



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DA TRANSFUSÃO SANGUÍNEA HOMÓLOGA EM OVINOS

REJANE DOS SANTOS SOUSA

Médica Veterinária

MOSSORÓ – RIO GRANDE DO NORTE - BRASIL
JULHO – 2012

REJANE DOS SANTOS SOUSA

**AVALIAÇÃO DA TRANSFUSÃO SANGUÍNEA HOMÓLOGA
EM OVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof D. Sc. Raimundo Alves Barrêto
Júnior – UFERSA

**MOSSORÓ –RIO GRANDE DO NORTE- BRASIL
JULHO – 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA

Bibliotecária:
Vanessa de Oliveira
Pessoa

CRB15/45
3

S725a Sousa, Rejane dos Santos.

Avaliação da transfusão sanguínea homóloga em ovinos. /
Rejane dos Santos Sousa. -- Mossoró, 2012.
168 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Área de
concentração: Sanidade animal – Universidade Federal Rural do
Semi-Árido.

Orientador: Profº. Dr. Raimundo Alves Barrêto Júnior.

1. Hemácias. 2. Estresse oxidativo. 3. Análises hemogasométrica.
I. Título.

CDD: 636.39089

REJANE DOS SANTOS SOUSA

AVALIAÇÃO DA TRANSFUSÃO SANGUÍNEA HOMÓLOGA EM OVINOS

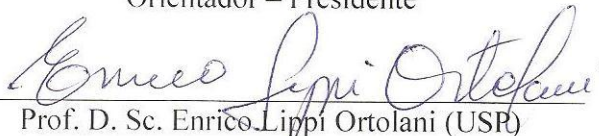
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA EM: 04/07/2012

BANCA EXAMINADORA:



Prof. D. Sc. Raimundo Alves Barrêto Júnior (UFERSA)
Orientador – Presidente



Prof. D. Sc. Enrico Lippi Ortolani (USP)
Primeiro Conselheiro



Prof. D. Sc. Valéria Veras de Paula (UFERSA)
Segundo Conselheiro

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

REJANE DOS SANTOS SOUSA – filha de Maria Lenilde dos Santos Sousa e Edvaldo Nonato de Sousa, nasceu no dia 28 de Agosto de 1983, na cidade de Crateús, estado do Ceará. Coursou o ensino fundamental na Escola Estadual Jardeir de Figueredo Corrêa (em Sucesso-CE, em 1998) e o Ensino Médio na Escola Estadual Abel Freire Coelho (Mossoró- RN, em 2001). No período de Junho de 2004 a Junho de 2009 cursou Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Durante a graduação atuou nas áreas de Histologia e Embriologia e Histologia Veterinária, como monitora. Desenvolveu projetos de pesquisa na área de Clínica de Ruminantes, trabalhando com armazenamento e transfusão de sangue. Nos anos de 2009 a 2011 realizou curso de Especialização *Lato Sensu* em Saúde Coletiva pela Faculdade Integrada de Patos. Em Março de 2010, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, junto a Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), área de concentração sanidade animal, em nível de mestrado.

**Aos meus
familiares**

*À vocês, que compartilharam deste meu ideal
me incentivando a prosseguir na jornada,
fossem quais fossem os obstáculos. Dedico
esta conquista com a mais profunda
admiração e gratidão, porque ela lhes
pertence, ela é tão de vocês quanto minha.*

“Uma crise difícil pode ser mais prontamente suportada se tivermos a convicção de que a nossa existência traz consigo um propósito – uma causa para defender, uma pessoa para amar, um alvo para alcançar”.

John Maxwell

AGRADECIMENTOS

Chegar à conclusão de mais esta etapa requer coragem, determinação e a participação de pessoas que acreditam em você e que se mostram solidária a sua causa, assim agradeço:

À **Deus**, pelo dom da vida, por ter me dado coragem e força para enfrentar as dificuldades na vida, por guiar meus passos e o meu caminho, me proporcionando a companhia de pessoas extraordinárias para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

À meu orientador **Prof. Dr. Raimundo Alves Barrêto Júnior** pela confiança, ensinamentos, carinho e pela autonomia a mim concedida em algumas situações que foram essenciais para meu amadurecimento e crescimento profissional. Pela oportunidade de fazer parte de uma equipe caracterizada pela competência, respeito ao próximo e acima de tudo companheira.

Ao **Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani**, pela oportunidade de desenvolver esse projeto de pesquisa junto a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ-USP e pelo privilégio de ter trabalhado com pessoas tão competentes desta instituição. Apesar das poucas conversas que tivemos sobre o delineamento desse projeto, seus questionamentos foram de extrema importância para este trabalho.

À minha família, em especial minha mãe (**Maria Lenilde dos Santos Sousa**) e meu pai (**Edvaldo Nonato de Sousa**) por todo o incentivo, sacrifício e dedicação. A minha maior felicidade é saber que posso contar com vocês em todos os momentos da minha vida. A minhas irmãs (**Gessianne e Regina**) pela incondicional ajuda durante os meus estudos.

À **Clayton Carlos Alves da Silva** por toda dedicação, amor e compreensão, você foi muito importante nesta fase da minha vida e a toda sua família pelo apoio e incentivo.

À Família Ortolani - **Frederico Augusto Mazzocca Lopes Rodrigues, Carolina Akiko Sato Cabral, Francisco Leonardo Costa de Oliveira e Isadora Karolina Freitas de Sousa**, pela extrema ajuda na realização desse projeto, sem vocês não teria conseguido chegar até aqui. Agradeço pelo agradável convívio diário, pelo companheirismo durante os longos dias de trabalho, pelos vários momentos de descontração e por não terem permitido que eu desanimasse frente a algumas intempéries.

Ao **Prof. Dr. Antonio Humberto Hamad Minervino**, da Universidade Federal do Oeste do Pará, pelo apoio incondicional a realização desse projeto, pela amizade e companheirismo.

À **Prof. Dr. Maria Claudia Araripe Sucupira** (Macau) pela sensibilidade e disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

À **Clara Mori e Samantha Miyashiro** técnicas de nível superior da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ-USP, pela extrema competência com que

desenvolvem seu trabalho. Muito obrigada pelas dúvidas sanadas, pelo auxílio no desenvolvimento das técnicas laboratoriais, pela prontidão em ajudar e pela amizade. Aos técnicos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia **Agnaildo, Dinha, Marli, Maú, Maria Helena, Carmem, Claudia e Geraldo** pelo bom convívio durante esse período na instituição, além da disponibilidade em ajudar quando precisei.

À **Janaina Zaminham** (Universidade Federal do Mato Grosso) e **Thiago Moreira** (Faculdades Integradas do Tapajós), **Rodolfo Gurgel Vale** (Universidade Federal Rural do Semi-Árido) pelo apoio incondicional nos dias de coleta, pelas noites em claro de trabalho e por terem se prontificado em ajudar nesse projeto. Foi um privilégio trabalhar com pessoas tão competentes e companheiras como vocês.

A minha querida e estimada equipe (FAMILIA): **Isabella Barros, Marcondes Tavares, Paulo Firmino, Rodolfo Vale, Marília, Jucélio Gameleira e Jocélio**. Saibam que trabalhar com vocês é muito gratificante, pelo carinho e respeito que temos uns pelos outros, pelo companheirismo e sobretudo pela forma como aceitamos os desafios diários, sempre com descontração.

Aos colegas de pós-graduação **Gleudson Benevides de Oliveira** (meu amigo de fé, irmão camarada), **Gislayne Peixoto, Maitê Miranda, Zuliete Aliona, Edinayde, Mariana, Kênia Suênia e Severino** muito obrigada pelo bom convívio durante essa fase, muito gratificante conhecer pessoas tão enriquecedoras.

Aos professores do Departamento de Ciências Animais e da Pós-graduação, **Valéria Veras de Paula, Alexandre Rodrigues, Jean Berg, Sidney Sakamoto, Benito Soto Blanco, Moacir Franco, Celicina e Patricia Tholon** pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados, cada disciplina foi de extrema importância para minha formação.

À **Prof. Dr. Valeria Veras de Paula**, pelo companheirismo e apoio ao desenvolvimento das pesquisas junto a nossa equipe, estando sempre disposta a ajudar.

Aos colegas que permanecem desde a graduação e aqueles que conhecemos ao longo desta fase de pós-graduação: **Ariana Paiva, Taciana Fernandes, Maria Rociene, Talyta Lins, Glaucia Carlos, Leyse Fernandes, Vanessa Basilio, Manuela e André Menezes**.

À UFERSA por me conceder a oportunidade de estudar em uma universidade pública e de qualidade.

Ao **PROCAD**, por permitir a realização do mestrado sanduíche na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –USP.

Ao **Cnpq** pela concessão de bolsa de mestrado, imprescindíveis ao desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

E principalmente a todos os **ovinos**, que foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

AVALIAÇÃO DA TRANSFUSÃO SANGUÍNEA HOMÓLOGA EM OVINOS

SOUSA, Rejane dos Santos. **Avaliação da transfusão sanguínea homóloga em ovinos**. 2012. 168f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Curso de Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2012.

RESUMO - O presente trabalho objetivou avaliar as respostas clínicas, hematológicas, bioquímicas, hemogasométricas e o estresse oxidativo de ovinos induzidos à anemia superaguda e transfundidos com sangue total fresco ou armazenado por dois diferentes períodos (15 e 35 dias). Foram utilizados 18 ovinos, machos e fêmeas, com idade entre 3 e 4 anos, pesando em média 52kg. Os animais foram submetidos a uma única flebotomia para retirada de 40% do volume sanguíneo e divididos em três grupos experimentais, sendo o G0 composto por animais que receberam sangue fresco, G15 e G35 animais que receberam sangue armazenado em bolsas CPDA-1 por 15 e 35 dias, respectivamente. Foi realizado exame clínico e coleta de amostras de sangue 24 horas pós-indução da anemia (T0), 30 minutos pós-transfusão (T30), seis, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após à transfusão (T6, T12, T24, T48, T72, T96, respectivamente) e oito e dezesseis dias após à transfusão (T8d e T16d, respectivamente). O sangue armazenado por 35 dias apresentou aumento do potássio, pCO₂, pO₂, lactato, hemoglobina plasmática e diminuição do pH, sódio e leucócitos. Ovinos transfundidos no T30 apresentaram aumento significativo do VG, hemácias e hemoglobina total. Os animais do G35 apresentaram maiores valores de hemoglobina plasmática no T12 e diminuição do pH sanguíneo, caracterizando leve acidemia metabólica no T96. Com relação ao estresse oxidativo o G35 apresentou redução da catalase no T30, T6, T12 e T24, indicando a ocorrência de hemólise, o que foi corroborado pelo aumento concomitante da bilirrubina. Os animais que receberam sangue armazenado por 35 dias apresentaram maiores alterações hematológicas, hemogasométricas, bioquímicas e oxidativas.

Palavras-Chave: hemácias, estresse oxidativo, análises hemogasométrica.

EVALUATION OF HOMOLOGOUS BLOOD TRANSFUSION IN SHEEP

SOUSA, Rejane dos Santos. **Evaluation of homologous blood transfusion in sheep.** 2012. f. Thesis (Master's degree In Animal Science: Animal Production and Animal Health) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN. 2012.

SUMARRY - This study evaluated the clinical, hematological, biochemical and blood gas responses and the oxidative stress in sheep submitted to hiperacute anemia and subsequently underwent to homologous transfusion with whole blood, either fresh, or stored for 15 or 35 days. Eighteen adult Santa Inez crossbred sheep, males and females, were used, weighing on average 52kg. The animals were submitted to a single phlebotomy to remove 40% of blood volume and equally divided into three experimental groups: G0 - animals receiving fresh blood; G15 – receiving blood stored for 15 days; and G35 - receiving blood stored for 35 days. The animals were submitted to clinical examination and blood collection 24 h after induction of anemia (T0), 30 minutes after transfusion (T30), six, twelve, twenty-four, forty-eight, seventy-two and ninety-six hours post-transfusion (T6, T12, T24, T48, T72 and T96, respectively), and eight and sixteen days post-transfusion (T8d and T16d, respectively). The blood bags stored for 35 days showed an increase in K, pCO₂, pO₂, lactate, plasma hemoglobin and decreased plasma pH, sodium and leukocytes. The sheep transfused from all groups had increased GV, red cell count and total hemoglobin in the T30. The animals of the G35 had higher plasma hemoglobin in T12, a significant decrease in blood pH indicating a mild metabolic acidosis on T96. With respect to oxidative stress, was observed a decreased on catalase values of the G35 at T30, T6, T12 and T24, suggesting the occurrence of hemolysis witch was supported by the concomitant increase in the total bilirubin values at the same periods. Animals that received blood stored for 35 days showed higher alteration on hematological, blood gas, biochemical and oxidative stress parameters.

Keywords: red blood cells, oxidative stress, blood gas analysis

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Composição bromatológica do feno de coast-cross e do concentrado comercial oferecida aos ruminantes durante todo o período experimental.....	51
Tabela 2. Composição das Bolsas de sangue tipo CPDA-1.....	54
Tabela 2. Média e desvio padrão das variáveis hemogasométricas do sangue total armazenado em bolsa CPDA-1 imediatamente após a coleta (B0), armazenado por quinze dias (B15) e armazenado por 35 dias (B35).....	64
Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis hematológicas do sangue total armazenado em bolsa CPDA-1 imediatamente após a coleta (B0), armazenado por quinze dias (B15) e armazenado por 35 dias (B35).....	65
Tabela 4. Média e desvio padrão das variáveis bioquímicas do sangue total armazenado em bolsa CPDA-1 imediatamente após a coleta (B0), armazenado por quinze dias (B15) e armazenado por 35 dias (B35).....	66
Tabela 5. Média e desvio padrão do peso, volume transfundido e tempo de transfusão dos ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....	67
Tabela 6. Ocorrências clínicas constatadas nos ovinos durante a transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....	67
Tabela 7. Média e desvio padrão da Frequência cardíaca (batimentos/minutos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....	68
Tabela 8. Média e desvio padrão da Frequência respiratória (movimentos/minuto) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....	70
Tabela 9. Média e desvio padrão da temperatura (°C) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....	72
Tabela 10. Média e desvio padrão do Volume globular (%) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....	74
Tabela 11. Média e desvio padrão do Número de hemácias ($\times 10^6$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por	

15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....76

Tabela 12. Média e desvio padrão da concentração de Hemoglobina total (g/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....78

Tabela 13. Média e desvio padrão da concentração de Hemoglobina plasmática (mg/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....80

Tabela 13. Média e desvio padrão da concentração do Volume corpuscular médio (fL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....82

Tabela 14. Média e desvio padrão da concentração da Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....84

Tabela 15. Média e desvio padrão do número de leucócitos ($\times 10^3$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....86

Tabela 16. Média e desvio padrão do Número de plaquetas ($\times 10^3$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....88

Tabela 17. Média e desvio padrão do pH venoso de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....90

Tabela 18. Média e desvio padrão da Pressão parcial de oxigênio (mmHg) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....92

Tabela 19. Média e desvio padrão da Pressão parcial de carbono (mmHg) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....94

Tabela 20. Média e desvio padrão da Saturação de Oxigênio (%) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....96

Tabela 21. Média e desvio padrão da concentração de Bicarbonato (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....98

Tabela 22. Média e desvio padrão do Excesso de base (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....100

Tabela 23. Média e desvio padrão da Proteína total (g/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....102

Tabela 24. Média e desvio padrão da concentração de Albumina (g/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....104

Tabela 25. Média e desvio padrão das concentrações de Bilirrubina total ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....106

Tabela 26. Média e desvio padrão da concentração de Bilirrubina indireta ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....108

Tabela 27. Média e desvio padrão da atividade da Lactato desidrogenase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....110

Tabela 28. Média e desvio padrão da concentração de Sódio (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....112

Tabela 29. Média e desvio padrão da concentração de Potássio (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....114

Tabela 30. Média e desvio padrão da atividade da Aspartato aminotransferase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....116

Tabela 31. Média e desvio padrão da atividade da Gama glutamiltransferase (U/L) de

ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....118

Tabela 32. Média e desvio padrão da atividade da Creatina quinase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....120

Tabela 33. Média e desvio padrão da concentração de Creatinina ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....122

Tabela 34. Média e desvio padrão da concentração de Uréia (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....124

Tabela 35. Média e desvio padrão d Tempo de protrombina (segundos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....126

Tabela 36. Média e desvio padrão do Tempo de tromboplastina parcial ativado (segundos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....128

Tabela 37. Média e desvio padrão do Malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....130

Tabela 38. Média e desvio padrão da concentração de Glutathione reduzida (mg/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....132

Tabela 39. Média e desvio padrão da Superóxido dismutase (U/g Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....134

Tabela 40. Média e desvio padrão da Glutathione peroxidase (U/g Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....136

Tabela 41. Média e desvio padrão da Catalase (U/mg Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por

15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....138

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Média da Frequência cardíaca (batimentos/minutos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados69
- Figura 2 - Média da Frequência respiratória (movimentos/minuto) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados71
- Figura 3 - Média da temperatura (°C) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados73
- Figura 4 - Média do Volume globular (%) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados75
- Figura 5 - Média do Número de hemácias ($\times 10^6$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados77
- Figura 6 - Média da concentração de Hemoglobina total (g/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados79
- Figura 7 - Média da concentração de Hemoglobina plasmática (mg/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados81
- Figura 8 - Média da concentração do Volume corpuscular médio (fL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados83
- Figura 9 - Média da concentração da Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados85
- Figura 10 - Média do número de leucócitos ($\times 10^3$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados87

Figura 11 - Média do Número de plaquetas ($\times 10^3$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados	89
Figura 12 - Média do pH venoso de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....	91
Figura 13- Média da Pressão parcial de oxigênio (mmHg) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados	93
Figura 14 - Média da Pressão parcial de carbono (mmHg) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados	95
Figura 15 - Média da Saturação de Oxigênio (%) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados	97
Figura 16 - Média da concentração de Bicarbonato (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados	99
Figura 17 - Média do Excesso de base (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados	101
Figura 18 - Média da Proteína total (g/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....	103
Figura 19 - Média da concentração de Albumina (g/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados	105
Figura 20 - Média das concentrações de Bilirrubina total ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados	107
Figura 21 - Média da concentração de Bilirrubina indireta ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....	109
Figura 22 - Média da atividade da Lactato desidrogenase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados	111

Figura 23 - Média da concentração de Sódio (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados113

Figura 24 - Média da concentração de Potássio (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados..... 115

Figura 25 - Média da atividade da Aspartato aminotransferase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....117

Figura 26 - Média da atividade da Gama glutamiltransferase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....119

Figura 27 - Média da atividade da Creatina quinase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....121

Figura 28 - Média da concentração de Creatinina ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....123

Figura 29 - Média da concentração de Uréia (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados125

Figura 30 - Média do Tempo de protrombina (segundos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....127

Figura 31 - Média do Tempo de tromboplastina parcial ativado (segundos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados129

Figura 32 - Média do Malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados131

Figura 33 - Média da concentração de Glutationa reduzida (mg/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....133

Figura 34 - Média da Superóxido dismutase (U/g Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados135

Figura 35 - Média da Glutathione peroxidase (U/g Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados137

Figura 36 - Média da Catalase (U/mg Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.....139

Figura 37 - Perfil eletroforético em fita de acetato de celulose, mostrando as bandas de hemoglobina A e B, a origem da corrida (-) e os fenótipos homozigotos para a hemoglobina A (HbAA), hemoglobina B (HbBB) e T representa os animais que tinham fenótipo HbAA e receberam transfusão de animais com fenótipo HbBB.....139

Figura 38 - Histograma de animal com variante de hemoglobina AA.....141

Figura 39 - Histograma de animal com variante de hemoglobina BB.....141

Figura 40 - Histograma de ovino com HbAA que recebeu transfusão de animal com HbBB.....141

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Célsius
µL	Microlitro
µmol	Micromol
ACD	Ácido cítrico, citrato e dextrose.
AS	Solução salina
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BE	Déficit ou Excesso de base no sangue
bpm	Batimentos por minuto
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CHM	Hemoglobina corpuscular média
CHOH	Carboidrato
CK	Creatina quinase
Cl ⁻	Cloreto
CO ₂	Dióxido de Carbono
CP2D	Citrato, fosfato e dextrose-dextrose
CPD	Citrato, fosfato e dextrose
CPDA	Citrato, fosfato, dextrose e adenina
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPG	2,3 Difosfoglicerato
DTNB	Ácido 2-dinitrobenzóico
EDTA	Ácido dietilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato etéreo
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FB	Fibra bruta
Fe ²⁺	Ferro Ferroso
Fe ³⁺	Ferro Férrico
fL	Fentolitro

g	Gramas
GGT	Gama-glutamyltransferase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduced
GSSG	Glutathione oxidized
H ⁺	Hydrogen
H ₂ O	Monoxide of hydrogen
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
Hb	Hemoglobin
HbAA	Variant of hemoglobin A
HbAA	Variant of hemoglobin B
HbAB	Variant of hemoglobin AB
HCM	Hemoglobin corpuscular mean
HCO ₃ ⁻	Bicarbonate
HK	High potassium
IgM	Immunoglobulin M
K ⁺	Potassium
kg	Kilogram
L	Liter
LDH	Lactate dehydrogenase
LOOH	Lipid hydroperoxide
LK	Low potassium
MDA	Malondialdehyde
mg	Milligram
mL	Milliliter
MM	Mineral matter
mmHg	Millimeter of mercury
mmol	Millimole
mol	Mole
MS	Dry matter
Na ⁺	Sodium
NADH	Nicotinamide, adenine, dinucleotide reduced

NADPH	Nicotinamida, adenina, dinucleotídeo fosfato reduzida
NADP ⁺	Nicotinamida adenina de nucleotídeo fosfato
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Superóxido
OH	Hidroxila
PAGGS-M	Fosfato, adenina, guanosina, glicose, salina e manitol
PB	Proteína bruta
pCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
pH	Potencial hidrogeniônico
pO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PT	Tempo de protrombina
PVC	Policloreto de vinila
RBC	Número de eritrócitos
RL	Radicais livres
rpm	Rotações por minuto
RTNH	Reação transfusional não hemolítica febril
SAG-M	Salina, adenina, glicose e manitol
SO ₂	Saturação de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TRALI	Lesão pulmonar aguda associada à transfusão
Tris-HCl	Tris-Hidrocloreto
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativado
U	Unidade
VCM	Volume corpuscular médio
VG	Volume globular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 GERAL	25
2.2 ESPECÍFICOS	25
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 INDUÇÃO DA ANEMIA AGUDA	26
3.2 CONSERVAÇÃO DE SANGUE	27
3.2.1 Bolsas de sangue e refrigeração	28
3.2.2 Conservação de Sangue Total nas Diferentes Espécies	30
3.2.3 Lesões de Armazenamento e Controle de Qualidade	31
3.2.3.1 Alterações Hematológicas e Morfológicas	32
3.2.3.2 Alterações Hemogasométricas	35
3.2.3.3 Alterações Bioquímicas	36
3.3 ARMAZENAMENTO DE SANGUE E ESPÉCIES REATIVAS	39
3.4 TRANSFUSÃO DE SANGUE	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 LOCAL DO ESTUDO	51
4.2 SELEÇÃO DOS ANIMAIS	51
4.3 INSTALAÇÕES E ALIMENTAÇÃO	51
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	52
4.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	53
4.5.1 Indução da Anemia	53
4.5.2 Transfusão Homóloga	54
4.6 TEMPOS EXPERIMENTAIS	54
4.7 AVALIAÇÃO DAS BOLSAS	55
4.8 PARÂMETROS AVALIADOS	55
4.8.1 Avaliação Clínica	55
4.8.2 Avaliação Hematológica	56
4.8.2.1 Hemograma	56
4.8.2.2 Concentração de hemoglobina plasmática livre	56
4.8.2.3 Coagulação	57
4.8.3 Avaliação Hemogasométrica	57
4.8.4 Avaliação Bioquímica	58
4.8.4.1 Determinação da concentração sérica da proteína total	58
4.8.4.2 Determinação da concentração sérica de albumina	59
4.8.4.3 Determinação da concentração sérica de bilirrubina total e indireta	59
4.8.4.4 Determinação da atividade sérica da lactato desidrogenase (LDH)	59
4.8.4.5 Determinação da concentração sérica de sódio e potássio	59
4.8.4.6 Determinação da atividade da aspartato aminotransferase (AST)	59
4.8.4.7 Determinação da atividade da gama glutamiltransferase (GGT)	60
4.8.4.8 Determinação da atividade da creatina quinase (CK)	60
4.8.4.9 Determinação da creatinina e lactato	60
4.8.4.10 Determinação da concentração sérica da ureia	60
4.8.5 Avaliação do Estresse Oxidativo e Peroxidação Lipídica	60

4.8.5.1 Malondialdeído (MDA)	61
4.8.5.2 Glutathiona Reduzida (GSH)	61
4.8.5.3 Superóxido Dismutase e Glutathiona Peroxidase (GPx)	62
4.8.5.4 Catalase (CAT)	63
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5 RESULTADOS	64
5.1 AVALIAÇÃO DAS BOLSAS	64
5.1.1 Avaliação Hemogasométrica	64
5.1.2 Avaliação Hematológica.....	65
5.1.3 Avaliação Bioquímica.....	66
5.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA	67
5.2.1 Observações Clínicas.....	67
5.2.2 Frequência Cardíaca	68
5.2.3 Frequência Respiratória	70
5.2.4 Temperatura	72
5.3 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA	74
5.3.1 Volume Globular (VG)	74
5.3.2 Número de Hemácias.....	76
5.3.3 Concentração de Hemoglobina Total	78
5.3.4 Hemoglobina Plasmática.....	80
5.3.5 Volume Corpuscular Médio (VCM)	82
5.3.6 Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	84
5.3.7 Número de Leucócitos	86
5.3.8 Número de Plaquetas.....	88
5.4 AVALIAÇÃO HEMOGASOMÉTRICA.....	90
5.4.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)	90
5.4.2 Pressão Parcial de Oxigênio (PO ₂)	92
5.4.5 Pressão Parcial de Dióxido de Carbono (pCO ₂)	94
5.4.6 Saturação de Oxigênio (SO ₂)	96
5.4.7 Concentração de Bicarbonato	98
5.4.8 Concentração de Excesso de Base (BE)	100
5.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	102
5.5.1 Proteína Total	102
5.5.2 Concentração de Albumina	104
5.5.3 Bilirrubina Total.....	106
5.5.4 Bilirrubina Indireta.....	108
5.5.5 Lactato Desidrogenase (LDH)	110
5.5.6 Concentração de Sódio (Na)	112
5.5.7 Concentração de Potássio (K)	114
5.5.8 Aspartato Aminotransferase (AST)	116
5.5.9 Gama Glutamilttransferase (GGT)	118
5.5.10 Atividade da Creatina Quinase (CK)	120
5.5.11 Concentração de Creatinina	122
5.5.12 Concentração de Ureia.....	124

5.6 AVALIAÇÃO DA COAGULAÇÃO.....	126
5.6.1 Tempo de Protrombina (TP)	126
5.6.2 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA)	128
5.7 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	130
5.7.1 Malondialdeído (MDA)	130
5.8 ESTRESSE OXIDATIVO.....	132
5.8.1 Concentração de Glutathione Reduzida (GSH)	132
5.8.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	134
5.8.3 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)	136
5.8.4 Catalase (CAT)	138
5.9 VARIANTE DA HEMOGLOBINA.....	140
5.10 RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS.....	141
6 DISCUSSÃO	142
7 CONCLUSÕES	150
8 REFERÊNCIAS	151

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade existem referências do poder terapêutico do sangue, seja por meio da ingestão como fonte de cura de enfermidades, ou pela transferência de poder quando se ingeria o sangue de guerreiros derrotados. As primeiras transfusões, que tratam de meados do século XVII, eram quase sempre feitas utilizando sangue de animais (ESPINOSA, 1997; OLIVEIRA, 2003).

Somente no início do século XX que os avanços tecnológicos como o conhecimento dos diferentes tipos sanguíneos entre os indivíduos, o uso dos anticoagulantes, domínio das técnicas de esterilização, fracionamento do sangue e identificação das doenças transmissíveis permitiram o uso mais difundido da transfusão sanguínea na medicina humana (LACERDA, 2005). O início da moderna medicina transfusional veterinária se deu apenas na década de 50, posterior aos avanços vivenciados pela medicina humana onde se procurou adaptar as novas tecnologias em benefício dos pacientes veterinários (KRISTENSEN; FELMAN, 1997; COSTA JUNIOR, 2006).

O desenvolvimento das bolsas plásticas e substâncias preservativas possibilitaram que o doador e receptor fossem separados no espaço, já que o sangue poderia ser transportado de um local para outro sem coagular, e no tempo, possibilitando a nutrição das hemácias e aumentando a vida útil dos componentes sanguíneos (MOLLISON, 2000; LACERDA, 2005; COSTA JUNIOR, 2008). Embora se conheça as técnicas de fracionamento do sangue para obtenção de seus componentes, a conservação e utilização de sangue total ainda é a forma mais difundida e utilizada nos centros veterinários (LUCAS et al., 2004; COSTA JÚNIOR, 2006).

Durante o período de armazenamento o sangue sofre várias alterações que em conjunto são conhecidas como “lesões de armazenamento”, as quais se agravam à medida que o tempo de armazenamento é estendido. Essas alterações vão desde alterações microscópicas das células vermelhas que podem resultar em danos irreversíveis e redução da sobrevivência pós-transfusional, até o acúmulo de substâncias biorreativas que podem influenciar a qualidade do sangue transfundido e contribuir para reações pós-transfusionais (CHIN-YEE et al., 1997).

Os eritrócitos são altamente suscetíveis a danos causados pelos radicais livres na membrana celular, mesmo tendo alta capacidade antioxidante, as mesmas possuem demanda de antioxidantes aumentada quando armazenadas, devido a fatores intrínsecos

como alta quantidade de ferro e predisposição a auto-oxidação da hemoglobina, e a fatores extrínsecos como exposição à luz e agitação, altas concentrações de glicose e liberação de radicais livres pelos leucócitos (HESS, 2010). Racek et al. (2001) mostraram que durante o armazenamento as hemácias sofrem ação dos radicais livres que tendem a aumentar no decorrer do armazenamento, provocando peroxidação lipídica.

O sangue armazenado antes de ser utilizado para transfusão deve passar por controle de qualidade, para avaliação da viabilidade do sangue estocado. Na medicina humana os parâmetros de qualidade estão bem estabelecidos e são rigorosamente seguidos, enquanto na medicina veterinária, apesar de se conhecer as alterações ocorridas durante o armazenamento nas diferentes espécies, os mesmos não estão bem instituídos. Estudos de coorte retrospectivos humanos tem encontrado uma correlação entre tempo de armazenamento das hemácias e taxas de morbidade e mortalidade após a transfusão (ZALLEN et al. 1999; LEAL et al., 2003), sugerindo que lesões de armazenamento progressivas podem ser responsáveis por resultados adversos.

Sousa et al. (2009) analisaram as variáveis hematológicas, hemogasométricas e bioquímicas do sangue total ovino armazenado por 35 dias em bolsas CPDA-1, concluindo que o sangue dessa espécie manteve-se viável semelhante aos parâmetros de qualidade do sangue humano. No entanto, muitas pesquisas desenvolvidas tanto na medicina humana como na medicina veterinária tem como foco principal a preservação das hemácias no intuito de melhorar a viabilidade durante o armazenamento e prolongar a vida útil dessas células. Pouca atenção tem sido dada a estudos que mostram a correlação entre tempo de armazenamento e os efeitos e respostas do receptor pós-transfusão (ELFATH, 2006; GOULD et al., 2007).

Devido à complexidade desse assunto tanto no concernente à conservação do sangue nas bolsas, suas mais variadas alterações bioquímicas e hematológicas, assim como os métodos de indução da anemia e do processo de transfusão, tais questões serão melhor elucidadas na revisão de literatura a seguir.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar as respostas clínicas, hematológicas, bioquímicas e hemogasométricas de ovinos submetidos à anemia aguda e transfundidos com sangue total armazenado em três diferentes períodos 0, 15 e 35 dias.

2.2. ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito da anemia por perda aguda de sangue, pela retirada de 40% do volume sanguíneo após 24 horas da flebotomia.
- Analisar os parâmetros hematológicos, bioquímicos e hemogasométricos do sangue total armazenados em bolsas de sangue antes da transfusão sanguínea.
- Comparar as respostas clínicas, hematológicas, bioquímicas e hemogasométricas de ovinos transfundidos com sangue total armazenado em bolsas tipo CPDA-1, em três diferentes períodos (0, 15 e 35 dias);
- Checar o efeito da transfusão de sangue armazenado em três diferentes períodos sobre o sistema de coagulação.
- Pesquisar a presença de estresse oxidativo e peroxidação lipídica de ovinos transfundidos com sangue total armazenado em três diferentes períodos (0, 15 e 35 dias);
- Determinar o tempo de permanência das hemoglobinas homólogas transfundidas, utilizando a variante da hemoglobina como biomarcador.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. INDUÇÃO DA ANEMIA AGUDA

A anemia é a redução da capacidade do organismo de suprir os tecidos com quantidade apropriada de oxigênio para o desempenho satisfatório das funções celulares (THRALL, 2007). Clinicamente, o quadro de anemia é caracterizado quando um ou mais parâmetros das células sanguíneas (volume globular, hemoglobina, número de hemácias) estão abaixo dos valores normais para idade, sexo e espécie (JAIN, 2006).

O aparecimento da anemia está baseado em três mecanismos básicos que são a perda sanguínea, produção deficiente ou destruição excessiva das hemácias. A anemia raramente é uma causa primária de doença e sim um resultado de um processo sistêmico (JAIN, 2006).

Na literatura são encontrados estudos indução da anemia aguda em ovinos no intuito de estudar as alterações ocorridas pela perda de sangue e as respostas adaptativas a esse evento, no entanto são utilizadas metodologias diferentes para a realização das flebotomias e conseqüentemente são encontradas respostas diferenciadas.

Entre as metodologias encontradas, Winter (1967) realizou flebotomias consecutivas por nove dias, sendo observado menores valores do volume globular (VG), número de eritrócitos (RBC) e hemoglobina (Hb) no décimo dia. Também constataram sinais de regeneração medular (presença de reticulócitos, policromasia, anisocitose, aumento do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)) ao quarto dia da flebotomia. No 28º dia o tamanho dos eritrócitos retornou aos valores normais. Howard et al. (1998) com a retirada de 20% do sangue, observaram diminuição significativa do VG, RBC e Hb, enquanto a regeneração medular iniciou-se no 2º dia e elevações do VCM e HCM entre 6 e 12 horas respectivamente. No décimo segundo dia os valores do VG, RBC e Hb retornaram ao normal.

Chapel et al (2000) e Veng-Perdensen et al. (2002) induziram a anemia em cordeiros jovens por duas flebotomias com intervalo de quatro semanas e acompanharam os animais até a recuperação. Os sinais de regeneração foram evidentes entre o terceiro e oitavo dia, sendo que a concentração de hemoglobina retornou aos valores iniciais na quarta semana após a flebotomia.

A retirada de 40% de sangue no período de duas horas na indução da anemia fetal em ovinos observou-se pequeno aumento na produção de eritrócitos dentro de sete dias (ZHANG et al., 2002). Contudo, Al-Hunití et al. (2004) em animais adultos, observaram maiores valores de reticulócitos entre 2,5 e 5 dias após a flebotomia, retornando aos valores basais 10 a 15 dias após a flebotomia.

Sousa et al. (2012) com a retirada de 15mL/kg de sangue, observaram redução significativa do VG e RBC 24h após a flebotomia e recuperação desses valores oito dias após a perda aguda de sangue.

Além das alterações hematológicas já relatadas na literatura, os processos anêmicos podem provocar estresse oxidativo, no entanto o mecanismo pelo qual a anemia contribui para o estresse oxidativo não está totalmente elucidado, mas a inadequada oxigenação tecidual é acompanhada por aumento na produção de radicais livres determinando alterações no metabolismo celular energético, elevação no catabolismo de catecolaminas e ativação leucocitária (SOMMERBURG et al., 1998; GRUNE et al., 2000; SARADA et al., 2002; STENVINKEL, 2003).

A hipóxia resultante da limitada capacidade de carrear o oxigênio, eleva a frequência respiratória e o metabolismo anaeróbico resultando na produção de lactato (HALLIWELL; GUITTERRIDGE, 1999), sendo também responsabilizada pela liberação de mediadores inflamatórios que ativam leucócitos elevando as produções radicais e oxidantes (MOORE et al., 1996). Durante a hipoxia há aumento na concentração de catecolaminas e na atividade de enzimas que metabolizam as catecolaminas produzindo mais espécies reativas do oxigênio (EROs). A degradação da purina pela xantina oxidase em casos de reperfusão durante a hipóxia tecidual temporária é também uma fonte de produção de EROs (MOCHIZUKI-ODA et al., 1997).

3.2. CONSERVAÇÃO DE SANGUE

Durante o período de conservação o sangue armazenado sofre várias alterações que em conjunto são conhecidas como “lesões de armazenamento”. Essas alterações vão desde alterações microscópicas das células vermelhas que podem resultar em danos irreversíveis e redução da sobrevivência pós-transfusional, até o acúmulo de substâncias bioreativas que podem influenciar a qualidade do sangue transfundido e contribuir para reações pós-transfusionais (CHIN-YEE et al., 1997).

A seguir serão feitas considerações a cerca do armazenamento de sangue e das principais lesões de armazenamento descritos na literatura.

3.2.1. Bolsas de sangue e refrigeração

Durante algum tempo na medicina veterinária a coleta e armazenamento de sangue para transfusão foi realizado em frascos de vidro à vácuo, contendo anticoagulante. Os frascos de vidro contendo vácuo são menos adequados para o armazenamento de sangue por provocarem hemólise, agregação plaquetária e inativação dos fatores de coagulação VIII e XIII (HUNT; MOORE, 1990). Assim, desde a Segunda Guerra Mundial, utilizam-se bolsas de policloreto de vinila (PVC) para o armazenamento, em vez de frascos de vidro, os quais são impermeáveis á troca de gases. (GENETET; MANNONI, 1980).

A introdução do PVC na confecção de bolsas de sangue em 1960 veio minimizar a adesão celular, a formação de coágulos e a hemólise durante a estocagem, além de facilitar o transporte e centrifugação do sangue, bem como possibilitou a sobrevivência de vários componentes sanguíneos pós-transfusão (PIERRE, 1981).

As bolsas possuem também propriedades especiais de permeabilidade ao CO₂, pois durante a estocagem do sangue, a glicose consumida para produzir ATP gera uma série de metabólitos, dentre eles o lactato e prótons. Estes componentes, na presença da anidrase carbônica dos eritrócitos, são convertidos em água e CO₂. O dióxido de carbono resultante dessa reação difunde-se para o meio externo, devido à permeabilidade da bolsa a esse gás, evitando a reversão da reação (HESS; GREENWALT, 2002).

As bolsas para conservação de sangue total utilizadas na medicina veterinária são as mesmas utilizadas na medicina humana, as quais possuem solução conservadora na proporção de 63mL para 450mL ou 70mL para 500mL de sangue total, enquanto as bolsas com soluções aditivas possuem ainda solução de 100mL a ser adicionada após a coleta (RAZOUK, 2004).

