



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS
ÓRGÃOS E SISTEMAS**

SUZANA CLAUDIA SPÍNOLA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E
CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-DEA 1.1 EM
CÃES PÓS-TRANSFUNDIDOS**

SALVADOR

2014

SUZANA CLAUDIA SPÍNOLA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E
CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-DEA 1.1 EM
CÃES PÓS-TRANSFUNDIDOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA), como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa

SALVADOR

2014

Ficha Catalográfica elaborada pela BUS – Biblioteca Universitária de Saúde da UFBA

S237 Santos, Suzana Claudia Spínola dos
Avaliação de parâmetros hematológicos e cinética da
produção de anticorpos anti-DEA 1.1 em cães pós-transfun-
didos / Suzana Claudia Spínola dos Santos. – Salvador, 2014.
88 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Isoanticorpos. 2. Anticorpos caninos. 3. DEA 1.1. 4.
Transfusão de sangue - Cães. I. Universidade Federal da Ba-
hia. Instituto de Ciências da Saúde. II. Costa, Maria de Fátima
Dias. III. Título.

CDU 615.38:636.7

SUZANA CLAUDIA SPÍNOLA DOS SANTOS

**AValiação de parâmetros hematológicos e cinética da
Produção de anticorpos anti-DEA 1.1 em cães pós-
transfundidos**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 13 de novembro de 2014.

Banca Examinadora

Maria de Fátima Dias Costa – Orientadora _____
Doutora em Neurociência, Université de Paris XII
Universidade Federal da Bahia

Denise Tabacchi Fantoni _____
Doutora em Clínica Cirúrgica Veterinária, USP
Universidade Federal de São Paulo

José Eugênio Guimarães _____
Doutor em Clínica Médica, USP
Universidade Federal da Bahia

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos treze dias do mês de novembro de dois mil e catorze, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a **Defesa Pública da Dissertação** da Mestranda **Suzana Cláudia Spínola dos Santos**, através da Comissão Julgadora composta pelos **Professores Maria de Fátima Dias Costa, José Eugênio Guimarães e Denise Tabacchi Fantoni**. O título da Dissertação apresentada foi **Avaliação de parâmetros hematológicos e cinética da produção de anticorpos anti-dea 1.1 em cães pós-transfundidos**. Ao final dos trabalhos, os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa APROVADA

Prof. Dr. José Eugênio Guimarães Aprovada

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni Aprovada

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, 13 de novembro de 2014

Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa Maria de Fátima Dias Costa

Prof. Dr. José Eugênio Guimarães José Eugênio Guimarães

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni Denise Tabacchi Fantoni

Dedico àqueles que ao longo dos séculos contribuíram para o crescimento da hemoterapia, aos quais devemos respeito e desculpas pelo sofrimento: os cães.

AGRADECIMENTOS

São muitos, sinceros e devotados...

A Deus, por nos ter criado, homens e animais.

Aos meus pais, Antônio (*in memoriam*) e Geovana, por terem me dedicado todo amor.

Às minhas amadas filhas, Yasmine e Janaína, por terem sido minhas melhores colegas de estudo.

A Jean, esposo que sempre acreditou em mim.

À minha professora orientadora Maria de Fátima Dias Costa, incrível neurocientista, por ter acreditado e fomentado minhas ideias e assim me aceitado como orientanda com imensa gentileza.

Ao professor Roberto Meyer, por ter tido reservado seu precioso tempo de cientista para ser meu coorientador.

A Ludmila Moroz, hemoterapeuta veterinária, por ter me estimulado a fazer esse trabalho, ao me iluminar com ideias.

À professora Maria Terezita Bendicho, hemoterapeuta, por ter aberto portas do saber quando esta área me foi apresentada.

Ao pessoal do laboratório veterinário CITVET, que contribuiu com a realização dos exames de análises clínicas desse estudo.

À professora Soraya Castro Trindade do Labimuno – ICS/UFBA, por ter me auxiliado nas avaliações estatísticas.

A Mariane e Alan, biomédicos do Labimuno – ICS/UFBA, que vibraram comigo frente ao desafio da padronização e realização da técnica de citometria de fluxo desse estudo.

Aos proprietários dos cães desse estudo, que participaram com boa vontade e confiança plena.

Aos cães que participaram desse estudo, os quais reagiram bravamente ao tratamento com uma única meta: a cura.

A todos aqueles, tão especiais, que estiveram e estão ao meu lado, contribuindo direta e indiretamente para o meu crescimento profissional e a minha formação humana.

Aprendi a não fazer nenhum caso de
opiniões a que falte o fundamento dos fatos.

