

BIOQUÍMICA DOS CONSERVANTES SANGUÍNEOS*

Introdução

O armazenamento dos eritrócitos e o trabalho dos bancos de sangue só foi possível com o desenvolvimento dos anticoagulantes e soluções nutritivas para preservação sanguínea. Tais soluções foram desenvolvidas e aprimoradas para manter o metabolismo energético eritrocitário através da glicólise e assegurar a viabilidade celular durante a estocagem do sangue. Essa revisão tem o objetivo de descrever as principais alterações sanguíneas decorrentes do armazenamento, as soluções conservantes e aditivas mais utilizadas e seus mecanismos de ação.

História da hemoterapia

A história da hemoterapia pode ser dividida em duas fases, uma empírica, cujas primeiras referências remontam aos gregos e vai até 1.900 e outra científica de 1.900 em diante. No primeiro período, a hemoterapia adotou um papel místico onde a ingestão de sangue de inimigos derrotados nos campos de batalhas e de animais era uma prática para adquirir bravuras.

A primeira transfusão ocorreu, por via oral, no século XV com o Papa Inocêncio VIII. Após, em 1569, Andréa Cisalpino descobriu a circulação sanguínea, que foi descrita em 1627 por Willian Harvey, a partir de então, os médicos passaram a estudar a transfusão em animais e em humanos, das mais diversas formas.

Jean Baptiste Denis, em 1667, infundiu sangue de carneiro em um doente mental e em 1788, Pontick e Landois realizaram transfusões entre animais da mesma espécie.

Já na era científica, desenvolvida no século XX, realizavam-se transfusões diretas, conhecida como “doação braço a braço”. Em 1901, ocorreu o descobrimento dos grupos sanguíneos e em 1907 houve a primeira transfusão com realização de exames de compatibilidade. Os anticoagulantes e os conservantes sanguíneos foram descobertos mais tarde, em 1917, o que permitiu o início do processo de armazenamento e de estocagem. Durante esse período outras descobertas importantes foram feitas como o fator Rh, invenção das bolsas de sangue e a medicina transfusional foi reconhecida como especialidade médica.

* Seminário apresentado pela aluna PRISCILA SECCHI na disciplina BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no primeiro semestre de 2010. Professor responsável pela disciplina: Félix H. D. González.

Lesões de conservação

O sangue e/ou seus componentes podem ser utilizados logo após a coleta ou armazenados em temperatura entre 1 e 6°C para uso posterior, entretanto as plaquetas em sangue total não permanecem viáveis por mais de 6 horas. Durante o armazenamento ocorre um conjunto de alterações danosas no sangue as quais são chamadas de “lesões de conservação”. A perda da funcionalidade das células e a viabilidade tende a diminuir proporcionalmente com o tempo de estocagem e essas injúrias minimizam a taxa de sobrevivência das células após a transfusão.

Algumas dessas alterações são o aumento da produção de ácido láctico e redução do pH, a redução no consumo de glicose, com conseqüente diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP) e a redução do 2,3 difosfoglicerato (2,3DPG) das hemácias. A redução no nível de ATP leva a injúrias físicas na membrana das células gerando formação de agregados citoplasmáticos, esferocitose progressiva, endocitoses anormais, redução do tamanho e surgimento de microvesículas (Figura 1), sendo essas intimamente relacionadas com a taxa de sobrevivência celular após a transfusão.

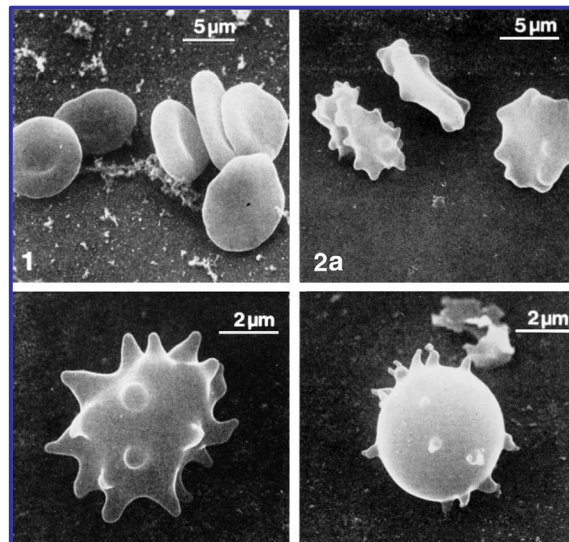


Figura 1. Morfologia eritrocitária durante estocagem. Mudanças progressivas da forma discóide até a formação do esferócito.