São utilizadas para coleta e armazenamento de sangue quatro principais tipos de soluções preservativas: ACD (Citrato Dextrose), CPD (Citrato Fosfato Dextrose), CPDA-1 (Citrato Fosfato Dextrose e Adenina) e bolsas plásticas que contém soluções aditivas, as quais possuem na bolsa primária CPD ou CPD2 e na bolsa satélite solução

aditiva como SAG-M, ADSOL (AS-1), NUTRICEL (AS-3) ou OPTISOL (AS-5) (HESS, 2006).

As bolsas contendo CPDA-1 são as mais utilizadas na medicina veterinária (LANEVSKI; WARDROP, 2001), sendo que a CPD/SAG-M aos poucos vem ganhando espaço.

Originalmente as soluções aditivas são adicionadas ao concentrado de hemácia após a centrifugação do sangue total e separação do plasma. Pesquisas no campo da medicina veterinária têm utilizado essas soluções na conservação de sangue total (COSTA JÚNIOR et al., 2008; BERTOLETTI, 2011; BARROS, 2011).

Cada constituinte da solução preservativa possui funções específicas que ajudam a manter a viabilidade do sangue por um tempo maior. O citrato é um anticoagulante que age quelando o cálcio, impedindo a coagulação, além de promover estabilização da membrana auxiliando na manutenção do pH intracelular (AUTHEMENT et al., 1986; HÖGMAN et al., 2002).

O ácido cítrico promove a acidificação da solução conservadora, impedindo que a glicose e o citrato sofram caramelização quando passarem pela autoclavagem (MOLLISON, 1997).

A dextrose é adicionada a solução como fonte de energia, pois este carboidrato não é consumido rapidamente pela célula em baixas temperaturas (1 a 6°C) contribuindo, inclusive, com a manutenção de níveis adequados de ATP. A adenina promove um aumento do adenilato que é importante para a síntese de ATP, aumentando as reservas desses nucleotídeos no interior das células estocadas, reduzindo a fragilidade osmótica e garantindo maior sobrevivência das hemácias (AUTHEMENT et al., 1986).

O fosfato é substrato para a produção do 2,3 difosfoglicerato (DPG) no interior das hemácias, que é um componente orgânico responsável pela captura e liberação de O₂ pela hemoglobina aos tecidos (EISENBRANDTE; SMITH, 1973; WARDROP et al., 1994a).

As soluções aditivas possuem composições variadas, mas uma base comum é a presença de glicose, manitol e adenina diluídos em solução salina, que proporciona maior aporte energético e consequentemente maior tempo de conservação das hemácias. O manitol apresenta a capacidade de estabilizar a membrana celular, promovendo impermeabilização a íons como o cloreto (Cl⁻), mantendo níveis altos do pH intracelular e reduzindo a taxa de hemólise (HESS; GREENWALT, 2002).

A primeira solução aditiva desenvolvida foi a SAG-M, sendo as soluções aditivas subsequentes variações da mesma, podendo-se citar AS-1, AS-3 e AS-5 (HESS, 2006). A solução AS-3 não possui manitol na sua composição, entretanto tem citrato, que substitui a ação estabilizadora de membrana do manitol e também é enriquecida de fosfato no anticoagulante CP2D e na solução aditiva (fosfato de sódio monobásico) (HESS, 2006).

Novas soluções aditivas vêm sendo desenvolvidas na medicina humana no intuito de diminuir as lesões de armazenamento e aumentar o tempo de conservação. A produção de ATP para manutenção do metabolismo energético dos eritrócitos tem sido um grande desafio para a medicina transfusional, mais recentemente foi criada uma nova solução aditiva a PAGGS-M que possui em sua composição cloreto de sódio, fosfato, glicose, adenina, manitol e guanosina (WALKER et al., 1990; HESS, 2006). A guanosina foi adicionada como fonte de ribose com objetivo de conduzir a via Embden–Meyerhof da glicólise e aumentar o aporte de ATP, sendo que essa solução proporcionou aumento do período de armazenamento que antes era de 42 dias para 49 dias (7 semanas) (WALKER et al., 1990). Outra solução desenvolvida foi a ½ CPD ErythroSol (½ CPD/RAS2), onde tentou-se aumentar o pH da solução conservadora através da redução do anticoagulante CPD e usando uma solução aditiva neutra com glicose autoclavada em uma bolsa separada (HOGMAN et al., 1997), a qual conserva os eritrócitos humanos por até sete semanas.

Hess et al. (2003) criaram uma solução preservativa (CPD/EAS-81) capaz de armazenar as hemácias por 8 semanas, na qual promoveram a alcalinização da solução aditiva, que abranda a queda do pH e consequentemente conserva o ATP e DPG.

Independente do tipo de solução utilizada para conservação do sangue, após a coleta as bolsas devem ser armazenadas em geladeiras com temperatura de 1 a 6°C, pois as reações bioquímicas e moleculares das hemácias são retardadas pela redução da temperatura (SCOTT et al., 2005). As hemácias humanas mantidas sob refrigeração entre 2 a 8°C diminuem em até 40% o metabolismo, retardando o processo de envelhecimento normal (HÖGMAN, 1998).

3.2.2. Conservação de sangue total nas diferentes espécies

Na medicina veterinária a separação dos hemocomponentes sanguíneos não é uma prática rotineira, como ocorre na medicina humana (LACERDA, 2005). No

entanto, o fracionamento do sangue permite que mais de um paciente possa se beneficiar de apenas um doador, pois muitas vezes o paciente que requer uma transfusão, precisa de apenas um componente sanguíneo específico (RAZOUK, 2004).

O tempo de armazenamento do sangue na espécie humana depende da solução utilizada na bolsa de coleta: ACD e CPD são de 21 dias, CPDA-1 é de 35 dias e bolsas contendo solução aditiva varia de 42 a 49 dias (RAZOUK, 2004). Na medicina veterinária utilizando as mesmas soluções para a conservação do sangue o tempo de armazenamento é diferente entre as espécies, não sendo indicado usar como referência o tempo de conservação do sangue humano.

O sangue total de equinos e bovinos pode ser armazenado em bolsas contendo CPDA-1 por 21 a 28 dias (DURHAM, 1996) e por 35 dias, respectivamente (RIBEIRO FILHO et al., 1994). Em ovinos o sangue total pode ser armazenado por até 35 dias em bolsas CPDA-1 (SOUSA et al., 2009). O sangue total asinino mostrou boa qualidade quando armazenado por 42 dias em bolsas CPDA-1 e CPD/SAGM (BARROS, 2011).

O sangue canino pode ser armazenado por até 35 dias em bolsas CPDA-1 e até 21 dias em bolsas contendo ACD (AUTHEMENT, 1986). Costa Junior et al. (2008), em trabalho comparativo envolvendo bolsas CPDA-1 e bolsas CPD/SAGM, verificou que as bolsas CPD/SAG-M são melhores para a conservação do sangue total canino sob refrigeração em um período mínimo de 41 dias em relação as bolsas CPDA-1. Para gatos tem-se usado bolsas CPDA-1 e CPD-SAGM para conservação de sangue total por 28 dias (BERTOLETTI, 2011).

O concentrado de hemácias em equinos pode ser armazenado por até 35 dias utilizando bolsas CPD- SAGM com depleção de plaquetas e leucócitos (NIINISTÖ et al., 2008). Já em caninos o concentrado de hemácias pode ser armazenado por 20 dias em CPDA-1, por 37 dias em solução CPD-Adsol (WARDROP et al., 1994b) e 35 dias em solução CPD-Nutricel (WARDROP et al., 1997).

3.2.3. Lesões de armazenamento e controle de qualidade

A retirada do sangue da circulação para conservação *in vitro*, transfere os eritrócitos para um ambiente diferente do encontrado no organismo vivo, o que promove uma série de alterações hematológicas, morfológicas, hemogasométricas e bioquímicas que em conjunto são conhecidas como lesões de armazenamento (CHIN-YEE et al., 1997; BERTOLETTI, 2011).

Na medicina humana existem parâmetros hematológicos e bioquímicos de referência que precisam ser seguidos para que o sangue e seus componentes sejam considerados de boa qualidade para a realização da transfusão. Na medicina veterinária os parâmetros de qualidade não estão bem estabelecidos para cada espécie animal, sendo observado em alguns estudos a utilização de parâmetros humanos para avaliar a qualidade do sangue animal armazenado (MUDGE et al., 2004; NIINISTO et al., 2008; BARROS et al., 2011).

A utilização dos hemocomponentes é uma realidade na clínica de pequenos animais, em especial na canina, sendo conhecidas as formas de fracionamento, tempo de conservação dos hemocomponentes e sobrevivência pós-transfusional das hemácias transfundidas, enquanto na clínica de grandes animais o sangue total ainda é a forma mais utilizada, embora alguns estudos em equinos venham sendo conduzidos no intuito de possibilitar a utilização dos hemocomponentes. Abaixo estão descritas as principais alterações hematológicas, morfológicas, bioquímica e hemogasométrica ocorridas no armazenamento de sangue total nas diferentes espécies animais.

3.2.3.1. Alterações Hematológicas e Morfológicas

Os eritrócitos dos mamíferos são células anucleadas que não possuem mitocôndrias, o que diminui a capacidade sintética e impede a realização do ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, sendo necessário que as soluções conservadoras forneçam nutrientes para a manutenção do metabolismo energético através da glicólise. Nesse contexto, a concentração de adenosina trifosfato (ATP) durante o armazenamento desempenha papel fundamental, principalmente por estar envolvido em funções importante como o controle da bomba de sódio e potássio, na manutenção da forma e deformabilidade dos eritrócitos (KORTE; VERHOEVEN, 2004).

Apesar das soluções conservadoras possuírem fontes de energia para a manutenção do metabolismo eritrocitário, a sobrevivência dos eritrócitos é limitada tanto pela redução da fonte energética ao longo do armazenamento como pelo envelhecimento natural das hemácias. O período de armazenamento promove uma série de alterações na membrana plasmática dos eritrócitos como redução do tamanho e esferocitose progressiva, surgimento de microvesículas e aumento gradual da fragilidade osmótica, sendo que algumas sofrem lise, levando a diminuição no número de hemácias,

diminuição do volume globular e aumento da hemoglobina plasmática (WARDROP et al., 1994a).

O aumento da hemoglobina plasmática é resultante da ruptura das hemácias ou liberação da hemoglobina presente em microvesículas presente na membrana, o que pode ocasionar danos à função renal e ao sistema de coagulação quando o sangue é transfundido devido à alta concentração de hemoglobina livre (HESS; GREENWALT, 2002; KORTE; VERHOEVEN, 2004). Nos bancos de sangue humanos a percentagem de hemólise durante o armazenamento não deve ser superior a 1%. Nos países da União Européia e no Brasil esse parâmetro é mais rígido não podendo ultrapassar 0,8% (KORTE; VERHOEVEN, 2004; RDC, 2004).

Pelas normas brasileiras o nível de hemoglobina plasmática do concentrado de hemácias humano não deve ser superior a 0,8 g/dl ao final do tempo de armazenamento (RDC, 2004). Na medicina veterinária não existem parâmetros estabelecidos quanto ao grau de hemólise e o nível de hemoglobina plasmática admissível no sangue total ou no concentrado de hemácias para as diferentes espécies, no entanto alguns trabalhos levam em consideração os parâmetros humanos (NIINISTO et al., 2008; MUDGE, 2004; BARROS, 2011).

Em algumas espécies o armazenamento tem promovido variações no volume corpuscular médio das hemácias (VCM), sendo observado que hemácias de ovinos e humanos aumentam o volume corpuscular médio (VCM) (SOUSA et al., 2009; WOLFE, 1985), entretanto na espécie equina esta alteração não foi observada (MUDGE et al., 2004; LOPES et al., 1994). Esta variação no VCM está relacionada à falência da bomba de sódio e potássio que é afetada pela diminuição dos níveis de ATP, levando ao acúmulo de substâncias osmóticas e a perda progressiva da área de superfície das hemácias (VALERI, 1994).

A conservação de sangue total em bolsas CPDA-1 em ovinos (SOUSA et al., 2009) e ACD em equinos (LOPES et al., 1994; BARTHEL, 1999) mostrou redução no número de leucócitos totais. Salib e Dawson (1985) sugeriram que a diminuição dos leucócitos ao longo do armazenamento ocorre devido à rápida degeneração dos neutrófilos quando comparado aos linfócitos.

Ao longo dos anos, estudos têm mostrado que os leucócitos podem exercer efeitos deletérios indiretos sobre as hemácias armazenadas por consumir a glicose da solução conservadora e por liberar substâncias bioreativas. Durante o armazenamento ocorre ruptura dos leucócitos promovendo liberação de imunomoduladores

inflamatórios como histamina, mieloperoxidase e proteína eosinofílica catiônica (HÖGMAN, 1998).

A presença de leucócitos em produtos sanguíneos armazenados tem sido causa de reações febris devido à liberação de citocinas, imunossupressão pela diminuição da atividade das células Natural Killer e da fagocitose e lesões pulmonares devido à presença de agregado leucocitário na circulação pulmonar (EDER; CHAMBERS, 2007; SHEPPARD et al., 2007).

A contaminação de hemácias por leucócitos acelera a hemólise e aumenta o potássio extracelular, portanto a conservação é melhor quando se elimina a camada leucoplaquetária (HOGMAN et al., 2002), sendo que a redução de 80 a 90% dos leucócitos tem demonstrado redução dos riscos de reação pós-transfusional (HÖGMAN, 1998). Existem no mercado bolsas que reduzem a camada leucoplaquetária (buffy coat) do sangue total, são as chamadas bolsas Top Bottom que possuem filtros especiais que separam as hemácias e plasma dos leucócitos e plaquetas. A leucorredução realizada por essas bolsas não é completa, sendo recomendado que os produtos das células vermelhas não tenham mais que $1,2 \times 10^9$ leucócitos/unidade (HOGMAN et al., 1978).

Durante o armazenamento as hemácias também sofrem uma sequência previsível de alterações na forma. Inicialmente as hemácias apresentam forma normal de disco bicôncavo (discócitos), sofrem crenação formando equinócitos e posteriormente as hemácias ficam “ingurgitadas” formando uma esfera crenada com múltiplas espículas (esferoquinócitos), as quais são eventualmente perdidas por meio de vesículas lipídicas, produzindo esferócitos (GREENWALT et al., 1990).

A formação dos equinócitos ocorre quando há diminuição nos níveis de ATP, excesso de Ca^{2+} , presença de agentes químicos, expansão da porção externa ou interna da bicamada lipídica dos eritrócitos, sendo que equinócitos são reversíveis e interconvertíveis à forma de discócito (CHAILLEY et al., 1973; FÉO; MOHANDAS, 1977). Entretanto, se houver perda de fragmentos da membrana pela continuidade da lesão, com aumento da viscosidade e rigidez do eritrócito, forma-se o esferócito, irreversível e altamente suscetível à hemólise (CHABANEL et al., 1987).

No entanto, Hess et al. (2000) mostraram que existe uma correlação entre a morfologia e a concentração de ATP e a sobrevivência das hemácias pós-transfusional, mas não existe correlação entre a morfologia e o grau de hemólise, sugerindo que a manutenção da forma das hemácias é uma característica desejável, porém não necessária para a manutenção da qualidade das hemácias. Experimentos *in vitro*

mostraram que as hemácias retornam a sua forma normal após serem ressuspensas, desde que estas não estejam no estágio de esferócito (HESS et al., 2000).

3.2.3.2. Alterações Hemogasométricas

O pH sanguíneo dos animais está próximo da neutralidade com leve tendência à alcalinidade (aproximadamente 7,4). Em condições fisiológicas as reações metabólicas tendem a desviar continuamente este pH para ácido ou básico (ALMOSNY, 2006). Quando o sangue coletado é armazenado em soluções conservadoras as células continuam seu metabolismo, sendo a redução do pH uma das principais alterações que ocorre durante o armazenamento (RIBEIRO FILHO et al., 1994).

Nas diferentes espécies é observado a redução do pH logo no primeiro dia de armazenamento, o que é decorrente da presença de ácido cítrico na solução conservadora, este tende a decrescer ainda mais ao longo do tempo devido ao metabolismo anaeróbico das hemácias em que a glicose é metabolizada a lactato levando ao acúmulo de íons H^+ (AUTHEMENT et al., 1986; RIBEIRO FILHO et al., 1993).

O poder tampão do plasma também produz efeitos na conservação. Em concentrados de hemácias, a diminuição do pH é mais rápida do que no sangue total. A retirada de plasma elimina parte da solução de conservação utilizada e, sobretudo, os substratos, como glicose e fosfatos (GENETET; MANNONI, 1980). Entretanto, a relação solução de conservação/volume de sangue deve ser respeitada, pois, se o volume de sangue coletado for pequeno em relação ao anticoagulante, a diminuição do pH será mais acentuada, devido a acidez da solução (HESS; GREENWALT, 2002).

A captação e liberação de oxigênio pela hemoglobina é mediada pelo 2,3 DPG. As concentrações desse elemento estão relacionados a variações do pH, na qual um pH menor que 7,0 promove degeneração do DPG aumentando a afinidade da hemoglobina pelo O_2 , enquanto num pH acima de 7,0 desencadeia regeneração do DPG e menor afinidade da hemoglobina pelo O_2 (KURUP et al., 2003).

Não é bem conhecida o pH no qual as células sanguíneas podem ser submetidas sem alterar o grau de seu metabolismo, mas Hess e Greenwalt (2002) em trabalho com sangue humano sugeriram que este seja no máximo 6,2.

A pressão de CO_2 é uma variável hemogasométrica que tende a aumentar no interior das bolsas de sangue ao longo do período de armazenamento, devido

principalmente a neutralização do ácido láctico produzido pelo metabolismo celular, resultando na produção de CO_2 . A pO_2 também tende a aumentar no interior das bolsas, sendo observado aumento dessas variáveis no armazenamento de sangue canino, bovino, ovino e asinino (COSTA JÚNIOR et al., 2008; RIBEIRO FILHO et al., 1994; SOUSA et al., 2009; BARROS, 2011). Comprovando que as bolsas plásticas utilizadas para o armazenamento do sangue são permeáveis ao CO_2 e ao O_2 (RIBEIRO FILHO et al., 1994). Alta pCO_2 também promove maior degradação do 2,3 DPG (HÖGMAN et al., 2002).

O metabolismo anaeróbico das hemácias produz ácidos, entre eles o ácido láctico, que é neutralizado pela ação do HCO_3^- plasmático, que tem papel tamponante no meio extracelular (RANDALL, 2008). Sendo observado aumento nos teores de lactato ao longo do período de armazenamento, em contrapartida ocorre redução gradual nos níveis de bicarbonato plasmático no intuito de neutralizar esses ácidos (RIBEIRO FILHO et al., 1994).

3.2.3.3. Alterações Bioquímicas

Entre os padrões bioquímicos utilizados para avaliar a conservação de sangue total estão as concentrações de ATP, 2,3 DPG, sódio, potássio e glicose, entretanto, a determinação desses dois últimos parâmetros são práticos e normalmente utilizados na rotina dos bancos de sangue para avaliar a qualidade do sangue armazenado (TOMCZACK, 2006).

O potássio é um íon predominante intracelular, sendo encontrado apenas cerca de 2% no meio extracelular, em contrapartida o sódio é um íon extracelular. A manutenção do equilíbrio desse gradiente de concentração nas hemácias é realizada pela bomba de sódio e potássio encontrada na membrana plasmática. A atividade da bomba Na/K é dependente dos níveis de ATP, sendo também influenciada pela diminuição do pH e da temperatura (MEYER et al., 1995; HÖGMAN, 1997; HÖGMAN, 1998).

Ao longo do período de armazenamento ocorre diminuição dos teores de ATP, queda do pH e diminuição da atividade da bomba de Na^+/K^+ , ocorrendo aumento do potássio extracelular e diminuição do sódio extracelular (MEYER et al., 1995). A inversão do gradiente de concentração promove aumento de soluções osmóticas e consequentemente aumento da hipertonidade do meio intracelular, enquanto altos níveis de potássio no sangue transfundido podem levar o receptor a hipercalemia.

Altos níveis de potássio no sangue armazenado estão na dependência da hemólise, e das concentrações de potássio intra-eritrocitários entre as espécies, sendo encontradas altas concentrações nas hemácias de humanos ($102 \pm 3,9 \text{ mmol/L}$), equinos ($120 \pm 1,1 \text{ mmol/L}$), suínos ($105,9 \pm 12,7$), caprinos ($76,1 \text{ mmol/L}$) e bovinos ($22 \pm 2,5 \text{ mmol/L}$) e baixos valores para cães ($5,7 \pm 1 \text{ mmol/L}$) e gatos ($5,9 \pm 1,9 \text{ mmol/L}$) (HARVEY, 2010). Com relação aos ovinos e asininos tem-se observado variações individuais, onde existem animais com hemácias com altos valores de potássio (HK^+ - ovinos $98,7 \text{ mmol/L}$, asininos 114 mmol/L) e com baixos valores (LK^+ - ovinos $39,4 \text{ mmol/L}$, asininos 100 mmol/L) (TURCKER; ELLORY, 1971; MISETA et al., 1993).

O sangue armazenado e hemolisado de animais que possuem altos valores de potássio intraeritrocitário quando transfundido possuem maiores chances de provocar hipercalemia, enquanto sangue armazenado de animais que possuem pouco potássio intracelular tem menores chances de provocar hipercalemia, mas podem agravar quadros de pacientes que possuem problemas renais ou pacientes que recebam grandes volumes transfusionais (HOHENHAUS, 2007).

Assim como a hemoglobina, o aumento da concentração do potássio extracelular indica um dos primeiros eventos que se relacionam com a redução da qualidade das células vermelhas (KORTE; VERHOEVEN, 2004). Para a espécie humana é aceitável concentrações menores que 100 mmol/L (TOMCZACK, 2006) de potássio ao final do período de armazenamento do concentrado de hemácias.

As determinações das concentrações de ATP e 2,3 DPG vêm sendo incluído nas pesquisas para avaliar a qualidade do sangue armazenado, porém na prática esses parâmetros não são utilizados para avaliar a qualidade do sangue estocado nos bancos de sangue, devido ao custo da análise. No entanto, os níveis de ATP e do 2,3 DPG tendem a diminuir no decorrer do período de armazenamento (NIINISTO et al., 2008; MUDGE et al., 2004; COSTA JÚNIOR et al., 2008; HÖGMAN et al., 1998).

O ATP é um nucleotídeo produzido pelo metabolismo anaeróbico a partir da glicólise, sendo importante como fonte de energia para manutenção do metabolismo celular, para o funcionamento da bomba de sódio e potássio e para manutenção da forma celular (SCOOTT et al., 2005; HÖGMAN, 1998). Assim a redução desse fosfato durante o armazenamento promove alterações na membrana celular dos eritrócitos, como esferocitose progressiva, endocitoses anormais, aumento da fragilidade, redução

do tamanho e surgimento de microvesículas (EISENBRANT; SMITH, 1973; HÖGMAN et al., 2002).

O 2,3 DPG como já mencionado anteriormente é um fosfato importante na liberação do oxigênio ligado a hemoglobina, para os tecidos. Apesar de o armazenamento promover depleção dos níveis de 2,3 DPG, os eritrócitos retornam a síntese normal de 2,3 DPG, sendo necessárias 24 a 48 horas após a transfusão para que ele se normalize. Contudo, este é um fator limitante para a utilização de sangue armazenado por longo período em pacientes críticos que necessitam de entrega rápida de O₂, sendo agravado ainda mais porque pacientes críticos necessitam de tempo superior a 24 e 48 horas pós-transfusão para recuperarem os níveis de 2,3 DPG (SCOTT et al., 2005; KRISTENSEN; FELDAM, 1997).

Os teores de 2,3 DPG também são variáveis entre as espécies, ruminantes e felinos diferentemente das outras espécies animais inclusive o homem, apresentam quantidades menores de 2,3-DPG, devido a mecanismos adaptativos que permitem a esses animais terem liberação rápida de oxigênio aos tecidos (BUNN; FORGET, 1986). Os ruminantes e felinos são animais corredores, fato que requer uma liberação rápida de energia. Nos momentos de exigência física repentina, a temperatura corpórea aumenta, o pH sanguíneo diminui, e a demanda de O₂ aumenta. Nessa situação a afinidade diminuída pelo oxigênio pode facilitar a sua liberação para os tecidos (BUNN; FORGET, 1986).

A glicose tem sido utilizada como um marcador da qualidade do sangue humano armazenado, onde ao final do período de conservação os níveis desse carboidrato devem ser superiores a 50mg/dL (TOMCZACK, 2006). A glicose é o substrato utilizado para produção de energia através da glicólise, no início do período de conservação observa-se elevados valores de glicose devido à presença de glicose na solução preservativa, porém os níveis deste carboidrato tendem a diminuir durante o armazenamento devido sua utilização como fonte energética para produção de ATP (RIBEIRO FILHO et al.; 1994).

O consumo de glicose pelos eritrócitos varia de acordo com as diferentes espécies animais, sendo que os eritrócitos humanos ($1,48 \pm 1,1 \mu\text{mmol/h/mL}$) apresentam maior taxa de consumo de glicose quando comparado com outros mamíferos. Como as bolsas de conservação de sangue foram projetadas para essa espécie, a quantidade de glicose não é um empecilho para a conservação de sangue em outras espécies (HARVEY, 2010).

Ao final de 32 dias de conservação de sangue total equino em diferentes soluções observou-se valores de glicose acima 300mg/dL (MUDGE et al., 2004), no sangue canino e felino valores acima de 500mg/dL durante 42 dias e 28 dias de conservação respectivamente, em bolsas CPD/SAGM (COSTA JÚNIOR et al., 2008; BERTOLETTI, 2011). As bolsas tipo CPD/SAG possuem na solução preservativa maior quantidade de glicose quando comparada as bolsas tipo CPDA-1.

A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) tem sido utilizada em estudos com sangue equino armazenado para auxiliar na avaliação de hemólise, já que essa enzima está presente em grande quantidade nos eritrócitos (MUDGE et al., 2004).

3.3. ARMAZENAMENTO DE SANGUE E ESPÉCIES REATIVAS

Os seres vivos se adaptaram, no transcorrer dos últimos dois bilhões de anos, a uma crescente concentração de oxigênio atmosférico, no entanto, esse elemento representa um paradoxo, por ser um elemento essencial para a manutenção da vida e ao mesmo tempo potencialmente deletério as estruturas celulares devido à capacidade de produzir radicais livres (RL) (HALLINWELL, 1987; VASCONCELOS, 2006).

O termo radical livre é utilizado para designar qualquer espécie química de existência independente que possui elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica. Esta configuração eletroquímica torna essas moléculas instáveis, conferindo-lhe alta reatividade e vida curta. Os RL interagem com outras moléculas através de reações de oxiredução com o propósito de estabilizar sua configuração eletrônica. No entanto, algumas substâncias com propriedades reativas não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Por este motivo, o termo radical livre não é o ideal para designar de maneira geral estes agentes reativos. Assim, o termo espécies reativas é considerado o mais apropriado (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As espécies reativas são classificadas pelo grupo funcional presente em sua molécula, porém os processos aeróbicos que envolvem o oxigênio são os mais comuns e seus produtos são denominados de espécies reativas do oxigênio (EROs) (CHIHUAILAF et al., 2002).

Nos seres vivos os EROs são produzidos principalmente durante a respiração celular no transporte de elétrons localizado na membrana mitocondrial e durante a atividade de fagocitose das células polimorfonucleares, podendo também ocorrer devido a fatores exógenos. Em situações específicas como processos infecciosos, exposição a

raios X ou toxina ambientais, anemias, o metabolismo da mitocôndria aumenta intensificando o consumo de oxigênio e favorecendo o escape de EROs do sistema de transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, que reduzem o oxigênio molecular a superóxido e peróxido (WOODS; PLESSINGER; FANTEL, 1998).

As mitocôndrias possuem aparato enzimático que promove a redução de 98% do oxigênio, através da ação da oxidase citocrômica, no entanto à alta dinâmica da oxidação mitocondrial não consegue reduzir todas as moléculas de oxigênio que adentram o espaço intracelular, permitindo que 2 a 5% do oxigênio se transforme em EROs (SEN, 2000).

Entre os EROS produzidos durante o metabolismo aeróbico o $O_2^{\cdot-}$ (superóxido), $\cdot OH$ (hidroxila) e H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; VINCENT; TAYLOR, 2006; VALKO et al., 2007) são os mais comuns.

O $O_2^{\cdot-}$ é, dentre as forma citadas acima, é a que possui menor capacidade de oxidação, com pouca reatividade em soluções aquosas, sendo produzido principalmente na cadeia respiratória mitocondrial e durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2007).

O $\cdot OH$ é a espécie reativa de oxigênio mais reativa do sistema biológico, podendo causar danos a várias estruturas celulares, devido à capacidade de se combinar rapidamente com metais e com outros radicais (VALKO et al., 2007).

O H_2O_2 , não é um radical livre, por não possui elétrons desemparelhados na ultima camada, mas é uma espécie reativa de vida longa, bastante tóxico e deletério, podendo atravessar as membranas celulares e provocar danos ao DNA. Além disso o H_2O_2 , pode participar de reações que produzem $\cdot OH$ (ANDERSON, 2000). Os peroxissomos são organelas citoplasmáticas que possuem grande quantidade desse elemento, pois o consumo de oxigênio nessa organela leva a produção de H_2O_2 .

A produção de EROs via mitocôndrias citada anteriormente ocorre em células que possuem essa organela citoplasmática, as hemácias são células diferenciadas, por não apresentarem organelas citoplasmáticas, como núcleo, mitocôndria e ribossomos, sendo incapazes de sintetizar novas proteínas, realizar reações oxidativas associadas a mitocôndrias ou sofrer mitose (HEYNEN, 1990; PERKINS, 2004).

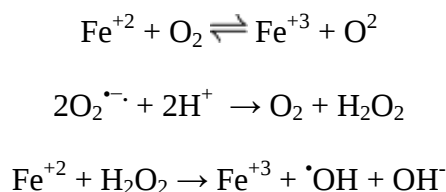
No entanto, estas células são passíveis de sofrerem oxidação e de produzirem EROs. As hemácias estão constantemente expostas aos danos oxidativos por circularem nos vasos sanguíneos com alta concentração de oxigênio e de íons ferro (DOMANSKI et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2007). Além disso, a hemoglobina contida nessa

célula está suscetível a sofrer auto-oxidação, que pode ser exacerbada por condições como aumento da temperatura, diminuição do pH, presença de fosfatos orgânicos ou íons metálicos e sua própria oxigenação parcial (RICE-EVANS, 1990; TELEN & KAUFMAN, 2004; LÓPEZ-REVUELTA et al., 2006). As hemácias possuem ainda em sua constituição lipídeos insaturados e proteínas susceptíveis ao ataque dos radicais livres (REVUELTA et al., 2005).

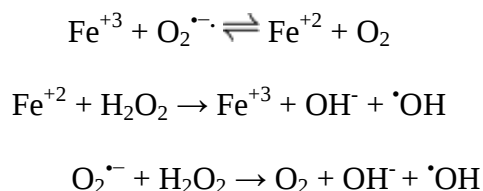
O ferro é o íon central do grupo heme da hemoglobina (GAW et al., 1999), possuindo a capacidade de aceitar e doar elétrons, interconvertendo-se em forma férrica (Fe^{3+}) e ferrosa (Fe^{2+}). Esta propriedade o torna um componente muito útil em citocromos, moléculas que ligam e transportam oxigênio e enzimas que realizam o processo redox. No entanto pode ser altamente reativo e danoso ao organismo quando se encontra livre, podendo catalisar a conversão do superóxido e peróxido de hidrogênio em radicais livres que irão atacar a membrana celular, proteínas e DNA (BENITE; MACHADO, 2002; BENDOVA et al., 2010).

As reações do ferro na geração de espécies reativas são conhecidas como Reação de Fenton e Reação de Haber-Weiss, nas quais um dos produtos é o radical hidroxila (BARREIROS et al., 2006).

- Reação de Fenton:



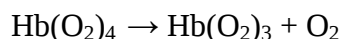
- Reação de Haber-Weiss:



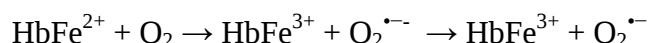
Essas reações produzem o radical $\bullet\text{OH}$, o mais deletério ao organismo, pois possui meia vida curta e dificilmente é sequestrado *in vivo*. A formação desse radical pode desencadear reação em cadeia, devido à capacidade de sequestrar o hidrogênio da

cadeia poliinsaturada dos fosfolipídios da membrana celular iniciando a peroxidação lipídica (BARREIROS et al., 2006). A formação desse radical também pode promover danos às proteínas, DNA e polissacarídeos (NELSON; Mc CORD, 1998).

A hemoglobina pode sofrer auto-oxidação, isso ocorre porque na forma desoxihemoglobina (hemoglobina não ligada ao oxigênio), o ferro possui seis elétrons na camada mais externa, sendo quatro desemparelhados, assim quando o oxigênio é adicionado, um desses elétrons é parcialmente transferido para o oxigênio (TELEN; KAUFMAN, 2004). Em uma situação normal, quando o oxigênio é liberado para os tecidos, a oxihemoglobina (hemoglobina ligada ao oxigênio) dissocia-se em hemoglobina parcialmente desoxigenada e oxigênio molecular.



Em algumas situações, em vez do oxigênio molecular, um radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode se dissociar, oxidando o ferro para o estado férrico, e produzindo metemoglobina:



A metemoglobina (HbFe^{3+}) é incapaz de liga-se ao oxigênio, para que isso ocorra, o ferro na molécula de hemoglobina deve ser mantido no estado reduzido ferroso (Fe^{2+}). A forma metemoglobina não se combina com o oxigênio, portanto não é um pigmento respiratório. Fisiologicamente cerca de 3% da hemoglobina eritrocitária é oxidado para metemoglobina diariamente, no entanto, a metemoglobina geralmente representa menos de 1% da hemoglobina total, porque é constantemente reduzida de volta à hemoglobina pela citocromo - b5 - redutase presente nas hemácias. A medida que a desnaturação oxidativa continua, a metemoglobina é convertida em derivados conhecidos como hemicromos, os quais não podem ser convertidos à hemoglobina normal, produzindo precipitados que podem-se ligar à membrana celular e encurtar a sobrevivência dos eritrócitos (TELEN; KAUFMAN, 2004).

Assim, os danos sofridos pelos eritrócitos decorridos do estresse oxidativo geralmente são resultado final de dois processos: oxidação da hemoglobina, seguida de conversão da metemoglobina a hemicromos; e ataque dos radicais livres aos componentes lipídicos da membrana (LÓPEZ-REVUELTA et al., 2006).

Diante da exposição às diversas fontes de espécies reativas, todas as células possuem mecanismos de defesa para evitar danos maiores provocados por estas substâncias. Os mecanismos de defesa consistem de sistemas e substâncias conhecidas como antioxidantes. No entanto, existem situações em que a produção de EROs supera a ação dos antioxidantes ocorrendo o evento conhecido como estresse oxidativo (MAXWELL, 1995).

Os antioxidantes são compostos que protegem os sistemas biológicos contra lesões causadas por processos que podem levar a altos níveis de oxidação (KRINSKI, 1992). Os antioxidantes podem ser classificados em fatores endógenos, sintetizados no organismo e exógenos, obtidos da dieta (GALIZIA; WAITZBERG, 2001). Este sistema de defesa pode atuar de maneira detoxificadora do agente lesivo antes que ele cause a lesão (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os antioxidantes endógenos são compostos por uma variedade de enzimas como superóxido dismutase (SOD) (dependente de cobre e zinco), a glutatona peroxidase (GPx) (dependente do selênio), a catalase (CAT) e a proteína glutatona reduzida (GSH) (HALLIWELL; CHIRICO, 1993) entre outras. Estes agentes antioxidantes por serem derivados de proteínas, possuem concentrações dependentes da taxa de síntese, o que dificulta suas alterações.

Os antioxidantes exógenos por estarem disponíveis na natureza, podem ter suas concentrações manipuladas através da suplementação na dieta. Os principais antioxidantes exógenos são o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenoides e flavonoides (GALIZIA; WAITZBERG, 2011).

O sistema antioxidante endógeno está presente no meio intracelular, com utilização do eritrócito para sua análise, enquanto o sistema oxidante está, principalmente, no meio extracelular em plasma e soro, onde circulam importantes antioxidantes (vitamina E, vitamina C, β -caroteno), bem como biomarcadores do dano causado por EROs, como o malondialdeído (MDA) e outros derivados da peroxidação lipídica das membranas celulares.

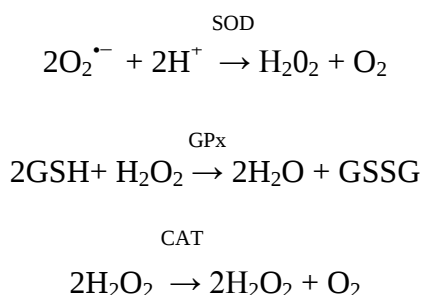
A SOD é uma metaloenzima que catalisa a dismutação do anião radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 . A SOD pode ser encontrada na forma SOD-cobre-zinco presente no citosol principalmente, e a SOD-mangânese encontrada na mitocôndria (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As peroxidases são enzimas que utilizam o peróxido de hidrogênio para oxidar o substrato (VICENT; TAYLOR, 2006). Entre as peroxidases a glutatona peroxidase

(GPx) possui uma característica importante, apresentando um resíduo de cisteína contendo selênio ligado a enzima, além disso, atua sobre peróxido de hidrogênio, com utilização do tripeptídeo glutathiona reduzida (GSH) como doador de elétrons, transforma-a em glutathiona oxidada (GSSG). Após a oxidação a GSH pode retornar à sua forma reduzida pela ação da enzima glutathiona redutase (GR) na presença de NADPH. A recuperação de GSH pela GR é uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, pois baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo (VALKO et al., 2007).

A GPx assim como a SOD estão presentes no citosol e nas mitocôndrias, esta presença conjunta sugere a ação sequencial e primordial do sistema antioxidante ao lidar com os radicais livres de oxigênio superóxido e peróxido de hidrogênio (GALIZIA; WAITZBERG, 2001).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que atua na redução da H_2O_2 a O_2 e H_2O . Esta enzima é encontrada no peroxissoma, a organela responsável pela desintoxicação celular, oxidação de ácidos graxos de cadeia longa e que é fonte de peróxidos orgânicos. A catalase também é encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco (VALKO et al., 2007).



Além das substâncias endógenas, as substâncias exógenas são importante na defesa antioxidante e dependem de substâncias derivadas da alimentação, como zinco, cobre, selênio, vitamina E, vitamina C e carotenóides. Os antioxidantes obtidos da alimentação como os minerais e as vitaminas mostram-se extremamente importantes nas ações contra as espécies reativas (BIACHI; ANTUNES, 1999).

Os EROS quando superam a ação de defesa do sistema antioxidantes, promovem diversos danos a vários componentes celulares, principalmente os carboidratos, proteínas e fofolípídeos encontrados nas membranas celulares.