Charles Darwin

SANTOS, Suzana Cláudia Spínola dos. *Avaliação de parâmetros hematológicos e cinética da produção de anticorpos anti-DEA 1.1 em cães pós-transfundidos*. 88 f. il. 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

RESUMO

Na Medicina Veterinária, em situações emergenciais, os cães doadores de sangue não são muito numerosos e a escassez dos mesmos leva a transfusões de sangue dos animais disponíveis, sem sequer dar a atenção para seu tipo sanguíneo. Mas, para os animais que serão submetidos a uma segunda transfusão ou outras, a presença de aloanticorpos é um sinal de alerta para que apenas recebam sangue de cães compatíveis ou de mesmo tipo sanguíneo.

Foram pesquisados anticorpos antieritrocitários em trinta e três cães transfundidos em uma única vez com o sangue do grupo DEA 1.1, por meio da citometria de fluxo e comparou-se os resultados com os da prova de reação cruzada lenta em tubos dos mesmos com sangue DEA 1.1. Para a realização desse objetivo central procedeu-se testes de tipificação sanguínea por cromatografia em sangue estocado de doadores para classificar os mesmos em DEA 1.1 positivo e DEA 1.1 negativo; prova de reação cruzada nos dias 7, 14, 21 e 28 após o recebimento da transfusão sanguínea; e nessas mesmas datas foram traçados perfil hematológico e bioquímico dosando creatinina e gama-glutamil transferase (γ GT) para avaliação de cada animal pesquisado.

Com esses testes, determinou-se a positividade e negatividade dos soros testados e foi possível mensurar a intensidade das reações positivas com relação ao tempo decorrido da primeira exposição ao antígeno DEA 1.1. Foi encontrada uma associação entre os resultados da citometria de fluxo e a prova de reação cruzada sendo que os achados da citometria de fluxo apresentaram grande especificidade e os da prova de reação cruzada mais sensibilidade, podendo confundir o resultado de produção de anticorpos com reações autoimunes. Com isso concluiu-se que a citometria de fluxo é uma técnica eficaz para a pesquisa de anticorpos anti DEA 1.1 positivo.

Palavras-chave: Aloanticorpos; Anticorpos caninos; DEA 1.1; Transfusão de sangue em cães.

SANTOS, Suzana Claudia Spínola dos. *Detection of anti-DEA 1.1 canine antibodies through flow cytometry in post-transfused dogs with blood from DEA 1.1 donors*. 88 pp. ill. 2014. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

ABSTRACT

In Veterinary Medicine, in many emergency situations, the dog blood donors are not very numerous, and the shortage of them results in a search for blood transfusions of available animals, for which it is not even given the attention about the blood types of these dogs. However, for dogs that will undergo a second or another transfusion, the presence of alloantibodies is a warning sign for the blood be only received from dogs of the same or compatible blood type.

The antibodies were studied in thirty-three only once transfused dogs with blood of the DEA 1.1 group, through flow cytometry, and after this the results was compared to the crossmatching in the same tubes containing the blood of DEA 1.1 group. To achieve this central objective was proceeded blood typing tests by chromatography of stored donated blood to classify it into positive DEA 1.1 and negative DEA 1.1 groups; as well the result of the crossmatching on the following days: 7, 14, 21 and 28, after receive the blood transfusion. In these days were set hematological and biochemical profiles dosing creatinine and gamma glutamyl transferase (γ GT) for the assessment of each animal studied.

With these tests, the positivity and negativity of tested serums could be determined and, thus, it was possible to measure the intensity of positive reactions with respect to the elapsed time from the first exposure to the antigen DEA 1.1. It was found an association between the results of the flow cytometry and the positivity of the crossmatching, considering that was found in the flow cytometry a highest sensitivity in comparison to what was found in the crossmatching, in which was exhibited a lower sensitivity, what may confound the result of antibodies producing with autoimmune reactions. Thus, it was concluded that the flow cytometry is an effective technique for the detection of positive anti DEA 1.1.

