysmex pocH-100iV Diff (Roche[®]). Foram obtidos dados da contagem global de hemácias e hematócrito. Determinou-se matematicamente os valores de volume corpuscular médio (VCM) de cada amostra.

Ao final dos 28 dias do período teste, as bolsas foram enviadas para laboratório de microbiologia, a fim de serem isolados possíveis agentes bacterianos que poderiam ter contaminado as amostras durante o armazenamento e manuseio.

Os resultados encontrados foram submetidos à análise estatística com teste de normalidade de Shapiro-Wilk, em que os dados seguiram distribuição normal (dados paramétricos = $P > 0,10$). Logo após, foram submetidos à análise de variância de repetidas mensurações de um fator, seguido do teste de Tukey, com diferenças significativas quando $P < 0,05$. O programa utilizado foi “GraphPad Prism for Mac version 5.00” (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Os valores foram expressos em médias e desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras retiradas no tempo -1 (D-1) foram encontrados os resultados demonstrados na tabela 1. Tais valores foram considerados de referência pois foram determinados logo após a colheita, antes do sangue ser acondicionado nas bolsas de transfusão. Percebeu-se que os valores se encontraram dentro dos limites dos padrões normais, quando comparados aos valores de referência da espécie equina (KANEKO, 2008; RICKETSS, 2006; SEAHORN e SEAHORN, 2003; VETLAB, 2009)

Tabela 1. Valores médios (\pm desvio padrão) de variáveis hemogasométricas, hematológicas e bioquímicas do sangue total de equinos (n=20), no momento da coleta.

Variáveis	Média \pm Desvio Padrão	Valores de Referência
pH	7,36 \pm 0,04	7,32 – 7,44 (b)
PCO₂ (mmHg)	47,07 \pm 4,52	38 – 48 (d)
HCO₃ (mmol/L)	26,04 \pm 1,54	20 – 28 (b)
BE (mmol/L)	0,31 \pm 1,59	-4 – 4 (c)
PO_{2t} (mmHg)	47,04 \pm 11,96	37 – 56 (d)
He (x10⁶)	6,18 \pm 0,84	6,2 – 10,2 (a)
HT (%)	29,87 \pm 4,18	31 – 43 (a)
VCM (fL)	48,33 \pm 1,56	40,0 – 50,0 (a)
Glicose (mg/dL)	76,93 \pm 16,38	75-115 (b)
Lactato (mmol/L)	0,98 \pm 0,5	1,11-1,78 (b)
Na⁺ (mmol/L)	141,46 \pm 4,53	134 – 142 (a)
K⁺ (mmol/L)	3,60 \pm 0,76	3,0 – 5,0 (a)

(pH Potencial de Hidrogênio; PCO₂ – pressão de CO₂; HCO₃ – bicarbonato; BE – excesso de base; PO_{2t} – pressão total de oxigênio; He – concentração de hemácias; HT – hematócrito; VCM – Volume Cospuscular Médio; Na⁺ - concentração de íons de Sódio; K⁺ - concentração de íons potássio. (a) RICKETSS, 2006; (b) KANEKO, 2008; (c) SEAHORN e SEAHORN, 2003; (d) VETLAB, 2009.

Os resultados encontrados nas análises realizadas após armazenamento nos dias zero, sete, 14, 21 e 28 (D0, D7, D14, D21 e D28) do sangue total equino em bolsas CPDA-1 estão demonstrados na Tabela 2:

Tabela 2. Valores médios (\pm desvio padrão) de variáveis hemogasométricas, hematológicas e bioquímicas do sangue total de equinos (n=20), armazenado em bolsas CPDA-1 sob refrigeração por 28 dias.

Variáveis	D0	D7	D14	D21	D28
pH	7,08 \pm 0,03 ^b	7,23 \pm 0,05 ^a	7,07 \pm 0,06 ^b	6,97 \pm 0,08 ^c	6,88 \pm 0,09 ^d
PO ₂ t(mmHg)	51,30 \pm 5,55 ^a	6,835 \pm 0,96 ^c	7,388 \pm 1,19 ^c	8,530 \pm 2,08 ^c	11,71 \pm 6,22 ^b
PCO ₂ (mmHg)	82,09 \pm 6,88 ^a	28,56 \pm 3,11 ^c	33,25 \pm 3,75 ^b	33,96 \pm 4,64 ^b	29,55 \pm 3,39 ^c
HCO ₃ (mmol/L)	23,55 \pm 2,37 ^a	20,95 \pm 1,67 ^b	17,91 \pm 1,20 ^c	14,94 \pm 1,73 ^d	11,30 \pm 1,45 ^e
BE(mmol/L)	-7,13 \pm 2,5 ^a	-14,62 \pm 2,6 ^b	-20,21 \pm 2,2 ^c	-24,38 \pm 3,3 ^d	-28,53 \pm 2,6 ^e
Ht(%)	28,86 \pm 3,81 ^a	30,84 \pm 4,45 ^a	31,64 \pm 7,49 ^a	30,36 \pm 3,69 ^a	30,89 \pm 4,26 ^a
He (x10 ⁶)	6,09 \pm 0,68 ^a	6,27 \pm 1,00 ^a	6,23 \pm 1,52 ^a	5,93 \pm 0,77 ^a	6,19 \pm 0,83 ^a
VCM (fL)	47,30 \pm 2,46 ^c	49,27 \pm 1,99 ^b	50,88 \pm 1,72 ^a	51,30 \pm 2,31 ^a	51,44 \pm 1,26 ^a
Glicose(mg/dL)	540 \pm 54,4 ^a	494 \pm 27,7 ^a	362 \pm 100 ^b	337 \pm 60,2 ^{bc}	287 \pm 67,0 ^c
Lactato(mg/dL)	1,18 \pm 0,78 ^e	6,66 \pm 1,02 ^d	11,35 \pm 4,33 ^c	18,37 \pm 4,10 ^b	21,19 \pm 2,95 ^a
K ⁺ (mmol/L)	2,87 \pm 0,32 ^e	4,67 \pm 0,74 ^d	6,10 \pm 1,14 ^c	7,28 \pm 1,35 ^b	8,45 \pm 1,62 ^a
Na ⁺ (mmol/L)	138,2 \pm 3,71 ^a	137,7 \pm 3,01 ^a	138 \pm 3,52 ^a	136,56 \pm 3,54 ^a	136,7 \pm 2,23 ^a
Hemólise (%)	,81 \pm 0,76 ^b	0,58 \pm 0,66 ^b	0,98 \pm 0,64 ^{ab}	0,79 \pm 0,60 ^{ab}	1,30 \pm 0,86 ^a
Cl ⁻ (mmol/L)	85,27 \pm 5,60 ^c	92,2 \pm 3,36 ^b	92,93 \pm 4,71 ^{ab}	92,94 \pm 4,45 ^a	94,97 \pm 3,30 ^a

Letras minúsculas diferentes, nas mesmas linhas, indicam diferença significativa (P<0,05).

pH - Potencial de Hidrogênio; PO_{2t} – pressão total de oxigênio; PCO₂ – pressão de CO₂; HCO₃ – íon bicarbonato; BE – excesso de base; Ht - hematócrito; He – contagem de hemácias; VCM – Volume Cospuscular Médio; Na⁺ - concentração de íons de Sódio; K⁺ - concentração de íons potássio)

Quanto a análise bacteriológica, não houve crescimento bacteriano em nenhuma bolsa após os 28 dias de armazenamento. Portanto, os resultados obtidos não foram influenciados por possíveis contaminações.