Um dos principais danos causados pelos EROS é a peroxidação lipídica das membranas celulares, esse processo é uma reação em cadeia dividida em etapas. A

etapa de inicialização ocorre quando um ERO (radical hidroxila, peroxila, alcoxila ou alquila) retira um hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado, deixando um elétron desemparelhado no carbono, formando um radical lipídico. Esse radical lipídico reage rapidamente com o oxigênio, resultando em um radical proxil que por sua vez sequestra um hidrogênio de um novo ácido graxo poliinsaturado, formando novamente um radical lipídico, esta etapa é denominada de fase de propagação (reação em cadeia) (GATÉ et al., 1999; DOTAN et al., 2004). A combinação do radical peroxila com o $H^{\bullet}$ retirado dos lipídeos, gera LOOH. A última etapa da peroxidação é a terminação, onde ocorre a neutralização dos radicais formados por ação dos antioxidantes lipossolúveis (β caroteno, α tocoferol). Estas modificações oxidativas formam hidroperóxidos que alteram a fluidez e a permeabilidade da membrana, promovendo expansão do líquido intracelular e risco de ruptura da membrana plasmática e organelas, com consequente morte celular (SIES; STAHL, 1995). Com a destruição celular, o peróxido lipídico é liberado para a circulação sanguínea elevando sua concentração sérica ou plasmática, indicando a ocorrência de lesão de membrana celular.

A peroxidação lipídica pode ser avaliada através de testes capazes de detectarem produtos primários e secundários da lipoperoxidação (BONDAN, 2006). Os hidroperóxidos formados podem se decompor em numerosos produtos aldeídos de diferentes comprimentos de cadeia, reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA). O malondialdeído (MDA) é um aldeído produzido após a peroxidação lipídica que pode ser determinado no intuito de avaliar a ocorrência de lipoperoxidação.

O ERO hidroxila pode reagir com carboidratos $(CHOH)_n$ levando à quebra da cadeia de importantes moléculas, como o ácido hialurônico. As proteínas estão susceptíveis a ação dos EROS, por possuírem sítios reativos, quando ocorre o estresse oxidativo, há fragmentação das cadeias e oxidação de muitos aminoácidos, com a produção de compostos carbonilados (VASCONCELOS et al., 2007).

Os danos ao DNA podem ser causados por espécies reativas, através da reação destes com a desoxirribose, as bases pirimidínicas ou purínicas ocasionando a quebra da cadeia de DNA, facilitando a ligação cruzada entre fitas e modificações nas suas bases levando a mutação e apoptose (VASCONCELOS et al., 2007).

De forma semelhante, danos oxidativos para lipídios e proteínas podem contribuir para lesões de armazenamento durante a conservação de sangue total em bolsas (SHARIFI; DZIK; SADRZADEH, 2000). Como mencionado anteriormente às hemácias na circulação sanguínea estão em um ambiente com alta saturação de oxigênio

(75%), essas moléculas de oxigênio estão constantemente ligando-se a forma ferrosa (Fe^{2+}) da hemoglobina e entrando em solução, para em seguida ser entregue aos tecidos, no entanto essa reação não é perfeita, ocasionalmente o oxigênio pode receber um elétron, formando um radical superóxido e metemoglobina férrica (Fe^{3+}). Em condições fisiológicas normais, as hemácias possuem um sistema antioxidante eficiente, como a SOD e a metemoglobina redutase e o dano é reparado rapidamente.

Nas hemácias a produção de energia (ATP) ocorre principalmente através da metabolização da glicose pela via glicolítica (via de Embden-Meyerhof), no entanto a glicose pode ser desviada para outras vias catabólicas gerando produtos especializados necessários para a célula, entre elas a via da oxidação em pentose fosfato. Nesta via oxidativa, a glicose é metabolizada e produz nicotinamida adenina de nucleotídeo fosfato (NADP^+) que é um receptor de elétrons e transforma-se em NADPH, o qual é empregado nas reduções biossintéticas ou na defesa contra EROS. A transformação de glutatona reduzida (forma efetiva) para glutatona oxidada é dependente de NADPH. O GSH mantém a estrutura normal, a elasticidade e a integridade dos eritrócitos e sustenta a hemoglobina no estado ferroso, essencial para o transporte de oxigênio, assim como tem ação contra os EROs (FARHUD; YAZDANPANA, 2008). Contudo o armazenamento de sangue em baixas temperaturas ($1-6^{\circ}\text{C}$) promove a redução do metabolismo eritrocitário, ou seja, há diminuição da via glicolítica e também da produção de GSH eritrocitário, diminuindo a defesa antioxidante (DUMASWALA et al., 2000), além do armazenamento promover redução significativa das concentrações energéticas o que consequentemente afeta a produção de NADPH diminuindo a regeneração do GSH. Nessas circunstâncias, há uma maior probabilidade dos radicais superóxido e água reagirem na presença do ferro livre ou submeter-se a transformação de Fenton, aumentando a produção de radicais hidroxilas.

Os radicais hidroxilas podem prontamente provocar danos a proteínas e lipídeos das hemácias. Os lipídeos como o triacilglicerol podem ser desequilibrados para tornar biologicamente ativos em diaquil-gliceróis (SILLIMAN, 2006), podendo ocorrer oxidação ou polimerização dos lipídios das membranas celulares. As proteínas podem ter suas cadeias laterais de aminoácidos alteradas. Mudança das cadeias laterais das proteínas podem ser desde mudanças oxidativas inofensivas como a ligação da glicose a hemoglobina, até mesmo mudanças graves como a quebra da cadeia polipeptídica da proteína de Banda 3, promovendo a expressão de antígenos que marcam as hemácias, para serem removidas pelas células fagocitárias após a transfusão (HESS, 2010).

Em experimentos animais o dano oxidativo pode induzir a lise de fosfolipídios, a qual esta associada á Lesão Pulmonar Aguda Associada a Transfusão (TRALI) (HESS, 2010).

A produção de EROS durante o armazenamento de sangue ainda não está totalmente esclarecida, mas alguns estudos tem mostrado que a produção de espécies reativas não está só relacionada com o metabolismo eritrocitário, mas também com a presença ou ausência de leucócitos no sangue armazenado. Racek et al. (2001) sugeriu que os leucócitos podem atuar como fonte de produção de EROS, para comprovar tal hipótese utilizou concentrado de hemácias com elevada quantidade de leucócitos e concentrado com baixa quantidade de leucócitos, observando que o grupo com elevada quantidade de leucócitos apresentou aumento da peroxidação lipídica, pelo aumento do biomarcador MDA e diminuição da capacidade antioxidante total do plasma. Sabe-se que os leucócitos durante o armazenamento sofrem lise prematura liberando diversos imunomoduladores como a histamina, mieloperoxidase, ativador de plasminogénio inibidor-1, proteína esinofilica catiônica (NIELSEN et al., 1997), podendo causar resposta inflamatória a transfusão de sangue em humanos e cães (McMICHAEL et al, 2010; DZIK, 1993; DZIK et al., 2000).

3.4. TRANSFUSÃO DE SANGUE

A transfusão sanguínea é considerada um transplante tecidual temporário (BROOKS, 1992), sendo prática terapêutica que consiste em injetar sangue total ou seus componentes em paciente que tenha sofrido de grande perda ou que esteja afetado por doença no seu próprio sangue (LACERDA, 2005).

O valor terapêutico da transfusão sanguínea para várias enfermidades é amplamente reconhecido. Thornton (1968) considera que as transfusões sanguíneas têm a mesma importância dos agentes antimicrobianos, técnicas cirúrgicas, oxigenioterapia, anestesia e outros, como um grande fator na redução da mortalidade dos animais domésticos.

As transfusões sanguíneas podem ser classificadas como autóloga, que consiste na coleta e reintrodução do sangue do animal em suas próprias veias, homóloga, quando a coleta é feita em um animal e transfundido para outro animal da mesma espécie (mais comum) e heteróloga quando a coleta de sangue é feita em um animal de uma espécie e transfundido para outro de espécie distinta (obsoleto) (CHAVES, 2009).

As indicações para transfusão de sangue total ou de seus componentes são a necessidade do restabelecimento da capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, deficiências na hemostasia, transferência de imunidade passiva e hipoproteinemia ou hipovolêmia (REICHMANN; DEARO, 2001).

Nos traumas, nas anemias graves ou em grandes cirurgias onde ocorre perda sanguínea aguda, a função de oxigenação do sangue é mais relevante, sendo o principal indicador do momento decisivo em que a reposição volêmica deve ser realizada com sangue ou seus hemocomponentes (VANE; GANEM, 2006).

A transfusão sanguínea deve ser vista como medida terapêutica emergencial e de efeito limitado e transitório. Isto se deve ao fato do tempo de vida das hemácias transfundidas ser bastante curto, em bovinos 2 a 3 dias (RADOSTITS et al., 2007), caprinos 2,4 a 5,1 dias (SMITH; SHERMAN, 1994), suínos até 2 semanas (GINGERICH, 1986), não sendo encontrado o tempo de sobrevivência das hemácias transfundidas em ovinos.

A indicação de transfusão sanguínea para grandes animais é baseada no volume globular (VG) e na avaliação clínica, no entanto existe divergências quanto ao valor do VG crítico para o recebimento de transfusão. Collatos (1997) considera que em casos agudos o valor limite do VG é 10-12% para animais adultos, enquanto Hunt e Moore (1990) consideram VG de 7-8% para casos crônicos (HUNT; MOORE, 1990). Wardrop e Weiss (2006) consideram que para ruminantes em casos de perda sanguínea aguda o VG menor que 20% é indicativo da necessidade de transfusão, enquanto VG menor que 12% em casos crônicos.

Para que a transfusão homóloga seja bem sucedida é necessária à escolha de doadores saudáveis, de maior porte que poderão fornecer volume de sangue maior, devendo haver compatibilidade sanguínea entre doador e receptor. O volume de sangue total a ser coletado de um doador ovino deve ser de 10-15ml/kg, cerca de 20-25% do volume de sangue (REICHMANN; DEARO, 2001).

Os ovinos possuem oito sistemas de grupos sanguíneos: EAA, EAB, EAC, EAD, EAM, EAR, EAF30 e EAF41 (NGUYEN; BUNCH, 1980), no entanto alguns autores não consideram os dois últimos grupos separados, mas juntos formando o grupo sanguíneo EAX (WEISS; WARDROP, 2006). Dentro de cada grupo sanguíneo existem variações de fatores sanguíneos e número de alelos, formando uma variedade de possíveis combinações.

O sistema EAB possui maior risco de reações transfusionais, enquanto o EAR é um lipídeo encontrado no fluido corporal e adsorvido pelas hemácias, não sendo, portanto antígeno eritrocitário verdadeiro. O conteúdo de antígeno é variável entre os indivíduos (THRALL et al., 2006). Independente do número de diferentes grupos sanguíneos em ovinos, estes não apresentam ou possuem poucas hemolisinas circulantes naturalmente, e, portanto, a primeira transfusão pode ser realizada com riscos menores de ocorrerem reações adversas fatais. Cuidados devem ser tomados quando de transfusões homologas repetidas (HUNT; MOORE, 1990; SOLDAN, 1999).

Em ruminantes para se verificar a compatibilidade entre hemácias e plasma de doadores e receptores, e identificar a presença de anticorpos pré-existentes responsáveis por hemólise utiliza-se testes de reações hemolíticas, utilizando complemento. As reações cruzadas de rotina não são úteis para ruminantes, pois as hemácias destes não sofrem aglutinação. Os testes hemolíticos não estão rotineiramente disponíveis em todos os laboratórios, sendo pouco prático a utilização destes (WEISS; WARDROP, 2006).

Os anticorpos contra os antígenos presentes nos eritrócitos são componentes importantes envolvidos nas reações transfusionais, encontrados no plasma/soro são geralmente da classe IgM. Existem dois tipos de anticorpos associados à transfusão: os anticorpos de ocorrência natural e aqueles adquiridos após a exposição a outro tipo sanguíneo. Os anticorpos de ocorrência natural (aloanticorpos) estão presentes antes da exposição do animal a outro tipo sanguíneo (KRISTENSEN; FELDMAN; 1997). A síntese destes anticorpos se dá pela exposição a organismos como plantas, bactérias, protozoários e helmintos, que possuem moléculas similares ou idênticas aos antígenos encontrados na superfície dos eritrócitos e, por isso, podem levar a reação cruzada. Os anticorpos adquiridos são formados apenas após a exposição a outro tipo sanguíneo (seja por transfusão de sangue ou pela via transplacentária), quando ocorre a sensibilização e imunoestimulação para sua produção (LACERDA, 2005).

Estudos têm mostrado que os ovinos possuem três variantes de hemoglobinas conhecidas como HbAA, HbBB e HbAB (LACERDA; SOTO-BLANCO, 2006). A frequência das variantes de hemoglobina difere entre as raças de ovinos e dependem da variabilidade genética do rebanho (LACERDA; SOTO-BLANCO, 2006; LUZ, et al.; 2010).

Independente do tipo de hemoglobina, a infusão intravenosa de soluções contendo hemoglobina ou componentes hemolisados tem demonstrado efeitos adversos sobre a função renal e o sistema de coagulação (WARDROP et al, 1994a), porém o

organismo possui mecanismo de remoção. Quando a hemoglobina está presente no plasma, ocorre decomposição, no leito vascular, de sua forma tetramérica em dímeros α e β . Estes se ligam à haptoglobina que será removida pelas células parênquimais hepáticas. Quando a capacidade de ligação com a haptoglobina é excedida, esta é parcialmente removida pelas células hepáticas, mas também poderá ser excretada pelos rins ou oxidada à metahemoglobina (da qual a heme é facilmente dissociada) e que será metabolizada em globina e heme (CARVALHO et al., 2007).

Sousa et al. (2012), em estudo com transfusão sanguínea autóloga em ovinos, mostrou que a transfusão não repõe apenas hemácias, mas também proteínas totais, albumina e cálcio. Para Reichmann e Dearo (2010) a transfusão de 10-15mL de sangue total pode elevar o VG em até 3 a 4%, enquanto Sousa et al. (2009) observou aumento de 10%.

Durante o armazenamento as hemácias sofrem uma série de lesões que podem influenciar a sobrevivência pós-transfusional, no entanto supõe-se que diferentes tempos de armazenamento podem influenciar a elevação do VG pós-transfusão, assim como afetar outras variáveis hematológicas, bioquímicas e hemogasométricas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. LOCAL DO ESTUDO

O experimento foi realizado nas dependências do Centro de Pesquisa em Doenças Nutricionais e Metabólicas de Ruminantes do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ da Universidade de São Paulo - USP, Campus de São Paulo.

4.2. SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 18 ovinos (12 fêmeas e 6 machos) hígidos, mestiços da raça Santa Inês, pesando em média 52 kg, com três a quatro anos de idade.

Os animais foram selecionados pela variante de hemoglobina, onde apenas animais com hemoglobina HbAA e HbBB foram utilizados no experimento.

A determinação do tipo de hemoglobina foi realizada com auxílio do Sistema para Eletroforese Biosystems. A migração eletroforética para determinação do tipo de hemoglobina foi efetuado em fitas de acetato de celulose em meio alcalino e a leitura realizada em densitômetro para eletroforese (Zênite - Z-30), com separação manual das hemoglobinas. A variante de hemoglobina HbBB foi estabelecida como a banda lenta, enquanto a variante HbAA, a banda rápida (LACERDA; SOTO-BLANCO, 2006).

4.3. INSTALAÇÕES E ALIMENTAÇÃO

Os animais selecionados permaneceram em baias coletivas, separados pelo sexo e passaram por um período de 30 dias de adaptação. Nesse período os animais receberam aplicação de endectocida a base de moxidectina¹ na dose recomendada pelo fabricante, aplicada por via subcutânea. Além da aplicação de vacina contra clostridioses², seguida de reforço 30 dias após a primeira imunização os animais receberam coccidiostáticos³ por três dias consecutivos. Durante o período experimental

¹ Cydectin®, Fort Dodge®

² Sintotan polivalente T®- Merial Saúde Animal®

³ Coccifin®- Ouro fino Saúde Animal®

foram realizados exames de contagem de ovos por grama de fezes e coprocultura a cada 15 dias, sendo os animais vermifugados de acordo com os resultados.

Os animais foram alimentados com dieta basal calculada em 2,3% do peso vivo, composta de 75% da matéria seca de feno de capim de coast-cross e de 25% de ração concentrada comercial, a qual era fornecida fracionada duas vezes ao dia. Os ovinos foram suplementados com sal mineral e tiveram livre acesso à água. A constituição bromatológica da dieta encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição bromatológica do feno de coast-cross e do concentrado comercial oferecida aos ruminantes durante todo o período experimental.

Composição	Feno ¹	Ração Peletizada ²
% MS(matéria seca)	89,2	88
% FB (fibra bruta)	31,2	10
% PB (proteína bruta)	8,5	18
% EE (extrato etéreo)	1,8	2,5
% MM (matéria mineral)	6,4	10
% MS(matéria seca)	89,2	88

¹ Análises realizadas no Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas da FMVZ - USP.

² Informações fornecidas pelo fabricante.

4.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os 18 animais selecionados foram divididos em três grupos. Em todos os grupos os animais foram submetidos a anemia aguda sendo 24 após transfundidos com:

- G0 (Grupo controle - n=6) - Sangue total coletado no mesmo dia em bolsas CPDA-1.
- G15 (Grupo quinze dias - n=6) - Sangue total armazenado em bolsas CPDA-1 por 15 dias.
- G35 (Grupo trinta e cinco dias – n=6) - Sangue total armazenado em bolsas CPDA-1 por 35 dias.

Cada grupo experimental foi composto por 3 pares de animais (1 par de machos e 2 pares de fêmeas). Levando em consideração o tipo de hemoglobina, cada par teve um animal com hemoglobina tipo HbAA e outro com hemoglobina tipo HbBB, de maneira que animais com HbAA doaram sangue para animais com HbBB e animais com HbBB doaram sangue para animais com HbAA.

4.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Antes da indução da anemia e da transfusão de sangue os animais tiveram a região da jugular direita e esquerda tricotomizadas e passaram por assepsia da região com iodo povidine a 10%.

4.5.1. INDUÇÃO DA ANEMIA

Para a indução da anemia aguda foram retirados 40% do volume sanguíneo total, de acordo com o cálculo de 8% do peso corpóreo correspondendo ao volume total de sangue (RADOSTITS et al., 2007). Os ovinos foram mantidos em decúbito lateral esquerdo sobre uma mesa, tendo os membros contidos por cordas e o pescoço por auxiliares.

A retirada de sangue foi realizada por venipunção jugular direito utilizando-se cateter (14G), o qual foi acoplado ao equipo da bolsa de sangue coletora, sendo o volume sanguíneo retirado por gravidade. A quantidade de sangue retirada de cada animal era monitorada através de balança analítica modelo⁴ AS-2000C, com capacidade de 2000g e sensibilidade de 0,01g. Anterior ao início da coleta a bolsa coletora era pesada e seu peso tarado, sendo considerado no momento da coleta apenas o peso do sangue que entrava no sistema, cada bolsa recebeu 500g de sangue total. As bolsas coletoras eram estéreis e continham anticoagulante Citrato Fosfato Dextrose e Adenina (CPDA-1⁵).

O sangue do G15 e G35 foram armazenados em geladeira em temperatura variando entre 2 e 4°C, sendo homogeneizado por cinco minutos diariamente durante o período de conservação.

⁴ Marca da balança - Master®

⁵ Bolsas plásticas duplas CPDA-1, para coleta de sangue- Fresenius hemocare.

Tabela 2 - Composição das Bolsas de sangue tipo CPDA-1

Componente	CPDA-1
Ácido Cítrico	0,229 g
Citrato de Sódio	2,63 g
Fosfato Diácido de Sódio	0,222 g
Glicose	3,19 g
Adenina	0, 0275 g

Fonte: Fresenius hemocare do Brasil

4.5.2. TRANSFUSÃO HOMÓLOGA

Após 24 horas da indução da anemia, os animais foram submetidos à transfusão, onde receberam 20g/kg/animal de sangue total conforme Widness et al. (2000) Para tal procedimento os ovinos foram mantidos sobre uma mesa em decúbito lateral direito, contidos por cordas e manualmente por auxiliares. Após a assepsia foi realizado venopunctura da jugular com cateter 14G, sendo este acoplado a um equipo com filtro específico para transfusão e conectado a bolsa de sangue. A transfusão foi realizada por gravidade sendo a bolsa mantida em um nível superior ao da mesa.

Nos primeiros trinta minutos de transfusão o sangue foi infundido a uma velocidade de 0,25 mL/kg/30min, após esse período a velocidade era aumentada para 5ml/kg/h.

4.6. TEMPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram avaliados clínica e laboratorialmente nos seguintes tempos: T0 (vinte quatro horas após a indução da anemia e antes da transfusão); T30 (trinta minutos após a transfusão); T6 (seis horas após a transfusão); T12 (doze horas após a transfusão); T24 (24 horas após a transfusão); T48 (2 dias após a transfusão); T72 (3 dias após a transfusão); T96 (4 dias após a transfusão); T8 (8 dias após a transfusão) e T16 (16 dias após a transfusão).

Nos tempos pré-determinados acima foram avaliados os parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos, hemogasométricos, peroxidação lipídica e o estresse oxidativo. A determinação do tempo de permanência das hemoglobinas homólogas transfundidas foi avaliada após a transfusão nos momentos T30, T6, T12, T24, T48, T72, T96, T8 e T16.

4.7. AVALIAÇÃO DAS BOLSAS

Antes da transfusão foram coletadas amostras de sangue (10mL) das bolsas B0, B15 e B35 para análise hematológica, bioquímica e hemogasométrica. Os parâmetros hematológicos incluíram a determinação do volume globular, número de hemácias, leucócitos e plaquetas, concentração de hemoglobina total e hemoglobina plasmática. Os parâmetros bioquímicos analisados foram concentração de sódio, potássio, proteína total, albumina, lactato desidrogenase (LDH) e lactato, enquanto os parâmetros hemogasométricos analisados foram potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial de oxigênio (pO_2), pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2), saturação de oxigênio (SO_2) e déficit de base (BE).

4.8. PARÂMETROS AVALIADOS

4.8.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA

Nos tempos experimentais pré-estabelecidos anteriormente foram realizados exames físicos dos animais para verificação da frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal. As frequências cardíaca e respiratória foram mensuradas com auxílio de um fonendoscópio, no intervalo de um minuto, enquanto a temperatura foi aferida com o uso de termômetro clínico⁶, por três minutos.

⁶ Termômetro da marca BD.

4.8.2. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

A avaliação hematológica foi realizada através de hemograma, concentração de hemoglobina plasmática livre, tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA).

4.8.2.1. Hemograma

Para realização do hemograma foram coletadas amostras de 5 mL de sangue em tubos à vácuo (Vacutainer®) com anticoagulante ácido dietilenodiamino tetra-acético (EDTA) com capacidade de 5mL. As amostras de sangue foram analisadas em analisador hematológico Mindray (BC 2800 Vet). Sendo determinado o volume globular (VG), número de hemácias, hemoglobina total, número de leucócitos e contagem de plaquetas. Além dos índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

4.8.2.2. Concentração de hemoglobina plasmática livre

A concentração de hemoglobina plasmática foi determinada pelo método da Peroxidase conforme Standefer e Vanderjagt (1977). Para a determinação da hemoglobina plasmáticas foi coletado 5mL de sangue total em tubos com citrato de sódio, os quais foram centrifugados a 1500 g por 10 minutos, para obtenção do plasma. O plasma proveniente dessa amostra foi utilizado para a determinação da hemoglobina plasmática e para os testes de coagulação descritos posteriormente.

Em tubo de ensaio adicionou-se 20µL de plasma, o qual foi levado ao banho-maria a 37°C e incubado com 1mL de solução de peróxido de hidrogênio (0,03%) por 10 minutos. Posteriormente, o tubo foi colocado em temperatura ambiente adicionou-se 1000µL da solução de tetrametilbenzidine 0,1% (em solução de ácido acético a 90%) deixando a temperatura ambiente por 25 minutos. Após esse período foi adicionado 10mL de solução de ácido acético a 10% , sendo o tubo homogeneizado vigorosamente e a absorbância lida a 660nm em espectrofotômetro CELM (Modelo E-225D). A absorbância foi lida dentro de 20 minutos após a adição da solução de ácido acético. O branco e a amostra padrão passaram pelo mesmo processo da amostra de plasma, no entanto a concentração da solução de peróxido de hidrogênio acrescido foi mais

concentrada (0,15%). A partir dos valores da curva padrão, foi calculada a equação da reta e os valores da absorbância das amostras analisadas foram convertidos para mg/dl.

4.8.2.3. Coagulação

A partir de amostras de plasma coletado em citrato, foram analisados o Tempo de Protrombina (TP) e o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA).

Os testes de TP e TTPA foram realizados em aparelho Coagutimer III (Inlab) utilizando kits comerciais da Weiner Lab (Rosário, Argentina).

Para a determinação do TP foi adicionado 100µL em cubetas contendo barra magnética, uma solução contendo tromboplastina, cloreto de cálcio 0,0125 mol/l e cloreto de sódio para uma concentração final de 0,1mol/l por 2 minutos a 37°C, sendo adicionado posteriormente 50µL de plasma. A contagem do tempo foi iniciada imediatamente após a adição do plasma.

Para a determinação do TTPA foi adicionado 50µL de cefalina em cubetas contendo barra magnética e adicionado 50µL de plasma, após a homogeneização a amostra foi incubada a 37°C por 3 minutos e posteriormente adicionado 50µL de solução de cloreto de cálcio a 0,025 mol/l. A contagem do tempo foi iniciada imediatamente após a adição do cloreto de cálcio.

Nos dois testes o tempo decorrido para que ocorresse a coagulação foi monitorado pelo equipamento.

4.8.3. AVALIAÇÃO HEMOGASOMÉTRICA

Amostras de sangue foram coletadas por meio da venopunção jugular com agulhas descartáveis acopladas a seringas plásticas de 3mL contendo heparina sódica como anticoagulante. Após a colheita tais amostras foram acondicionadas em caixa térmica⁷ contendo gelo e água e tomou-se o cuidado, no momento da colheita, de não permitir a entrada de bolhas de ar no interior da seringa. Imediatamente após a punção do sangue fechou-se a ponta da agulha com uma tampa de borracha, para impedir a entrada ou saída de gases, segundo recomendações de Sucupira e Ortolani (2003).

⁷ Caixa térmica- isopor®

As seringas contendo 3 mL de sangue venoso e heparina sódica foram retiradas da caixa térmica com gelo e água, secas com papel absorvente e homogeneizadas antes da colocação da amostra em hemogasômetro⁸. Cada determinação foi corrigida segundo a temperatura retal do animal correspondente. Foram obtidos os valores do potencial hidrogeniônico (pH sanguíneo), pressão parcial de gás carbônico (pCO₂), pressão parcial de O₂ (pO₂) concentração de bicarbonato (HCO₃⁻), excesso de base no sangue (BE).

4.8.4. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Para a avaliação bioquímica e determinação do Malondialdeído (MDA) foram coletadas 2 amostras de sangue em tubos à vácuo sem anticoagulante, os quais foram centrifugados a 1500g por 15 minutos para a obtenção do soro. Um dos tubos de coleta, utilizado para a obtenção de soro foi envolvido com papel alumínio, para evitar o contato da luz ambiente com o soro, este foi utilizado para determinação da concentração de bilirrubinas.

As amostras de soro para análise da atividade sérica da gama-glutamyltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), creatinina, concentrações de ureia, proteínas totais, albumina, sódio e potássio após a centrifugação foram acondicionadas em microtubos⁹ transparentes. Ao passo que a alíquota de soro para análise da bilirrubina total e indireta foi acondicionado em microtubos âmbar. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C para posterior análise.

Todas as análises bioquímicas foram processadas a 37°C, no entanto os valores da atividade das enzimas AST, GGT, CK e LDH apresentados nos resultados estão corrigidos para a temperatura de 30°C, segundo recomendação de Kaneko et al. (2008).

4.8.4.1. Determinação da concentração sérica da proteína total

A concentração sérica de proteína total foi determinada pelo método do biureto e processada no analisador bioquímico automático marca Randox, (modelo RX Daytona).

⁸ Cobas 121- Roche Diagnostics

⁹ Microtubos eppendorfs®

4.8.4.2. Determinação da concentração sérica de albumina

A concentração sérica de albumina foi determinada pelo método do verde bromocresol e processada no analisador bioquímico automático marca Randox, (modelo RX Daytona).

4.8.4.3. Determinação da concentração sérica de bilirrubina total e indireta

A concentração sérica de bilirrubina total e indireta determinada em analisador bioquímico automático marca Randox, (modelo RX Daytona), utilizando kits da mesma empresa.

4.8.4.4. Determinação da atividade sérica da lactato desidrogenase (LDH)

A atividade sérica da LDH foi determinada em analisador bioquímico automático marca Randox, (modelo RX Daytona) utilizando-se kit comercial Randox[®], seguindo a técnica enzimática.

4.8.4.5. Determinação da concentração sérica de sódio e potássio

A concentração sérica de sódio e potássio foi determinada por meio de fotometria de chama, sendo as amostras de soro diluídas em água deionizada (1:200) e posteriormente lidas em fotômetro CELM.

4.8.4.6. Determinação da atividade da aspartato aminotransferase (AST)

A atividade sérica da AST foi determinada em analisador bioquímico automático marca Randox, (modelo RX Daytona) utilizando-se kit comercial Randox[®], seguindo a técnica enzimática descrita por Wroblewski e La Due (1956).

4.8.4.7. Determinação da atividade da gama glutamiltransferase (GGT)

A atividade sérica da GGT determinada no analisador bioquímico automático marca Randox, (modelo RX Daytona), utilizando-se kit comercial Randox[®], segundo técnica enzimática descrita por Szasz e Bergmeyer (1974).

4.8.4.8. Determinação da atividade da creatina quinase (CK)

A atividade de CK foi determinada através de método cinético, utilizando kit comercial Randox[®]. As amostras foram processadas em analisador bioquímico automático marca Randox, (modelo RX Daytona).

4.8.4.9. Determinação da Creatinina e do lactato

A concentração de creatinina e do lactato foram determinadas em analisador bioquímico automático marca Randox, (modelo RX Daytona), utilizando-se kit comercial Randox[®].

4.8.4.10. Determinação da concentração sérica da ureia

A concentração sérica de uréia foi determinada por método ultravioleta em analisador bioquímico automático marca Randox, (modelo RX Daytona), como descrito por Marshall (1913) e Talke e Schubert (1965).

4.8.5. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Para a avaliação da peroxidação lipídica foi analisado as concentrações de Malondialdeído (MDA), e para a avaliação do estresse oxidativo foi analisado as atividades da Glutathione reduzida (GSH), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx) e Catalase (CAT).

Foram coletadas amostras de sangue total à vácuo em dois 2 tubos de 8,5 mL contendo heparina lítica como anticoagulante, para a análise da SOD, GPx e CAT. As amostras foram centrifugadas com 2500 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a

4°C com desaceleração lenta, sendo retirado o plasma e a camada leucoplaquetária (buffycoat) e posteriormente as hemácias foram lavadas três vezes com solução de fosfato (PBS 10%), até que o sobrenadante ficasse límpido e não houvesse a presença de leucócitos na papa de hemácias. A papa de hemácia obtida das lavagens foi acondicionada em microtubos âmbar e congelada em freezer a -40°C para posterior análise de SOD e GPx. Para a análise da CAT foi retirado 200µL da papa de hemácia e adicionado a 1800µL do hemolisante EDTA- β-mercaptoetanol. Em seguida, procedeu-se o ciclo de congelamento-degelo a -20°C durante 10 min, seguido de fusão a temperatura ambiente por mais 10 min, repetindo-se o processo por duas vezes consecutivas. O hemolisado obtido foi conservado a -40°C em microtubos âmbar para posterior utilização.

Todas as análises do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica foram processadas no tempo inferior a 30 dias após o período de coleta.

4.8.5.1. Malondialdeído (MDA)

Para a determinação do MDA foi utilizado amostra de soro, segundo metodologia de Esterbauer e Cheeseman (1990).

A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de Ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido, para medir espectrofotometricamente a formação de um composto corado (base de Schiff). Para tanto se utilizou 1000µL de solução de ácido tricloroacético (TCA-10%) sendo adicionado 500µL de soro em banho de gelo. Após a desnaturação das proteínas do soro pela adição o TCA, a mistura foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 3000rpm, durante 15 minutos. Posterior a centrifugação foi retirado 750µL do sobrenadante e adicionados 700µL de TBA (1%), que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada em banho-maria a 100°C por 10 minutos e após resfriada durante 5 a 10 minutos. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância a 532 nm em espectrofotômetro. A partir dos valores da curva padrão, foi calculada a equação da reta e os valores da absorbância das amostras analisadas foram convertidos para µmol/L.

4.8.5.2. Glutationa Reduzida (GSH)

A determinação do GSH foi realizada de acordo com BEUTLER et al. (1963). Para a determinação da GSH foi utilizado sangue total coletado em tubos à vácuo

(vacuotainer®) com EDTA. Em um tubo de ensaio hemolisou-se 200µl de sangue total com 1800µl de água destilada, em seguida adicionou-se 3mL de solução precipitante (3,34 g de ácido metafosfórico, 0,44 g de EDTA Na₂H₂O, 60 g de NaCl e água destilada q.s.p 200 ml) sendo homogeneizado em vortex. Essa solução ficou em repouso por 5 minutos e depois era centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. Sendo o sobrenadante coletado para armazenamento em microtubos âmbar em freezer a -40°C até a análise.

Para determinar a concentração do GSH, adicionou-se uma alíquota de 200µl do sobrenadante obtido a 800µl de uma solução de Na₂HPO₄.12H₂O (300 mmoles/l). Após a homogeneização, adicionou-se 100µl de solução de DTNB (ácido 2-dinitrobenzóico) 0,05% ao sistema, realizando-se leitura a 412 nm em até 30 segundos após a adição DTNB. A partir dos valores da curva padrão, foi calculada a equação da reta e os valores da absorbância das amostras analisadas foram convertidos para mg/dL.

4.8.5.3. Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase (GPx)

As atividades séricas de SOD e GPx foram determinadas em analisador bioquímico automático marca Randox, (modelo RX Daytona) utilizando-se kits comerciais Randox® (RANSOD e RANSEL), como descrito por Woolliams et al. (1983) e Paglia e Valentine (1967) respectivamente.

As amostras de papa de hemácia foram descongeladas e centrifugadas por 3 minutos a 13000 rpm e posteriormente diluídas em água deionizada gelada (300µL de papa de hemácia: 300µL de água) para obtenção do hemolisado, sendo realizada diluições posteriores de acordo com a avaliação pretendente.

Para determinação da concentração de SOD: 50µL do hemolisado foi diluído em 950µL de tampão fosfato e homogeneizado em vortex, sendo retirada uma alíquota de 100µL dessa solução e diluído novamente em 900µL de tampão fosfato. Após essas diluições a amostra foi analisada em analisador automático.

Para determinação da concentração de GPx: 50µL do hemolisado foi diluído em 450µL de diluente para GPx e homogeneizado em vortex, sendo retirada uma alíquota de 20µL dessa solução e diluído novamente em 480µL de diluente para GPx. Após essas diluições a amostra foi analisada em analisador automático.

4.8.5.4. Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada utilizando-se sua função de dismutar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Tal análise foi realizada através do decaimento de H_2O_2 conforme descrito por Aebi (1984).

Para determinação da concentração da catalase foram utilizados 200 μ L do hemolisado armazenado a $-40^{\circ}C$, o qual foi diluído em 2900 μ L de água deionizada e homogeneizado, sendo retirado 20 μ L desta solução e adicionado ao meio de reação contendo Tris-HCl e água oxigenada. Sendo a absorbância dessa solução lida a cada 1 minuto por 6 minutos em espectrofotômetro Varian (Cary 50 Bio) a 232nm. A media das absorbâncias avaliadas durante os 6 minutos foram corrigidas por um fator de correção de queda da atividade por diluição do hemolisado (0,071), multiplicado pelo valor do caminho óptico da cubeta (1cm), dividido pela quantidade da amostra utilizada no ensaio (0,02mL), o valor resultante é dividido pelo valor da diluição utilizada 15,5 (200 μ L do hemolisado: 2900 μ L de água deionizada). O valor final foi corrigido pela hemoglobina do hemolisado, sendo os dados expressos em U/ mg Hb.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para se conhecer a distribuição dos dados obtidos nas diversas variáveis estudadas os mesmos foram submetidos ao teste de Kolmogorov e Smirnov.

A análise estatística para comparação entre as bolsas dos três grupos antes da transfusão foi realizada por meio de análise de variância seguida do teste de Tukey para comparação de médias. A avaliação dos animais após a transfusão nos diferentes momentos foi realizada por meio de análise de variância de duas vias com medidas repetidas no tempo (Two-way repeted mensure ANOVA), seguida de teste de comparação de médias de Bonferroni, considerando a comparação entre os grupos nos diferentes tempos e a comparação entre o T0 e os tempos subsequentes.

Para estudar a influência das relações entre duas variáveis foram calculadas os coeficientes de determinação (R^2) e de correlação (r). Adotou-se um grau de significância de 5 % (SAMPAIO, 2002).

5. RESULTADOS

Os resultados das diferentes variáveis obtidos durante o experimento serão expressos por meio das médias e desvios. Desta forma, foram alocados em Tabelas e gráficos com a finalidade de facilitar a leitura deste capítulo.

5.1. AVALIAÇÃO DAS BOLSAS

A temperatura média de armazenamento das bolsas de sangue foi de $2,9^{\circ}\text{C} \pm 0,5$.

5.1.1. Avaliação Hemogasométrica

As bolsas de sangue armazenadas por 35 dias (B35) apresentaram menores valores do pH sanguíneo, aumento da PO_2 , PCO_2 , do déficit de base e da saturação de oxigênio.

Tabela 3 – Média e desvio padrão das variáveis hemogasométricas do sangue total armazenado em bolsa CPDA-1 imediatamente após a coleta (B0), armazenado por quinze dias (B15) e armazenado por 35 dias (B35).

Variável	B0	B15	B35
pH	7,109 ^A	6,959 ^B	6,943 ^C
DP	67,6	42,4	26,7
PO_2 (mmHg)	49,98 ^C	58,81 ^B	90,51 ^A
DP	1,03	7,11	14,56
PCO_2 (mmHg)	58,00 ^C	68,68 ^B	72,73 ^A
DP	3,05	5,05	3,05
Bicarbonato (mmol/L)	20,56	16,12	15,45
DP	1,47	3,56	0,76
SO_2 (%)	59,45 ^C	66,86 ^B	78,38 ^A
DP	1,13	10,63	9,48
BE (mmol/L)	-14,38 ^C	-16,38 ^B	-20,88 ^A
DP	2,46	4,41	2,19

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

5.1.2. Avaliação Hematológica

Não foi observada diferença estatística entre os grupos para o volume globular, número de hemácias, hemoglobina total, VCM e plaquetas. No entanto, o grupo B35 apresentou maiores valores da hemoglobina plasmática e redução significativa do número de leucócitos.

Tabela 4 – Média e desvio padrão das variáveis hematológicas do sangue total armazenado em bolsa CPDA-1 imediatamente após a coleta (B0), armazenado por quinze dias (B15) e armazenado por 35 dias (B35).

Variável	B0	B15	B35
Volume Globular (%)	29,89	28,44	31,33
<i>DP</i>	2,84	3,30	2,23
Número de Hemácias ($\times 10^6$)	8,42	8,38	9,43
<i>DP</i>	1,17	1,00	0,90
Hemoglobina (g/dL)	9,68	9,77	9,93
<i>DP</i>	0,86	1,28	0,92
Hemoglobina plasmática (mg/dL)	9,39 ^C	24,66 ^B	57,11 ^A
<i>DP</i>	1,82	15,51	15,56
VCM (fL)	24,04	34,23	33,32
<i>DP</i>	15,35	3,33	1,37
CHCM (g/dL)	58,34 ^A	34,27 ^B	31,65 ^C
<i>DP</i>	30,65	1,35	1,57
Número de Leucócitos ($\times 10^3$)	6,37 ^A	4,58 ^B	3,85 ^C
<i>DP</i>	1,14	1,74	0,89
Plaquetas ($\times 10^3$)	157,39	134,28	105,58
<i>DP</i>	38,85	35,98	22,13

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

5.1.3. Avaliação Bioquímica

As bolsas armazenadas por 35 dias apresentaram maiores valores de potássio, lactato e menores de sódio.