Keywords: Alloantibodies; Canine antibodies; DEA 1.1; Blood transfusion in dogs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Frequência dos grupos sanguíneos em uma população de cães doadores no Rio Grande do Sul/Brasil, São Paulo/Brasil, Estados Unidos, Portugal e Espanha.....	23
Figura 1. Cromatografia para tipificação sanguínea de animais doadores: (A) Início; (B) Visualização da linha controle.....	35
Quadro 2. Graduação da aglutinação da prova de reação cruzada em cruces.....	36
Figura 2. Técnica da prova de reação cruzada lenta em tubos.....	37
Figura 3. Técnica de citometria de fluxo.....	40
Figura 4. Tubos da prova de reação cruzada.....	43
Figura 5. Apresentação em lâmina e em tubo da amostra com aglutinação positiva.....	44
Figura 6. Cinética da prova de reação cruzada lenta em tubos (PRC) nos cães submetidos à transfusão sanguínea com sangue DEA 1.1+.....	45
Figura 7. Evolução dos parâmetros hematológicos em cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	48
Figura 8. Evolução das dosagens das proteínas plasmáticas totais – PPT (g/dL) dos cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	50
Figura 9. Evolução das dosagens séricas de creatinina (mg/dL) dos cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	51
Figura 10. Evolução das dosagens séricas de gama-glutamil transferase (U.I./dL) de cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	52
Figura 11. Cinética da detecção de anticorpos anti DEA 1.1+ em cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das raças, idade, peso, sexo e condição clínica dos 33 cães que receberam sangue DEA 1.1+.....	34
Tabela 2. Descrição das raças, idade, peso, sexo e tipo sanguíneo de 30 cães doadores de sangue.....	42
Tabela 3. Resultado da intensidade de cruces da prova de reação cruzada lenta em tubos nas quatro semanas avaliadas.....	44
Tabela 4. Evolução do perfil hematológico pós-transfusão sanguínea com o tipo DEA 1.1+.....	47
Tabela 5. Resultado da prova de reação cruzada lenta em tubos (em cruces) de 33 cães pós-transfundidos com o tipo DEA 1.1+.....	74
Tabela 6-A. Contagem de hemácias (em milhões/dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	75
Tabela 6-B. Concentração de hemoglobina (em g/dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	76
Tabela 6-C. Proporção de volume globular (em%) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	77
Tabela 6-D. Contagem de leucócitos ($\times 10^3$ /dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	78
Tabela 6-E. Contagem de neutrófilos ($\times 10^3$ /dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	79
Tabela 6-F. Contagem de linfócitos ($\times 10^3$ /dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	80
Tabela 6-G. Contagem de plaquetas ($\times 10^3$ /dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	81

Tabela 7. Dosagem de proteínas plasmáticas totais (em g/dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	82
Tabela 8. Dosagem de creatinina sérica (em mG/dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	83
Tabela 9. Dosagem de gama-glutamil transferase sérica (em U.I./L) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	84
Tabela 10. Resultado da citometria de fluxo da pesquisa de anticorpos anti-DEA 1.1+ de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1+.....	85
Tabela 11. Resultado do teste ANOVA, com diferença estatisticamente significativa da citometria de fluxo, nas quatro semanas avaliadas.....	86
Tabela 12. Resultado do teste Tukey da citometria de fluxo nas quatro semanas avaliadas.....	87
Tabela 13. Teste de Qui-quadrado das variáveis do estudo.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEA – *Dog Erythrocyte Antigen*

EPO – Eritropoietina

EPO-R – Receptor da Eritropoietina

GATA 1 – Fator de Transcrição Eritróide Maior

TNF – Fator de Necrose Tumoral

SGT – Shigeta

NAT – Teste de Ácido Nucléico

TRALI – *Transfusion-Related Acute Lung Injury*

TACO – *Transfusion-Associated Circulatory Overload*

TRIM – *Transfusion-Related Immunomodulation*

2,3-DPG – 2,3 difosfoglicerato

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

PBS – Salina Tamponada de Fosfato

PPT – Proteínas Plasmáticas Totais

PRC – Prova de Reação Cruzada

SPSS – *Statistical Package for social sciences*

γ GT – Gama-glutamil transferase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 HISTÓRICO.....	15
2.2 INDICAÇÕES DE TRANSFUSÃO SANGUÍNEA.....	17
2.3 CARACTERÍSTICAS DOS TIPOS SANGUÍNEOS CANINOS.....	20
2.4 REAÇÕES TRANSFUSIONAIS.....	24
2.5 MÉTODOS DE TIPIFICAÇÃO E ANÁLISE DE COMPATIBILIDADE SANGUÍNEA.....	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 GERAL.....	31
3.2 ESPECÍFICOS.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 GRUPO DE ANIMAIS DOADORES DE SANGUE.....	33
4.2 GRUPO DE ANIMAIS RECEPTORES DE SANGUE.....	33
4.2.1 Cálculo Amostral	33
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	35
4.3.1 Provas de reação cruzada lenta em tubos	35
4.3.2 Acompanhamento pós-transfusão	38
4.3.3 Citometria de fluxo para pesquisa de anticorpos anti-DEA1.1	38
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
5 RESULTADOS	41