As médias (e desvio padrão) dos valores de pH para os diferentes tempos estão demonstradas na Figura 1. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística (P<0,05) entre os tempos.

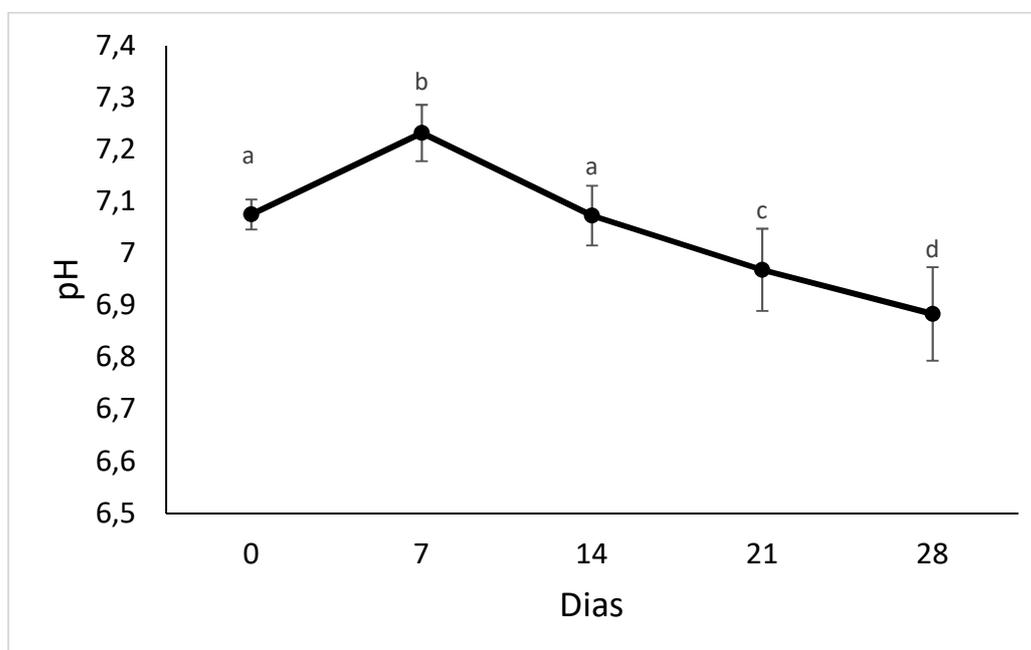


Figura 1. Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do pH no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.

Observou-se que a partir do D7 os valores referentes ao pH aumentaram significativamente ($7,23 \pm 0,05$) retornando aos mesmos valores de D0 em D14 ($7,07 \pm 0,06$), e revelando diminuição em D21 ($6,97 \pm 0,08$) e D28 ($6,88 \pm 0,09$), respectivamente.

Em outros experimentos com armazenamento de sangue total (MUDGE et al, 2004) e com concentrado de hemácias de equinos (NIINISTO, 2008), os valores de pH desde o primeiro dia de armazenamento se mantiveram sempre abaixo de 7,1 e 7,0,

respectivamente. Em todos os trabalhos houve diminuição progressiva conforme o aumento do tempo, representando um aumento gradual na acidez do meio. No presente estudo, notou-se um aumento significativo dos valores de pH do D0 para o D7 de armazenamento vindo a decrescer significativamente no dia 14. Em trabalhos com sangue total de ovinos (SOUSA et al, 2012) e caninos (COSTA JUNIOR, 2008), não ocorreu esse aumento entre os dias 0 e 7, sendo a diminuição do pH sempre constante a partir do primeiro dia de armazenamento.

Notadamente, a queda brusca de pH verificada logo após a coleta de sangue, em D0, provavelmente deveu-se ao fato do pH da solução conservadora CPDA-1 ser baixo. Entretanto, os diversos mecanismos da capacidade tampão do sangue parecem seguir em plena atividade nos primeiros dias de armazenamento, com capacidade de equilibrar a acidez do meio por um tempo considerável em um ambiente extra-corpóreo. O motivo pelo qual os resultados encontrados divergem da literatura ainda carece de maior esclarecimento e deve ser alvo de estudos futuros. Outro aspecto interessante a ser desvendado é em qual momento, entre os dias 0 e 7 de armazenamento, existe um “pico” de aumento do pH pós coleta.

Os níveis de pH em sangue total armazenado estão diretamente relacionados à sua viabilidade e efetividade pós transfusional. O 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) é uma molécula do interior dos eritrócitos ligado à subunidade β da hemoglobina. Esta molécula é diretamente responsável por realizar a liberação de oxigênio (O_2) para os tecidos, de forma que quanto menor a disponibilidade de 2,3-DPG, maior a afinidade da hemoglobina por O_2 e conseqüentemente menor capacidade das hemácias liberarem oxigênio aos tecidos (COSTA JUNIOR et al, 2008). Já está bem determinado que o principal fator relacionado à disponibilidade de 2,3-DPG é o pH sanguíneo, sendo que níveis maiores que 7 favorecem a síntese de 2,3-DPG, enquanto que níveis menores que estes favorecem a sua degradação. Logo, é possível afirmar que quanto mais rápido for a diminuição do pH durante o período de armazenamento, mais rápido se dará a degradação e diminuição dos níveis de 2,3-DPG, comprometendo a qualidade e viabilidade do sangue (KURUP, 2003). Em estudos com equinos (MUDGE et. al, 2004) houve uma redução constante nos níveis de 2,3-DPG, acompanhando a queda no pH. Entretanto, Costa Junior e colaboradores (2008) verificaram um aumento em sua mensuração entre os dias 0 e 7 de armazenamento no sangue de cães, mesmo com o pH abaixo de 7 desde o primeiro dia.

Foi relatado que esse aumento provavelmente deveu-se à alta disponibilidade de adenina, energia e fosfato na solução conservadora.

No presente estudo, o pH só alcançou níveis abaixo de 7 no dia 21 de armazenamento, diferentemente dos outros trabalhos com sangue equino. Portanto, é razoável afirmar que o ambiente extracelular se manteve favorável à síntese de 2,3-DPG, até o dia 14 de armazenamento. Estudos adicionais com a mensuração de 2,3-DPG devem ser feitos utilizando a mesma metodologia para confirmar que este ambiente favorável até D14 reflete em bons níveis de 2,3-DPG.

As médias (desvio padrão) dos valores mensurados da pressão de oxigênio (PO₂) para os diferentes tempos estão demonstradas na Figura 2. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos.

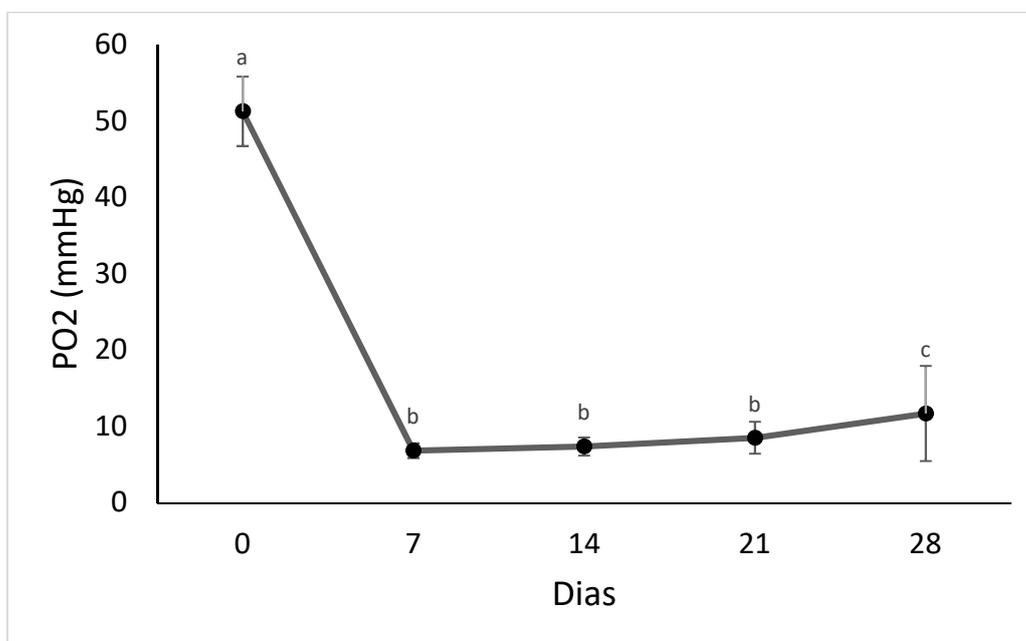


Figura 2. Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do pO₂ (mmHg) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.