Tabela 5 – Média e desvio padrão das variáveis bioquímicas do sangue total armazenado em bolsa CPDA-1 imediatamente após a coleta (B0), armazenado por quinze dias (B15) e armazenado por 35 dias (B35).

Variável	B0	B15	B35
Sódio (mmol/L)	149,30 ^A	146,67 ^B	137,78 ^C
<i>DP</i>	5,12	8,35	8,17
Potássio (mmol/L)	4,37 ^C	9,43 ^B	15,41 ^A
<i>DP</i>	1,10	3,87	4,57
Lactato (mg/dL)	39,12 ^C	75,20 ^B	86,54 ^A
<i>DP</i>	8,06	13,10	23,86
Proteína total (g/L)	61,40	67,50	67,50
<i>DP</i>	0,32	0,60	1,13
Albumina (g/L)	25,80	26,80	26,90
<i>DP</i>	0,19	0,23	0,22
Lactato Desidrogenase (U/L)	103,46	101,64	95,48
<i>DP</i>	75,70	101,70	85,38

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

5.2. AVALIAÇÃO CLÍNICA

5.2.1. Observações Clínicas

O peso médio dos animais, o volume transfundido e a duração da transfusão não diferiram entre os grupos experimentais.

Tabela 6 – Média e desvio padrão do peso, volume transfundido e tempo de transfusão dos ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Variável	G0	G15	G35
Peso Animal (kg)	55	51,53	52,21
<i>DP</i>	3,38	10,60	4,40
Volume Transfundido (L)	1100,00	1030,60	1042,60
<i>DP</i>	67,53	212,08	88,20
Tempo de Transfusão (horas)	3,11	2,55	2,51
<i>DP</i>	1,30	0,88	0,89

Todas as ocorrências clínicas durante a transfusão estão dispostas na tabela 10. A micção e a defecação foram às observações clínicas mais frequentes nos três grupos. Nos animais do G0 e G35 esta observação só foi constatada uma única vez em cada grupo, diferentemente do G15 onde três animais tiveram mais de duas micções durante o período transfusional. Apenas no G35 ocorreram sudorese e manifestação de timpanismo leve durante a transfusão.

Tabela 7 - Ocorrências clínicas constatadas nos ovinos durante a transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Variável	G0	G15	G35
Micção	5/6	6/6	4/6
Defecação	1/6	5/6	2/6
Taquipnéia	-	1/6	2/6
Fasciculações	-	1/6	1/6
Sudorese	-	-	1/6
Timpanismo	-	-	1/6
Ejaculação	-	-	1/6

5.2.2. Frequência Cardíaca

A Tabela 8 apresenta os valores médios e os respectivos desvios padrão da frequência cardíaca. O gráfico 1 ilustra o comportamento dessa variável no decorrer do experimento.

Não houve diferença significativa entre os três grupos. Na comparação entre tempos houve redução significativa da frequência cardíaca após 8 dias da transfusão no G0.

Tabela 8 - Média e desvio padrão da Frequência cardíaca (batimentos/minutos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	123,0 ^a	22,6	121,3	32,3	106,0	7,9
T30	129,7 ^a	26,0	114,0	20,0	100,2	29,4
T6	111,3 ^a	27,8	102,0	14,4	113,3	9,0
T12	101,3 ^a	13,7	99,6	1,9	114,3	29,1
T24	98,0 ^a	31,8	98,33	13,6	99,3	23,9
T48	104,0 ^a	18,2	103,0	27,4	82,6	12,3
T72	96,6 ^a	20,7	92,0	16,5	93,3	16,7
T96	92,0 ^a	21,6	96,8	111,5	83,3	14,8
T8d	96,0 ^b	14,9	92,6	7,3	86,6	17,6
T16d	78,0 ^b	9,2	94,0	18,0	84,0	13,6

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

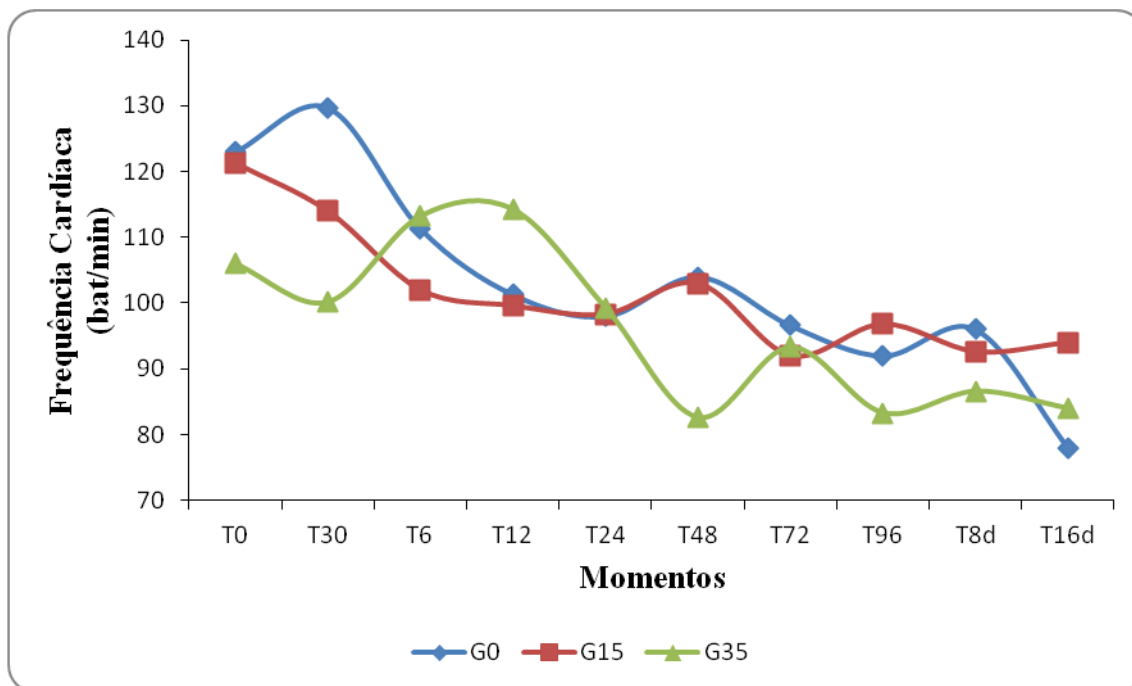


Figura 1- Média da Frequência cardíaca (batimentos/minutos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.2.3. Frequência Respiratória

Os resultados médios e desvios padrão da frequência respiratória ao longo do experimento estão expostos na Tabela 9 e no Gráfico 2.

Tabela 9 - Média e desvio padrão da Frequência respiratória (movimentos/minuto) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	32,00	26,05	42,50	31,09	26,67	5,47
T30	43,83	23,63	39,33	39,79	20,00	2,19
T6	42,00	22,16	41,33	39,39	30,83	11,18
T12	32,67	24,19	37,67	30,94	28,67	9,27
T24	29,33	11,22	39,67	39,89	34,67	11,22
T48	32,67	16,08	45,67	51,20	27,33	11,15
T72	32,67	9,93	47,00	30,87	28,00	4,38
T96	36,00	17,89	38,50	36,32	30,00	16,92
T8d	35,67	21,78	42,00	28,48	22,67	5,47
T16d	35,00	25,44	46,67	27,79	23,33	9,61

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.
Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

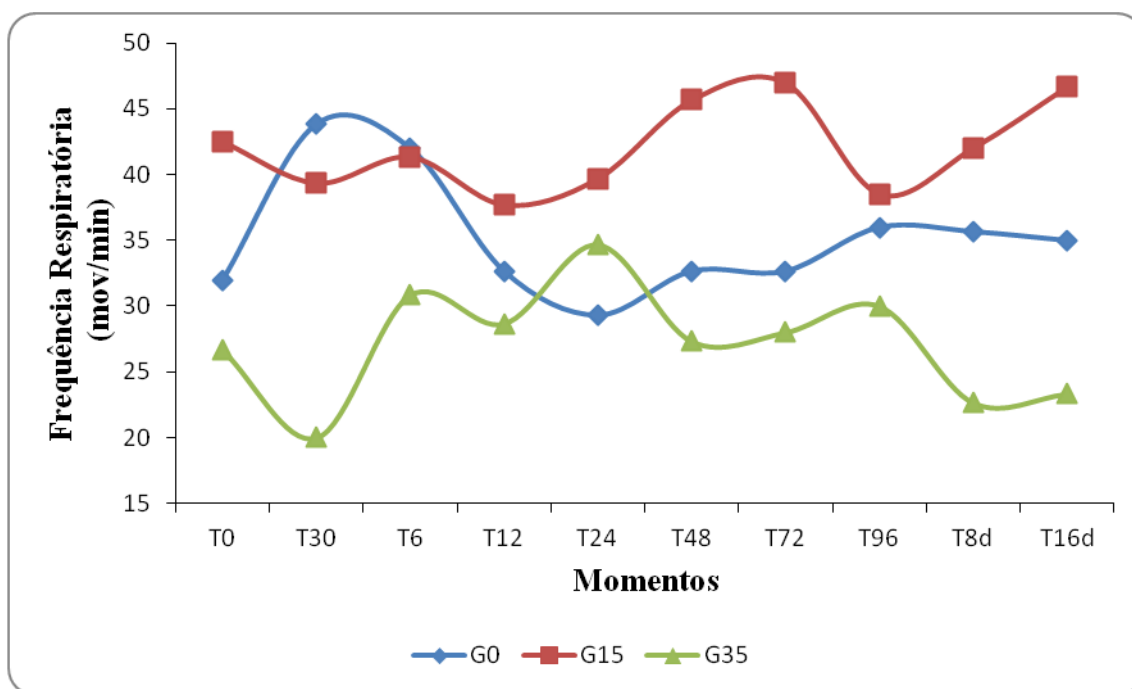


Figura 2 - Média da Frequência respiratória (movimentos/minuto) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.2.4. Temperatura

A tabela 10 apresenta os valores médios da temperatura nos diferentes momentos de avaliação clínica enquanto que gráfico 3 ilustra o comportamento dessa variável ao longo do experimento. Na avaliação entre grupos observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da temperatura no G15 quatro dias pós-transfusão.

Tabela 10 - Média e desvio padrão da temperatura (°C) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	38,2	0,56	38,4	0,57	38,2	0,57
T30	38,8	0,26	38,9	0,34	38,7	0,35
T6	38,9	0,53	39,0	0,54	39,0	0,50
T12	38,4	0,48	38,7	0,61	38,5	0,56
T24	38,5	0,39	38,8	0,41	38,9	0,43
T48	38,9	0,59	38,8	0,39	38,7	0,42
T72	38,7	0,45	38,5	1,30	38,5	0,29
T96	39,3 ^B	0,76	40,2 ^A	2,05	38,5 ^{AB}	0,23
T8d	39,2	0,55	37,8	2,88	38,3	0,47
T16d	38,7	0,54	37,5	2,71	38,2	0,62

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

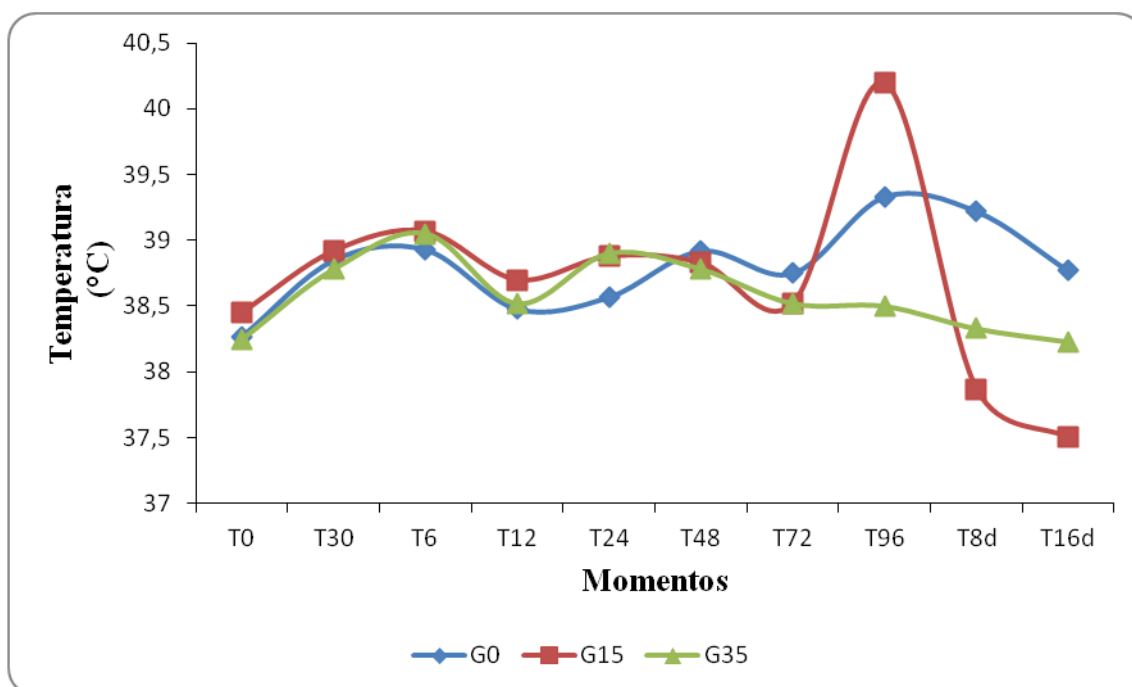


Figura 3 - Média da temperatura (°C) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.3. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

5.3.1. Volume Globular (VG)

A tabela 11 apresenta os resultados dos valores médios e respectivos desvios padrão do volume globular dos animais dos grupos G0, G15 e G35 no decorrer do experimento.

Com relação ao volume globular não se observou diferença entre grupos. A avaliação entre tempos mostrou aumento significativo do volume globular no G0 e G35 a partir do T30, enquanto no G15 ocorreu aumento seis horas pós-transfusão.

Tabela 11 - Média e desvio padrão do Volume globular (%) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	17,53 ^a	5,89	17,77 ^a	2,29	16,93 ^a	4,26
T30	25,03 ^b	6,32	22,07 ^a	2,43	24,42 ^b	3,03
T6	28,05 ^b	4,40	23,27 ^b	2,63	25,73 ^b	3,95
T12	29,13 ^b	5,22	25,17 ^b	2,34	23,12 ^b	3,55
T24	28,77 ^b	5,83	24,35 ^b	3,04	24,62 ^b	3,05
T48	28,30 ^b	3,95	23,32 ^b	2,13	25,58 ^b	3,65
T72	25,37 ^b	4,26	23,77 ^b	2,73	23,07 ^b	2,44
T96	26,78 ^b	4,74	23,25 ^b	2,30	21,17 ^a	4,14
T8d	24,92 ^b	5,28	25,05 ^b	5,57	22,15 ^a	1,99
T16d	28,08 ^b	4,11	28,37 ^b	3,07	24,93 ^b	3,41

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

O gráfico 4 ilustra o comportamento desta variável ao longo do experimento.

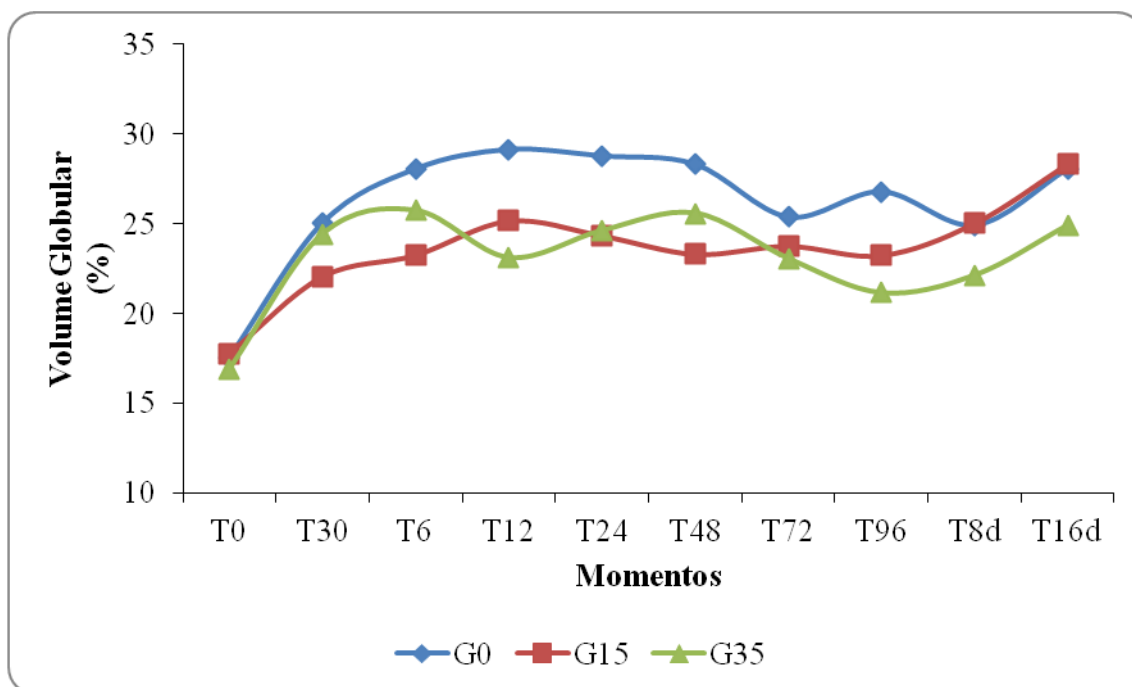


Figura 4 - Média do Volume globular (%) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.3.2. Número de Hemácias

Nos três grupos analisados observou-se diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de hemácias no T96, sendo que o G35 apresentou menores valores. Na comparação entre tempos, a partir da primeira meia-hora pós-transfusional ocorreu aumento significativo no número de hemácias, nos tempos posteriores observou-se esse mesmo padrão até o T96. Os menores valores para o número de hemácias foi observado no quarto dia pós-transusão no G15 e G35, diferentemente do G0 que o menor valor ocorreu no T8d.

Tabela 12 - Média e desvio padrão do Número de hemácias ($\times 10^6$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	4,82 ^a	1,41	5,10 ^a	1,05	4,63 ^a	1,36
T30	6,81 ^b	1,38	6,53 ^b	1,17	7,00 ^b	1,25
T6	7,64 ^b	0,77	6,94 ^b	1,24	7,56 ^b	1,16
T12	7,89 ^b	0,98	7,44 ^b	0,75	6,99 ^b	1,19
T24	7,76 ^b	1,11	7,24 ^b	1,36	7,16 ^b	0,77
T48	7,37 ^b	0,68	6,87 ^b	1,00	7,84 ^b	0,88
T72	6,88 ^b	0,99	6,86 ^b	1,37	7,18 ^b	0,81
T96	7,07 ^{Ab}	0,94	6,60 ^{Bb}	1,20	6,30 ^{BCb}	1,44
T8d	6,49 ^b	1,12	6,95 ^b	1,93	6,61 ^b	0,85
T16d	7,21 ^b	0,58	7,52 ^b	1,43	7,07 ^b	1,21

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.
Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

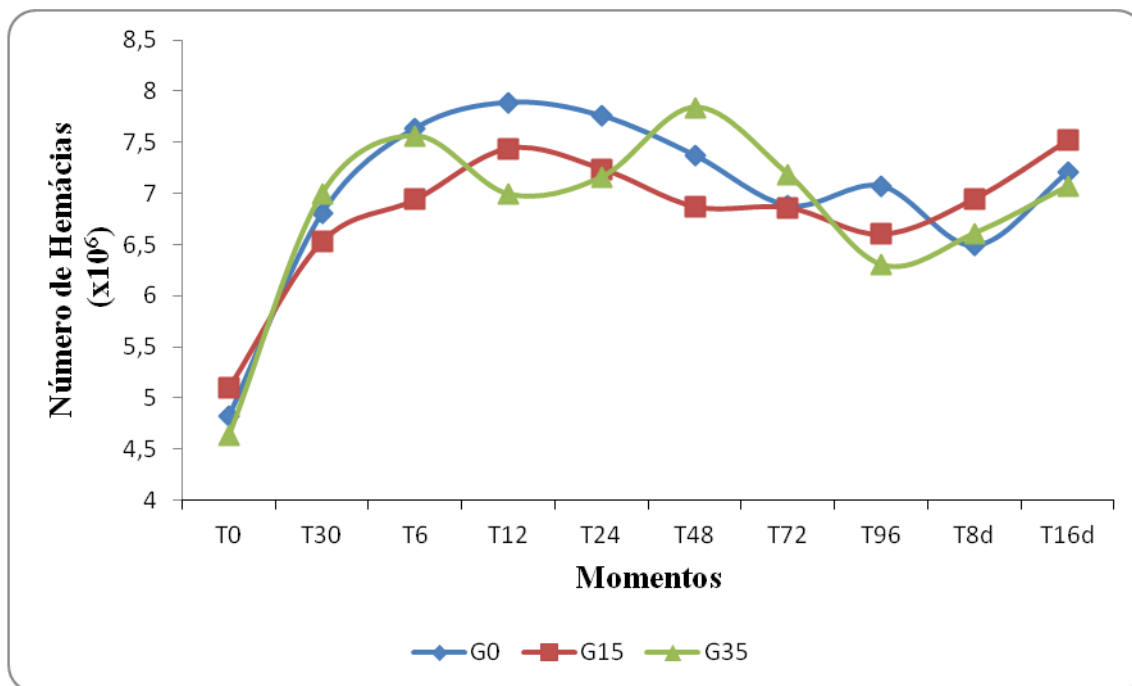


Figura 5 - Média do Número de hemácias ($\times 10^6$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.3.3. Concentração de Hemoglobina Total

A tabela 13 apresenta os resultados dos valores médios e respectivos desvios-padrão da hemoglobina total média dos animais no decorrer do experimento. O gráfico 6 apresenta o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

Não se observou diferença estatística entre grupos ($p>0,05$). No entanto na comparação entre tempos notou-se aumento da hemoglobina total a partir do T30 nos G0 e G15, enquanto no G15 só ocorreu aumento significativo a partir do T6.

Tabela 13 - Média e desvio padrão da concentração de Hemoglobina total (g/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	6,38 ^a	2,03	5,73 ^a	0,94	4,88 ^a	1,20
T30	8,61 ^b	2,13	7,36 ^a	1,08	7,43 ^b	0,79
T6	9,63 ^b	1,56	8,01 ^b	0,99	8,30 ^b	1,49
T12	10,05 ^b	2,04	8,31 ^b	0,90	7,60 ^b	1,18
T24	9,53 ^b	2,13	8,35 ^b	1,19	7,96 ^b	0,81
T48	9,23 ^b	1,68	7,91 ^b	1,04	9,66 ^b	1,15
T72	8,28 ^b	1,48	8,00 ^b	1,47	8,85 ^b	1,08
T96	9,00 ^b	1,66	7,55 ^b	0,96	8,16 ^b	1,37
T8d	8,28 ^b	1,63	8,08 ^b	1,89	8,48 ^b	0,55
T16d	9,90 ^b	0,92	9,25 ^b	0,43	9,46 ^b	1,31

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

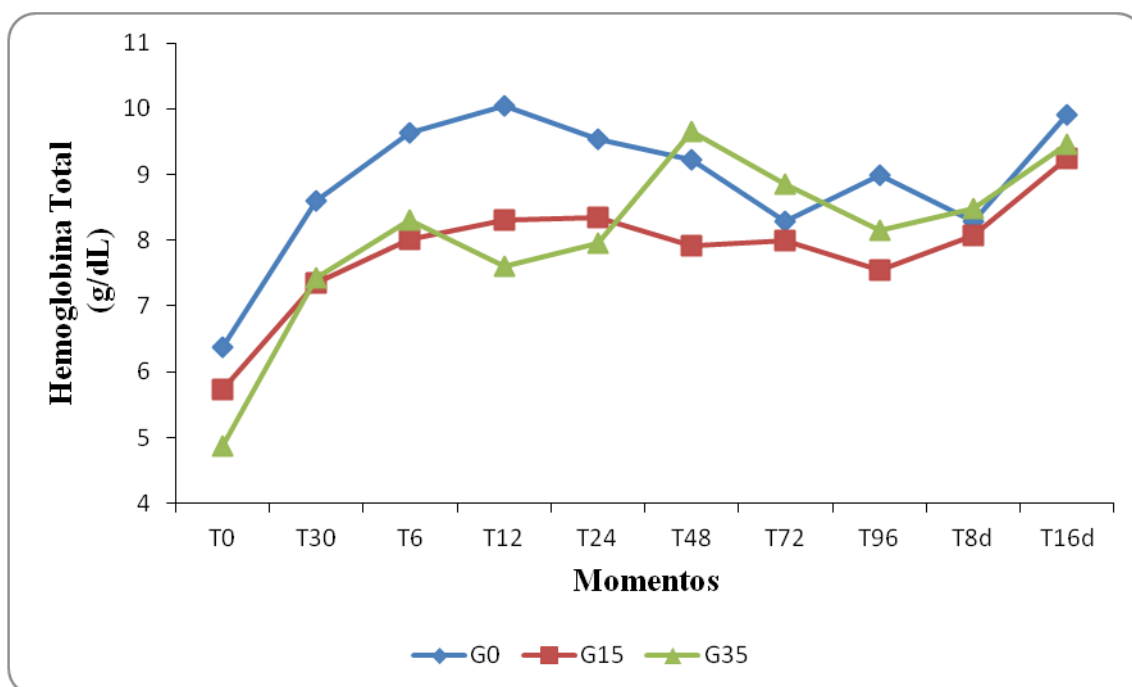


Figura 6 - Média da concentração de Hemoglobina total (g/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.3.4. Hemoglobina Plasmática

A tabela 14 apresenta os resultados dos valores médios e respectivos desvios-padrão da concentração da hemoglobina plasmática dos animais nos três grupos experimentais.

Inicialmente não houve diferença entre as concentrações da hemoglobina plasmática, no entanto, observou-se aumento significativo ($p < 0,0001$) desta variável 12 horas (T12) após a transfusão sanguínea no G35 quando comparado com o G0, não havendo diferença entre as concentrações de hemoglobina entre G0 e G15. Na comparação entre tempos houve aumento significativo da hemoglobina plasmática no T30, T6 e T12 do G35.

Tabela 14 - Média e desvio padrão da concentração de Hemoglobina plasmática (mg/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	10,39	4,71	10,57	3,49	10,01 ^a	6,99
T30	19,01	3,56	22,41	5,83	27,70 ^b	5,91
T6	29,35	7,33	31,39	4,23	44,09 ^b	16,36
T12	19,39 ^C	8,31	22,24 ^{BC}	7,58	59,98 ^{Ab}	45,29
T24	26,32	19,69	9,57	3,84	26,38 ^a	10,55
T48	20,04	9,38	16,90	8,33	16,33 ^a	6,83
T72	24,8	25,85	13,01	5,49	11,4 ^a	6,36
T96	13,03	5,98	14,12	5,54	15,75 ^a	10,40
T8d	6,85	2,02	16,45	14,07	18,86 ^a	20,13
T16d	24,51	13,69	23,98	7,18	22,40 ^a	17,22

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.
Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

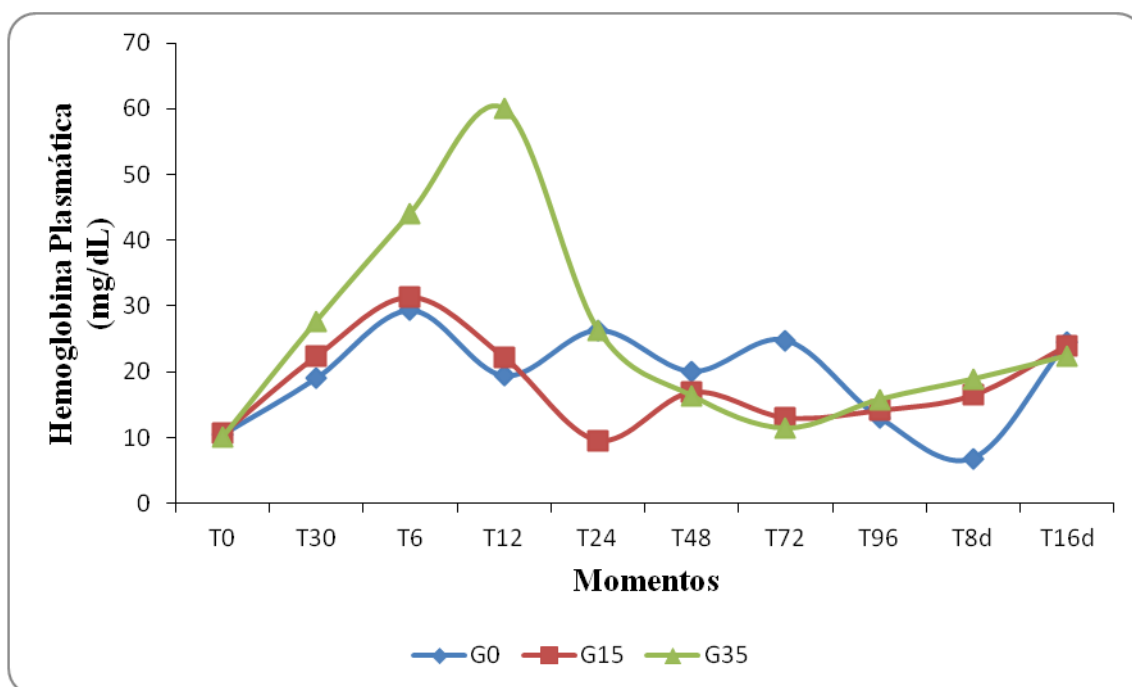


Figura 7 - Média da concentração de Hemoglobina plasmática (mg/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.3.5. Volume Corpuscular Médio (VCM)

Os valores médios e os respectivos desvios padrão do VCM no decorrer do experimento podem ser vistos na tabela 15. O gráfico 8 apresenta o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

O VCM do G0 aumentou significativamente no T24, quando comparado com o G35. No G35 no momento T48 houve redução significativa ($p>0,05$) do VCM.

Tabela 15 - Média e desvio padrão da concentração do Volume corpuscular médio (fL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	37,5	4,61	35,02	3,65	35,57 ^a	4,27
T30	36,62	3,44	33,40	4,02	34,10 ^a	2,41
T6	37,77	4,66	33,93	3,22	33,65 ^a	2,08
T12	38,05	4,41	33,98	3,11	32,12 ^a	2,65
T24	38,73 ^A	2,98	34,07 ^{AB}	3,06	32,15 ^{Ba}	2,94
T48	37,57	2,96	34,28	2,83	31,63 ^b	2,27
T72	36,85	2,33	34,80	3,11	31,97 ^a	2,60
T96	38,30	2,45	35,75	3,35	33,40 ^a	3,86
T8d	38,9	1,24	36,87	3,05	35,87 ^a	3,66
T16d	38,97	2,49	37,72	3,81	36,50 ^a	3,57

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.
Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

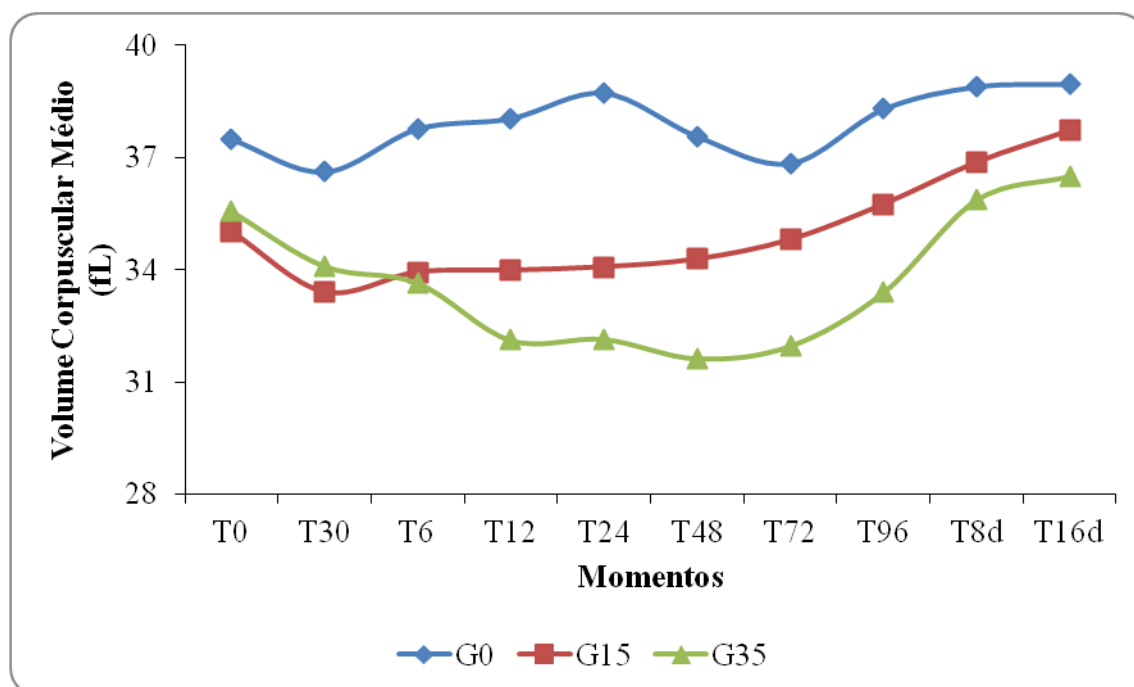


Figura 8 - Média da concentração do Volume corpuscular médio (fL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.3.6. Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

Os valores médios e os respectivos desvios padrão da CHCM no decorrer do experimento podem ser vistos na tabela 16. O gráfico 9 apresenta o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

Na comparação entre grupos, o CHCM foi significativamente menor no T0 e T30 do G35, no entanto nos momentos T48, T72, T96 e T8d ocorreram aumento. Na avaliação entre os tempos houve aumento significativo do CHCM a partir do T6 seguindo o mesmo padrão nos tempos subsequentes.

Tabela 16 - Média e desvio padrão da concentração da Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	33,22 ^A	1,08	32,25 ^{AB}	2,01	28,82 ^{Ba}	0,70
T30	34,60 ^A	2,92	32,63 ^{AB}	1,68	30,45 ^{Ba}	0,74
T6	34,27	0,73	34,30	1,49	32,38 ^b	2,54
T12	34,43	2,71	33,57	1,14	32,92 ^b	1,97
T24	32,22	1,97	33,50	1,04	32,45 ^b	2,14
T48	32,53 ^B	2,65	34,22 ^{BC}	1,42	38,03 ^{Ab}	3,68
T72	32,58 ^B	1,02	33,70 ^{BC}	2,03	38,35 ^{Ab}	2,63
T96	33,55 ^B	2,13	32,57 ^{BC}	1,87	37,82 ^{Ab}	2,41
T8d	33,35 ^B	2,37	32,05 ^{BC}	1,04	38,37 ^{Ab}	1,49
T16d	35,43	1,93	32,38	2,89	37,93 ^b	1,55

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.
Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

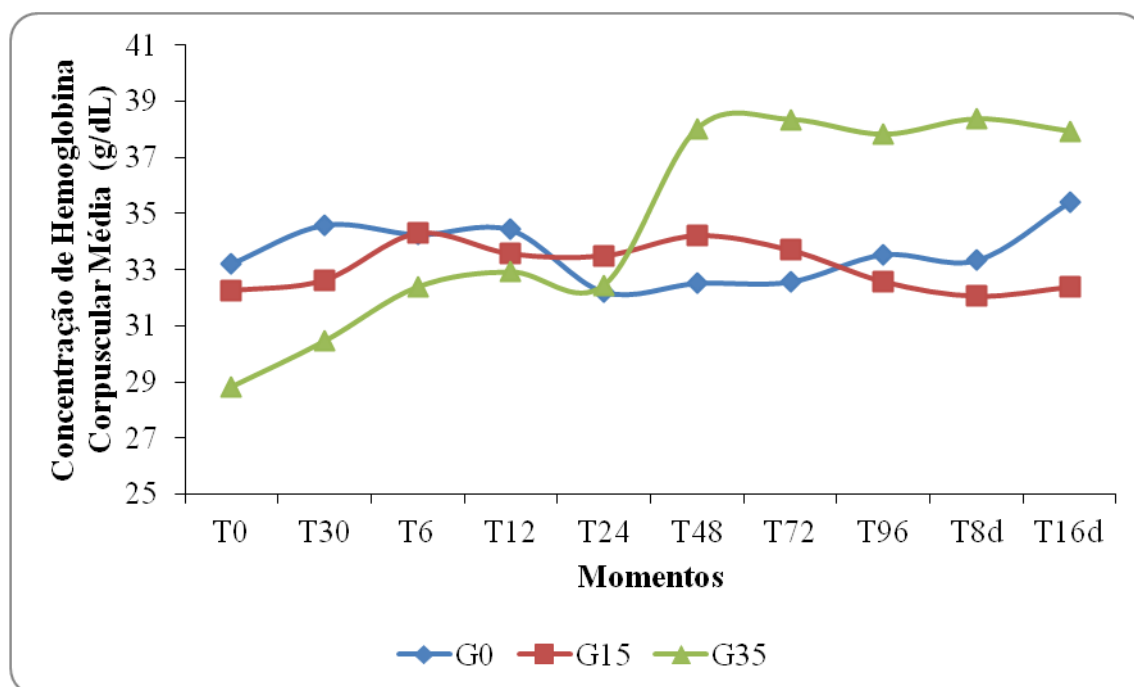


Figura 9 - Média da concentração da Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.3.7. Número de Leucócitos

Na tabela 17 encontramos os valores médios e desvios padrão do número de leucócitos. O gráfico 11 ilustra o comportamento desta variável no decorrer do experimento.

Na comparação entre grupos houve aumento significativo dos leucócitos totais no T6 no G35 e no T8d no G15.