5.1 DETERMINAÇÃO DOS TIPOS SANGUÍNEOS DOS CÃES DO GRUPO DOADORES DE SANGUE.....	41
5.2 PROVAS DE REAÇÃO CRUZADA LENTA EM TUBOS.....	43
5.3 ACOMPANHAMENTO PÓS-TRANSFUSÃO.....	45
5.3.1 Análises de sangue total e plasmática.....	46
5.3.1.1 Hemograma.....	46
5.3.1.2 Proteínas plasmáticas totais.....	49
5.3.2 Análises séricas.....	50
5.3.2.1 Dosagens séricas de creatinina.....	50
5.3.2.2 Dosagens séricas de gama-glutamil transferase.....	51
5.4 AVALIAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	52
5.5 AVALIAÇÃO FINAL DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	54
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO A.....	70
APÊNDICE A.....	71
APÊNDICE B.....	73
APÊNDICE C.....	74

1 INTRODUÇÃO

A Medicina Transfusional representa papel importante na clínica de pequenos animais, promovendo a homeostasia por meio do uso do sangue total, ou, preferencialmente de seus hemocomponentes. Dentre seus objetivos, reestabelece a volemia e a reposição de proteínas hemostáticas, assim como a oxigenação tecidual; melhora a atividade oncótica e facilita transferência passiva de imunidade (REICHMANN; DEARO, 2001; BOCHIO et al., 2010).

A primeira notificação de transfusão de sangue de cães ocorreu em 1665 (DODDS, 2005). No século XIX, tomou-se conhecimento do primeiro relato de transfusão sanguínea entre seres humanos, e vale lembrar que somente no século XX mudanças tecnológicas foram incorporadas à hemoterapia, com o reconhecimento da necessidade da escolha do doador ideal, do uso de anticoagulantes e de técnicas de esterilização (LACERDA, 2005).

A transfusão sanguínea é uma forma de transplante, existindo, portanto, riscos associados aos seus procedimentos (LEMOS et al., 2010). Uma rigorosa seleção de doadores reduz ao máximo o risco de reações transfusionais. Esta seleção deve obedecer também a critérios de segurança, para que animais doadores não venham a sofrer efeitos deletérios da doação de sangue.

Atualmente, em Medicina Veterinária, a prática segura das transfusões sanguíneas ganha cada vez mais destaque, estabelecendo-se normas pré-transfusionais de triagem para os animais doadores, o que representa uma tendência de padronização da avaliação pré-transfusional (TOCCI; EWING, 2009).

Há, a cada dia, mais testes capazes de diagnosticar doenças transmissíveis pelo sangue e as soluções preservantes das bolsas têm melhorado a qualidade dos hemocomponentes estocados. Ressalta-se que também existem equipamentos modernos capazes de reduzir os riscos de contaminação dos produtos sanguíneos durante seu processamento (VIEIRA et al., 2009).

É notório que, para uma transfusão de sangue segura, é importante que se faça uso do sangue tipificado e compatível (DODDS, 2005). O reconhecimento dos tipos sanguíneos na imuno-hematologia em diferentes populações caninas de variadas raças

tem sido estabelecido com vistas à manutenção de um arquivo de dados dos doadores (ESTEVEES et al., 2011).

No entanto, há poucos estudos que relatem a monitoração dos cães receptores de sangue, no que diz respeito às respostas imunológicas quando eles recebem sangue DEA 1.1, sendo DEA 1.1 negativo, mesmo tendo sido feita previamente a prova de compatibilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

A primeira transfusão sanguínea realizada no mundo, que se tenha conhecimento, ocorreu entre dois cães, em 31 de maio de 1665, por Robert Boyle, que relatou o experimento no *Journal Book of the Royal Society*. Mas a maior parte dos experimentos neste campo foi feita por Richard Lower, e sua primeira transfusão entre cães foi publicada em seu livro intitulado *Tractatus de Corde* (BOVENS; GRUFFYDD-JONES, 2012; LEAROYD, 2012-1; KISIELEWICZ; SELFI, 2014).

Atribui-se a Lower o mérito da realização da primeira transfusão sanguínea, cientificamente executada em 26 de setembro de 1666, porque ele demonstrou que o procedimento era capaz de repor o sangue perdido em hemorragias graves. Para tanto, um cão foi submetido à sangria até próximo à morte, tornando-se completamente restabelecido ao receber a transfusão sanguínea (NAKAGE et al., 2005; LEAROYD, 2012-1; FASTAG et al., 2013).