Notou-se brusca redução nos valores da pO₂, logo na primeira semana de armazenamento, com decréscimo importante de D0 (51,30±4,55) para D7 (6,83±0,96). Com o passar do tempo de armazenamento (D14 e D21), os níveis permaneceram estáveis até sofrer um pequeno aumento em D 28 (11,71 ± 6,22), quando comparado ao D7. Embora os valores iniciais sejam semelhantes, próximos a 50 mmHg, em cães verificou-se um

aumento no pO_2 conforme o período de armazenamento tanto em sangue total quanto em concentrado de eritrócitos (COSTA JUNIOR et al, 2008; COSTA JUNIOR, 2010). Já em ovinos só foi verificada variação na pO_2 após 35 dias de armazenamento de sangue total (SOUSA et al, 2013).

As variações, tanto para mais como para menos, nas concentrações de PO_2 , encontradas nas diferentes espécies citadas demonstram a permeabilidade das bolsas a esse gás (SOUSA et al, 2012). A diminuição da PO_2 pode interferir na viabilidade do sangue pós transfusão, pelo fato da capacidade de oxigenar os tecidos ser o principal motivo para a transfusão sanguínea. Entretanto, durante o armazenamento, a baixa PO_2 acaba por ser benéfica porque o excesso de oxigênio intracelular pode danificar o citoesqueleto, através de estresse oxidativo, afetando a flexibilidade da célula, e consequentemente diminuindo a viabilidade celular pós transfusional (LION et al, 2009).

As médias (desvio padrão) das determinações da pressão de CO_2 (PCO_2) para os diferentes tempos estão demonstradas na Figura 3. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos.

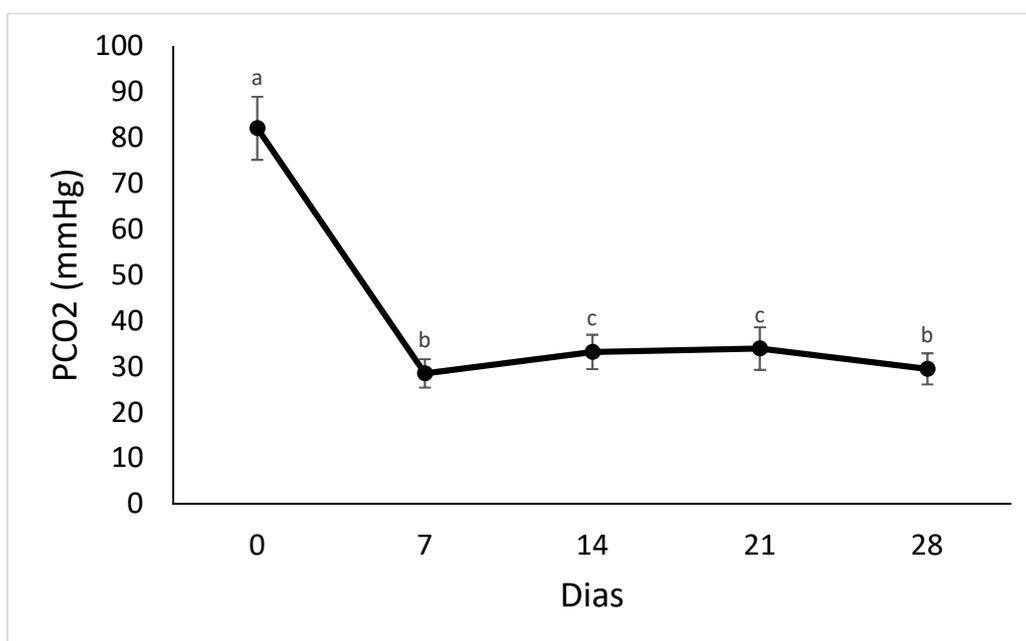


Figura 3. Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do PCO_2 (mmHg) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.

A pressão de CO₂ (PCO₂), determinada em mmHg, iniciou em valores mais altos que o normalmente visualizado em sangue venoso normal, como demonstrado no D0 (82,09±6,88) revelando diminuição desses valores em D7 (28,56±3,11) e aumento significativo em D14 (33,25±3,75) vindo a diminuir em D28 (29,55±3,39).

Segundo Sousa et. al (2012), a pressão de CO₂ é uma variável que tende a aumentar durante o período de armazenamento. Em cães, durante o armazenamento em bolsas CPDA-1, foram encontrados valores sempre acima de 60 mmHg, havendo um aumento até o dia 21, com posterior redução (COSTA JUNIOR, 2008). Em ovinos, os níveis de PCO₂ aumentaram de maneira linear durante o período de armazenamento, sendo que o valor mínimo encontrado foi de 83 mmHg, em D0 (SOUSA et al, 2013). Os níveis de PCO₂ interferem na disponibilidade de 2,3-DPG, principalmente por competirem pelo mesmo sítio de ligação na hemoglobina. Quando o 2,3-DPG não está ligado à hemoglobina, está livre para sofrer degradação. Portanto altos níveis de PCO₂ levam a uma alta taxa de degradação de 2,3-DPG (HOGMAN et al, 2002).

No que se refere aos íons bicarbonato, as médias (desvio padrão) dos valores determinados para os diferentes tempos estão demonstradas na Figura 4. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística (P<0,05) entre os tempos.

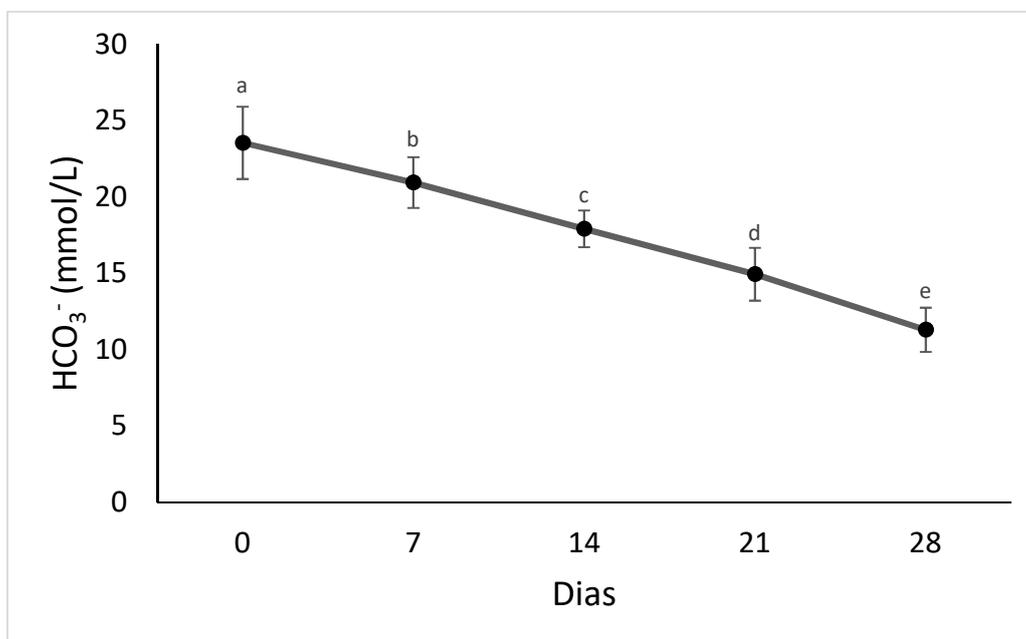


Figura 4. Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do HCO₃⁻ (mmol/L) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.