Tabela 17 - Média e desvio padrão do número de leucócitos ($\times 10^3$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	9,04	1,03	7,23	3,41	7,35	2,65
T30	7,09	1,86	5,47	0,56	6,47	2,42
T6	8,34 ^{AB}	1,99	5,84 ^B	0,79	10,69 ^A	2,69
T12	9,71	1,06	7,07	2,49	10,53	3,07
T24	8,55	2,72	7,07	2,26	9,03	2,48
T48	6,48	1,23	6,46	1,81	6,75	2,75
T72	5,71	1,20	6,53	2,50	6,91	2,65
T96	5,83	1,34	6,06	2,20	6,98	3,06
T8d	6,03 ^{AB}	0,68	10,34 ^A	5,07	5,13 ^B	0,98
T16d	5,64	1,13	6,61	3,73	5,10	2,07

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

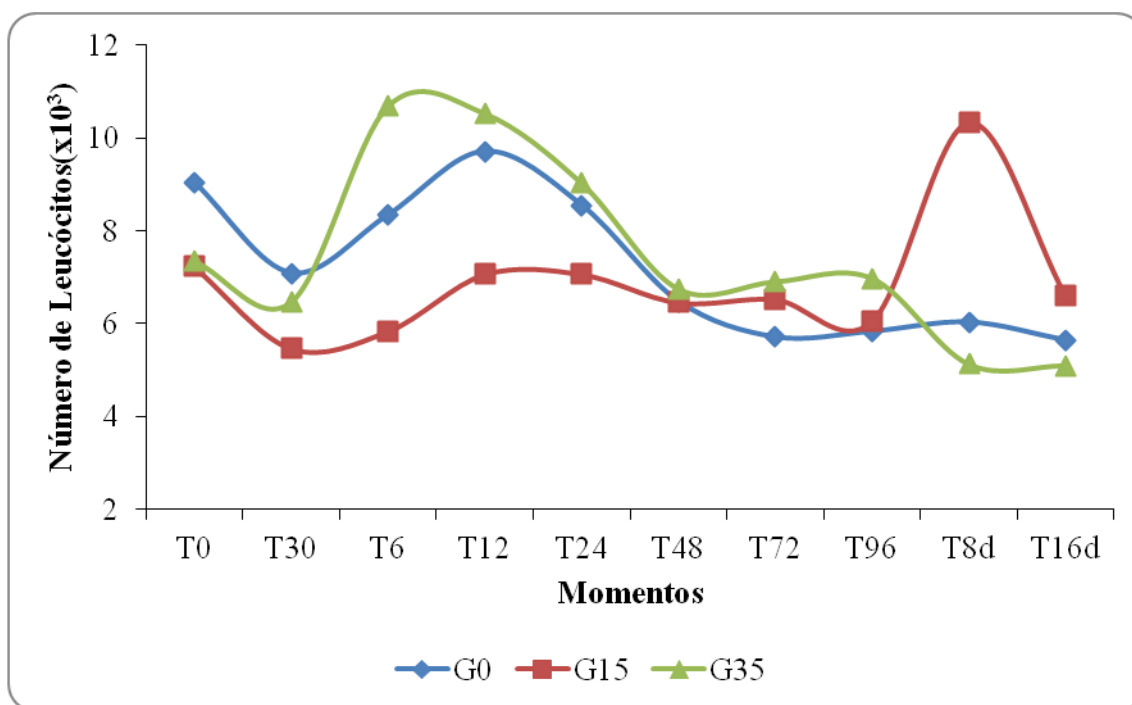


Figura 10 - Média do número de leucócitos ($\times 10^3$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.3.8. Número de Plaquetas

Na tabela 18 encontramos os valores médios e desvios padrão do número de plaquetas. O gráfico 12 ilustra o comportamento desta variável no decorrer do experimento.

Não houve diferença entre grupos. Na comparação entre tempos ocorreu aumento significativo nos momentos logo após a transfusão no G0, enquanto no G15 o aumento no número de plaquetas ocorreu no T96.

Tabela 18 - Média e desvio padrão do Número de plaquetas ($\times 10^3$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	159,0 ^a	43,76	212,2 ^a	80,41	195,2	69,55
T30	176,7 ^b	62,95	126,3 ^a	39,29	128,0	52,18
T6	156,0 ^a	34,85	141,3 ^a	43,99	158,7	49,23
T12	187,7 ^b	56,78	245,3 ^a	199,55	107,3	55,26
T24	159,7 ^a	35,72	182,0 ^a	55,47	191,7	82,59
T48	214,0 ^b	56,40	263,0 ^a	145,83	182,8	68,83
T72	246,0 ^b	93,74	304,3 ^a	110,01	188,8	66,69
T96	307,0 ^b	98,22	369,5 ^b	105,45	267,3	81,04
T8d	288,5 ^b	45,82	318,3 ^a	54,32	254,2	76,17
T16d	270,0 ^b	128,04	265,5 ^a	108,88	205,2	51,10

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

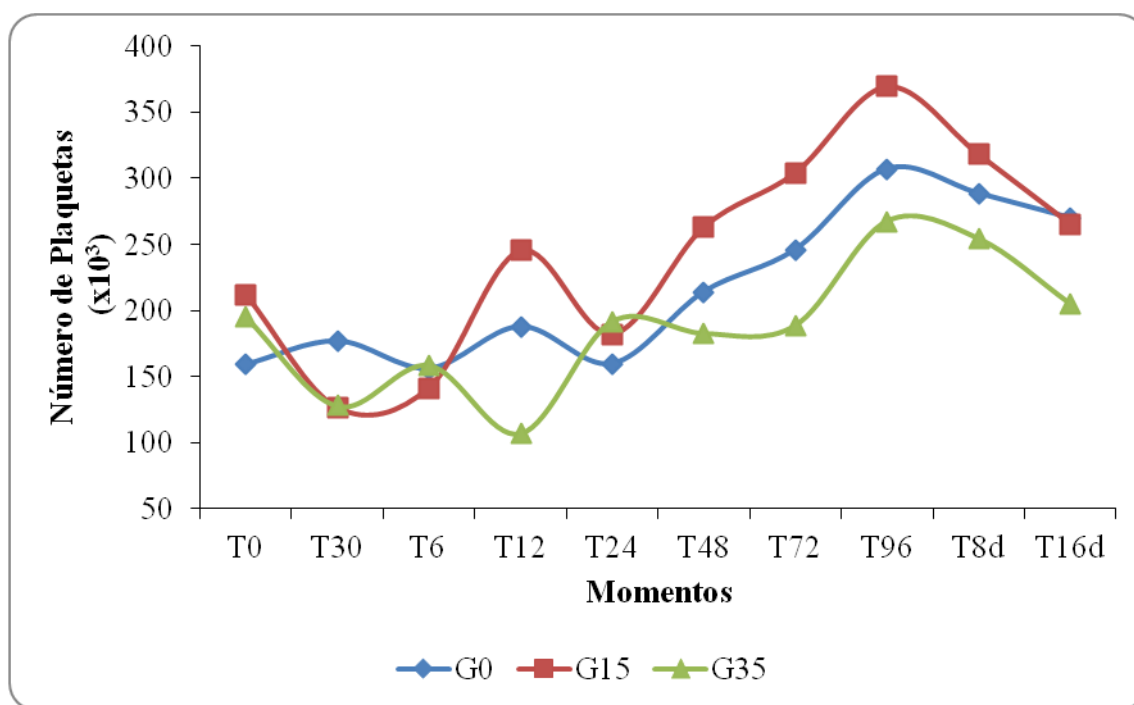


Figura 11 - Média do Número de plaquetas ($\times 10^3$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.4. AVALIAÇÃO HEMOGASOMÉTRICA

5.4.1. Potencial Hidrogeniônico (pH)

Antes da transfusão (momentos basais) não houve diferença entre os três grupos, no entanto com o passar do tempo evidenciaram-se diferenças estatísticas.

O G35 apresentou redução significativa nos momentos T6 ($p < 0,05$) e no T48 ($p < 0,0001$), enquanto o G15 apresentou redução significativa ($p < 0,01$) no T48 quando comparado com G35. Entre os tempos o pH aumentou significativamente 48 horas pós-transfusão no G35.

Tabela 19 - Média e desvio padrão do pH venoso de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	7,479	0,03	7,437	0,07	7,410 ^a	0,04
T30	7,495	0,04	7,476	0,03	7,426 ^a	0,03
T6	7,489 ^A	0,03	7,433 ^{AB}	0,05	7,385 ^{Ba}	0,06
T12	7,465	0,05	7,448	0,02	7,395 ^a	0,02
T24	7,463	0,03	7,444	0,03	7,385 ^a	0,07
T48	7,437 ^A	0,04	7,405 ^{AC}	0,03	7,290 ^{Bb}	0,14
T72	7,421	0,05	7,425	0,03	7,418 ^a	0,05
T96	7,417	0,04	7,370	0,04	7,382 ^a	0,08
T8d	7,404	0,03	7,377	0,07	7,344 ^a	0,02
T16d	7,395	0,04	7,371	0,07	7,423 ^a	0,05

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

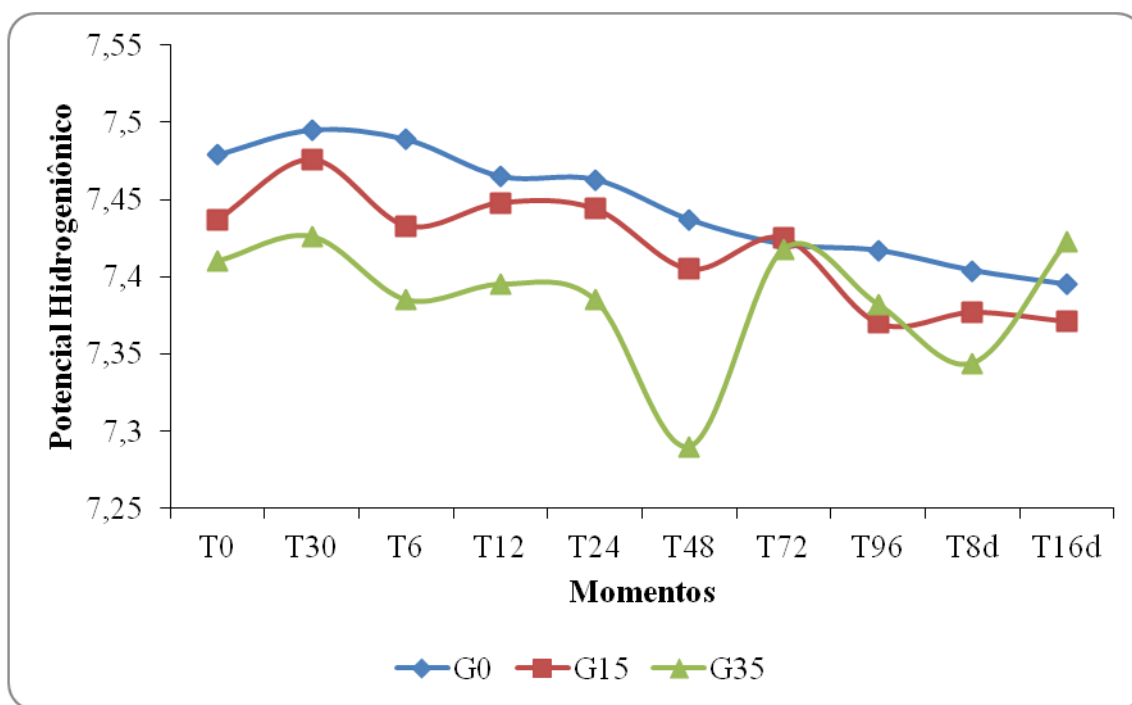


Figura 12 - Média do pH venoso de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.4.2. Pressão Parcial de Oxigênio (PO₂)

Na tabela 20 encontramos os valores médios e desvios padrão da PO₂. O gráfico 14 ilustra o comportamento desta variável no decorrer do experimento. Não se observou diferença entre grupos.

Tabela 20- Média e desvio padrão da Pressão parcial de oxigênio (mmHg) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	34,13	3,76	33,20	7,30	36,72	4,22
T30	36,15	2,25	37,42	4,60	39,32	5,22
T6	38,15	7,13	38,02	4,34	41,00	2,78
T12	38,32	5,48	37,58	5,91	38,58	8,14
T24	38,55	4,89	40,50	2,52	41,80	9,97
T48	39,33	3,46	37,13	3,60	40,35	3,08
T72	40,20	5,98	40,18	7,28	40,18	3,64
T96	39,80	4,31	36,82	2,24	40,43	3,76
T8d	36,90	2,11	38,68	9,17	39,22	4,94
T16d	40,42	7,41	37,98	6,06	41,82	6,74

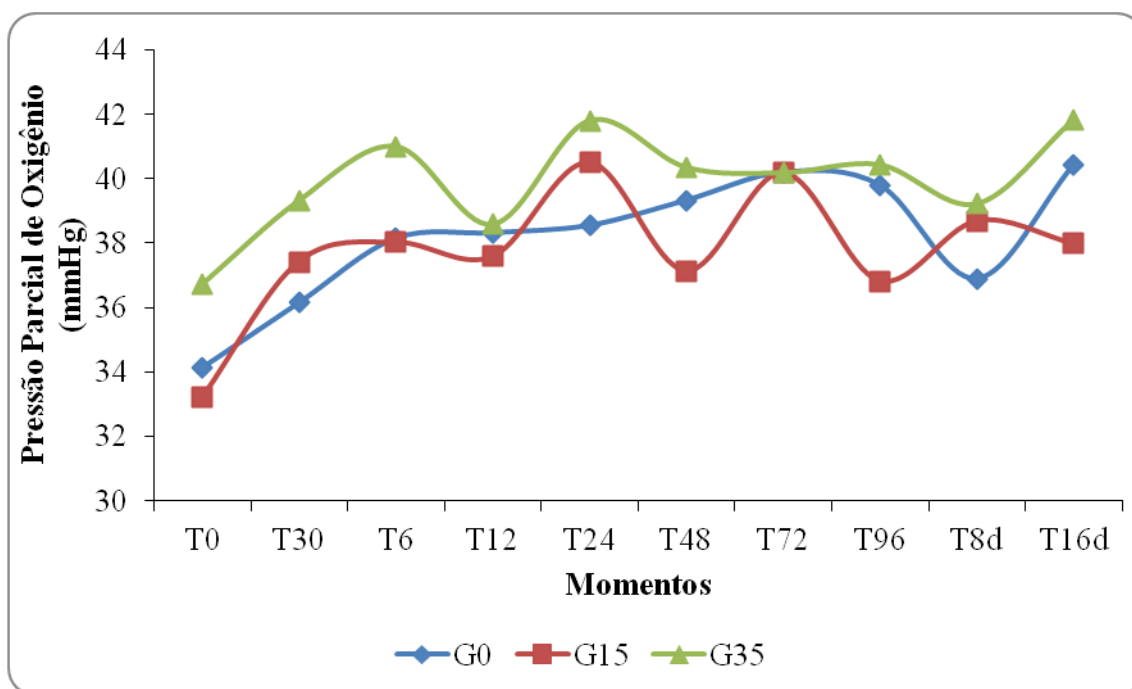


Figura 13- Média da Pressão parcial de oxigênio (mmHg) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.4.3. Pressão Parcial de Dióxido de Carbono (pCO₂)

Os valores médios e desvios padrão da pCO₂ sanguínea referentes aos tempos do experimento estão expressos na tabela 21. Não houve diferença entre os três grupos estudados. Na avaliação entre tempos a pCO₂ diminuiu significativamente no T72, T96 e T8d, enquanto no G15 houve redução significativa no T6, T24 e T72. O gráfico 14 apresenta o comportamento da pCO₂ ao longo do tempo transcorrido entre os momentos inicial e final do ensaio.

Tabela 21 - Média e desvio padrão da Pressão parcial de carbono (mmHg) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	41,08 ^a	4,90	41,58 ^a	6,12	36,77	2,08
T30	36,37 ^a	4,25	36,22 ^a	2,22	39,27	2,73
T6	38,00 ^a	3,24	33,48 ^b	2,85	35,40	2,23
T12	41,33 ^a	8,09	35,88 ^a	3,66	36,37	2,59
T24	36,32 ^a	6,11	33,0 ^b	1,23	33,83	4,93
T48	39,30 ^a	4,02	36,58 ^a	2,71	41,13	9,07
T72	33,90 ^b	5,50	32,77 ^b	2,45	36,75	3,97
T96	34,42 ^b	3,66	36,40 ^a	1,37	37,12	3,65
T8d	32,35 ^b	1,18	37,65 ^a	4,07	35,35	2,67
T16d	35,27 ^a	3,52	38,48 ^a	1,69	36,13	1,71

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

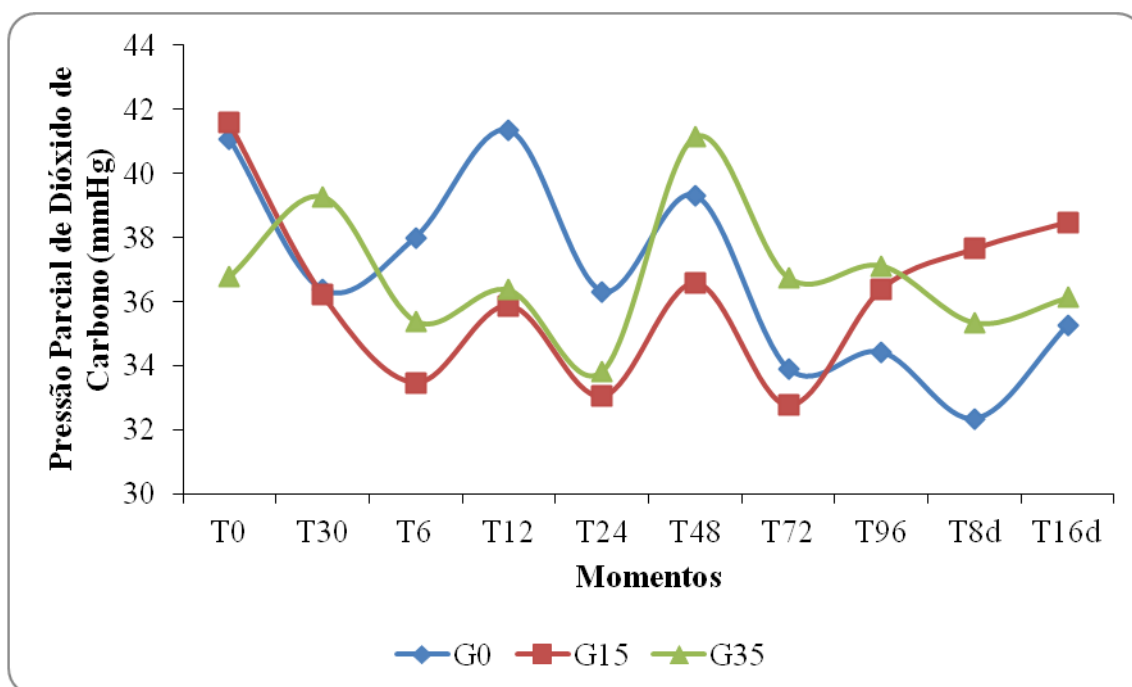


Figura 14 - Média da Pressão parcial de carbono (mmHg) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.4.4. Saturação de Oxigênio (SO₂)

Os valores médios e os desvios-padrão da SO₂ dos ovinos experimentais estão representados na tabela 22. O gráfico 15 apresenta o comportamento desta variável no decorrer do experimento.

Não houve diferença entre grupos.

Tabela 22 - Média e desvio padrão da Saturação de Oxigênio (%) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	63,92	4,68	62,97	4,95	62,87	2,83
T30	63,60	2,98	71,73	7,26	62,57	6,18
T6	68,22	6,40	72,17	4,91	64,02	4,03
T12	65,60	7,84	70,62	9,14	61,68	7,45
T24	72,08	5,89	66,08	1,78	64,15	10,59
T48	67,20	2,90	58,80	5,60	59,52	8,11
T72	70,42	7,64	68,68	6,84	63,50	3,86
T96	67,52	3,47	57,85	5,23	62,92	4,92
T8d	62,60	7,18	63,63	6,87	59,75	6,01
T16d	66,53	5,04	59,22	7,78	67,58	5,10

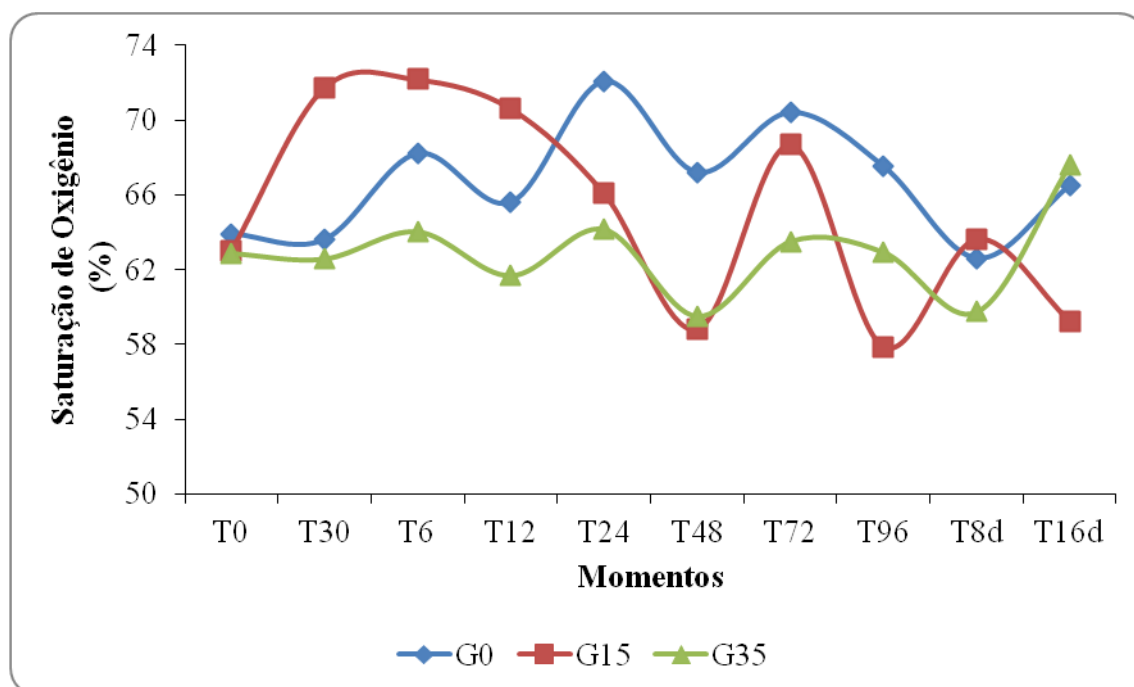


Figura 15 - Média da Saturação de Oxigênio (%) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.4.5. Concentração de Bicarbonato

Na tabela 23 encontramos os valores médios e desvios padrão da concentração de bicarbonato. O gráfico 16 ilustra o comportamento desta variável no decorrer do experimento.

Na comparação entre grupos o G35 apresentou redução significativa nos valores de bicarbonato no T0, T6, T12 e T24 pós-transfusão. Na comparação entre tempos os animais do G0 apresentaram redução a partir do T72, enquanto os animais do G15 apresentam redução a partir do T48.

Tabela 23 - Média e desvio padrão da concentração de Bicarbonato (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	28,22 ^{Aa}	1,83	27,42 ^{ABa}	5,47	22,63 ^B	2,01
T30	28,63 ^a	3,64	26,42 ^a	3,66	25,33	2,94
T6	28,22 ^{Aa}	2,01	22,05 ^{BCb}	3,53	20,83 ^C	2,78
T12	28,72 ^{Aa}	2,51	24,32 ^{ABa}	2,88	21,77 ^B	1,82
T24	25,50 ^{Aa}	3,94	22,17 ^{ABb}	1,07	19,72 ^B	2,50
T48	24,28 ^a	0,77	22,42 ^b	1,27	19,38	4,42
T72	21,22 ^b	1,49	20,97 ^b	1,37	23,43	4,51
T96	21,70 ^b	2,17	20,60 ^b	1,25	21,72	3,83
T8d	19,83 ^b	1,60	21,65 ^b	2,36	18,83	1,34
T16d	21,20 ^b	3,33	21,98 ^b	3,22	23,13	2,31

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

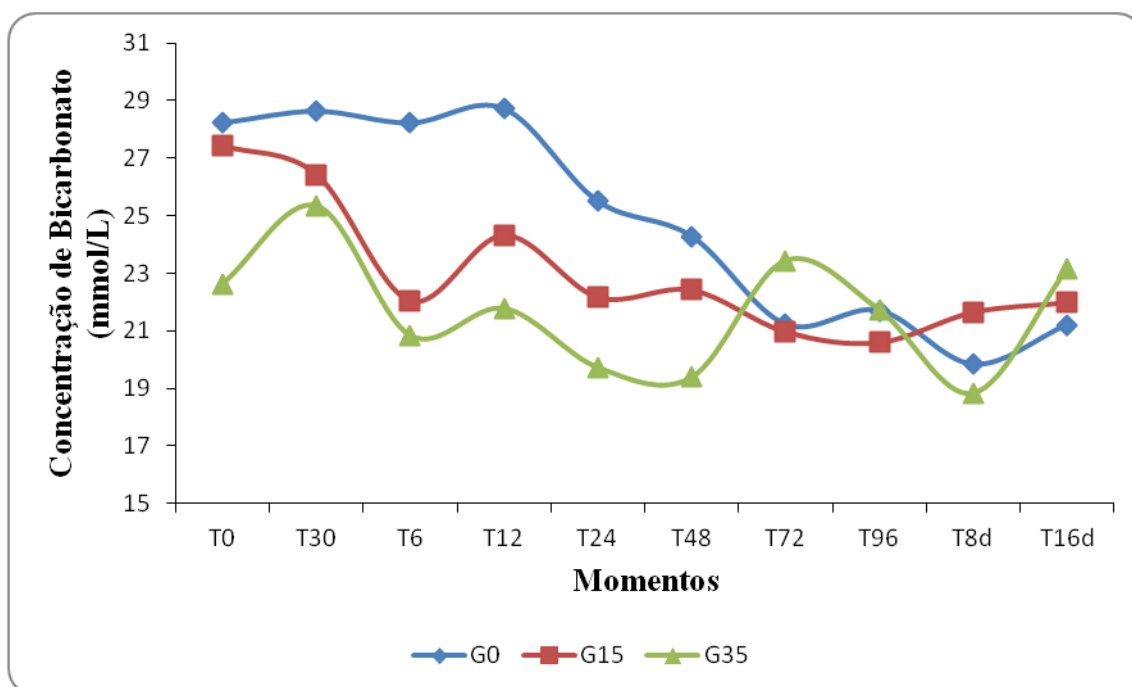


Figura 16 - Média da concentração de Bicarbonato (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.4.6. Concentração de Excesso de Base (BE)

A tabela 24 exibe os valores médios e desvios padrão do BE dos ovinos do G0, G15 e G35. O gráfico 17 ilustra o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

Observou diferença significativa entre os grupos, a partir do T6 houve aumento crescente do déficit de base, sendo mais evidente no G35.

Tabela 24 - Média e desvio padrão do Excesso de base (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	4,5 ^{Aa}	1,71	3,2 ^{ABa}	5,57	-2,0 ^B	2,38
T30	4,4 ^a	3,16	2,6 ^a	3,45	0,9	2,99
T6	4,6 ^{Aa}	2,03	-1,8 ^{Ba}	3,76	-3,7 ^C	3,44
T12	4,4 ^{Aa}	2,03	-0,01 ^{ABa}	1,87	-2,7 ^B	1,75
T24	1,8 ^{Aa}	3,58	-1,4 ^{ABa}	1,33	-4,7 ^B	2,83
T48	1,5 ^{Aa}	2,14	-2,03 ^{ABa}	1,33	-6,8 ^B	6,00
T72	-4,0 ^b	0,49	-2,8 ^b	1,85	-0,9	4,83
T96	-2,41 ^b	2,27	-4,2 ^b	1,82	-3,0	4,62
T8d	-4,33 ^b	1,96	-3,2 ^b	2,99	-6,26	1,36
T16d	-3,3 ^b	3,55	-2,9 ^b	3,97	-1,0	2,18

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

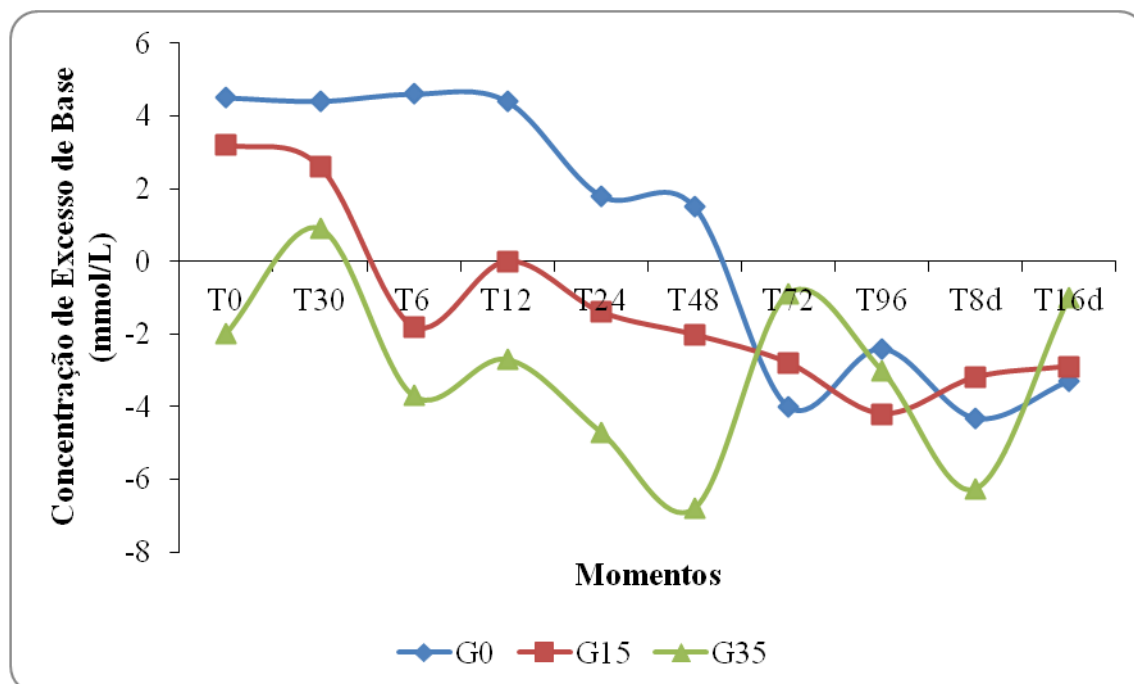


Gráfico 17 - Média do Excesso de base (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

5.5.1. Proteína Total

A tabela 25 apresenta os valores médios e desvios padrão da proteína total nos diferentes momentos enquanto que o gráfico 18 ilustra o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

Na comparação entre grupos não houve diferença significativa. No T96 e T8d ocorreu aumento significativo da concentração de proteína total.

Tabela 25 - Média e desvio padrão da Proteína total (g/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	50,90 ^a	1,79	53,30	0,73	50,80	0,52
T30	66,70 ^a	0,75	62,10	0,55	62,20	0,83
T6	68,90 ^a	0,60	65,40	0,67	62,90	0,80
T12	65,90 ^a	1,12	64,50	0,58	64,60	0,63
T24	68,70 ^a	0,73	62,90	0,50	63,80	0,86
T48	69,60 ^a	0,74	62,60	0,45	67,40	0,72
T72	68,40 ^a	0,61	64,70	0,54	65,30	0,60
T96	69,0 ^b	0,60	66,20	0,48	65,90	0,58
T8d	69,40 ^b	0,55	66,50	0,83	67,60	0,73
T16d	69,80 ^a	0,51	68,60	0,60	68,10	0,68

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre o tempo basal e os posteriores.

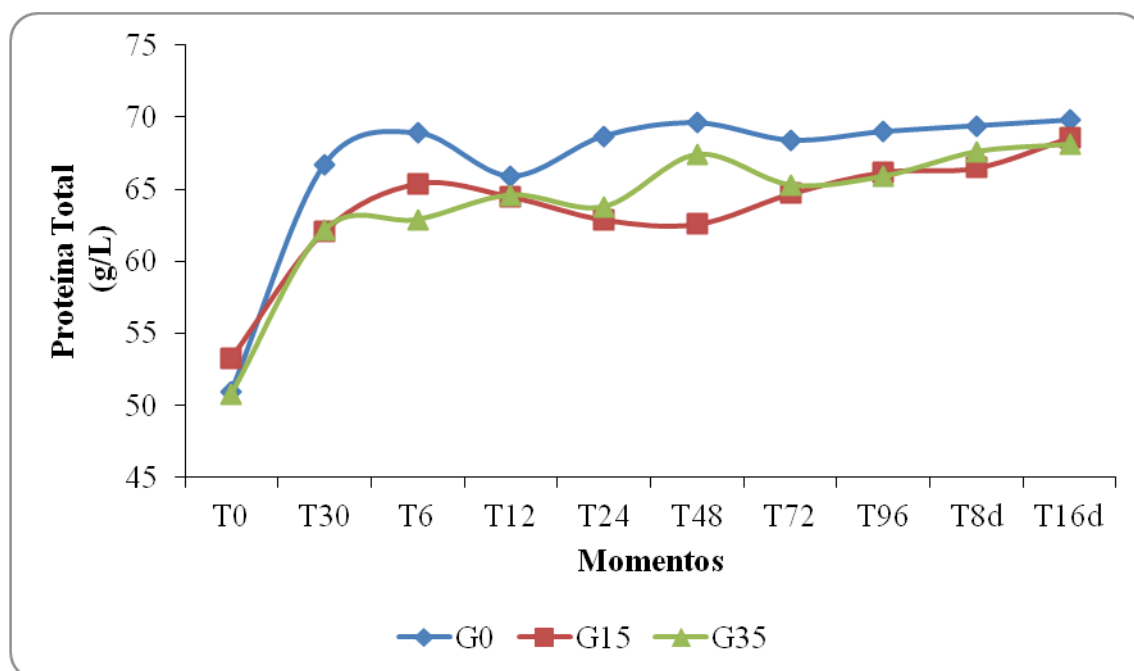


Figura 18 - Média da Proteína total (g/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5.2. Concentração de Albumina

A Tabela 26 apresenta os valores médios e os respectivos desvios padrão da concentração de albumina. O gráfico 19 ilustra o comportamento dessa variável no decorrer do experimento.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre grupos, no entanto no G35 nos momentos T24 e T48 ocorreu aumento significativo da albumina em comparação ao momento basal (T0), com posterior redução nos tempos seguintes e aumento no momento T16d.

Tabela 26 - Média e desvio padrão da concentração de Albumina (g/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	26,80	0,19	27,10	0,15	26,00 ^a	0,11
T30	30,10	0,21	29,80	0,20	29,50 ^a	0,19
T6	30,60	0,23	30,80	0,17	30,50 ^a	0,22
T12	30,0	0,20	30,80	0,17	30,10 ^a	0,22
T24	30,10	0,17	31,00	0,23	35,10 ^b	1,28
T48	30,60	0,18	29,80	0,22	31,00 ^b	0,19
T72	30,30	0,10	30,50	0,23	30,00 ^a	0,19
T96	30,00	0,14	30,10	0,19	30,50 ^a	0,22
T8d	31,00	0,14	30,50	0,21	30,60 ^a	0,20
T16d	30,50	0,20	31,50	0,24	31,30 ^b	0,22

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre o tempo basal e os posteriores.

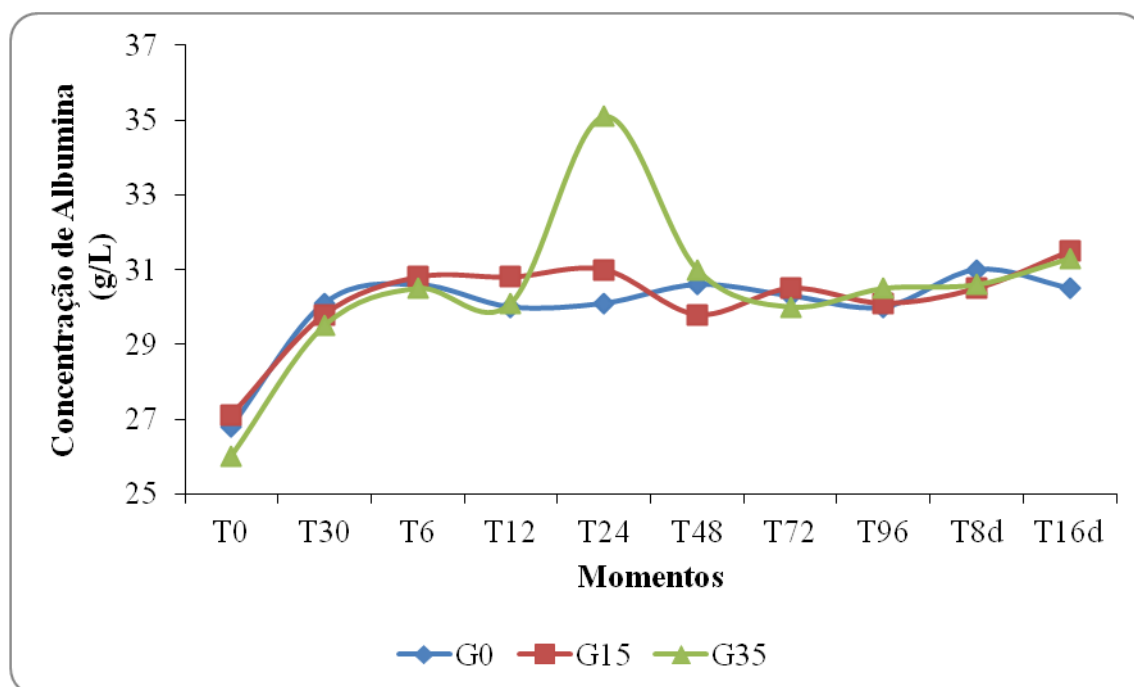


Figura 19 - Média da concentração de Albumina (g/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5.3. Bilirrubina Total

Os resultados médios e desvios padrão das concentrações de bilirrubina total no decorrer do experimento estão expostos na Tabela 27 e no Gráfico 20.

A concentração de bilirrubina total foi significativamente ($p < 0,01$) menor no grupo G35 nos momentos T30, T6 e T12.

Tabela 27 - Média e desvio padrão das concentrações de Bilirrubina total ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	3,25	0,05	2,22	0,09	2,40	0,08
T30	3,86 ^B	0,07	3,42 ^{AB}	0,11	3,93 ^A	0,05
T6	2,54 ^B	0,11	4,30 ^{AB}	0,10	5,13 ^A	0,08
T12	2,13 ^A	0,12	3,76 ^{AB}	0,11	5,06 ^B	0,09
T24	2,10	0,09	3,93	0,09	1,71	0,14
T48	2,08	0,11	2,74	0,08	1,54	0,07
T72	2,91	0,09	2,22	0,05	1,20	0,04
T96	3,25	0,08	2,05	0,04	1,20	0,05
T8d	4,10	0,13	2,74	0,14	1,20	0,04
T16d	3,08	0,13	1,20	0,06	1,71	0,11

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

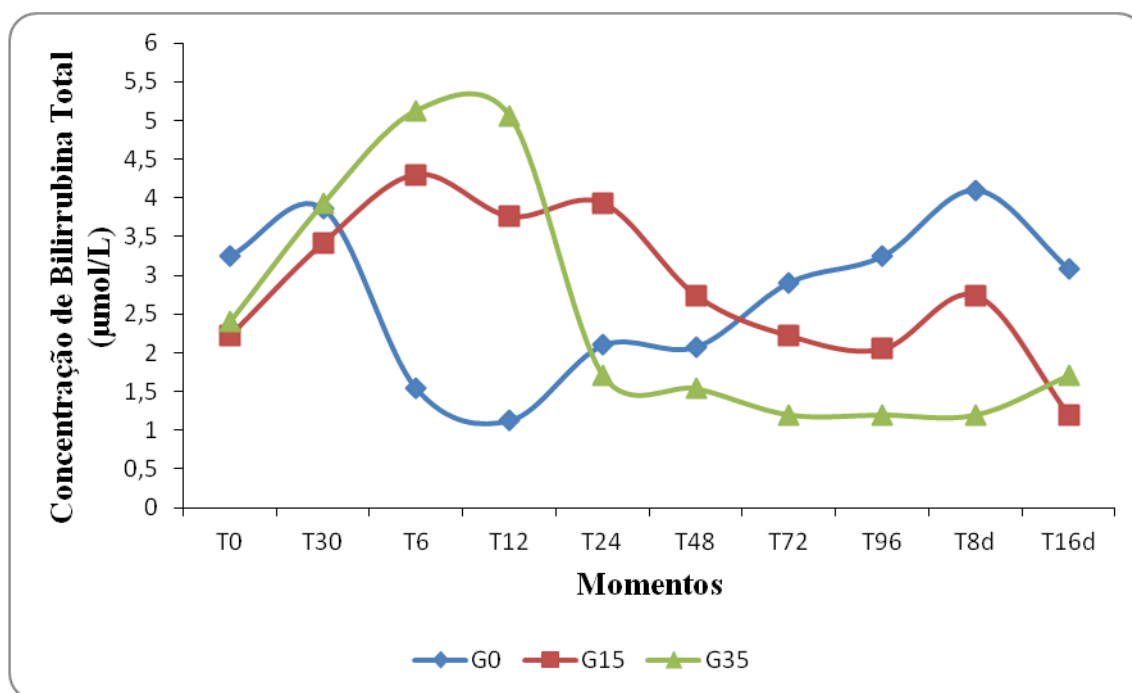


Figura 20 - Média das concentrações de Bilirrubina total ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5.4. Bilirrubina Indireta

A Tabela 28 apresenta os valores médios e os respectivos desvios padrão da concentração de bilirrubina indireta. O gráfico 21 ilustra o comportamento dessa variável no decorrer do experimento. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre grupos.