A taxa de hemólise é um marcador de falhas na estocagem. Ela pode se dar por ruptura da célula por completo ou pela liberação da hemoglobina contida nas microvesículas. O potássio é outro marcador importante da integridade da membrana plasmática, sendo seus níveis intracelulares mantidos pela bomba de sódio (Na^+) e potássio (K^+).

Com a diminuição do ATP, a bomba de Na^+ e K^+ tem sua atividade reduzida, gerando aumento do K^+ extracelular. Essa alteração de conservação deve ser avaliada considerando-se as diferentes concentrações de K^+ intra-eritrocitário nas diferentes espécies, como no caso de alguns ovinos, cabras, búfalos, cães, gatos e a maioria dos bovinos que possuem baixo conteúdo de potássio dentro dos eritrócitos.

A principal função da hemoglobina é fazer o transporte do oxigênio. A capacidade da hemoglobina de interagir com o oxigênio, não depende somente da concentração deste, mas também da presença de outras moléculas como: prótons (H^+), dióxido de carbono (CO_2), íons cloreto (Cl^-), fosfatos orgânicos (2,3-DPG, inositol pentafofato, ATP), bicarbonato e água.

O 2,3-DPG possui a função de ligar-se a desoxihemoglobina e facilitar o transporte de oxigênio para os tecidos (Figura 2).

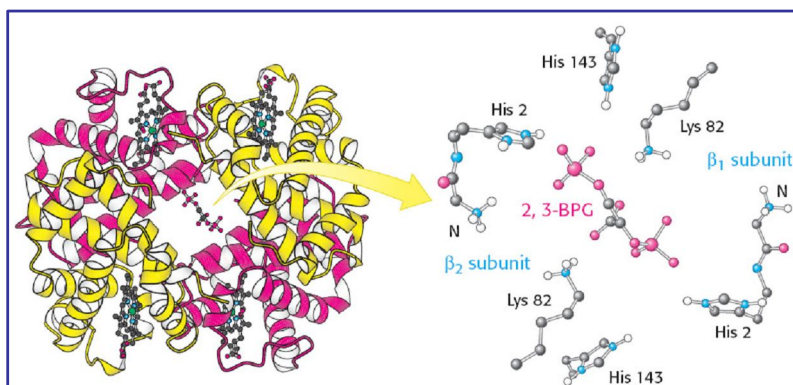


Figura 2. Ilustração do sítio de ligação do 2,3-DPG na desoxihemoglobina.

Essa ligação facilita a liberação de oxigênio para os tecidos, pois estabiliza a hemoglobina e permite que esta apresente uma baixa afinidade pelo O_2 . O baixo pH é o principal fator relacionado com a queda nos níveis de 2,3 DPG. Essa redução do pH que ocorre devido à metabolização da glicose a lactato o que gera acúmulo de íons H^+ . Valores de pH inferiores a 7,0 favorecem a degradação do 2,3DPG, reduzindo a liberação do oxigênio da hemoglobina para os tecidos.

Algumas espécies têm concentrações muito baixas de 2,3-DPG, portanto esse não é considerado o principal modificador da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e essa função é exercida por outros fosfatos orgânicos como o inositol pentafofato nas aves e o ATP nos répteis. Em gatos e bovinos, o cloreto é o principal modificador dessa afinidade.

O CO_2 produzido durante a glicólise compete com o 2,3-DPG, no sítio de ligação da hemoglobina, assim o 2,3-DPG livre fica sujeito a degradação. Para isso as bolsas para acondicionamento do sangue possuem grande permeabilidade ao CO_2 e são pobremente permeáveis a outros gases.

O pH é altamente dependente da temperatura, com a refrigeração entre 1 e 6°C, as taxas metabólicas e a produção de lactato são reduzidas possibilitando um maior tempo de armazenamento. Com a queda do pH também ocorre inativação de enzimas como a fosfofrutoquinase e a hexoquinase que participam da via glicolítica produzindo energia dentro da célula. Com isso ocorre um maior consumo de ATP para suprir a necessidade energética celular.

Outras lesões de conservação incluem a diminuição da função plaquetária, pela diminuição do cálcio ionizado e do pH, e a perda de fatores lábeis da coagulação (V e VIII).

A figura 3 ilustra a curva de saturação e dissociação do O_2 em relação aos fatores temperatura, pH, CO_2 e 2,3-DPG.