As concentrações de HCO_3^- no sangue sofreram diminuição constante durante o período de armazenamento, a partir de D7 ($20,95 \pm 1,67$), com diferença significativa entre todos os tempos, D14 ($17,91 \pm 1,20$), D21 ($14,94 \pm 1,73$) e D28 ($11,30 \pm 1,45$). Tal diminuição foi observada provavelmente devido ao consumo do HCO_3^- para a manutenção do equilíbrio ácido-base sanguíneo. O mesmo padrão dos valores de bicarbonato foi encontrado com armazenamento de sangue total e em concentrado de eritrócitos de cães (COSTA JUNIOR, 2010). Nota-se uma maior disponibilidade de bicarbonato no sangue equino, comparado ao canino, sendo que a média em D0 no sangue equino foi de 23 mmol/L, enquanto que nos estudos com sangue total e concentrado de eritrócitos de caninos foi de 14 e 9,67, respectivamente. (COSTA JUNIOR et. al, 2008; COSTA JUNIOR, 2010).

Como comentado anteriormente, o metabolismo celular anaeróbico gera inúmeros metabólitos ácidos. Nestas condições, o bicarbonato plasmático possui um importante papel tamponante, por neutralizar os íons H^+ , contribuindo para a manutenção do pH (SOUSA et. al, 2012). A maior disponibilidade de bicarbonato no início do armazenamento, quando comparado ao sangue canino, pode ter contribuído para uma melhor capacidade tamponante, e refletindo no aumento do pH observado no início do armazenamento, como citado anteriormente. Entretanto, a concentração de bicarbonato permanece elevada quando já há o início da queda de pH, em D14, demonstrando a incapacidade deste ânion de compensar solitariamente o aumento da acidez. Com o avanço no tempo de armazenamento as reservas de bicarbonato são consumidas conforme o aumento dos níveis de metabólitos ácidos, havendo uma maior queda na capacidade tamponante e diminuição do pH. Como será discutido posteriormente, houve um aumento na concentração de íons Cloreto, também de carga negativa. Sendo assim, é possível afirmar que uma parte do bicarbonato, no início do armazenamento, além de ser consumida para a neutralização de íons H^+ , também pode ter sido transportado para dentro das células, ocasionando em troca da saída dos íons cloreto.

Com relação ao excesso de base (BE) as médias (desvio padrão) para os diferentes tempos estão demonstradas na Figura 5. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos.

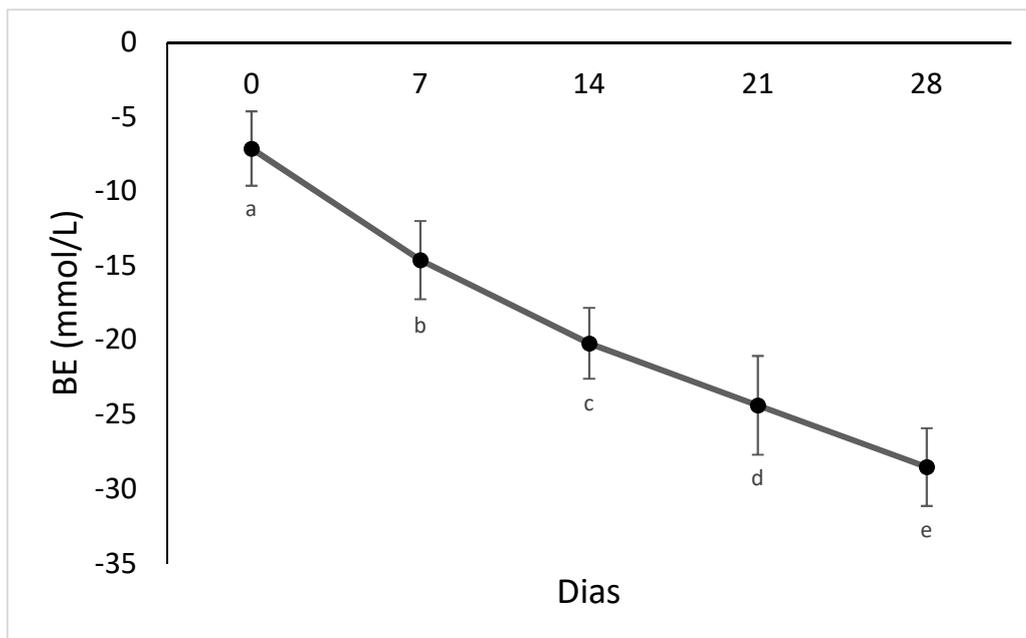


Figura 5. Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do Excesso de Base (mmol/L) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.

Observou-se que os valores referentes ao Excesso de Base (BE), em mmol/L, a partir de D7 ($-14,62 \pm 2,6$), se mantiveram em constante queda, com diferença estatística em todos os momentos de avaliação, D14 ($-20,21 \pm 2,2$), D21 ($-24,38 \pm 3,3$) e D28 ($-28,53 \pm 2,6$).

Em caprinos, Tavares (2013) relatou um comportamento semelhante, com aumento do déficit de forma linear conforme o avanço do tempo de armazenamento. Foi sugerido por esse autor que seus valores eram influenciados pelo equilíbrio ácido-base, acompanhando a diminuição do pH e dos níveis de bicarbonato. No presente estudo, foi verificado que seus valores acompanham os valores de bicarbonato, entretanto não foram influenciados pelo aumento temporário de pH entre D0 e D7. É importante observar que já há um aumento no déficit de base desde D0, provavelmente devido à acidez (íons H^+) do diluente. Entre D0 e D7, há a diminuição nos íons H^+ , constatado com o aumento do pH, portanto o aumento constante nesse período provavelmente foi causado pelo aumento na concentração de outros íons, como os íons cloreto, como será discutido a seguir.

Os valores expressos em médias (desvio padrão) das concentrações de íons potássio (K) estão exposta na Figura 6. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos.