Tabela 28 - Média e desvio padrão da concentração de Bilirrubina indireta ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	0,86	0,04	0,34	0,02	0,34	0,02
T30	0,51	0,04	0,17	0,01	0,34	0,01
T6	0,68	0,05	0,68	0,04	0,34	0,01
T12	1,20	0,06	0,86	0,04	0,34	0,03
T24	0,51	0,03	0,68	0,03	0,51	0,05
T48	0,34	0,02	0,86	0,03	0,51	0,02
T72	0,34	0,01	0,68	0,02	0,34	0,02
T96	0,86	0,06	0,34	0,01	0,34	0,01
T8d	0,68	0,02	0,34	0,02	0,17	0,01
T16d	0,34	0,02	0,17	0,0	0,17	0,01

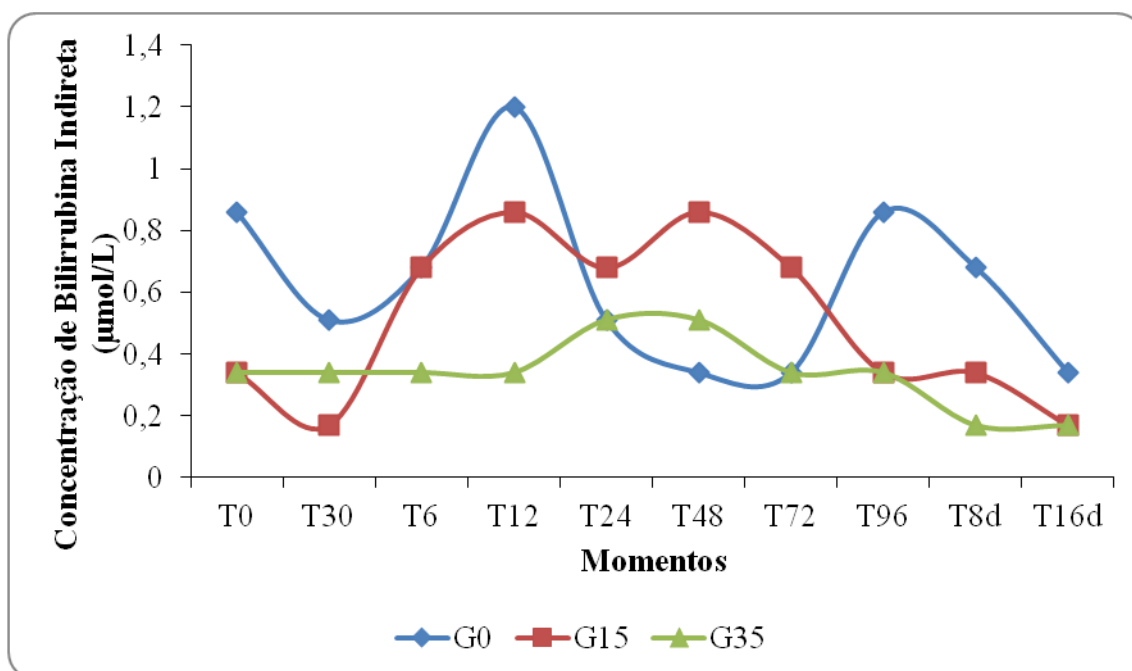


Figura 21 - Média da concentração de Bilirrubina indireta ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5.5. Lactato Desidrogenase (LDH)

A tabela 29 apresenta os valores médios e desvios padrão da atividade da lactato desidrogenase nos momentos de avaliação enquanto que gráfico 22 ilustra o comportamento dessa variável ao longo do experimento. Não houve diferença entre os grupos analisados.

Tabela 29 - Média e desvio padrão da atividade da Lactato desidrogenase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	398,89	407,74	765,42	465,41	504,09	124,99
T30	504,01	406,10	801,45	563,55	400,09	129,01
T6	538,56	450,25	734,12	453,74	468,24	157,71
T12	418,57	399,52	952,88	930,90	528,30	253,36
T24	557,00	493,80	802,67	570,64	499,31	361,78
T48	446,11	343,35	488,10	298,94	438,21	179,15
T72	505,97	285,18	607,03	583,07	357,84	142,48
T96	532,65	283,89	1032,60	1055,03	373,02	134,07
T8d	364,70	113,84	857,12	556,52	258,49	92,64
T16d	463,13	381,28	525,12	379,64	297,42	67,78

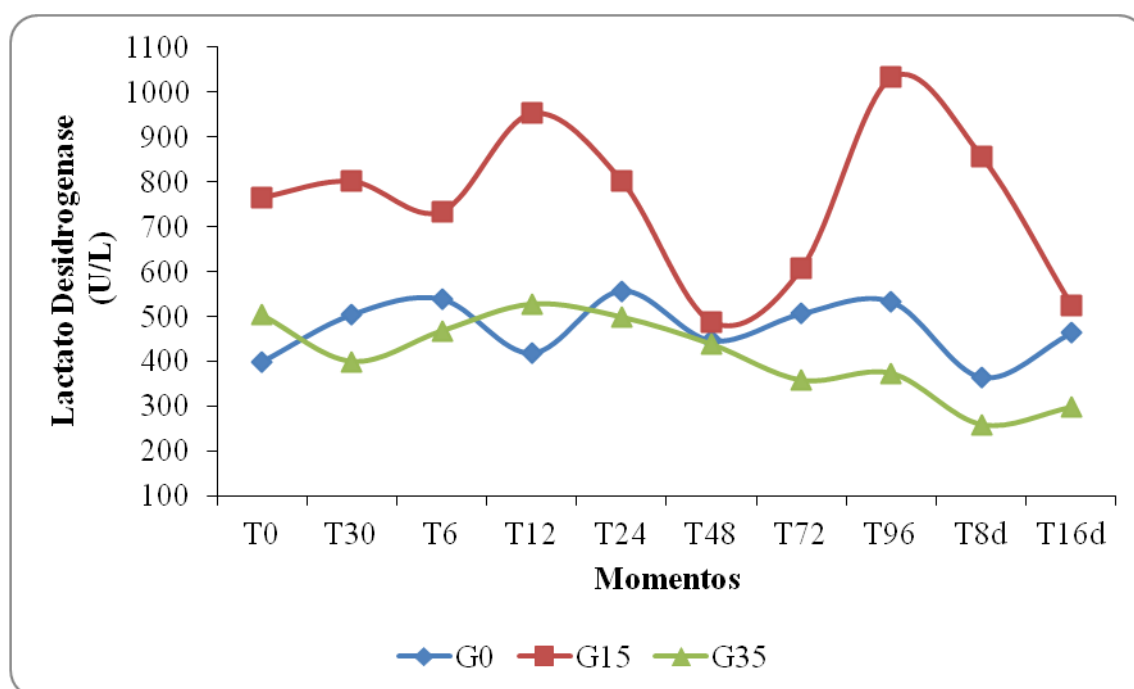


Figura 22 - Média da atividade da Lactato desidrogenase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5.6. Concentração de Sódio (Na)

Não houve diferenças significativas entre os três grupos quanto à concentração de sódio no tempo inicial. Entretanto com o avançar do tempo evidenciaram-se diferenças estatísticas entre os grupos.

Nos tempos T6 e T12 houve aumento significativo ($p < 0,01$) da concentração de sódio no G35 quando comparado com G15. No G0 nos momentos T72 e T8d houve aumento significativo quando comparado com G15 e G35 respectivamente. Na comparação entre tempos houve aumento significativo da concentração de sódio no T6 e redução significativa após 8 dias (T0) da transfusão.

Tabela 30 - Média e desvio padrão da concentração de Sódio (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	142,2	5,56	136,7	4,68	145,0 ^a	6,29
T30	144,0	5,66	146,5	4,37	153,7 ^a	11,83
T6	146,2 ^{AB}	4,58	143,5 ^B	5,92	158,5 ^{Ab}	10,95
T12	146,5 ^{AB}	6,98	138,0 ^B	5,66	152,5 ^{Aa}	10,31
T24	147,5	4,93	136,3	4,80	148,3 ^a	7,20
T48	150,3	6,47	141,3	9,85	148,7 ^a	5,75
T72	149,8 ^A	2,56	133,0 ^B	3,95	143,7 ^{ABa}	11,06
T96	149,7	4,03	136,0	3,35	146,7 ^a	6,65
T8d	145,8 ^A	8,89	136,7 ^{AB}	3,72	130,3 ^{Bb}	1,97
T16d	137,0	5,76	146,0	10,58	147,3	5,16

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

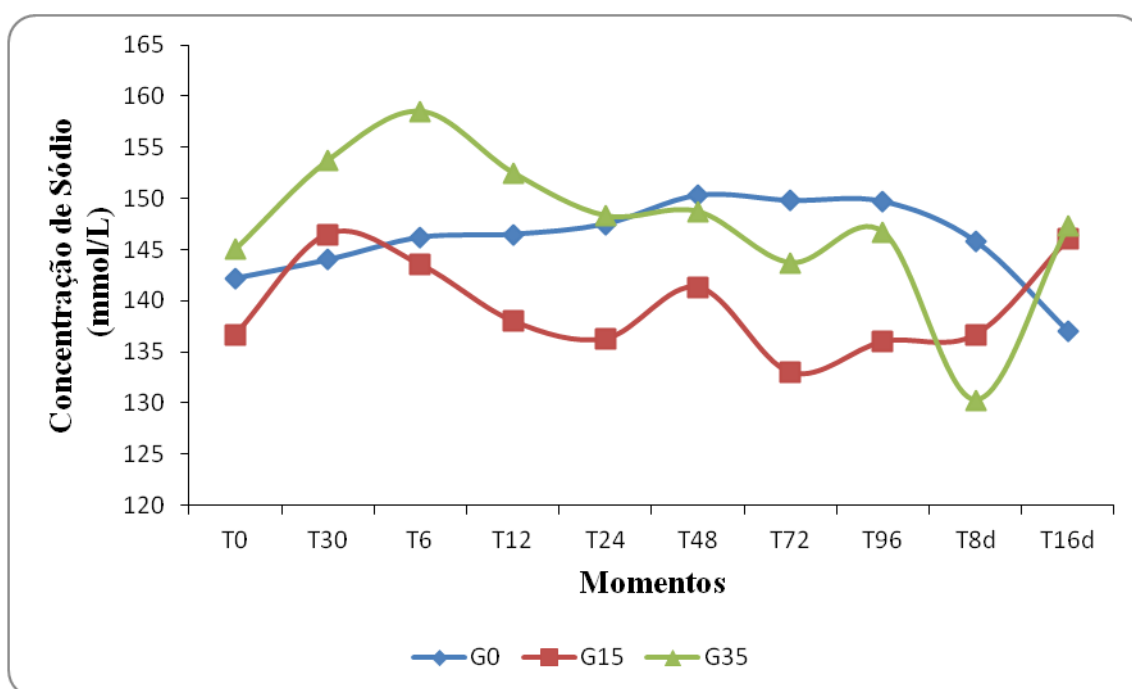


Figura 23 - Média da concentração de Sódio (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5.7. Concentração de Potássio (K)

Os resultados médios e desvios padrão das concentrações de potássio no decorrer do experimento estão expostos na Tabela 31 e no Gráfico 24.

Não houve diferença significativa entre os três grupos estudados. Na comparação entre os tempos houve inicialmente (T30) redução significativa da concentração de potássio no G0 e G15, sendo observado aumento significativo na concentração dessa variável 72 horas após a transfusão no G0. Entretanto no G35 o aumento da concentração de potássio ocorreu nos momentos T6 e T12 e redução nos tempos posteriores.

Tabela 31 - Média e desvio padrão da concentração de Potássio (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	3,81 ^a	0,37	4,21 ^a	0,68	3,78 ^a	0,57
T30	2,76 ^b	0,55	2,88 ^b	0,50	3,01 ^a	0,63
T6	4,27 ^a	0,28	4,45 ^a	0,36	4,75 ^b	0,61
T12	4,64 ^a	0,16	4,78 ^a	0,32	4,96 ^b	0,52
T24	4,40 ^a	0,53	4,18 ^a	0,70	4,21 ^a	0,50
T48	4,56 ^a	0,48	4,58 ^a	0,63	4,56 ^a	0,80
T72	4,71 ^b	0,47	4,71 ^a	0,29	4,15 ^a	0,61
T96	4,60 ^a	0,56	4,88 ^a	0,64	4,28 ^a	0,45
T8d	4,48 ^a	0,67	4,38 ^a	0,51	3,83 ^a	0,51
T16d	4,43 ^a	0,47	4,13 ^a	0,46	4,18 ^a	0,29

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

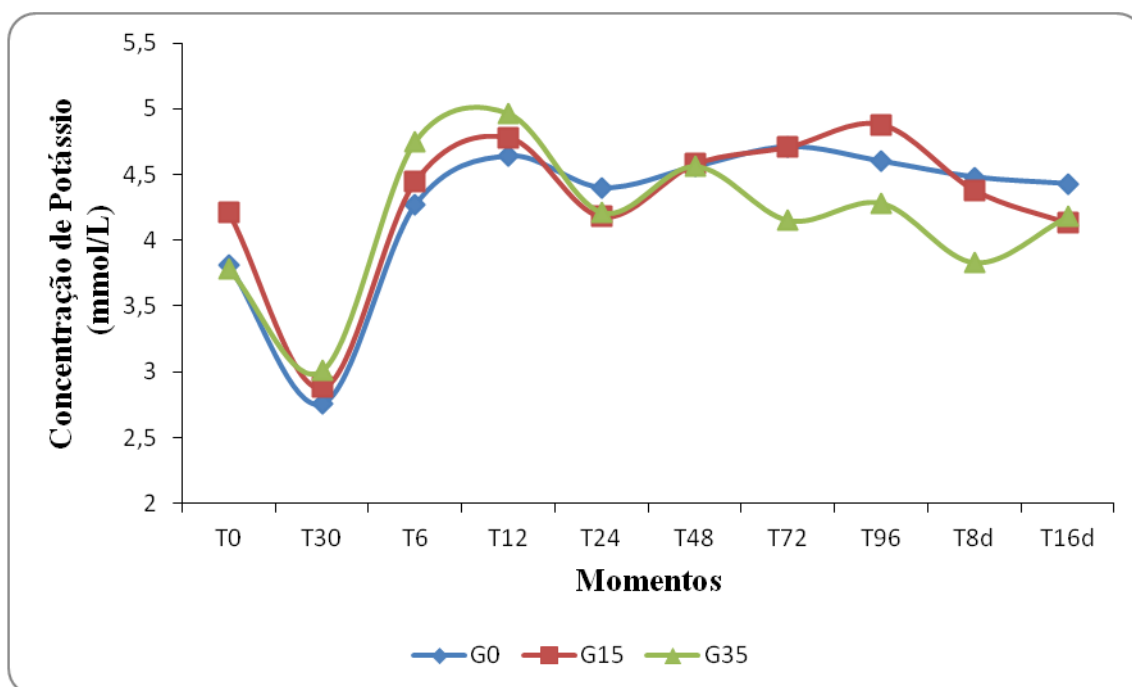


Figura 24 - Média da concentração de Potássio (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5.8. Aspartato Aminotransferase (AST)

A Tabela 32 apresenta os valores médios e os respectivos desvios padrão da atividade da AST. O gráfico 25 ilustra o comportamento dessa variável no decorrer do experimento. Na comparação entre grupos não houve diferença ($p>0,05$).

Tabela 32 - Média e desvio padrão da atividade da Aspartato aminotransferase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	77,59	93,60	81,62 ^a	83,45	44,04	39,94
T30	84,63	79,1	83,98 ^a	70,65	51,74	42,01
T6	99,09	79,90	99,15 ^a	85,95	64,71	69,07
T12	103,66	80,10	77,67 ^a	76,68	67,39	72,50
T24	104,69	83,80	90,49 ^a	82,43	63,71	70,52
T48	90,22	83,90	94,15 ^a	86,77	55,84	55,19
T72	85,64	67,10	80,93 ^a	71,14	46,52	38,69
T96	80,31	79,50	89,51 ^a	77,87	40,64	27,97
T8d	56,31	56,50	49,60 ^a	29,14	34,31	12,35
T16d	30,11	11,80	29,48 ^b	12,70	27,77	8,75

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre o tempo basal e os posteriores.

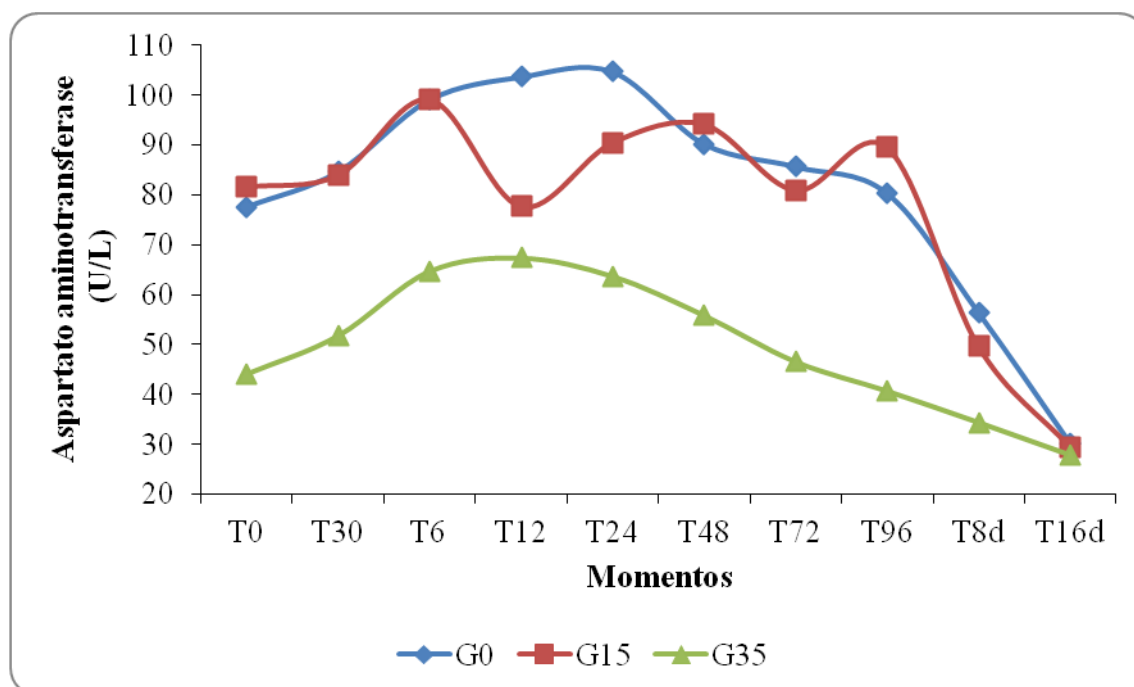


Figura 25 - Média da atividade da Aspartato aminotransferase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5.9. Gama Glutamyltransferase (GGT)

A tabela 33 apresenta os valores médios e desvios padrão da atividade da GGT nos diferentes momentos de avaliação enquanto que o gráfico 26 ilustra o comportamento dessa variável ao longo do experimento. Não houve diferença entre os grupos.

Tabela 33 - Média e desvio padrão da atividade da Gama glutamiltransferase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	17,15	14,74	12,98	2,35	13,54	4,78
T30	15,22	13,15	16,07	3,48	13,95	4,74
T6	18,61	12,65	13,61	4,92	13,61	5,43
T12	14,69	13,22	13,36	3,34	13,02	5,10
T24	15,80	13,18	15,62	1,36	13,70	3,35
T48	16,26	7,77	15,00	2,89	17,07	5,10
T72	17,21	11,70	14,66	3,46	14,84	4,99
T96	16,62	11,30	15,81	3,72	13,89	6,31
T8d	17,80	13,19	16,69	7,76	15,27	4,81
T16d	17,70	11,49	17,68	2,17	15,14	4,74

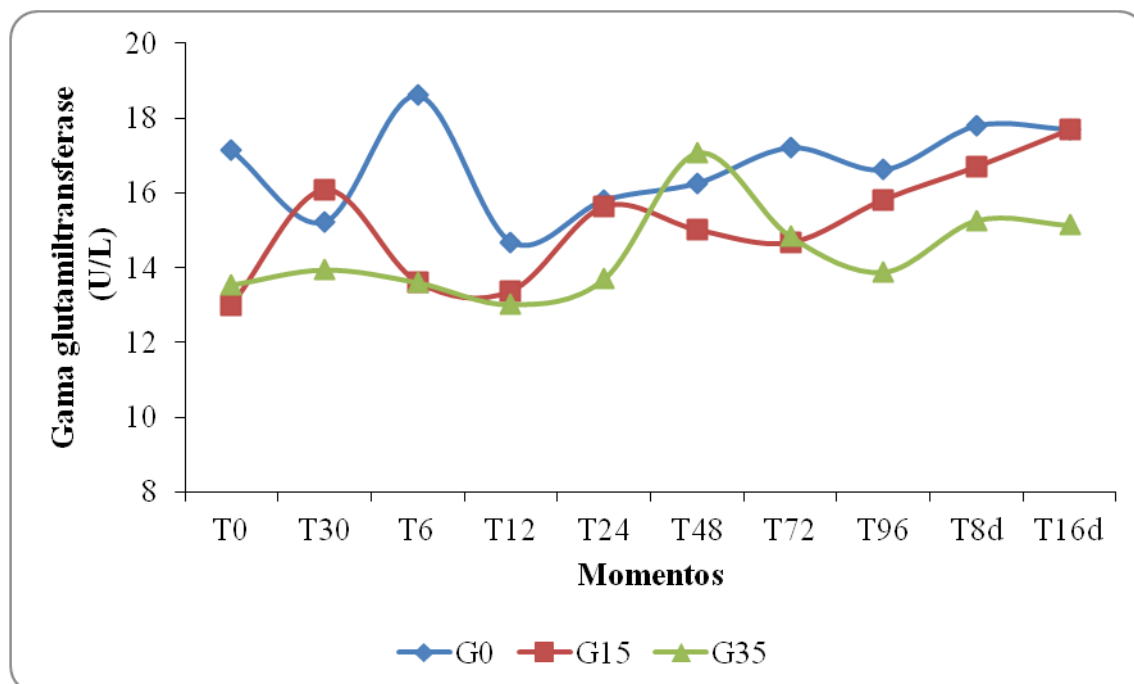


Figura 26 - Média da atividade da Gama glutamiltransferase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5.10. Atividade da Creatina Quinase (CK)

A tabela 34 exibe os valores médios e desvios padrão da atividade de CK nos ovinos do G0, G15 e G35. O gráfico 27 ilustra o comportamento desta variável ao longo do experimento. Não houve diferença significativa entre os grupos nos momentos analisados.

Tabela 34 - Média e desvio padrão da atividade da Creatina quinase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	212,7 ^a	213,3	276,5 ^a	195,7	243,6	364,1
T30	362,3 ^a	391,0	1358,0 ^b	1710,0	468,0	543,0
T6	1288,0 ^b	2168,5	734,40 ^a	874,6	571,4	664,4
T12	220,3 ^a	231,0	420,7 ^a	258,0	475,7	702,2
T24	209,3 ^a	275,9	289,6 ^a	344,6	313,7	577,2
T48	74,2 ^a	46,8	192,8 ^a	303,1	111,8	112,8
T72	124,6 ^a	198,9	58,2 ^a	20,8	76,4	57,5
T96	171,7 ^a	216,5	217,3 ^a	223,3	83,8	60,2
T8d	44,4 ^a	19,9	82,5 ^a	40,2	37,6	24,3
T16d	27,5 ^a	7,7	72,8 ^a	43,4	51,7	14,0

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

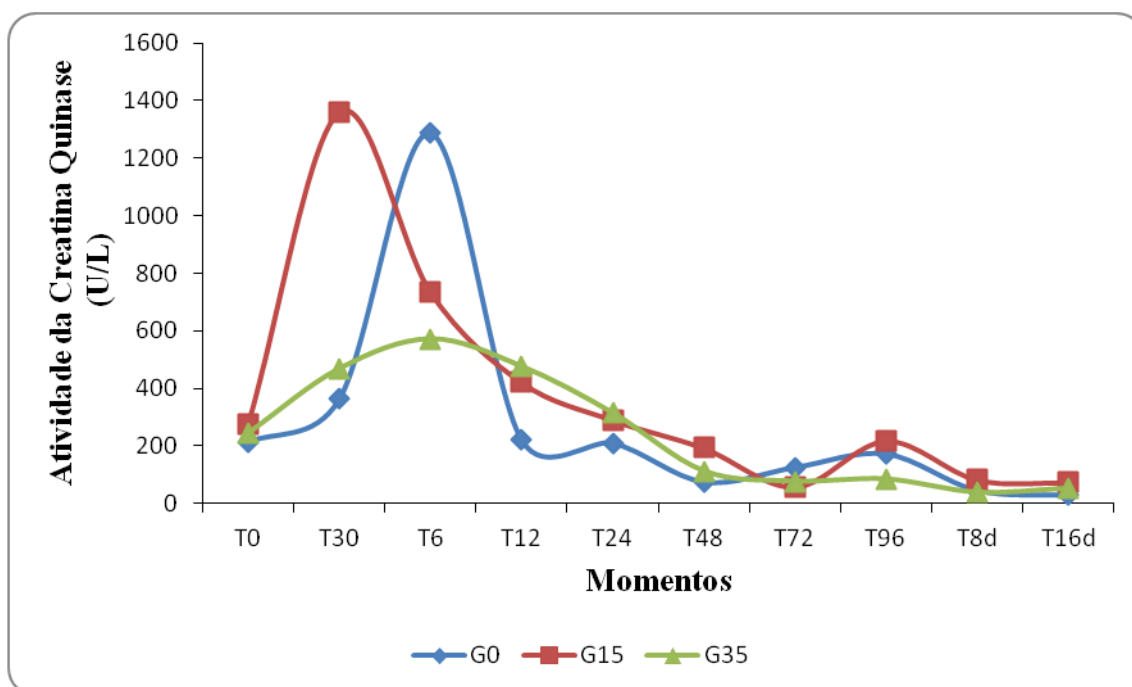


Figura 27 - Média da atividade da Creatina quinase (U/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5.11. Concentração de Creatinina

Os valores médios e os desvios-padrão da concentração de creatinina dos ovinos nos respectivos tempos experimentais estão representados na tabela 35. O gráfico 28 apresenta o comportamento desta variável no decorrer do experimento.

Inicialmente o G0 teve maior concentração de creatinina do que G35, nos momentos posteriores não houve diferença entre os grupos. No G0 observou-se redução significativa da concentração de creatinina a partir do T24 e prosseguiu até o T16d.

Tabela 35 - Média e desvio padrão da concentração de Creatinina ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	170,61 ^{Aa}	1,09	117,57 ^{AB}	0,50	97,24 ^B	0,23
T30	157,35 ^a	0,88	119,34	0,51	96,36	0,18
T6	143,21 ^a	0,78	106,08	0,37	100,78	9,26
T12	124,64 ^a	0,45	98,12	0,26	92,82	0,24
T24	116,69 ^b	0,31	107,85	0,27	98,12	0,20
T48	101,66 ^b	0,23	91,05	0,22	96,36	0,15
T72	101,66 ^b	0,21	88,4	0,20	90,17	0,12
T96	95,48 ^b	0,11	80,44	0,24	97,24	0,18
T8d	102,54 ^b	0,15	83,98	0,16	92,82	0,22
T16d	100,78 ^b	0,11	82,21	0,22	91,94	0,14

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre o tempo basal e os posteriores.

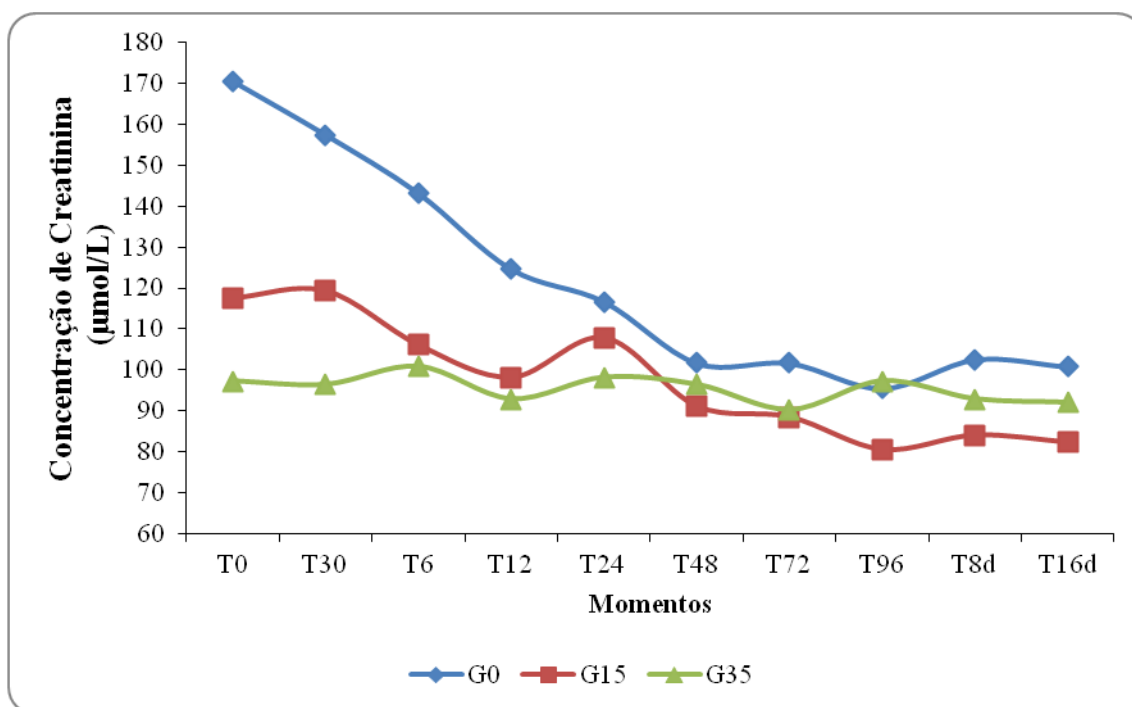


Figura 28 - Média da concentração de Creatinina ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.5.12. Concentração de Uréia

Na tabela 36 encontramos os valores médios e desvios padrão da concentração de excesso de ureia. O gráfico 29 ilustra o comportamento desta variável no decorrer do experimento.

O G0 no tempo basal teve a concentração de ureia maior do que o G15 e G35, ocorrendo redução significativa ($p < 0,0001$) nos tempos T30, T6 e T12. Na comparação entre o tempo basal e os tempos posteriores houve redução significativa da concentração de ureia após 24 horas até o final dos 16 dias no G0 e G15.

Tabela 36 - Média e desvio padrão da concentração de Uréia (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	18,54 ^{Aa}	5,78	8,88 ^{Ba}	24,0	8,40 ^B	10,4
T30	16,30 ^{Aa}	5,23	8,45 ^{Ba}	25,3	7,86 ^B	10,5
T6	16,11 ^{Aa}	5,15	6,66 ^{Ba}	20,6	7,62 ^B	10,8
T12	13,56 ^{Ab}	4,03	5,52 ^{Ba}	16,7	7,38 ^{BC}	8,8
T24	11,73 ^b	3,07	7,37 ^b	11,4	6,75	8,4
T48	6,94 ^b	2,29	5,44 ^b	8,2	6,73	9,3
T72	5,96 ^b	2,99	4,15 ^b	6,4	6,30	8,1
T96	5,78 ^b	1,48	4,87 ^b	10,3	6,92	9,3
T8d	6,71 ^b	2,06	5,47 ^b	5,7	5,04	5,3
T16d	4,92 ^b	1,97	5,79 ^b	9,3	7,33	2,4

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

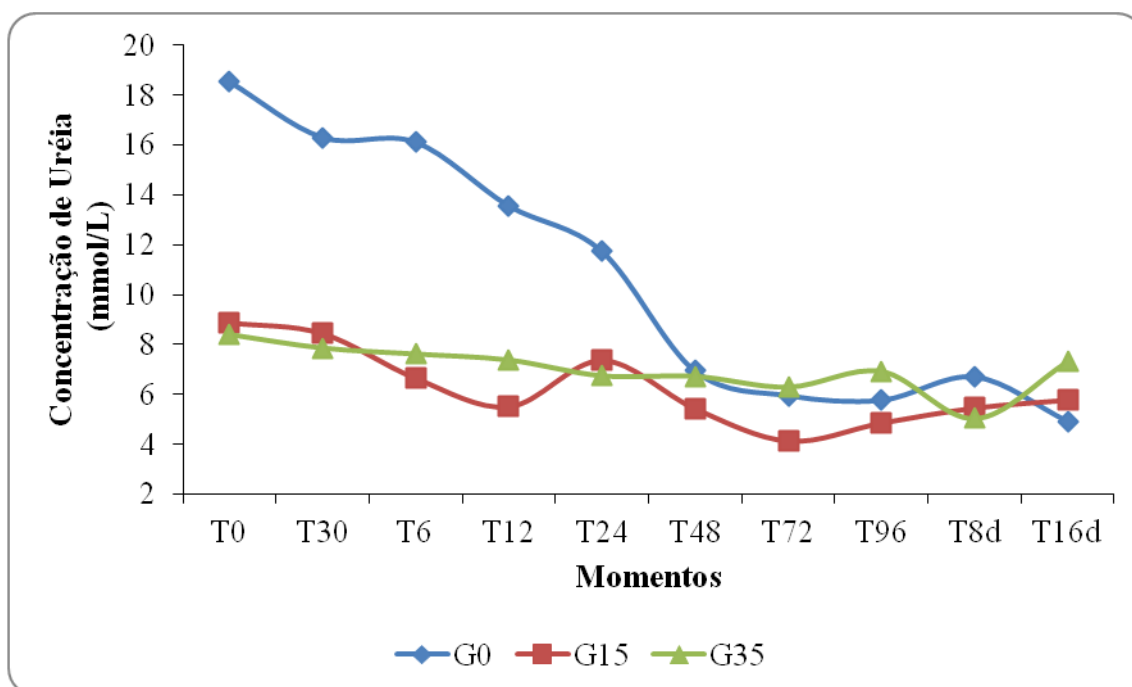


Figura 29 - Média da concentração de Uréia (mmol/L) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.6. AVALIAÇÃO DA COAGULAÇÃO

5.6.1. Tempo de Protrombina (TP)

Na tabela 37 encontramos os valores médios e desvios padrão do Tempo de protrombina. O gráfico 30 ilustra o comportamento desta variável no decorrer do experimento.

Na comparação intergrupos não houve diferença significativa ($p>0,05$). Houve aumento significativo no G0 no momento T8d pós-transfusão.

Tabela 37 - Média e desvio padrão d Tempo de protrombina (segundos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	25,12 ^a	3,11	25,97	2,95	28,67	4,27
T30	22,12 ^a	1,56	21,05	7,63	28,35	2,88
T6	22,52 ^a	1,05	24,53	3,56	26,67	3,20
T12	22,88 ^a	0,89	25,55	3,36	25,50	3,28
T24	22,30 ^a	1,44	25,15	2,56	22,98	3,11
T48	24,15 ^a	3,92	23,65	2,46	22,15	2,19
T72	22,07 ^a	1,72	21,47	3,89	22,40	3,82
T96	21,57 ^a	1,30	24,25	2,54	22,37	3,76
T8d	26,94 ^b	4,94	22,97	6,31	24,15	3,38
T16d	25,48 ^a	4,19	24,70	2,64	25,30	4,24

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

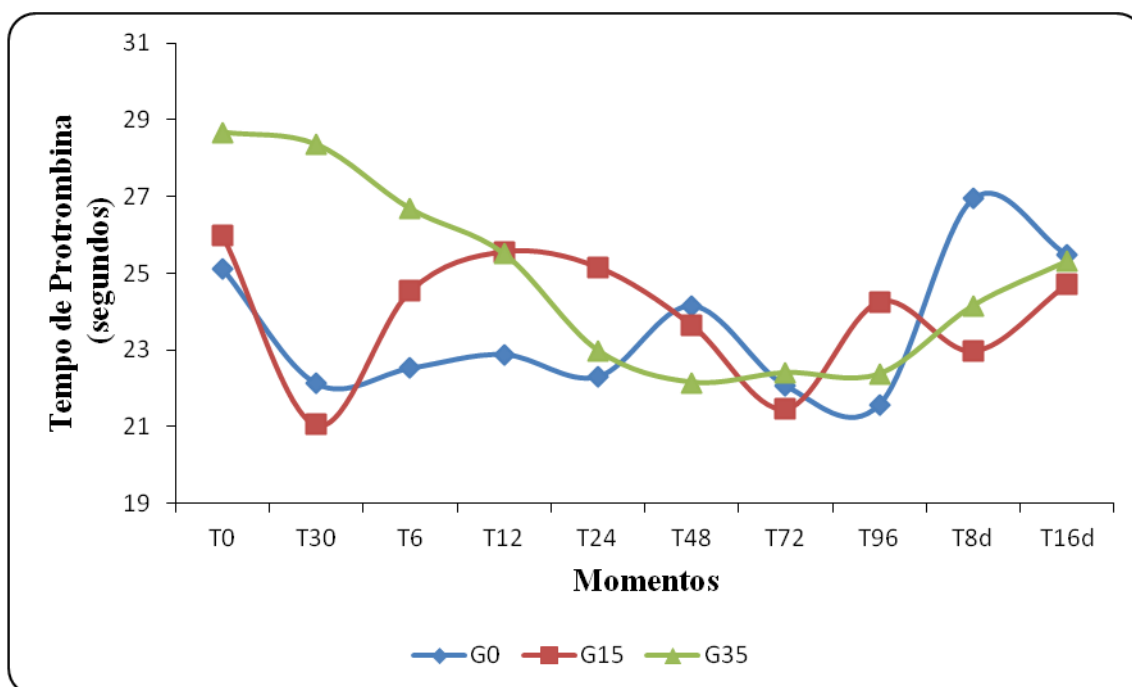


Figura 30 - Média do Tempo de protrombina (segundos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.6.2. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

Os valores médios e os respectivos desvios padrão encontram-se expostos na tabela 38. O gráfico 31 ilustra o comportamento desta variável no decorrer do experimento. Não se observou diferença estatística entre grupos ($p>0,05$).