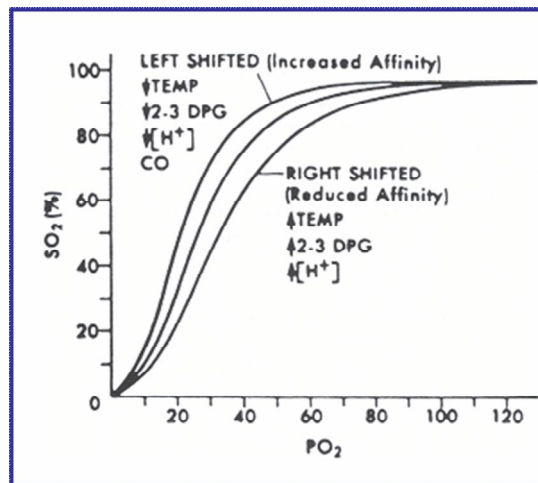


Figura 3. Curva de saturação e dissociação do O_2 em relação aos fatores temperatura, pH, CO_2 e 2,3-DPG.

Recipientes para coleta

Os recipientes para armazenamento podem ser de 3 tipos: frascos de vidro a vácuo, bolsas plásticas e seringas plásticas. Atualmente, prefere-se a utilização das bolsas plásticas que são

flexíveis, facilitando o acondicionamento dentro das centrífugas, translúcidas, permitindo a melhor visualização do volume sanguíneo e das linhas de separação dos hemocomponentes, e por possuírem permeabilidade ao CO₂ e O₂ o que assegura a sobrevivência das plaquetas nas primeiras horas e mantém o pH dentro de valores aceitáveis.

Conservantes/preservantes

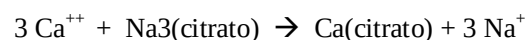
A hemoterapia somente adquiriu valor prático com o desenvolvimento de meios e soluções de preservação que objetivam manter a viabilidade e a função de cada constituinte sanguíneo, prevenir alterações físicas prejudiciais aos seus componentes e evitar a proliferação bacteriana.

Os anticoagulantes mais frequentemente utilizados são o citrato fosfato dextrose adenina (CPDA-1), o citrato ácido dextrose (ACD), o citrato fosfato dextrose (CPD e CP2D), o citrato de sódio e a heparina. Os três primeiros contêm fatores nutricionais para hemácias, portanto, são os utilizados quando se pretende estocar o sangue. Outros métodos de preservação como a liofilização e a criopreservação e até mesmo outras soluções ainda estão em fase de desenvolvimento.

A seguir são descritos os principais anticoagulantes/preservantes utilizados em veterinária e seus mecanismos de ação.

Citrato de sódio

O citrato de sódio é um quelante de cálcio que reage com o cálcio livre do sangue formando sais insolúveis conforme a reação:



A ausência de cálcio livre impede a efetivação do mecanismo de coagulação sanguínea.

Esse anticoagulante não preserva os eritrócitos, portanto o sangue deve ser utilizado em até 24 horas após a coleta. É o anticoagulante mais utilizado em casos de emergência, obsoleto na clínica de pequenos animais, mas ainda bastante usado para coleta em grandes.

O citrato é rapidamente metabolizado no fígado e geralmente não se acumula na circulação. Em casos de transfusões massivas ou na presença de enfermidade hepática ele pode se acumular causando hipocalcemia e hipomagnesemia que levam a arritmias cardíacas, espasmos musculares e outras alterações.

Heparina

É a solução mais disponível em clínicas, mais utilizada em gatos, não preserva eritrócitos, causa agregação plaquetária, inibe fatores de coagulação. O sangue coletado deve ser utilizado em até 24 horas.

A heparina interfere nas etapas finais da cascata da coagulação, impedindo conversão da protrombina (fator II) em trombina, que, por sua vez, promove a conversão do fibrinogênio (fator I) em fibrina, originando o coágulo. A trombina (fator II ativado), por ação enzimática, converte o fibrinogênio em fibrina, além de ativar os co-fatores V e VIII, o que acentua a velocidade da formação do coágulo de fibrina, através as vias intrínseca e comum da coagulação. A ação enzimática da trombina é impedida por uma glicoproteína do plasma, a antitrombina III. A heparina se une à antitrombina III, tornando a sua molécula muito mais ativa em relação à inibição da trombina, o que impede a conversão do fibrinogênio. A trombina também é responsável pela ativação co-fatores V e VIII da coagulação. A antitrombina III é um inibidor dos produtos ativados dos fatores IX, X, XI e XII e, por estes mecanismos, a heparina também impede a ação desses fatores, nos mecanismos da coagulação.