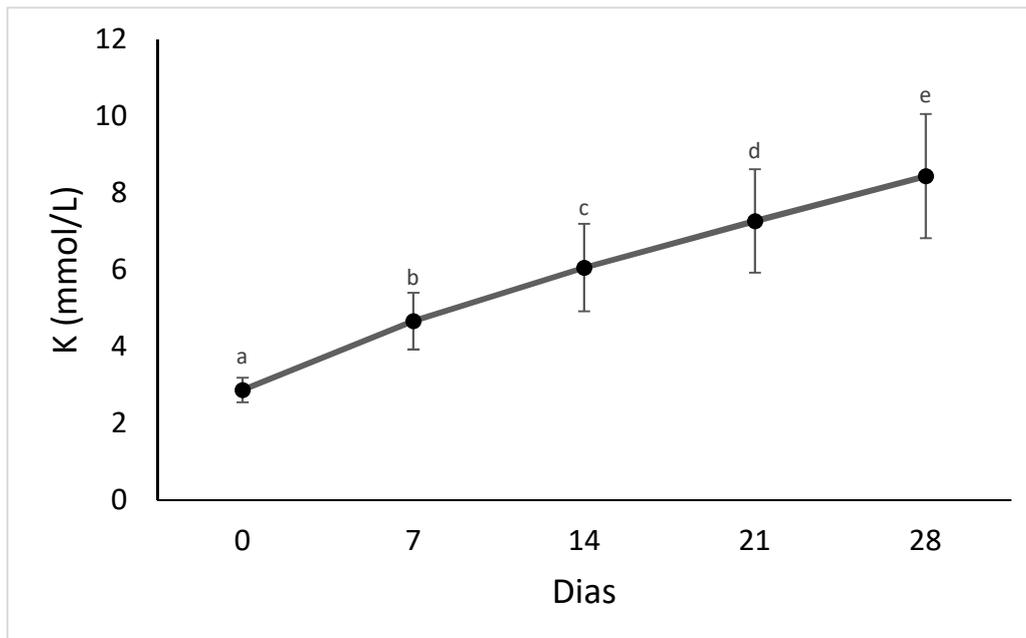


Figura 6. Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) de potássio (mmol/L) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.

Não foi constatada diferença estatística entre as médias das concentrações de Na^+ no meio extracelular durante o período de armazenamento. Já as concentrações de K^+ sofreram aumento constante a partir de D7 ($4,67 \pm 0,74$), com diferença estatística em todos os tempos de análise, D14 ($6,10 \pm 1,14$), D21 ($7,28 \pm 1,35$) e D28 ($8,45 \pm 1,62$).

O comportamento do potássio sérico corrobora aqueles encontrados em sangue total (MUDGE, 2004) e concentrado de eritrócitos (NIINISTO, 2008) de equinos. Também foi verificado aumento constante e significativo durante o armazenamento de sangue total em caninos (COSTA JUNIOR et al, 2008) e ovinos (SOUSA et al, 2013). Em caprinos não houve diferença entre os tempos durante o armazenamento de sangue total em CPDA-1 ou CPD/SAG-M. Essa diferença entre espécies pareceu demonstrar uma maior resistência da membrana celular no sangue de caprinos (TAVARES, 2013)

Dois fatores são preponderantes para o aumento dos níveis de potássio. Primeiramente a baixa temperatura do armazenamento leva à paralização da bomba de íons Na^+ e K^+ (MUDGE et al, 2004; LION et al, 2009). Além disso, com o passar do tempo de armazenamento, há uma inversão no metabolismo de ATP. Inicialmente, o pH ácido predispõe ao acúmulo de ATP devido à diminuição nas reações das enzimas hexoquinases e phosphofruitoquinases, consumidoras de ATP. Entretanto, com o avançar

do armazenamento, o pH ácido acaba por inibir a glicólise, levando diminuição na produção e concentração de ATP (HOGMAN et al, 2002). Conforme as reservas de ATP vão sendo consumidas, a bomba de sódio-potássio, dependente de ATP, começa a falhar, ocasionando o vazamento de potássio de dentro para fora das células (MUDGE, 2004). No presente estudo foram encontrados os mesmos níveis de potássio de estudo anterior com bolsas de sangue total equino, (MUDGE, 2004), mas inferior aos níveis de concentrado de eritrócitos (>30 mmol/L) (NIINISTO, 2008). Portanto, é possível afirmar, a partir da elevação de íons potássio para o meio extracelular, que existe algum grau de lesão na membrana celular e na função da bomba Sódio Potássio, provavelmente ocasionados pela baixa temperatura de armazenamento e diminuição das concentrações de ATP. Entretanto, as lesões verificadas no armazenamento de sangue total apresentaram menor intensidade daquelas notadas no armazenamento de concentrado de eritrócitos.

Os níveis plasmáticos de sódio não sofreram alterações conforme o tempo de armazenamento. Em estudos anteriores com equinos (MUDGE et al, 2004), e caninos (COSTA JUNIOR, 2008) não foi observada diferença estatística nas concentrações de sódio durante o período de armazenamento. Já em ovinos, foi observada diminuição significativa nos níveis de sódio conforme o aumento do tempo de armazenamento, sendo ocasionado pelo influxo de água para dentro das células (SOUSA et al, 2013).

Os valores expressos em médias (desvio padrão) das concentrações de íons Cloreto (Cl^-) estão expostas na Figuras 7. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos.

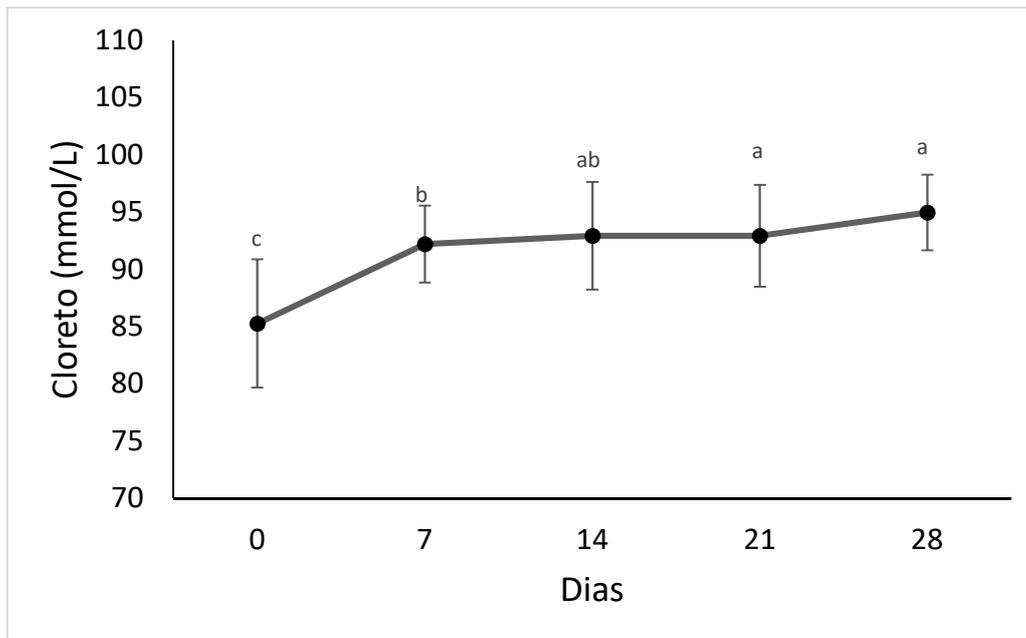


Figura 7. Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) de Cloreto (mmol/dL) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.

Quando comparado ao D0, houve aumento significativo nos valores da concentração de Cloreto em D7 ($92,2 \pm 3,36$), com tendência ao aumento em D14 ($92,97 \pm 4,71$), novo aumento em D21 ($92,93 \pm 4,45$) e se mantendo no mesmo patamar em D28 ($94,97 \pm 3,3$).

Em um estudo anterior com armazenamento de sangue total equino (MUDGE, 2004), não houve variações significativas nas concentrações de cloreto durante 31 dias de armazenamento. No presente estudo verificou-se aumento nos primeiros 21 dias de armazenamento, sendo que o principal aumento verificou-se nos primeiros 7 dias. Esse aumento inicial pode estar envolvido na diminuição do Excesso de Base (BE) verificado neste mesmo período, como discutido anteriormente. Pode-se hipotetizar que o aumento da concentração verificado deve-se a saída dos íons de cloro do meio intracelular para o meio extracelular para compensar a entrada de Bicarbonato para dentro da célula, devido a lei de eletroneutralidade. Com o passar do tempo de armazenamento existe uma estabilização nas concentrações de íons cloreto, possivelmente devido ao esgotamento das reservas intracelulares.