Tabela 38 - Média e desvio padrão do Tempo de tromboplastina parcial ativado (segundos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	52,00	10,18	58,05	13,97	53,52	14,10
T30	43,68	13,42	51,05	8,85	39,38	11,74
T6	41,77	14,53	46,20	10,75	45,17	7,85
T12	45,78	11,36	39,43	16,22	42,28	8,32
T24	48,83	14,95	45,10	13,07	37,67	10,70
T48	55,98	11,39	39,28	9,25	37,85	5,74
T72	54,17	25,63	42,08	7,40	37,10	8,57
T96	38,95	19,79	47,98	14,25	44,32	9,92
T8d	46,72	22,84	48,73	14,87	40,92	9,17
T16d	51,95	6,68	47,63	8,82	40,05	10,06

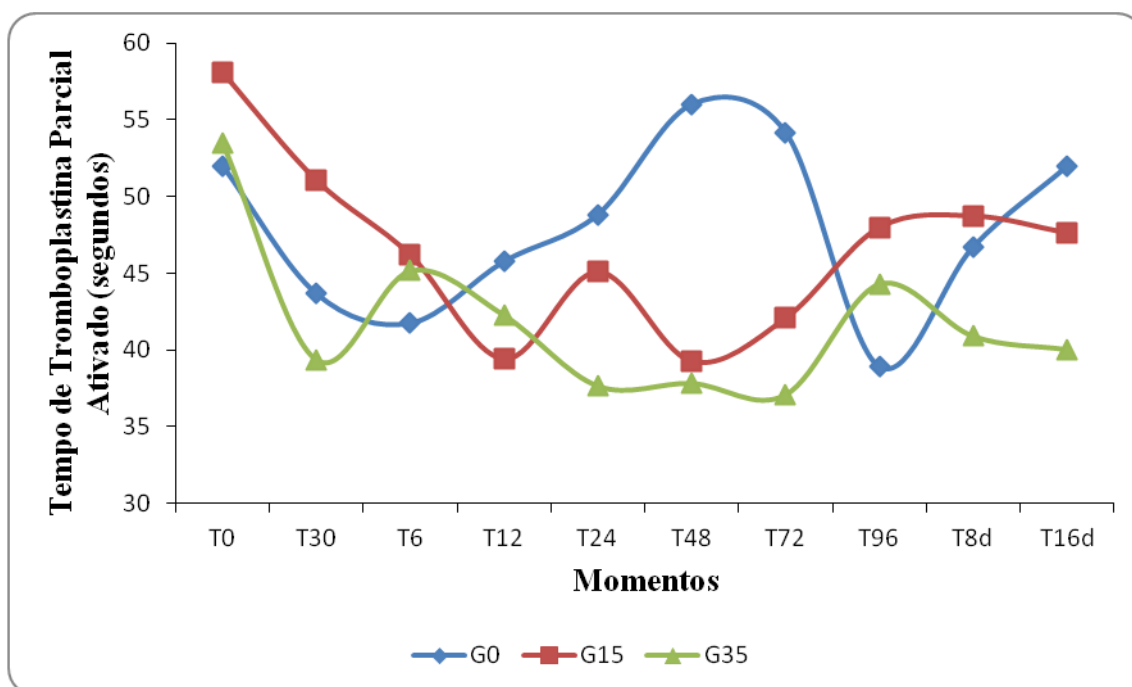


Figura 31 - Média do Tempo de tromboplastina parcial ativado (segundos) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.7. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

5.7.1. Malondialdeído (MDA)

Os valores médios e os respectivos desvios padrão do malondialdeído no decorrer do experimento podem ser vistos na tabela 39. O gráfico 32 apresenta o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

Na comparação entre grupos não houve diferença significativa entre as concentrações de MDA.

Tabela 39 - Média e desvio padrão do Malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	0,37	0,15	0,57	0,18	0,41	0,21
T30	0,51	0,35	0,57	0,11	0,50	0,24
T6	0,44	0,26	0,56	0,13	0,61	0,32
T12	0,37	0,2	0,57	0,14	0,52	0,32
T24	0,37	0,19	0,64	0,10	0,54	0,23
T48	0,42	0,09	0,66	0,12	0,58	0,28
T72	0,50	0,18	0,71	0,11	0,48	0,16
T96	0,60	0,43	0,71	0,09	0,47	0,18
T8d	0,46	0,08	0,58	0,21	0,46	0,09
T16d	0,53	0,16	0,57	0,17	0,38	0,10

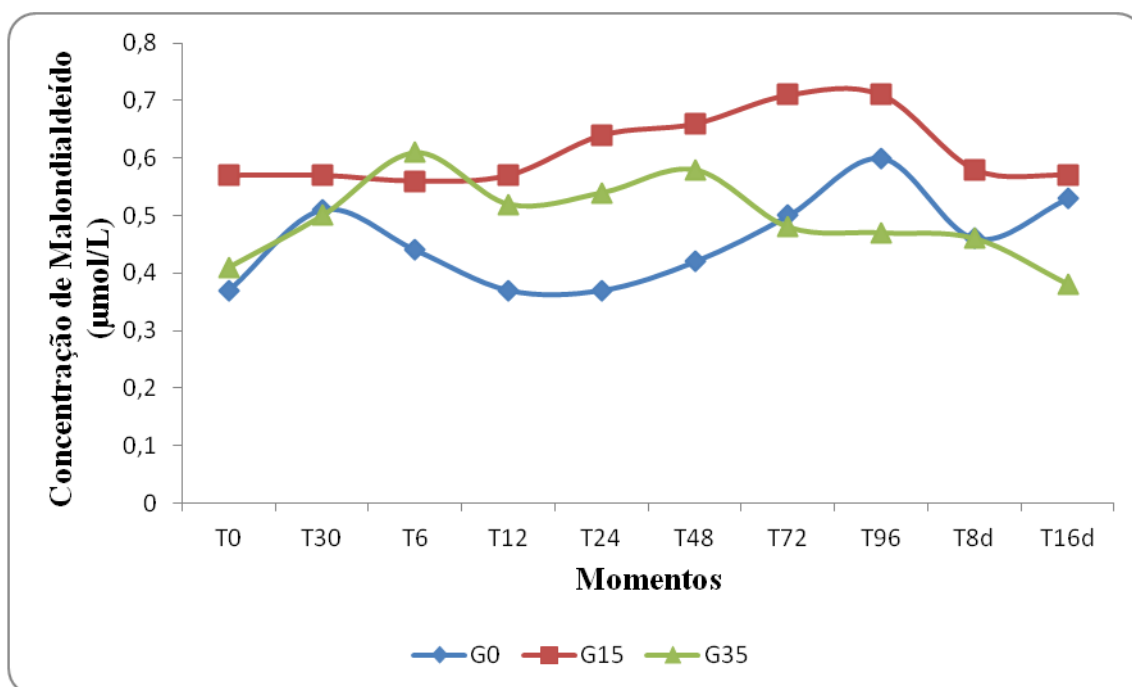


Figura 32 - Média do Malondialdeído ($\mu\text{mol/L}$) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.8. ESTRESSE OXIDATIVO

5.8.1. Concentração de Glutathione Reduzida (GSH)

Os valores médios e os respectivos desvios padrão da GSH no decorrer do experimento podem ser vistos na tabela 40. O gráfico 33 apresenta o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos. Na comparação entre tempos observou-se aumento significativo da concentração de GSH no G0 nos momentos T6, T24 e T72, enquanto no G35 houve aumento desde o T12 até o T72.

Tabela 40 - Média e desvio padrão da concentração de Glutathione reduzida (mg/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	18,28 ^a	11,10	17,76	6,72	13,78 ^a	5,75
T30	22,68 ^a	7,73	21,79	3,07	19,74 ^a	5,52
T6	26,14 ^b	7,79	22,79	2,42	20,03 ^a	6,22
T12	23,89 ^a	6,77	20,74	2,25	20,51 ^b	5,38
T24	25,23 ^b	6,95	21,31	4,04	20,89 ^b	5,62
T48	24,98 ^a	6,13	20,07	4,24	21,28 ^b	5,36
T72	25,52 ^b	6,37	20,53	2,48	21,20 ^b	3,26
T96	26,36 ^b	6,99	21,28	2,23	19,66 ^a	4,29
T8d	23,97 ^a	6,61	20,59	2,12	19,42 ^a	4,81
T16d	16,47 ^a	4,37	21,70	2,36	18,51 ^a	5,55

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

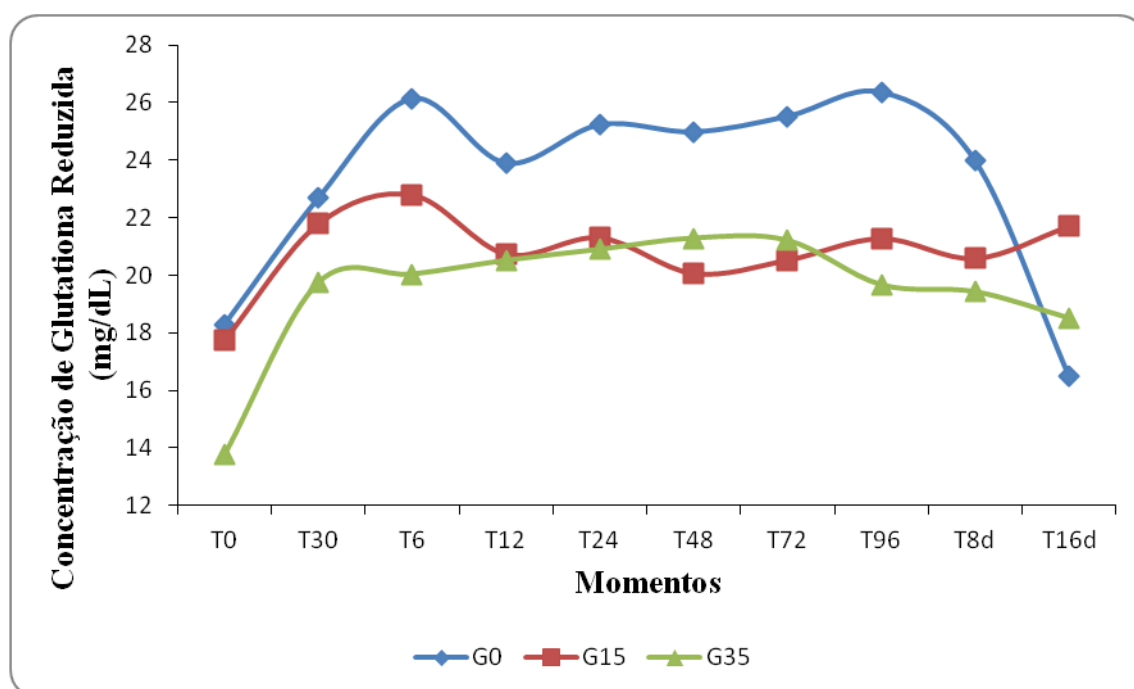


Figura 33 - Média da concentração de Glutathione reduzida (mg/dL) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.8.2. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A tabela 41 apresenta os resultados dos valores médios e respectivos desvios-padrão da superóxido dismutase média dos animais dos grupos G0, G15 e G35. Não houve diferença significativa entre grupos com relação à concentração da enzima SOD.

Tabela 41 - Média e desvio padrão da Superóxido dismutase (U/g Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	11,11	3,98	13,44	3,92	11,44	3,8
T30	12,66	2,21	13,21	3,52	12,59	5,63
T6	11,63	2,24	12,23	2,89	11,7	2,59
T12	12,19	2,79	12,24	6,04	11,1	2,01
T24	11,49	1,86	10,89	4,47	12,62	2,8
T48	10,68	2,26	12,83	2,76	12,37	2,36
T72	12,09	1,94	11,77	1,91	11,76	2,56
T96	10,71	2,54	13,81	3,19	11,78	2,17
T8d	13,01	2,08	14,88	3,33	11,93	3,66
T16d	14,74	2,88	12,71	1,4	11,47	2,17

O gráfico 34 ilustra o comportamento da SOD ao longo do experimento.

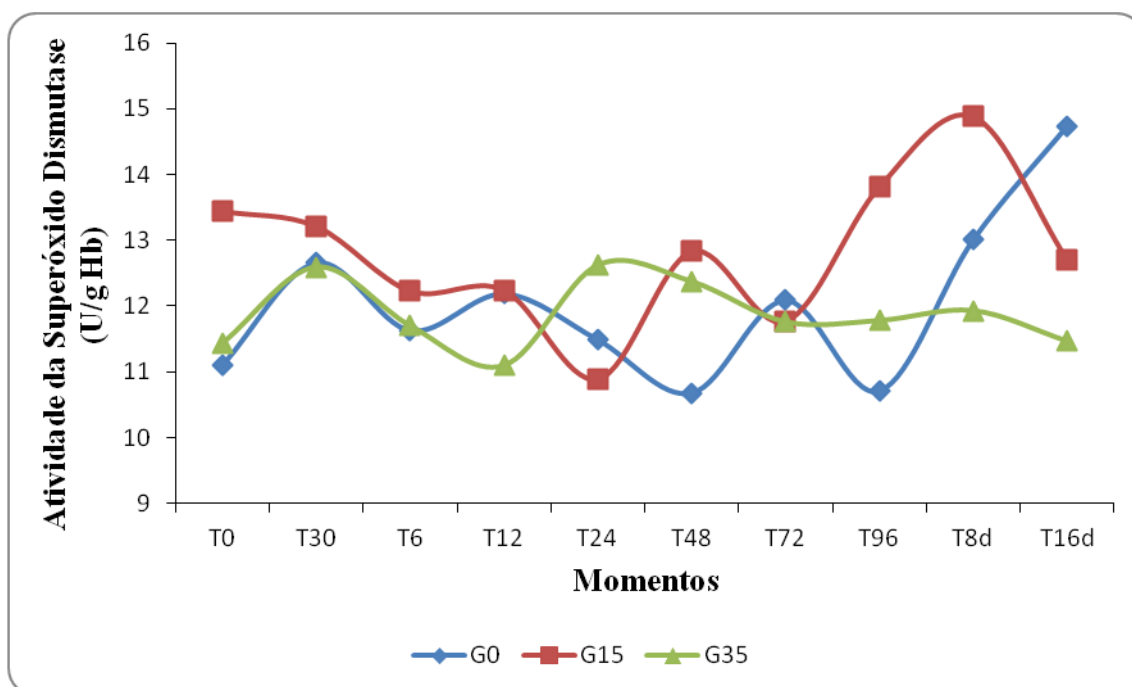


Figura 34 - Média da Superóxido dismutase (U/g Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.8.3. Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A tabela 42 apresenta os resultados dos valores médios e respectivos desvios-padrão da enzima GPx nos animais dos grupos G0, G15 e G35 no decorrer do experimento. O gráfico 35 apresenta o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

Não houve diferença entre os grupos estudados em nenhum dos momentos analisados, no entanto na comparação entre o tempo basal e os demais, ocorreu diminuição significativa da atividade da GPx no T8d e T16d no G0.

Tabela 42 - Média e desvio padrão da Glutathione peroxidase (U/g Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	4783 ^a	2307,36	4164	1137,5	3013	547,51
T30	3880 ^a	1634,48	3832	459,18	2663	432,94
T6	3807 ^a	1550,43	3641	664,91	3111	732,08
T12	3298 ^a	501,85	3769	537,9	2950	498,19
T24	3900 ^a	1194,46	3511	508,51	2919	1354,77
T48	3372 ^a	740,13	4031	681,65	3246	1110,86
T72	3275 ^a	894,54	3660	827,32	2963	581,54
T96	3687 ^a	1864,84	3899	649,89	3016	833,49
T8d	2810 ^b	985,36	3591	641,58	2649	572,35
T16d	3198 ^b	698,64	2987	565,45	2283	374,85

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre o tempo basal e os posteriores.

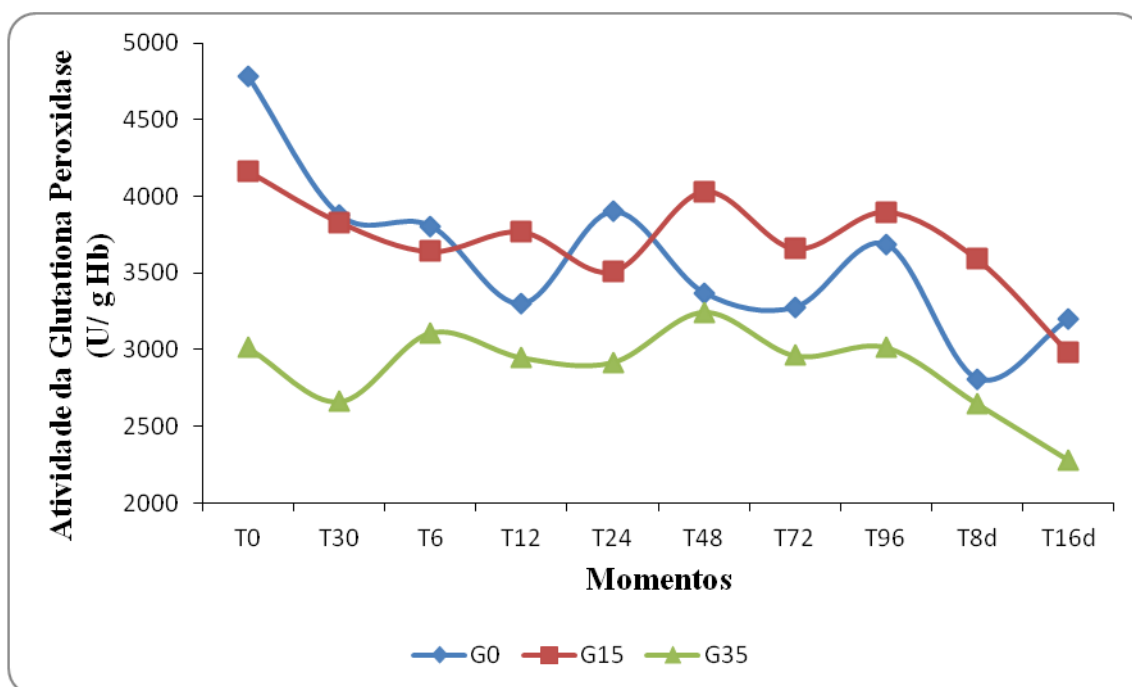


Figura 35 - Média da Glutathione peroxidase (U/g Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.8.4. Catalase (CAT)

Os valores médios e os respectivos desvios padrão da catalase no decorrer do experimento podem ser vistos na tabela 43. O gráfico 36 apresenta o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

Nos momentos T30, T6, T12 e T24 ocorreram diminuição significativa da catalase no G35.

Tabela 43 - Média e desvio padrão da Catalase (U/mg Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

Momentos	G0		G15		G35	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T0	3,07	0,86	2,70	0,71	1,98	0,51
T30	3,11 ^A	0,77	2,66 ^{AB}	0,58	1,42 ^B	0,48
T6	2,92 ^A	0,74	2,46 ^{AB}	1,18	1,23 ^B	0,40
T12	2,60 ^A	1,0	1,65 ^{AB}	0,59	1,15 ^B	0,22
T24	2,73 ^A	0,65	2,03 ^{AB}	0,74	1,25 ^B	0,50
T48	3,23	0,65	2,63	0,66	1,87	0,77
T72	2,833	0,97	2,30	1,14	1,51	0,57
T96	3,17	1,04	2,52	0,74	1,80	0,81
T8d	2,75	0,56	2,69	0,55	2,03	1,21
T16d	2,23	0,26	2,35	0,61	2,07	0,80

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

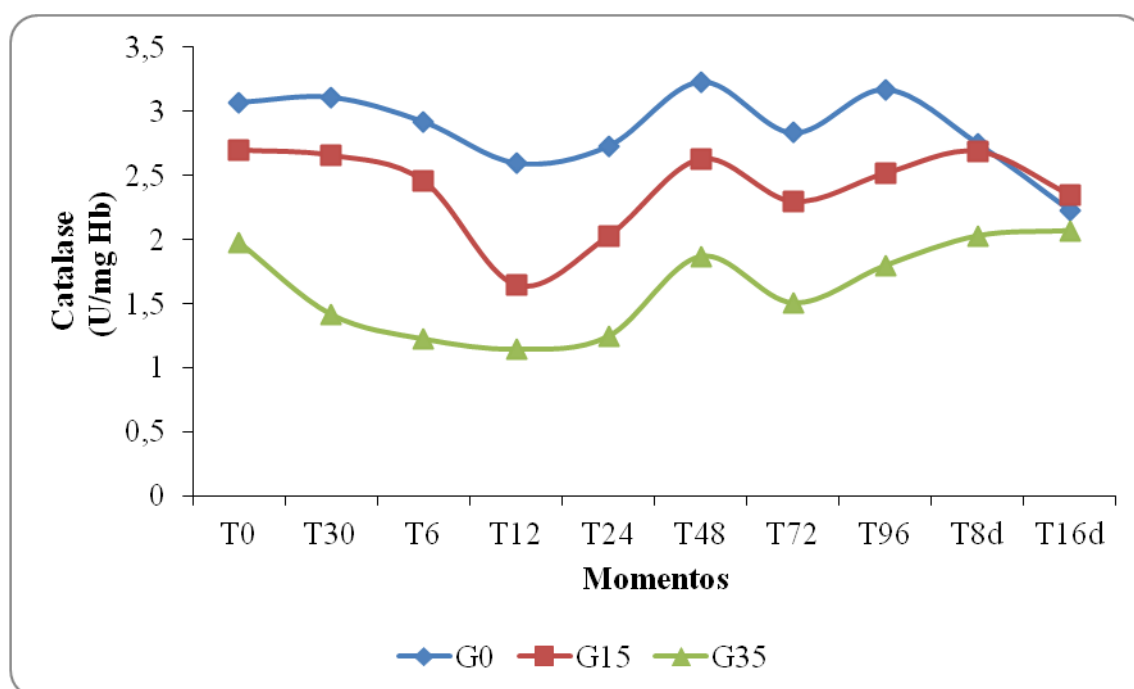


Figura 36 - Média da Catalase (U/mg Hb) de ovinos recebendo transfusão de sangue total coletado e transfundido imediatamente (G0), armazenado por 15 dias (G15) e armazenado por 35 dias (G35), nos momentos analisados.

5.9. VARIANTE DA HEMOGLOBINA

Os animais dos três grupos experimentais apresentaram após 16 dias da transfusão a variante da hemoglobina que receberam.

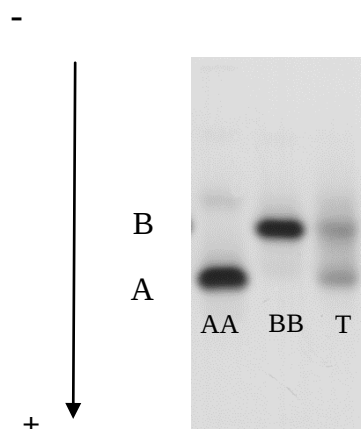


Figura 37- Perfil eletroforético em fita de acetato de celulose, mostrando as bandas de hemoglobina A e B, a origem da corrida (-) e os fenótipos homozigotos para hemoglobina A (HbAA), hemoglobina B (HbBB) e T representa os animais que tinham fenótipo HbAA e receberam transfusão de animais com fenótipo HbBB.

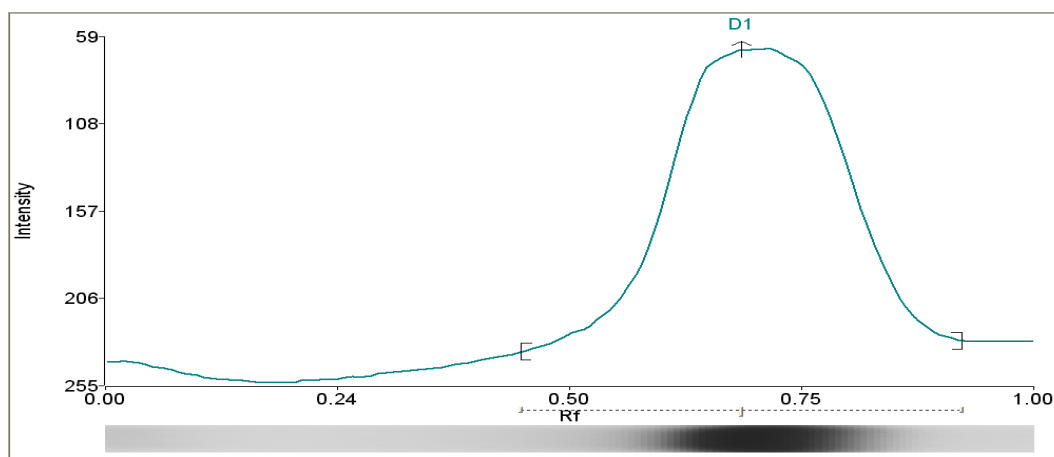


Figura 38 - Histograma de animal com variante de hemoglobina AA

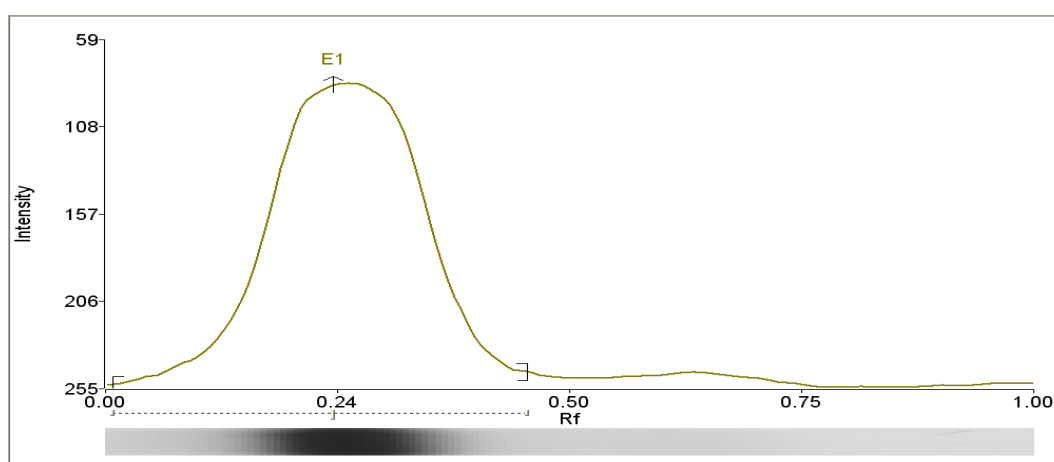


Figura 39 – Histograma de ovino com variante de hemoglobina BB

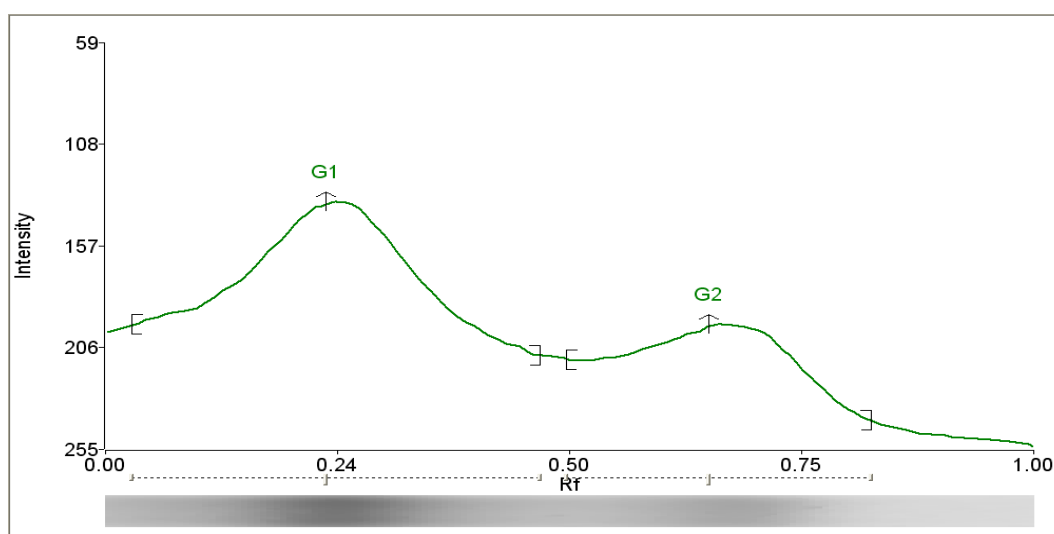


Figura 40 – Histograma de ovino com HbBB que recebeu transfusão de animal com HbAA.

5.10. RELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS

Não houve correlações entre as variáveis analisadas, com exceção das correlações óbvias entre VG x hemoglobina total ($r=0,90$), número de hemácias x hemoglobina total ($r=0,84$).

6. DISCUSSÃO

Optou-se pelo uso de bolsas com conservante CPDA-1 por serem as bolsas mais utilizadas na medicina veterinária (LANEVSKI; WARDROP, 2001) e economicamente mais acessíveis. Além da necessidade da avaliação das possíveis alterações provocadas pela transfusão homóloga de sangue armazenado em ovinos, já que em estudo anterior foi demonstrado que o sangue ovino manteve-se viável para transfusão quando armazenado por 35 dias nesse tipo de bolsa (SOUSA et al., 2009).

A avaliação das bolsas de sangue mostrou que o sangue armazenado por 35 dias apresentou alterações mais acentuadas quando comparadas com as amostras oriundas das bolsas de sangue coletadas imediatamente e armazenadas por 15 dias. Variáveis hematológicas, bioquímicas e hemogasométricas foram significativamente alteradas pelo período de armazenamento. As bolsas armazenadas por 15 e 35 dias apresentaram valores de hemoglobina plasmática maiores do que o sangue coletado no mesmo dia da transfusão (Tabela 4). Como constatado em estudo anterior o valor da hemoglobina plasmática tende a aumentar logo na primeira semana de armazenamento alcançando no 35º dia sua maior elevação (SOUSA et al., 2009). O aumento da hemoglobina plasmática está relacionado com o grau de hemólise no interior das bolsas, pois o armazenamento influencia à fragilidade osmótica das hemácias, favorecendo a lise e liberação da hemoglobina (HESS E GREENWALT, 2002).

Com relação ao volume globular, número de hemácias, hemoglobina total e VCM não foram constatadas diferenças entre as bolsas nos diferentes períodos de armazenamento.

A avaliação do sódio e potássio mostrou inversão na concentração desses íons, sendo observados menores valores de sódio e maiores de potássio no sangue armazenado (Tabela 3). Tais alterações já são bem conhecidas (SOUSA, 2009; RIBEIRO FILHO et al., 1994), pois em função do armazenamento as reservas energéticas na forma de ATP tendem a diminuir ao longo do período de armazenamento, o que interfere na atividade da bomba de sódio e potássio e consequentemente ocasiona à inversão do gradiente desses íons. A bomba de sódio e potássio também é influenciada pela baixa temperatura de armazenamento e pelo pH (HASHIMOTO, 1997), tendo sido observado redução concomitante do pH nas bolsas.

A redução do pH dentro das bolsas ocorre pela produção de lactato e pela presença do ácido cítrico na solução conservadora (RIBEIRO FILHO et al., 1994). O

menor pH observado na B35, em relação às B15 e B0, mostra a maior influência do tempo de armazenamento e consequentemente da concentração de lactato em relação ao aditivo ácido cítrico. A queda do pH sanguíneo promove maior afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, devido a redução do 2,3 DPG, apesar de não ter avaliado essa variável uma das indicações da ocorrência desse fenômeno é o aumento da saturação de oxigênio. A redução do 2,3DPG durante o armazenamento afeta a rápida liberação de oxigênio para os tecidos, sendo indicado em casos de hipoxia tecidual grave, utilizar sangue com menor tempo de armazenamento (ANNIS; SPARROW, 2007). O aumento da pressão de gás carbônico também contribui para a redução do 2,3 DPG.

O lactato e o CO₂ são os principais metabólitos resultantes do metabolismo anaeróbico das hemácias, e interferem diretamente na redução do pH sanguíneo do sangue armazenado. Apesar de o bicarbonato ser o principal tampão do meio extracelular, não foi observada diferença entre as bolsas (Tabela 3), sendo importante considerar que as proteínas como a hemoglobina e fosfatos são importantes agentes tamponantes no meio extracelular (RANDALL, 2008). Assim nessas condições, o déficit de base (BE) se apresentou como uma variável mais eficiente para avaliação do desequilíbrio acido-básico do sangue armazenado, uma vez que ele considera o poder tamponante total incluindo a ação do bicarbonato, fosfato e proteínas.

O número de leucócitos foi significativa menor nas bolsas de sangue armazenadas (Tabela 5), tal alteração tem mostrado contribuir para a redução da sobrevivência das hemácias, além de aumentar as chances de ocorrência de reação febril pós-transfusão (RFPT). A liberação de substâncias biorreativas como radicais livres, citocinas e histamina pelos leucócitos pode desencadear reação inflamatória no receptor (RIEDNER et al., 1990; EDER; CHAMBERS, 2007; McMICHAEL et al., 2010).

Nos últimos anos o benefício da transfusão de sangue vem sendo questionado, devido à ligação entre essa prática terapêutica e seus efeitos adversos. Nesse estudo foi observado o aumento significativo da temperatura 96h após a transfusão no grupo G0 e G15, caracterizando uma reação transfusional tardia. A elevação de 1°C ou mais na temperatura pós-transfusão quando comparada com a basal tem sido considerada como parâmetro para determinar se houve uma reação transfusional não hemolítica febril (RTNHF) (HEDDLE et al., 1993; SHARMA et al., 2000). Essas reações podem ter sido desenvolvidas pela presença de substâncias biorreativas liberadas pelos leucócitos no caso do G15, ou pela presença de aloanticorpos no receptor que passam a agir contra

antígenos presentes nas plaquetas e leucócitos do doador no caso do G0 já que o sangue não foi armazenado (CHAMBERS et al., 1990; BRUBAKER, 1990).

Outra alteração considerada como RTNHF de efeito circulatório é o aumento da frequência cardíaca acima de 20% da basal, no entanto não foi constatada nenhuma alteração nesse sentido. No momento basal os valores da frequência cardíaca estavam muito acima do (70-90/bpm) considerado normal para a espécie nos três grupos experimentais (RADOSTITS et al., 2007), devido a redução do VG e número de hemácias resultante da indução da anemia. Após a transfusão houve redução dessa variável ao longo do período experimental, sendo estes menores do que 100bpm, remetindo o aumento da volemia e a concomitante diminuição da frequência cardíaca na tentativa de manter o equilíbrio orgânico (SOUSA et al., 2012). Apesar da frequência cardíaca não ter ficado dentro da faixa de referência pós-transfusão é importante enfatizar que o estresse da manipulação deve ter contribuído para este achado.

A presença de tremores também é indicativa de RTNHF de efeito inflamatório, nesse estudo foram observados animais do G15 e G35 com fasciculações leve, que diminuíram com a redução da velocidade de infusão.

A retirada de 40% do volume sanguíneo reduziu o VG (27-35%), número de hemácias ($9-15 \times 10^6$) e hemoglobina total (9-15g/dL) para valores considerados abaixo do normal para a espécie (RADOSTITS, 2007). No T0 os valores do VG, número de hemácias e hemoglobina não diferiram entre os grupos indicando que a metodologia utilizada para indução da anemia logrou êxito.

Na comparação entre tempos foi possível verificar aumento significativo a partir de 30 minutos do VG, número de hemácias e hemoglobina total, devido a maior oferta de constituintes sanguíneos. Considerando as primeiras 24 horas pós-transfusão, os animais do G0 apresentaram aumento de 11,24% do VG, enquanto os do G15 e G35 apresentaram aumento de 6,58% e 7,69% respectivamente. No quarto dia após a transfusão ocorreu redução significativa no número de hemácias no G15 e G35, essa diferença pode estar relacionada à senescência e a alterações morfológicas sofridas pelas hemácias durante o armazenamento, estas alterações podem reduzir a sobrevivência pós-transfusional, já que as hemácias são eliminadas mais rapidamente pelo sistema fagocítico macrocítico (SCOTT et al., 2005). Mock et al. (2012) utilizando transfusão autóloga em ovinos com hemácias coletadas e marcadas com biotina e posteriormente reinfundidas mostraram que após 24 horas da transfusão 94% das hemácias transfundidas estavam viáveis.

A transfusão de sangue total armazenado também pode ser utilizada para repor proteínas plasmáticas em casos de hipoproteïnemia, já que esse componente sanguíneo não sofre alterações durante o período de armazenamento (REICHMANN; DEARO, 2001). Nesse estudo os valores basais de proteína total estavam abaixo do normal para a espécie ovina (60-79g/L) (RADOSTITS et al., 2007), em decorrência da retirada de 40% do volume sanguíneo, no entanto meia-hora após à transfusão os valores de proteína total se reestabeleceram.

Sousa et al. (2009) induzindo a anemia aguda em ovinos pela retirada de aproximadamente 20% de sangue, mostraram que a recuperação dos parâmetros hematológicos ocorreu 8 dias após a indução, enquanto Fonteque (2005) com a retirada de 50% mostrou que 28 dias é o tempo necessário para a recuperação. No presente estudo dezesseis dias pós-transfusão os animais apresentaram parâmetros hematológicos dentro do preconizado para a espécie ovina. Sendo importante notar que quanto maior o desafio, maior o tempo gasto na recuperação dos parâmetros hematológicos.

Os índices hematimétricos VCM e CHCM mantiveram-se dentro dos valores normais para a espécie. O VCM do G0 aumentou significativamente no T24 podendo ser indicativo do aparecimento dos primeiros reticulócitos, já que nesse período já tinha decorrido 48 horas da indução da anemia.

As bolsas de sangue utilizadas para a transfusão no grupo G15 e G35 apresentavam maiores quantidades de hemoglobina livre, e esses mesmos grupos apresentaram valores de hemoglobina significativamente maiores 12 horas após a transfusão quando comparado com G0, ocorrendo redução nos tempos seguintes. Altas concentrações de hemoglobina livre no plasma podem provocar danos renais e ao sistema de coagulação (HESS; GREENWALT, 2002; KORTE; VERHOEVEN, 2004). No entanto, não foram observadas alterações renais em função dos valores da creatinina sérica, apesar do G0 no T0 ter apresentado valores acima do normal (70-168 μ mol/L), sendo observada redução nos tempos subsequentes. A coagulação também não foi afetada permanecendo os valores de TP (22-55s) e TTPA (44-64s) dentro dos valores de referencia para a espécie.

Quando a hemoglobina está presente no plasma, o organismo apresenta mecanismos para sua remoção, inibindo seus efeitos deletérios. A remoção pode ser feita pelos rins, pelas células do fígado ou oxidada a metemoglobina (CARVALHO et al., 2007). O principal produto da metabolização da hemoglobina são as bilirrubinas, sendo observado aumento significativo da bilirrubina total nos momentos T30, T6 e T12

no G35, no entanto os valores permaneceram dentro dos normais (1,71-8,85 $\mu\text{mol/L}$) (RADOSTITS et al., 2007), não sendo detectada nenhuma alteração significativa na concentração de bilirrubina indireta. O aumento da hemoglobina plasmática concomitante com aumento da bilirrubina mostrou que o organismo não foi submetido a concentrações de hemoglobina suficiente para provocar problemas renais ou de coagulação, indicando que o organismo em condições fisiológicas conseguiu metabolizar eficientemente esse excesso. No entanto é importante considerar que animais com problemas renais ou de coagulação podem não responder da mesma forma.