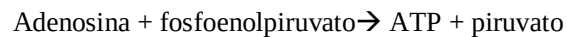
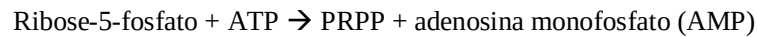
ACD (ácido cítrico-citrato de sódio-dextrose), CPD (ácido cítrico-citrato de sódio-fosfato-dextrose) e CPDA-1 (citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina)

Antes da II Guerra Mundial o sangue era conservado em uma solução de citrato de sódio e dextrose, permanecendo os eritrócitos viáveis somente por uma semana devido à falta de purinas e energia. A autoclavação dessas duas substâncias juntas ocasionava um processo de caramelização. Devido a essa alteração passou-se a se acidificar as soluções de citrato e dextrose com ácido cítrico para evitar a ocorrência desse processo desenvolvendo-se assim a primeira solução conservante efetiva, o ACD, descrito em 1943. Esse anticoagulante permitia o armazenamento por 21 dias.

O CPD é a solução de ACD com adição de bifosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$). O fosfato, além de ser substrato para formação do 2,3-DPG, atua como um tampão ligando-se aos íons H^+ produzidos durante a glicólise e impedindo a queda do pH que é o principal fator relacionado com a degradação do 2,3-DPG. Consequentemente tem-se uma menor taxa de hemólise e uma maior viabilidade celular.

As soluções ACD e CPD permitem o armazenamento do sangue durante 21 dias. Devido à acidez do pH dessas soluções, o nível de 2,3-DPG é muito baixo após 15 dias de armazenamento.

O CPDA-1 é o anticoagulante mais utilizado atualmente, tendo propriedades preservativas de hemácias melhores que o ACD. Com a diminuição do ATP e consequentemente do 2,3-DPG, devido ao elevado consumo celular durante a estocagem, essa solução é adicionada de adenina e tem o acréscimo de 24% de dextrose. A adição de adenina prevê um aumento de adenilato que servirá de substrato, combinando-se com a fosforibose-pirofosfato (PRPP), para nova síntese de ATP conforme as reações:



Aumentando as reservas desse nucleotídeo no interior das células, consequentemente ocorre aumento a produção de ATP e dos níveis de 2,3DPG. Essa solução permite o armazenamento de eritrócitos humanos por um período de 35 dias, entretanto, para cães o tempo de armazenamento sugerido é de 20 dias, sendo assim, preconiza-se a determinação individual do tempo de armazenamento nas diferentes espécies. A figura 4 ilustra a composição dos principais anticoagulantes/preservantes.

Compositions of Preservatives/Anticoagulants				
	ACD	CPD	CP2D	CPDA-1
Trisodium citrate (g)	22.0	26.30	26.35	26.35
Citric acid (g)	8.0	3.27	3.27	3.27
Dextrose (g)	24.5	25.50	51.10	31.90
Monobasic sodium phosphate (g)	-	2.22	2.22	2.22
Adenine (g)	-	-	-	0.27
Distilled water (ml)	1000	1000	1000	1000
Preservative (ml) / 100ml blood	15	14	14	14
Preservative (ml) / 450 ml blood	67.5	63	63	63
Initial pH of preservative	5.0	5.6	5.6	5.6
On first day pH of blood in bag	7.0	7.2	7.4	7.3
Storage time (days) at 2-6 °C	21	21	21	3

Figura 4. Composição dos principais anticoagulantes/preservantes.

Soluções aditivas

Em bancos de sangue humanos, podem ser adicionadas diretamente ao concentrado de eritrócitos, após a centrifugação e remoção do plasma, soluções que contém elementos como

dextrose, adenina, manitol e salina, necessários para manter a energia e viabilidade dos eritrócitos durante o armazenamento. Essas são chamadas soluções aditivas, estão presentes em bolsas satélites ligadas a bolsa principal que contém o anticoagulante padrão e são mais conhecidas por SAGM e algumas variações, AS-1 (Adsol), AS-3 (Nutricel) e AS-5 (Optisol), permitindo o adequado armazenamento dos eritrócitos humanos durante 42 dias (Figura 4). Nos eritrócitos caninos a viabilidade celular é mantida por até 35 dias para a AS-1 e 37 dias para AS-3.

Composition of Additive Solutions			
	As-1	AS-3	AS-5
Sodium Citrate	-	588 mg	-
Monobasic sodium phosphate	-	276 mg	-
Citric acid	-	42 mg	-
Dextrose	2.20 g	1.10 g	900 mg
Adenine	27 mg	30 mg	30 mg
Mannitol	750 mg		525 mg
Sodium chloride	900 mg	410 mg	877 mg
Volume	100 ml	100 ml	100 ml
Primary bag anticoagulant	CPD	CP2D	CPD

Figura 4. Composição das principais soluções aditivas.