No que se refere aos valores referentes às médias das concentrações de glicose estão expostos na Figura 8. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos.

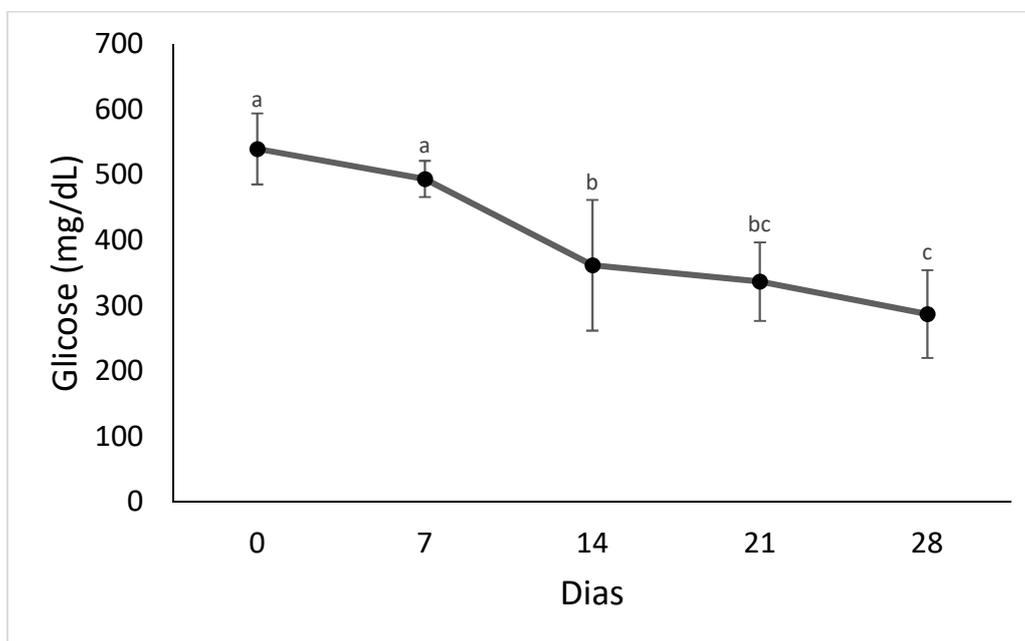


Figura 8. Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) de glicose (mg/dL) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.

Os valores da concentração de glicose em D0 ($540 \pm 54,4$) e D7 ($494 \pm 27,7$) foram elevados, provavelmente devido à presença de dextrose no diluente CPDA-1. Com o passar do tempo de armazenamento, houve uma redução significativa nesses valores, em relação a D0, em D14 (362 ± 100), D21 ($337 \pm 60,2$) e D28 ($287 \pm 67,0$).

A concentração de glicose no início do armazenamento neste estudo é semelhante a encontrada por Mudge e colaboradores (2004), próximo a 550 mg/dl, quando também diminuíram conforme o avanço no tempo de armazenamento. Dessa forma, verifica-se que houve um efetivo consumo da glicose pelos eritrócitos, chegando a utilização de 47% das reservas de energia durante o período de 28 dias de armazenamento. Essa proporção do consumo foi bem superior aos 26% encontrado por Mudge e colaboradores (2004) após 31 dias de armazenamento de sangue total, mas ainda inferior à taxa de consumo de glicose em sangue total canino (COSTA JUNIOR, 2008). Provavelmente esta diminuição foi reflexo do consumo da dextrose para obtenção de ATP e manutenção do metabolismo celular.

Foi sugerido que a diferença nas taxas de consumo de glicose no sangue equino era consequência de uma menor atividade metabólica, quando comparada aos cães e humanos (MUDGE et al, 2004). A glicose ainda pode ser considerada como um parâmetro de viabilidade do sangue a ser transfundido. Em humanos o nível mínimo de glicose no sangue doador é de 50 mg/dl (SOUSA et. al, 2012).

Os valores médios (desvio padrão) das concentrações de lactato estão expostas na Figura 9. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos.

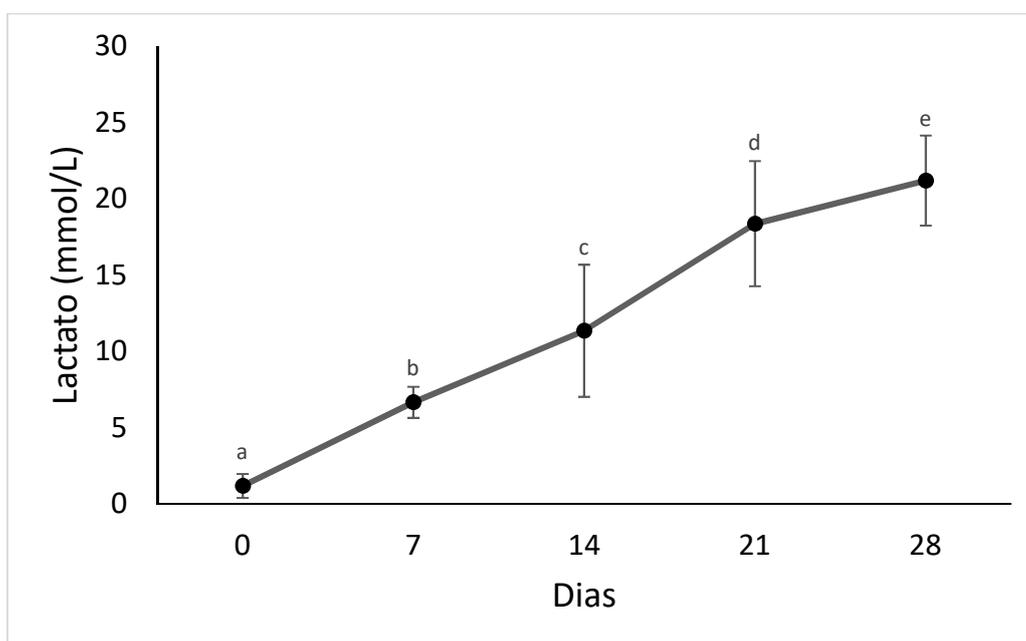


Figura 9. Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) de lactato no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.

Os valores referentes a concentração de lactato em D0 ($1,180 \pm 0,78$) se apresentaram de acordo com os valores considerados fisiológicos (KANECO, 2008). Entretanto, houve aumento significativo a partir de D7 ($6,66 \pm 1,02$), mantendo-se em elevação constante em D14 ($11,35 \pm 4,33$), D21 ($18,37 \pm 4,10$) e D28 ($21,19 \pm 2,95$).

Verificou-se aumento da concentração de lactato em estudos anteriores com sangue total (MUDGE et al, 2004) e concentrado de eritrócitos de equinos (NIINISTO et al, 2008). O pH mais próximo da neutralidade do meio acaba por influenciar positivamente no consumo de glicose, consequentemente gerando o acúmulo de uma

concentração maior de lactato (MUDGE et al, 2004). Desta forma, o aumento inicial do pH verificado no presente estudo pode ter tido influência direta no maior consumo de glicose, quando comparado ao consumo do estudo anterior com sangue total de equinos.

Com relação aos dados hematimétricos, as médias dos valores relativos ao Volume Corpuscular Médio estão representados na Figura 10. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos.