Após a transfusão ocorreu aumento significativo no número de leucócitos no G35 no T6. Estudos em humanos tem mostrado uma resposta inflamatória após a transfusão, ocorrendo aumento imediato de até 60% na contagem de leucócitos após a transfusão, a qual persiste por até 12 horas, voltando aos valores normais após 24 horas (FENWICK et al., 2004). Em cães e ovinos recebendo transfusão autóloga também foi observado aumento dos leucócitos, sugerindo que esse efeito não se deve a presença de antígenos estranhos ao receptor, sendo implicado ao efeito da liberação de citocinas pelos leucócitos ou de substâncias imunologicamente ativa pelas plaquetas durante o período de armazenado (KLÜTER et al., 1999; McMICHAEL et al., 2010; SOUSA et al., 2012). Não foi possível verificar elevação significativa no número de leucócitos em função do tempo, em nenhum dos grupos experimentais, entretanto percebe-se uma elevação numérica no T12.

As plaquetas perdem a funcionalidade quando armazenadas, devido ao resfriamento, no entanto na comparação entre tempos foi observado aumento significativo dessa variável no G0 isso se deve ao fato desse grupo, ter recebido sangue total fresco, sem passar por refrigeração anterior, servindo como fonte de plaquetas (ALLYSON et al., 1997).

As bolsas armazenadas por 35 dias apresentaram menores valores de pH antes da transfusão, demonstrando uma alta carga ácida, o que ocasionou redução significativa do pH no T6 e T48 no G35. O pH venoso considerado normal para ovinos é entre 7,32-7,5 (RADOSTITS et al., 2007), no T6 apesar de ter ocorrido redução significativa, o mesmo ficou dentro da normalidade, enquanto no T48 ocorreu uma discreta acidemia (pH=7,29). É perceptível uma discreta elevação da $p\text{CO}_2$ acima dos valores de referência (38-40mmHg) e menor $p\text{O}_2$ no T48 desse grupo, assim a acidose não pode ser considerada respiratória, pois quando avaliamos o bicarbonato este

apresentou alteração significativa, demonstrando ser consumido no intuito de diminuir a quantidade de ácido.

A redução do pH sanguíneo, e o aumento da $p\text{CO}_2$ são responsáveis por desencadear o efeito Bohr, onde maior quantidade de oxigênio é liberada pela hemoglobina na tentativa de corrigir o desequilíbrio acidobásico (RANDALL, 2008), sendo observado no T48 apesar de não significativo menor valor da SO_2 . Após 48h os valores do pH retornaram ao normal mostrando que os mecanismos de compensação foram suficientes para reverter o quadro.

O déficit de base pós-transfusão sempre foi maior no G35, alcançando seu pico no T48, indicando que apesar do pH não ter diminuindo significativamente logo após a transfusão, o déficit de base já pré-anunciava o risco de ocorrer acidose, sugerindo que essa variável pode informar precocemente o risco da ocorrência de acidose metabólica nesses casos.

O tempo de armazenamento afeta sobremaneira a bomba de sódio e potássio (HÖGMAN, 1997), no pós-transfusão ocorreu aumento significativo da concentração de potássio no T6 e T12 no G35, porém estes ficaram dentro dos valores de referência para espécie não caracterizando uma hipercalemia, no entanto os valores de sódio nesse mesmo tempo e grupo ficaram acima dos valores normais (145-152mmol/L), sugerindo que após as 12 primeiras horas da transfusão a bomba de sódio e potássio tende a retornar suas funções, equilibrando os valores desses íons (KORTE e VERHOEVEN, 2004).

Nesse estudo foi avaliada a atividade de algumas enzimas no intuito de acompanhar possíveis alterações hepáticas decorrentes da perda e transfusão de sangue total. A atividade da AST e GGT permaneceram dentro dos valores de referência, resultado similar observado em estudo com transfusão autóloga em ovino (SOUSA et al., 2012). A atividade da CK aumentou significativamente no G0 e G15 nos tempos T6 e T12, decorrentes de micro lesões musculares devido ao longo período de decúbito necessário para a transfusão.

A análise conjunta da uréia e creatinina mostrou que a indução da anemia no G0 promoveu diminuição significativa da perfusão renal, devido à presença de uremia. No momento basal os valores de uréia e creatinina já estavam acima dos valores de referência para espécie (3-10mmol/L e 70-105 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente), no entanto 48 horas após a transfusão os valores da uréia e creatinina retornaram ao normal, indicando que a transfusão melhorou consideravelmente a perfusão renal. Alterações renais em

casos de decréscimo do fluxo sanguíneo renal em casos de hemorragia, desidratação e volume sanguíneo marcadamente diminuído são descritos na literatura (BUSH, 2004, KANEKO et al., 2008).

Em humano e cães é relatada perda da estabilidade dos fatores V e VIII durante o período de armazenamento sob-refrigeração (HONDOW et al., 1982; NOLTE et al., 1998). No entanto nesse estudo apesar de não ter sido avaliado os fatores de coagulação separadamente, os testes de TP e TTPA foram utilizados para avaliar a via intrínseca e extrínseca da coagulação, não sendo observada diferença entre grupos, sugerindo que o sangue armazenado não provocou alterações na coagulação.

Estudos *in vitro* tem mostrado que o sangue ao longo do período de armazenado acumula alta carga de agentes oxidantes reduzindo os agentes antioxidantes, o que aumenta as chances da ocorrência de lesões causadas por radicais livres (RACEK et al., 2011; JÓZWIK et al., 1997). O presente estudo não encontrou alterações significativas quando avaliou o marcador de estresse oxidativo MDA, apesar dos estudos demonstrarem que quando há aumento dos radicais livres, esses podem afetar as membranas celulares através da peroxidação lipídica (RACEK et al., 2001; JÓZWIK et al., 1997). A carga de radicais livres gerada pelo armazenamento não promoveu peroxidação lipídica suficiente para ser detectada pós-transfusão.

Hess (2010) considera que o dano oxidativo, principalmente a peroxidação lipídica, sofrida pelas hemácias durante o armazenamento (cerca de 35 a 42 dias dependendo do tipo de bolsa), é baixo quando comparado com a vida média dessas hemácias que é em média de 120 dias em humanos e 110 em ovinos. No entanto este autor salienta que repetidas transfusões, ou transfusões maciças pode ser preocupante pois hemácias com membrana plasmática afetadas podem levar a ocorrência de TRALI (Injúria Pulmonar Aguda Associada a Transfusão), além do fato que os lipídios oxidados das hemácias e especialmente as microvesículas formadas para removê-las, fornece superfície pró-coagulante e pró-inflamatória que podem aumentar o risco de reação pós-transfusional e eventos trombóticos.

Após a transfusão os valores do GSH tenderam a aumentar, alcançando diferença significativa no T6, T24, T72 e T96 no G0, enquanto no G35 os valores foram significativamente maiores no T12, T24, T48 e T72. Saber-se que esse tripeptídeo pode ser reconstituído se houver depleção, para que isso aconteça a glutatona reduzida recebe um íon de hidrogênio da riboflavina (NADPH), no entanto em casos de concentrações de NADPH limitada ocorre aumento da glutatona oxidada, tornando os

sistemas biológicos mais sensíveis ao dano oxidativo (SHAN et al., 1990). O aumento da concentração de GSH observada sugere que após a transfusão ocorreu regeneração do GSH, devido às hemácias terem retornado ao ambiente com disponibilidade de NADPH, já que durante o armazenamento a glicólise tende a diminuir, no entanto é interessante também observar que a avaliação dessa variável foi feita com espaçamento longo de tempo podendo ter ocorrido diminuição e não conseguimos detectar. No G0 apesar do sangue transfundido não ter sido armazenado nem provavelmente ocorrer redução do NADPH, a própria solução conservante ácida assim como a redução do oxigênio do meio podem ter contribuído para alguma perturbação oxidativa.

Com relação à GPx não foi observada diminuição significativa entre grupos, mas é possível verificar redução dessa variável nos tempo seguintes pós-transfusão. Este fato atrelado à redução significativa da catalase no T30, T6, T12 e T24 mostra que ocorreu alguma perturbação no sistema antioxidante. A enzima GPx assim como a catalase removem o peróxido de hidrogênio produzindo água e oxigênio. A ação da GPx é feita utilizando a glutathione reduzida e transforma-a em glutathione oxidada (VANNUCCHI et al., 1998). O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio pode estar ligado a possível quadro de hemólise com liberação de H_2O_2 , já que as células armazenadas sofrem uma série de lesões que as tornam mais frágeis, esse fato também é apoiado pelo aumento da concentração de bilirrubina nos mesmos momentos no G35. Rios et al. (2006) relata, apesar de não esclarecido ainda, que após a transfusão ocorre redução de aproximadamente 30% das hemácias e este fato contribui para os efeitos adversos da transfusão.

Nesse estudo, utilizou-se a variante de hemoglobina como biomarcador qualitativo na tentativa de estimar o tempo de permanência da hemoglobina transfundida e indiretamente do tempo de permanência das hemácias transfundidas na circulação dos animais recebendo sangue fresco e armazenado em dois diferentes tempos. Pode-se verificar que até o décimo sexto dia pós-transfusão os animais apresentavam resquícios da hemoglobina transfundida em todos os grupos. Na literatura não é conhecido o tempo de sobrevivência das hemácias pós-transfusão, nem tão pouco o efeito do armazenamento sobre essa variável.

Segundo Smith e Sherman (1994) as hemácias de caprinos quando transfundidas possuem meia vida de 2,4 a 5,1 dias, no entanto não informa se o sangue utilizado no estudo era armazenado ou não. Nesse estudo no quarto dia houve uma redução significativa no número de hemácias no G15 e G35, essa redução é um indicativo de

que as hemácias armazenadas por 15 e 35 dias possuem uma sobrevivência menor que as hemácias frescas.

Os resultados obtidos no presente estudo levam a crer que em ovinos as hemácias transfundidas permanecem vivas por até 16 dias, independentemente dos tempos de armazenamento estudados.

7. CONCLUSÕES

- A retirada de 40% do volume sanguíneo por uma única flebotomia em ovinos produziu anemia aguda pela diminuição significativa do volume globular, número de hemácias, hemoglobina total e proteína total.

- As bolsas de sangue total armazenadas por 35 dias apresentaram maiores lesões de armazenamento, as quais foram responsabilizadas por reações adversas pós-transfusão.

- Os três grupos apresentaram casos de reações transfusionais, sendo observadas manifestações inflamatórias pela presença de fasciculações no G15 e G35 e hipertemia no G0 e G15.

- Os animais que receberam sangue total armazenado por 35 dias apresentaram maiores valores de hemoglobina livre e leve acidemia metabólica, sendo importante considerar esse fator de risco quando da avaliação do estado do paciente e da escolha do tempo de armazenamento do sangue para a transfusão.

- A transfusão de sangue total armazenado não afetou a via intrínseca e extrínseca do sistema de coagulação.

- A transfusão do sangue total armazenado não promoveu peroxidação lipídica pós-transfusão, no entanto houve manifestações de estresse oxidativo pela redução da catalase.

- A utilização da hemoglobina como biomarcador mostrou que as hemoglobinas transfundidas permaneceram por 16 dias pós-transfusão.

8. REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. C. D. MAIA, M. B.; COSTA, V. M. ME.; SOARES. HE. S. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da região oeste do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Animal Brasileira.**, v. 9, n. 1, p. 212-218, 2008.
- AL-HUNITI, N. H.; WIDNESS, J. A.; SCHMIDT, R. L.; VENG-PEDERSEN, P. Erythropoietin production rate in phlebotomy-induced acute anemia. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v. 25, p. 389-397, 2004.
- ALLYSON, K.; ABRAMS-OGG, A. C. G.; JOHNSTONE, I. B. Room temperature storage and cryopreservation of canine platelet concentrates. **American Journal Veterinary Research**, v.58, p. 1338-1347, 1997.
- ALMOSNY, N. Equilíbrio ácido-básico em Medicina Veterinária. In: **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. 2006. Porto Alegre: Grafica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. P. 5-16.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**. v. 350, n. 1, p. 103-108, 2000.
- 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. M.; WOLFSHEIMER, K. J.; CATCHINGS, S. Canine blood component therapy: product preparation, storage and administration. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.23, p. 483-493, 1986.
- AYRES, M.C. C.; CHAVES FILHO, R. M.; ROCHA, J. S.; GAMA, S. M. S.; CAVALCANTI, A. S. R.; ALMEIDA, M. A. O.; BITTENCOURT, T. C. B. S. C. Polimorfismo da hemoglobina de ovinos (*Ovis aries*, L.): determinação do tipo e da frequência em animais criados no Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.10, n.3, p 637-644 jul/set, 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, P. D. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113 – 123, 2006.
- BARROS, I. O. **Avaliação da conservação do sangue total de jumentos (*Equus asinus*) acondicionado em bolsas de sangue do tipo CPDA-1 e CPD/SAG-M**. 2011. 79f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Semi-Árido.
- BARTHEL, B. Functionell changes in red blood cells during storage in units of full blood or erythrocyte concentrates of the horse. 1999. **Dissertation Journal**, n. 2298, Freie Universita Berlin, Berlin, Germany.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**. São Paulo, v. 25, n. 6, 2002.

BENDOVA, P.; MACKOVA, E.; HASKOVA, P.; VAVROVA, A.; JIRKOVSKY, E.; STERBA, M.; POPELOVA, O.; KALINOWSKI, D. S. KOVARIKOVA, P.; VAVROVA, K.; RICHARDSON, D. R.; SIMUNEK, T. Comparison of clinically used and experimental iron chelators for protection against oxidative stress-induced cellular injury. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 1105–1114, 2010.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-888, 1963.

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

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radical livre e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BONDAN, C.; SOARES, J. C.; CECIM, M.; LOPES, S. T.; GRAÇA, D. L.; DA ROCHA, R. X. Oxidative stress in the erythrocytes of cattle intoxicated with *Senecio* sp. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.4, p.353-357, 2005.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. **Resolução RDC nº 153**, de 24 de junho de 2004. Disponível em :<<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=11662>>. Acesso em: 02 jun. 2012.

BROOKS, M. Transfusion medicine. In: MURTAUGH, R. J.; KAPLAN, P. M. **Veterinary Emergency and Critical Care Medicine**. Saint Louis: Mosby Yearbook, 1992. 935p.

BRUBAKER, D. B. Clinical significance of white cell antibodies in febrile nonhemolytic transfusion reactions. **Transfusion**, v. 30, p. 733–737, 1990.

BUNN, H.; FORGET, B. G. **Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects** Philadelphia, PA, Saunders, 1986.

BUSH, B. M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 262-289.

CHAPEL, S. H.; VENG-PEDERSEN, P.; SCHMIDT, R. L.; WIDNESS, J. A. A pharmacodynamic analysis of erythropoietin-stimulated reticulocyte response in phlebotomized sheep. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, p. 346-351, 2000.

CARVALHO, E. B.; BORGES, E. L.; CARLOS, L. M. B.; SILVA, M. A. M.; MAGALHÃES, S. M. M.; GOMES, F. V. B. A. F.; CARVALHO, M. J. C.; QUIXADÀ, A. T. S.; PITOMBEIRA, M. H. S. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 36-40, 2007.

CHAMBERS, L. A.; KRUSKALL, M. S.; PACINI, D. G.; DONOVAN, L. M. Febrile reactions after platelet transfusion: the use of single versus multiple donors. **Transfusion**, v. 30, p. 219-221, 1990.

CHAVES, D. F. **Respostas clínicas, hematológicas e bioquímicas de ovinos** submetidos à transfusão sanguínea autóloga. 2009. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

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. 447-458, 1997.

CHIHUAULAF, R. H.; CONTRERAS, P. A.; WITTEWER, F. G. Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. **Veterinaria México**. v. 33, n. 3, p. 265-283, 2002.

COLLATOS, C. Hemostatic dysfunction. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine** 4. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1997. p. 286-289.

COSTA JÚNIOR, J. D. **Avaliação do sangue total de cães armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa.

COSTA JÚNIOR, J.; VIANA, J. A.; RIBEIRO FILHO, J. D.; FAVARATO, E. S.; MATA, L. C.; ARGÔLO NETO, N. 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.

DOMANSKI, A. V.; LAPSHINA, E. A.; ZAVODNIK, I. B. Oxidative processes induced by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells: chemiluminescence studies. **Biochemistry**, v. 70, n. 7, p. 761- 769, 2005.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of stress oxidative. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 200-227, 2004.

DUMASWALA, U. J.; WILSON, M. J.; WU, Y. L.; WYKLE, J.; ZHUO, L, DOUGLASS, L. M.; DALEKE, D. L. Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage. **Free Radical Research**, v. 33, n. 5, p. 517-519, 2000.

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

DZIK, S. Leukodepletion blood filters: Filter design and mechanisms of leukocyte removal. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 7, p. 65-77, 1993.

DZIK, S.; AUBUCHON, J.; JEFFRIES, L, KLEINMAN, S.; MANNO, C.; MURPHY M. F.; POPOVSKY, M. A.; SAYERS, M.; SILBERSTEIN, L. E.; SLICHTER, S. J, VAMVAKAS, E. C. Leukocyte reduction of blood components: Public policy and new technology. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 14, p. 34-52, 2000.

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

ELFATH, M. D. Is it time to focus on preserving the functionality of red blood cells during storage. **Transfusion**, v. 46, p. 1469-1470, 2006.

EISENBRANDT, D. L.; SMITH, J. E. Use biochemical measures to estimate viability of red blood cells in canine blood storage in acid citrate dextrose solution, with an without added ascorbic acid. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 163, n. 8, p. 984-987, 1973.

ESPINOSA, J. A. L. Apuntes para la historia de las transfusiones sanguíneas. **Revista Cubana de Medicina General e Integral**, v.13, n. 4, 1997.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, p 407-421, 1990.

FARHUD, D. D.; YAZDANPANA, L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. **Iranian Journal of Public Health**, v. 37, n. 4, p. 1-18, 2008.

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.

FENWICK, J. C.; CAMERON, M.; RONCO, J. J.; WIGGS, B. R.; TWEEDDALE, M. G.; NAIMAN, S. C.; HALEY, L. P.. Blood transfusion as a cause of leucocytosis in critically ill patients. **The Lancet**, v. 344, p. 855–856, 1994

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

FONTEQUE, J. H. **Estresse oxidativo e lipoperoxidação devido à anemia induzida por perda aguda de sangue em ovinos**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

GATÉ, L.; PAUL, J.; BA, G. N.; TEW, K. D, TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 52, p. 169-180, 1999.

GALIZIA, MS. WAITZBERG, DL. Mecanismo de ação dos radicais livres e antioxidantes. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 16, p. 79-89, 2001.

GAW, A.; COWAN, R. A.; O'REILLY, D. S. J.; STEWART, M. J.; SHEPHERD, J. **Clinical Biochemistry**. 2.ed. Churchill Livingstone, 1999.

GENETET, B.; MANONNI, P. Antecedentes históricos. In: La transfusion ed em espanol. Habana, **Ministério de Cultura Editorial**; Cientifico Técnico, 1980.

GINGERICH, D. A. Fluid, shock and blood therapy. In: HOWARD, J. L. **Current veterinary therapy**. Food animal practice 2. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1986. p. 1-8.

GOULD, S.; CIMINO, M. J.; GERBER, D. R.; JOHNSON, R. W. Packed red blood cell transfusion in the intensive care unit: limitations and consequences. **American Journal of Critical Care**, v. 16, p. 3, 2007.

GREENWALT, T. J.; SOSTOK, C. Z.; DUMASWALA, U. J. Studies in red blood cell preservation: Comparasion of vesicle formation, morphology, and membrane lipids during storage in AS-1 and CPDA-1. **Vox Sanguinis**, v. 58, p. 90-93, 1990.

GRUNE, T.; SOMMERBURG, O.; SIEMENS, W. G. Oxidative stress anemia. **Clinical Nephrology**, v. 53, p. S18-S22, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 3th. New York: Oxford University Press, 1999. 936p.

HALLINWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB Journal**, v. 1, n. 5, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL. B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57 p. 715-725, 1993.

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**, 5 ed. Academic Press, London, 2010. p. 175–240.

HASHIMOTO, M. C. T. **Estudo da preservação de sangue em diferentes bolsas de coleta com di-octil-ftalato e anticoagulante citrato-fosfato-dextrose-adenina**. 1997. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

HEDDLE, N. M.; KLAMA, L. N.; GRIFFITH, L. A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. **Transfusion**, v. 33, n. 10, 1993.

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

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

HESS, J. R.; HILL, H. R.; OLIVER, C.K. OLIVER, C.K.; LIPPERT, L.E.; RUGG, N.; JOINES, A.D.; GORMAS, J.F.; PRATT, P.G.; SILVERSTEIN, E.B.; GREENWALT, T.J. Twelve-week red blood cell storage. **Transfusion**, v.43, p.867-872, 2003.

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

HESS, J. R.; RUGG, N.; GORMAS, J. F.; KNAPP, A.D.; GREENWALT, T.J. The meaning of RBC morphologic changes during blood storage. **Transfusion**, v. 60, p. 60-65, 2000.

HEDDLE, N. M.; KLAMA, L. N.; GRIFFITH, L. A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. **Transfusion**, v. 33, n. 10, 1993.

HEYNEN, N. J. Ultrastructural changes during erythroid development. In: HARRIS, J. R. **Blood Cell Biochemistry**. New York: Plenum Publishing, 1990. p. 1 – 26.

HONDOW, J. A.; RUSSELL, W. J.; DUNCAN, B. M.; LLOYD, J. V. The stability of coagulation factors in stored blood. **Australian and New Zealand Journal of Surgery** v. 52, p. 265–269, 1982.

HÖGMAN, C. F.; ERIKSSON, L.; WALLVIK, J.; PAYRAT, J. M. Clinical and laboratory experience with erythrocyte and platelet preparations for 0.5 CPD ErythroSol opti systems. **Vox Sanguinis**, v. 73, p.212-219, 1997.

HÖGMAN, C.F. Preparation and preservation of red cells. **Vox Sanguinis**. v. 74, Suppl. 2, p. 177–187, 1998.

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

HOLME, S. Current issues related to the quality of stored RBCs. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 33, p. 55–61, 2005.

HOWARD, D.L.; PEREIRA, L.; SANCHEZ, A.; REINHOLZ NETTO, J.; MADSUURA, T. A.; RAUPP, H. Avaliação do hemograma de ovinos em processo hemorrágico experimental agudo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 5, n. 2, p.89-92, 1998.

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.

HUNT, E.; MOORE, J.S. Use of blood and blood products. **Veterinary Clinical North American Food Animal Practice**, v. 6, n. 1, p. 133-147, 1990.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2006. 1344p.

JÓŻWIK M.; JÓŻWIK, M.; JÓŻWIK, 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.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals** , 6th ed. San Diego : Elsevier , 2008.

KORTE, D.; VERHOEVEN, A. J. Quality determinants of erythrocyte destined for transfusion. **Cell and Molecular Biology**, v. 50, n. 2, p. 187-195, 2004.

KRISTENSEN, A. T.; FELDMAN, B. F. Bancos de sangue e medicina transfusional. In: ETTINGER, E. J.; FELDMAN, E. C. ed. **Tratado de Medicina Interna de Pequenos Animais**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1997. p. 497-517.

KRINSKI, N. I. Mechanism of action of biological antioxidants. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 200, p. 248-254, 1992.

KURUP, P. A.; ARUN, P.; GAYATHRI, C.R. et al. 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.

KLUTTER, H.; BUBSEL, S; KIRCHNER, H; WILHELM, D. Frebile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell poor platelet preparations. **Transfusion**, v. 39, p. 1179-1184, 1999.

LACERDA, L. Transfusão sangüínea em veterinária: desafios a vencer. In: GONZÁLEZ, F. H. D., SANTOS, A. P. (eds.): **Anais do II Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.62-81. 2005.

LACERDA, R. M; SOTO-BLANCO, B. Determinação das variantes de hemoglobina em ovinos mestiços Santa Inês. **Caatinga**, v. 19, n. 4, 2006.

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

LEAL-NOVAL, S. R.; JARA-LOPEZ, I.; GARCIA-GARMENDIA, J. L.; MARIN-NIEBLA, A.; HERRUZO- AVILES, A.; CAMACHO-LARANA, P.; LOSCERTALES, J. Influence of erythrocyte concentrate storage time on postsurgical morbidity in cardiac surgery patients. **Anesthesiology**, v. 98, p. 815–822, 2003.

LÓPEZ-REVUELTA, A.; SÁNCHEZ-GALLEGO, J. I.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ-YAGÜE, J.; LLANILLO, M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v. 161, p. 79 – 91, 2006.

LOPES, R. S.; KOHAYAGAWA, A.; DANTAS FILHO, J.; FERREIRA, A. M; CURI, P. R. Alterações hematológicas e bioquímicas em sangue total de equino, conservado para transfusão, em bolsas plásticas contendo ACD-F. **Revista Universidade Rural. Ciências da Vida**, v. 17, n. 2, p. 91-95, 1995.

LÓPEZ-REVUELTA, A.; SÁNCHEZ-GALLEGO, J. I.; HERNANDES-HERNANDES, A.; SÁNCHEZ-YAGÜE, J.; LLANILLO, M. Increase in vulnerability to oxidative damage in cholesterolmodified erythrocytes exposed to *t*-BuOOH.

Biochimica et Biophysica Acta, v. 1734, p. 74 – 85, 2005.

LUCAS, R. L.; LENTZ, K. D.; HALE, A. S. Collection and preparation of blood products. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 19, n. 2, p. 55-62, 2004.

LUZ, D. O.; LACERDA, R. M.; BARRETO JÚNIOR, R. A.; SOTO-BLANCO, B. Eritrograma e variantes de hemoglobina em caprinos da raça Canindé. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 1, 2010.

MAXWELL, S. R. J. Prospects for the use antioxidant therapies. **Drugs**, v. 49, p. 345-361, 1995.

McMICHAEL, M. A.; SMITH, S. A.; GALLIGAN, A.; SWANSON, K. S.; FAN, T. M. Effect of leukoreduction on transfusion-induced inflammation in dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 1131–1137, 2010.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. Homeostasia e distúrbios eletrolíticos e ácido-básicos. In: **Medicina de Laboratório Veterinário: interpretação e diagnóstico**. Roca. 1995. p. 83-90.

MISETA, A.; BOGNER, P.; KELLERMAYER, M.; WHEALTLEY, D. N.; TAKACS, I.; NAGY, G.; CAMERON, I. L. Erythrocyte Potassium and Sodium Polymorphisms in Donkey (*Equus asinus*). **Comparative Biochemical Physiology**. v. 106, n. 3, p. 479 – 483. 1993.

MOCHIZUKI-ODA, N.; TAKEUCHI, Y.; MATSUMURA, K.; OOSAWA, Y.; WATANABE, Y. Hipoxia-induced catecholamine release and intracellular Ca^{2+} increase via supression of K^{+} channels in cultured rat adrenal chromaffins cells. **Journal Neurochemistry**, v. 69, p. 377-387, 1997.

MOCK, D. M.; MATTHEWS, N. I.; ZHU, S.; STRAUSS, R. G.; SCHMIDT, R. L.; ZIMMERMAN, M. B.; NALBANT, D.; FREISE, K. J.; SALEH, M.; VENG-PEDERSEN, P.; WIDNESS, J. A. Comparison of red blood cell survival in sheep determined using red blood cells labeled with either biotin at multiple densities or [^{14}C]cyanate: validation of a model to study human physiology and disease. **Transfusion**. v. 2, n. 5, p. 963-973, 2012.

MOLLISON, P. L: The introduction of citrate as an anticoagulant and of glucose as a red cell preservative. **British Journal Haematology**, v. 108, p. 13-18, 2000.

MOLLISON, P.L.; ENGELFRIET, C.P.; CONTRERAS, M. **Blood Transfusion in Clinical Medicine**. Nova York: Blackwell Science, 1997.

MOORE, T. M.; KHIMENKO, P. L.; TAYLOR, A. E. Endothelial damage caused by ischemia and reperfusion and different ventilatory strategies in the lung. **The Chinese Journal of Physiology**, v. 39, p. 65-81, 1996.

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.

MUDGE, MC; WALKER, NJ; BORJESSON, DL; LIBRACH, F; JOHNS, JL; OWENS, SD. Post-transfusion survival of biotin-labeled allogeneic RBCs in adult horses. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, p.56–62, 2012.

NGUYEN, T. C.; BUNCH, T. D. Blood - groups and evolutionary relationships among domestic sheep (*Ovis aries*), domestic goat (*Capra hircus*), aoudad (*Ammotragus lervia*) and european mouflon (*Ovis musimon*). **Ann Genetic Select Animal**, v. 12, p. 169-180, 1980.

NELSON, S. K.; Mc CORD, J. M. Iron, oxygen radicals, and disease. **Advances in Molecular and Cell Biology**, New York, v. 25, p. 157 – 183, 1998.

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

NIELSEN, H. J.; REIMERT, C.; PEDERSEN, A. N.; PEDERSEN, A. N.; DYBKJOER, E.; BRÜNNER, N.; ALSBJORN, B.; STAHL SKOV, P. Leucocytederived bioactive substances in fresh frozen plasma. **British Journal Anaesthesia**, v. 78, p. 548–552, 1997.

NOLTE, I.; NIEMANN, C.; MÜLLER-BERGHAUS, G. The conservation of whole blood of dogs for transfusion purposes in CPDA-I stabilizer-coated PVC bags – effect of storage on the preservation of plasmatic coagulation factors. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 101, p. 73–76, 1982.

OLIVEIRA, R. R. **Imunohematologia e transfusões sangüíneas**. 2003. Monografia (Curso de Pós-Graduação Lato-Sensu em Imunologia Clínica). Academia de Ciência e Tecnologia.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal Laboratory Clinical Medicine**, v.70, p. 158-169, 1967.

PIERRE, B. DEHP in blood bags medical plastic their limitations. **Canada Research**, p.3-25, 1981.

PERKINS, S. L. Examination of the blood and bone marrow. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N. **Wintrob's Clinical Hematology**. 11. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2004. p. 27 – 74.

RACEK, J.; HERYNKOVÁ, R.; HOLEČEK, V.; FALTYSOVÁ, J.; KREJČOVÁ, I. What is the Source of Free Radicals Causing Hemolysis in Stored Blood? **Physiological Research**, v. 50, p. 383-388, 2001.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D.

Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses. tenth ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, 2007, p. 2048-2049.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal:** mecanismos e adaptações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RAZOUK, F. H.; REICH, E. M. V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v. 26, p. 126-134, 2004.

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

RIBEIRO FILHO, J. D.; ALMEIDA, C. T.; GONÇALVES, R. C.; KOHAYAGAWA, A.; CURY, 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. **Veterinary Zootecnic**, v.6, p.77-84, 1994.

RIBEIRO FILHO, J. D.; ALMEIDA, C. T.; GONÇALVES, R. C.; KOHAYAGAWA, A.; CURI, P. R. Alterações bioquímicas de sangue bovino durante a conservação por 35 dias, em frascos de vidro com ACD e bolsas plásticas com CPDA-1. **Veterinary Zootecnic**, v.5, p.97-103, 1994.

RICE-EVANS, C. Iron-mediated oxidative stress and erythrocytes. In: HARRIS, J. R. **Blood Cell Biochemistry**. New York: Plenum Publishing, p. 429 – 453, 1990.

RIEDNER C.; HEIM, M. U.; MEMPEL, W.; WILMANNS, W. Possibility to improve preservation of whole blood by leukocyte-depletion before storage. **Vox Sanguinis**, v. 59, p. 78–82, 1990.

RIOS, J. A.; HAMBLETON, J.; VIELE, M.; RUGG, N.; SINDERMAN, G.; GREENWALT, T.; WAGES, D.; COOK, D.; CORASH, L. Viability of red cells prepared with S-303 pathogen inactivation treatment. **Transfusion**, v. 46, p. 1778–1786, 2006

SALIB, A. A.; DAWSON, R. B. Preservation of different types of buffalo leucocytes in ACD and CPD with metabolic additives. **Acta Veterinaria Biograd**, v. 35, p. 203-216, 1985.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.

SARADA, S.K.S.; DIPTI, P.; ANJU, B.; PAULINE, T.; KAIN, A.K.; SAIRAM, M.; SHARMA, S.K.; ILAVAZHAGAN, G.; DEVENDRA KUMAR, W.; Antioxidant effect of beta-carotene on hypoxia induced oxidative stress in male albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p.149-153, 2002.

SCOOT, K. L.; LECAR, J.; ACKER, J. P. Biopreservation of blood cells: past, present and future. **Transfusion Medicine Review**, v. 19, n. 2, p. 127-142, 2005.

SEN, C. K.; PACKER, L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 653S-669S, 2000.

SHAN, X. Q.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, p. 61-71, 1990.

SHARIFI, S.; DZIK, W. H.; SADRZADEH, S. M. Human plasma and tirilazad mesylate protect stored human erythrocytes against the oxidative damage of gamma-irradiation. **Transfusion Medicine**, v. 10, p. 125-130, 2000.

SHARMA, A. D.; SREERAM, G.; ERB, T.; GROCOTT, H. P.; SLAUGHTER, F. T. Leukocyte-Reduced Blood Transfusions: Perioperative Indications, Adverse Effects, and Cost Analysis. **Anesthesia Analgesia**, v. 90, p. 1315-1323, 2000.

SHEPPARD, C. A.; LOGDBERG, L. E.; ZIMRING, J. C.; HILLYER, C. D. Transfusion related acute lung injury. **Hematology Oncology Clinical North American**, v. 21, p. 163-176, 2007.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILLIMAN, C. C. The two-event model of transfusion-related acute lung injury. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 5, p. 124-131, 2006.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. **Blood, lymph and immune systems**. In: GOAT medicine. Philadelphia, Lea e Febiger, 1994. p. 193-230.

SOLDAN, A. Blood transfusion in cattle. **In Practice**, v. 21, n. 10, p. 590-595, 1999.

SOMMERBURG, O.; GRUNE, T.; HAMPL, H.; RIEDEL, E.; VAN KUIJK, F. J.; EHRLICH, J. H. H.; SIEMS, W. G. Does long-term treatment of renal anemia with recombinant erythropoietin influence oxidative stress in hemodialyzed patients? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 13, p. 2583-2587, 1998.

SOUSA, R. S.; BARRETO JÚNIOR, R. A.; SOUSA, I. K. F.; SOARES, H. S.; BARROS, I. O.; MINERVINO, A. H. H.; ORTOLANI, E. L. **Avaliação de sangue total ovino armazenado em bolsas de sangue (CPDA-1) mantido sob refrigeração**. In: VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009, Belo Horizonte. Ciência Animal Brasileira. Goiânia : Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, 2009. v. 10. p. 290-295.

SOUSA, R. S.; CHAVES, D. F.; BARRÊTO-JÚNIOR, R. A.; SOUSA, I. K. F.; SOARES, H. S.; BARROS, I. O.; MINERVINO, A. H. H.; ORTOLANI, E. L. Clinical, haematological and biochemical responses of sheep undergoing autologous blood transfusion. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 61, 2012.

STANDEFER, J. C.; VANDERJAGT, D. Use of tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay. **Clinical Chemistry**, v. 23, n. 4. p. 749-751, 1997.

STENVINKEL, S. Anemia and inflammation: what are the implications for the nephrologists? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 8, p. 17-22, 2003.

SUCUPIRA, M. C. A.; ORTOLANI, E. L. Uso de sangue arterial e venoso no exame do equilíbrio ácido-básico de novilhos normais ou com acidose metabólica. **Ciência Rural**, v. 33, p. 863-868, 2003.

SZASZ G. **Methods of Enzymatic Analysis** (Bergmeyer H. U., ed), Vol. 2, p.715–720, Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1974.

TALKE, H.; SCHUBERT, GE. Enzymatische Harnstoffbestimmung im Blut und Serum optischen Test nach Warburg. **Wien Klin Wochenschr**, v.43, p.174-175, 1965.

TELEN, M. J.; KAUFMAN, R. E. The mature erythrocyte. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N. **Wintrob's Clinical Hematology**. 11. Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2004. p. 421 – 484.

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Rocca, 2007. 582 p.

THORTON, G. Blood transfusion. In: KIRK, R. W. ed. **Current Veterinary Therapy**. Philadelphia Saunders: 1968. p.8-16.

TOMCZACK, A. C. T. Q. **Estudos sobre o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná.

TUCKER, E. M.; ELLORY, J. C. The cation composition of the red cells of sheep with an inherited deficiency of reduced glutathione. **Research Veterinary Science**, v. 12, p. 600-602, 1971.

VALERI, C. R. Liquid and freeze preservation of human red blood cells. In: **The red blood cell**. SURGENOR, D. M. 2^a ed. New York, Academic Press, p. 511-574, 1994.

VALKO, M.; LEIBFRTZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA FRANCO, M. V.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO, J. R. A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 31, p. 31-44, 1998.

VASCONCELOS, S. M. L. **Análise de biomarcadores de balanço redox em portadores de hipertensão arterial primária: Uma avaliação segundo técnicas bioquímicas, cromatográficas e espectrofotométricas**. 2006. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, 2007.

VENG-PEDERSEN, P.; CHAPEL, S.; SCHMIDT, P.R.L.; AL-HINITI, N.H.; COOK, R.T.; WIDNESS, J.A. An integrated pharmacodynamic analysis of erythropoietin, reticulocyte, and hemoglobin responses in acute anemia. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 11, p. 1630, 2002.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **Internal Journal of Obesity**, v. 30, n.3, p. 400-418, 2006.

WALKER, W. H.; NETZ, M.; GANSHIRT, K. H: 49 day storage of erythrocyte concentrates in blood bags with the PAGGS-mannitol. **Beitr Infusionsther**, v. 26, p. 55-59, 1990.

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

WARDROP, K. J.; OWEN, T. S.; MEYERS, K. M. Evaluation of an additive solution for preservation of canine red blood cells. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 8, n. 4, p. 253-257, 1994b.

WARDROP, K. J.; TUCKER, R. L.; MUGNAI, K. Evaluation of Canine Red Blood Cells Stored in a Saline, Adenine, and Glucose Solution for 35 Days. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n. 1, p 5-8, 1997.

WEISS, D. J.; WARDROP, J. K. **Schalm's veterinary hematology**. Iowa: Blackwell Publishing, 6th ed, 2010. Cap 48. p 347 – 360.

WINTER, H. Myelogram of sheep in post-hemorrhagic anemia. **American Journal Veterinary Research**, v. 28, n. 126, p. 1389-1395, 1967.

WOLFE, L. C. The membrane and the lesions of storage in preserved red cells. **Transfusion**, v. 25, n. 3, p. 185-202, 1985.

WOODS, J. R; PLESSINGER, M. A; FANTEL, A. An introduction to reactive oxygen species and their possible roles in substance abuse. **Obstetrics Gynecology Clinics of North America**. v. 25, n. 1, p. 219-236, 1998.

WOOLLIAMS, J.A.G; WIENER, P. H.; ANDERSON, AND C. H. MCMURRAY, C.H. Variation in the Activities of Glutathione-Peroxidase and Superoxide-Dismutase and in the Concentration of Copper in the Blood in Various Breed Crosses of Sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 34, p. 253-256, 1983.

WROBLEWSKI, F.; LADUE, J.S.; Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac with hepatic disease. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v.91, p. 569-57, 1956.

ZALLEN, G.; OFFNER, P. J.; MOORE, E. E.; BLACKWELL, J.; CIESLA, D. J.; GABRIEL, J.; DENNY, C.; SILLIMAN, C. C. Age of transfused blood is an independent risk factor for postinjury multiple organ failure. **American Journal of Surgery**, v. 178, p. 570–572, 1999.

ZANGH, L.; ALEXANDER, R. L.; WIDNESS, J. A.; CHEUNG, C. Y.; GRACE, R. A. Red cell mass responses to daily erythropoietin and iron injections in the ovine fetus. **American Journal Obstretic Gynecology**, v. 186, n. 2, p. 315-320, 2002.