O manitol adicionado nessas soluções tem um importante efeito na prevenção da hemólise, porém seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido. Inicialmente achava-se que ele atuava como elemento osmoticamente ativo, substituindo as proteínas plasmáticas, impedindo a célula de ultrapassar seu volume hemolítico crítico. Porém, esse não é seu principal efeito, pois o equilíbrio osmótico celular depende de outros fatores como a depleção do 2,3 DPG durante a estocagem e sua troca por outros ânions, a parada da bomba de Na^+ e K^+ , pela diminuição da temperatura e a queda do pH que afeta a movimentação de íons e leva a um progressivo ingurgitamento celular.

Conclusão

A hemoterapia é uma especialidade que desperta cada vez mais interesse em medicina veterinária, principalmente na clínica de pequenos animais. Em humanos métodos de conservação do sangue e seus componentes tem sido cada vez mais aprimorados, a fim de se obter uma melhor qualidade e maior tempo de estocagem do sangue. A aplicabilidade dessas técnicas de conservação na medicina transfusional veterinária deve ser cuidadosamente avaliada, visto que existem diferenças no metabolismo das diferentes espécies. Portanto, torna-se indispensável o conhecimento das alterações que ocorrem durante o armazenamento, das diferentes soluções anticoagulantes, conservantes e aditivas e sobre as particularidades sanguíneas de cada espécie para o adequado uso terapêutico do sangue e seus componentes.

Referências bibliográficas

- BEUTLER, E. Back to the future in RBC preservation. **Transfusion**, v. 40, p. 893-895, 2000.
- BRITTAIN, T. Root effect hemoglobins. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v.99, p.120-129, 2005.
- CAMPBELL-LEE, S. A.; NESS, P. M. Packed RBCs and Related Products. In: HILLYER, C. D.; SILBERSTEIN, L. E.; NESS, P. M.; ANDERSON, K. C.; ROUSH, K. S. **Blood Banking and Transfusion Medicine**. Philadelphia: Churchill Livingstone (Elsevier Science), p. 145-162, 2003.
- FRONTICELLI, C.; BUCCI, E. Conformational and Functional Characteristics of Bovine Hemoglobin. **Methods in Enzimology**, v. 231, p. 150-163, 1994.
- GIARDINA, B.; MOSCA, D.; DE ROSA, M. C. The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 182, p. 229-244, 2004.
- HESS, J. R. An update on solutions for red cell storage. **Vox Sanguinis**, v. 91, p. 13-19, 2006.
- HOLME, S. Current issues related to the quality of stored RBCs. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 33, p. 55-61, 2005.
- JUNQUEIRA, P. C.; ROSENBLIT, J; HAMERSCHLAK, N. História da Hemoterapia no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 3, 2005.
- LACERDA, L. A. Transfusão sanguínea 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.
- LANEVSKI A.; WARDROP K. J. Principles of transfusion medicine in small animals. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 447-454, 2001.
- PEÑUELA, O.; URBINA, A.; PALOMINO, L. Preservación de eritrocitos y cambios físicos ocurridos durante el almacenamiento. **Revista Facultad de Medicina: Universidad Nacional de Colombia**, v. 51, n.4, p. 190-197, 2003.

- PERUTZ, M. F.; SHIH, T.D. and WILLIAMSON, D. The Chloride Effect in Human Haemoglobin, A New Kind of Allosteric Mechanism. **Journal of Molecular Biology** 239, p. 555-560,1994.
- SARAIVA, J. C. P.; OTTA, M. I. Preservação do Sangue e Componentes. In: BORDIN, J. O.; LANGHI JUNIOR, D. M.; COVAS, D. T. **Hemoterapia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. Cap. 12, p. 107-114.
- SCOTT, K. L.; LECAK, J.; ACKER, J. P. Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 19, n. 2, p. 127-142, 2005.
- SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. Anticoagulação: Heparina e Protamina In: SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. **Fundamentos da Circulação Extracorpórea**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editorial Alfa Rio, 2006. Cap. 14, p.232-252.
- STRYER, L. **Biochemistry**. 5ª ed. New York: W.H.Freeman and Company, 2004. p. 131-135.
- TRULOCK, E. P. **Arterial Blood Gases**. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cm&part=A1479> Acesso em: 25/06/2010.