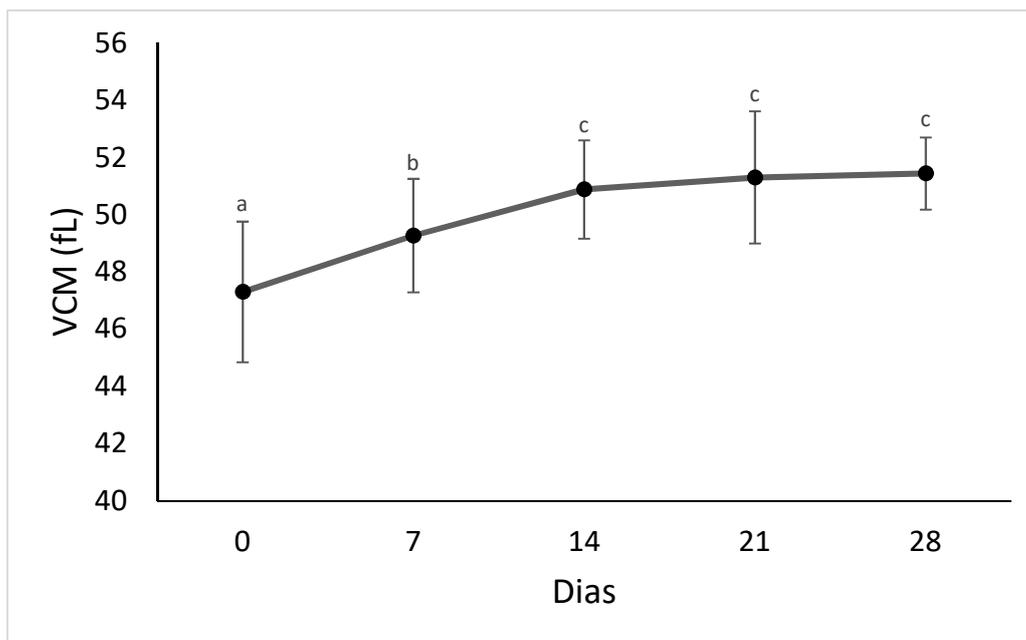


Figura 10. Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do Valor Corpuscular Médio (VCM) no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.

Não houve diferença, tanto nos valores de hematócrito, quanto na contagem de hemácias durante todo o período de armazenamento do sangue equino em bolsas CPDA-1 (Tabela 2). Em estudo anterior com armazenamento de sangue total equino (MUDGE et al., 2004) também não foi verificada alteração dos valores de hematócrito durante o período de armazenamento, assim como em concentrado de eritrócitos de equinos (NIINISTO, 2008), cães (COSTA JUNIOR, 2010) e caprinos (TAVARES, 2013). Em estudos com asininos e ovinos (SOUSA et al, 2013; TAVARES, 2011) percebeu-se aumento no hematócrito nas semanas finais de armazenamento, ao mesmo tempo em que houve diminuição na contagem de hemácias. Tal elevação ocorreu devido ao aumento do VCM durante o período de armazenamento

O VCM esteve dentro dos valores fisiológicos da espécie equina durante todo o período do experimento (RICKETSS, 2006). Notou-se aumento em D7 (49,27±1,99) e D14 (50,88±1,72), quando comparado a D0 (47,30±2,46) e, a partir de então se manteve estável em D21 (51,30±2,31) e D28 (51,44±1,26). Não foram encontrados aumentos significativos nos estudos realizados anteriormente com sangue total e concentrado de eritrócitos de equinos (MUDGE et al, 2004; NIINISTO, 2008) e caprinos (TAVARES, 2013). O aumento do tamanho das células nem sempre é constatado provavelmente devido a ruptura de espículas e saída de material citosólico nos eritrócitos (COSTA JÚNIOR, 2010).

Verificou-se que o armazenamento de sangue total de equinos altera pouco os dados hematológicos. Na literatura existem relatos que em ovinos e asininos, ocorre aumento no VCM conforme a progressão dos dias de armazenamento (TAVARES, 2011; SOUSA et al, 2013). Nestas espécies, foi verificado aumento no hematócrito enquanto houve diminuição na contagem de eritrócitos das bolsas. No presente estudo, verificou-se um aumento no VCM mesmo com a manutenção do hematócrito e contagem global de hemácias. Tal fenômeno está relacionado a falha da bomba sódio potássio com influxo de água para dentro das células, causando elevação do VCM, mas sem alterar significativamente o número de células (SOUSA et al, 2013).

Os dados referentes às médias do percentual de hemólise estão representados na Figura 11. As letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tempos.

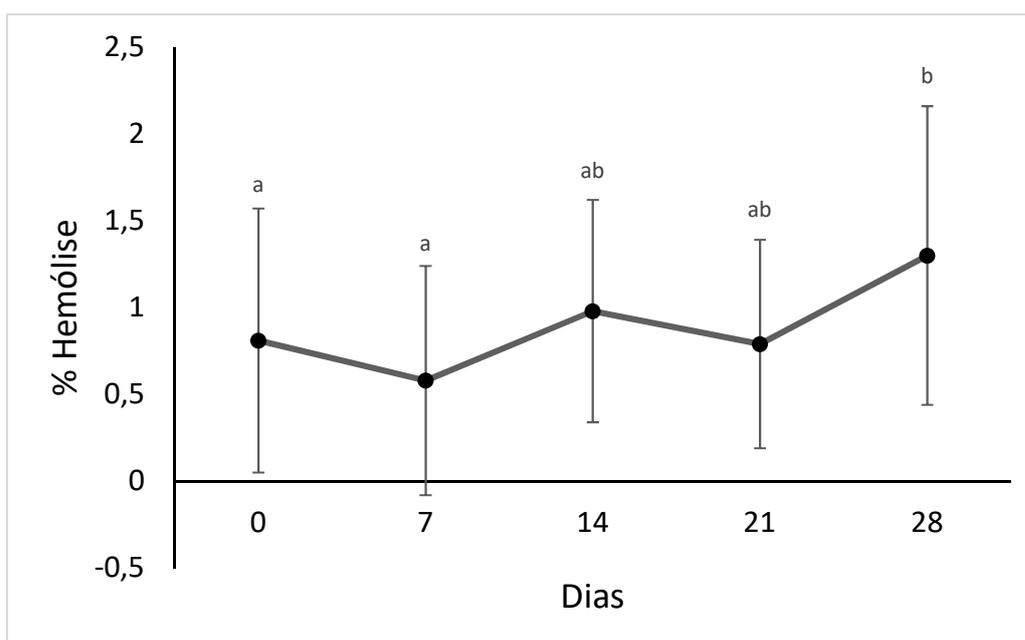


Figura 11. Representação gráfica dos valores médios (desvio padrão) do Percentual de Hemólise no sangue equino nos diferentes dias após a coleta e armazenamento em bolsas CPDA-1 sob refrigeração.

Foi constatado aumento nas médias do % de Hemólise em D28 ($1,30 \pm 0,86$) quando comparado com D0 ($0,81 \pm 0,76$) e D7 ($0,58 \pm 0,66$). Nos tempos D14 ($0,98 \pm 0,64$) e D21 ($0,79 \pm 0,60$) foi constatada apenas tendência a elevação das médias, sem diferença estatística. Em um estudo anterior com concentrado de eritrócitos de equinos, foi verificado aumento no percentual de hemólise a partir do 7º dia de armazenamento (NIINISTO, 2008). Entretanto, os valores foram inferiores aos encontrados no presente estudo, em todos os momentos de avaliação. Em asininos, de maneira interessante, não houve aumento no percentual de hemólise na conservação de sangue total em bolsas CPD/SAG-M (BARROS et al, 2013), enquanto houve aumento na hemólise quando utilizado bolsas CPDA-1 (TAVARES et al, 2013). Em caninos, o percentual de hemólise em sangue total não aumentou durante a conservação por 35 dias (WARDROP et al, 1997), enquanto no armazenamento de concentrado de eritrócitos foi encontrado aumento significativo após 30 dias (COSTA JUNIOR, 2010). Em ovinos, não foi relatado o percentual de hemólise, entretanto foi constatado um aumento dos níveis de hemoglobina plasmática com aumento do tempo de armazenamento de sangue total (SOUSA et al, 2013).

A porcentagem de hemólise é um importante indicador de viabilidade sanguínea para transfusão. Na falta de parâmetros para basear valores limítrofes nas espécies de interesse veterinário, tem-se utilizado uma analogia com a exigência para humanos, aonde o valor máximo aceitado, segundo a legislação brasileira, é de 1% (SOUSA et al, 2012). É importante salientar que o aumento dos níveis de hemoglobina plasmática, e consequentemente do percentual de hemólise, nem sempre são originados a partir do rompimento das células, mas também a partir da liberação de conteúdo citosólico contido em microvesículas próximas a membrana celular (HESS, 2009). De maneira geral, os valores encontrados neste estudo encontraram-se próximos a 1% e somente foi ultrapassado na última avaliação, após 28 dias de armazenamento.

CONCLUSÃO

Com base nos achados do presente trabalho é possível concluir que, de fato, o sangue total equino passa por inúmeras modificações durante o período de armazenamento em bolsas CPDA-1. Tais mudanças foram causadas principalmente pelo meio ácido proporcionado pelo ácido cítrico, metabolismo anaeróbico e aumento do tamanho dos eritrócitos provocado por distúrbios da bomba sódio potássio.

Para elucidar questões que surgiram durante o trabalho, como a causa do aumento do pH entre os dias D0 e D7 de armazenamento e o quanto isso pode impactar na produção de 2,3-DPG e ATP, novos estudos se fazem necessários, com a mensuração desses 2 importantes fatores de determinação de viabilidade.

Embora se tenham dados paramétricos até o 28º dia de conservação, não é possível determinar se este seria o período máximo, sendo necessários estudos *in vivo* para esta determinação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, I.O.; TAVARES, M.D.; SOUSA, R.S.; FIRMINO, P.R.; RÊGO, R.O.; GAMELEIRA, J.S.; SOUZA, F.J.A.; MINERVINO, A.H.H.; MORI, C.S.; BARRETO JÚNIOR, R.A. **Avaliação hematológica de sangue total asinino (*Equus asinus*) armazenado em bolsa CPD/SAG-M.** In: Anais do 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2013. Disponível em <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos>

BRASIL. **Normas Para o Controle dos Equideos do Exército Brasileiro.** Ministério da Defesa, 2013.

BRASIL. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo.** Ministério da Agricultura, 2016.

CHIN-YEE, I.; ARYA, N.; D'ALMEIDA, M.S. 1997. **The red cell storage lesion and its implication for transfusion.** Transfusion Science, s. 18 p. 447-458, 1997.

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

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

DURHAM, A. **Blood and plasma transfusion in the horse.** Equine Veterinary Education, v.8, n.1, p 8-12,1996.

HESS, J.R. **Red cell storage.** Journal of proteomic, v. 73, p 368-373, 2010.

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

HÖGMAN, C.F.; KNUTSON, F.; LÖÖF, H.; PAYRAT, J.M. **Improved maintenance of 2,3 DPG and ATP in RBC's stored in a modified additive solution.** Transfusion, v.42, p.824-829, 2002.

HÖGMAN, C.F. **Preparation and Preservation of Red Cells.** Vox Sanguinis, v. 74, s. 2. p. 177-187, 1998.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals.** Elsevier, 6^a ed., 2008.

KURUP, P.A.; ARUN, P.; GAYATHRI, N.S.; DHANYA, C.R.; INDU, A.R. **Modified formulation of CPDA for storage of whole, 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.

MUDGE, M.C.; MACDONALD, M.H.; OWENS, S.D.; TABLIN, F. **Comparison of 4 Blood Storage Methods in a Protocol for Equine Pre-operative Autologous Donation.** Veterinary Surgery, v. 33, p. 475– 486, 2004.

NIINISTÖ, K.; RAEKALLIO, M.; SANKARI, S. **Storage of equine red blood cells as a concentrate.** The Veterinary Journal, v. 176, p. 227–231, 2008.

PIERRE, B. **DEHP in blood bags medical plastic their limitations.** Canadian Research, v. June/July p. 13-25, 1981.

RANDALL, D., BURGGREN, W. & FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptações.** Editora Guanabara Koogan, 4^aed. p. 453-460, 2008.

REICHMAN, P.; DEARO, A.C.O. **Transfusão de sangue e seus derivados em grandes animais.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.22, n.2, p. 223-228, 2001.

RIBEIRO FILHO, J.D.; ALMEIDA, C.T.; GONÇALVES, R.C.; KOHAYAGAWA, A.; CURI, P.R. **Alterações hemogasométricas de sangue bovino durante a conservação**

em frascos de vidro com ACD e bolsas plásticas com CPDA-1, por 35 dias. Veterinária Zootecnia, v.6, p. 77-84, 1994.

RICKETSS, S.W. **Guide do equine clinical pathology.** Rossdale and Partners, 2006.

SEAHORN, J.L.; SEAHORN, T.L. **Fluid therapy in horses with gastrointestinal disease.** The Veterinary Clinics Equine Practice, v. 19, p. 665-679, 2003.

SOUSA, R.; BARROS, I.O.; TAVARES, M.D.; SOUSA, I.K.F.; OLIVEIRA, G.B.; MINERVINO, A.H.H.; BARRETO JUNIOR, R.A. **Lesões de armazenamento durante a conservação de sangue nas diferentes espécies: uma revisão.** Acta Veterinaria Brasilica, v.6, n.2, p.68-79, 2012.

SOUSA, R.; BARRETO-JÚNIOR, R.A.; SOUSA, I.K.F.; CHAVES, D.F.; SOARES, H.S.; BARROS, I.O.; MINERVINO, A.H.H.; ORTOLANI, E.L. **Evaluation of hematologic, blood gas, and select biochemical variables in ovine whole blood stored in CPDA-1 bags.** Veterinary Clinical Pathology, v. 42, n. 1, p. 27–30, 2013.

TAVARES M.D.; BARROS, I.O.; SOUSA, R.; FIRMINO, P.R.; RÊGO, R.O.; GAMELEIRA, J.S.; SOUZA, F.J.A.; ABRANTES, M.R.; MINERVINO, A.H.H.; BARRETO-JÚNIOR, R.A.; **avaliação hematológica de sangue total asinino (*Equus asinus*) armazenado em bolsas cpda-1.** IN: Anais do 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Disponível em <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos>

TAVARES, M.D. **Avaliação hematológica, bioquímica e hemogasométrica de sangue caprino armazenado em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró – RN, 2013.

WARDROP, K.J.; TUCKER, R.L.; MUGNAI, K. **Evaluation of canine Red Blood Cells Stores in a Saline, Adenine and Glucose Solution for 35 days.** Journal of Veterinary Internal Medicine, v.11, n. 1, 1997.

YAGI, K. **Canine blood Collection.** In: YAGI, K.; HOLOEAYCHUK, M. Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking. Wiley Blakwell, 2016.