Em humanos, a primeira transfusão sanguínea ocorreu em 1667, com o sangue proveniente de um ovino, relatando-se que o paciente transfundido não apresentou nenhuma alteração visível, porém, dois dias após uma segunda transfusão, feita também com sangue de ovelha, verificou-se uma reação hemolítica com hemoglobinúria e epistaxis, notificando-se a primeira reação pós-transfusional por incompatibilidade. Na

terceira transfusão do sangue da mesma origem, o homem veio a óbito (LEAROYD, 2012-1).

A primeira notificação de transfusão sanguínea de humano para humano ocorreu em 22 de dezembro de 1818, feita por James Blundell, na Inglaterra, e, como todos os relatos anteriores, o transfundido veio a óbito dois dias depois. A primeira bem sucedida transfusão entre humanos foi de uma mulher que apresentou metrorragia pós-parto e recebeu sangue por três horas, sendo publicada no jornal *The Lancet*, em 1829, tornando-se a primeira referência a afirmar que transfusão sanguínea salva vida (BATOR, 2011; LEAROYD, 2012-2).

As xenotransfusões tornaram-se comuns no período da guerra Franco-Prussiana (1870-1871). Depois de várias repetidas transfusões e algumas mortes por reação hemolítica aguda, essas práticas foram abandonadas. Trata-se da primeira evidência da produção de anticorpos pelos indivíduos transfundidos (imunização) demonstrada por reações cruzadas entre as amostras de sangue do receptor e do animal doador (BOVENS; GRUFFYDD - JONES, 2012).

No Brasil, o primeiro trabalho científico sobre hemoterapia foi em forma de monografia, de autoria de José Vieira Marcondes, como tese de doutoramento, em 27 de setembro de 1879, na Faculdade de Medicina da Bahia. Em seguida, foi relatada a primeira transfusão de sangue em humanos no Brasil, realizada pelo professor de Clínica Médica Garcez Fróes, em uma paciente do Hospital das Clínicas, na Bahia, em 1916 (JUNQUEIRA et al., 2005).

Em 1894, Wright identificou o citrato de sódio como primeiro anticoagulante eficaz para as transfusões indiretas. E, apenas no início do século XX, foram iniciadas metodologias de esterilização, desenvolvimento de práticas anticoagulantes e a descoberta do sistema ABO (LEAROYD, 2012-2).

Foi atribuído a Karl Landsteiner a descoberta dos grupos ABO em 1900, o que lhe conferiu o prêmio Nobel em 1930 (BATOR, 2011; BOVENS; GRUFFYDD-JONES, 2012; FASTAG et al., 2012; ZEUNER et al., 2012; DAVIDOW, 2013).

Os estudos iniciais com os grupos sanguíneos caninos datam de 1910 e, em 1950, Swisher demonstrou as primeiras técnicas de transfusão e a classificação dos grupos

sanguíneos, marcando o início das pesquisas nesse campo da Medicina Veterinária (BOVENS, 2012).

Inicialmente, Swisher; Young em 1950 os designaram por letras de A até G. Em 1976, durante o segundo Workshop Internacional de Imunogenética Canina, os grupos sanguíneos caninos foram determinados pela sigla DEA seguida de números, *Dog Erythrocyte Antigen* (IAZBIK et al., 2010).

2.2 INDICAÇÕES DE TRANSFUSÃO SANGUÍNEA

Anemia é definida como uma condição em que se apresenta um número reduzido das células sanguíneas ou uma concentração de hemoglobina menor que a normal no sangue, e, conseqüentemente, a capacidade de transporte de oxigênio é diminuída (SIGRIST, 2008). Short et al. (2012) definem a anemia e enfatizando que é o decréscimo da capacidade de carrear oxigênio pelo sangue. No animal normovolêmico a anemia apresenta menor número de eritrócitos que o normal, baixa concentração de hemoglobina e baixo hematócrito o que gera a diminuição dessa capacidade carreadora. Um fator influenciador na anemia é a produção da eritropoietina, que promove a permanência das células progenitoras eritróides e mantém ativa a circulação de hemácias. Também tem sido relatado um efeito citoprotetor pela interação com seu receptor presente em vários tecidos como cardiovascular, renal, gastrointestinal e sistema nervoso central. No miocárdio isquêmico, seu efeito é a inibição da apoptose dos cardiomiócitos, efeitos antiarrítmicos e estimulante da angiogênese (XENOCOSTAS et al., 2010; LACERDA et al., 2011).

A eritropoietina (EPO) exerce sua ação pela ligação a um receptor específico (EPO-R) nas células tanto progenitoras como precursoras. Em todos os estágios das células progenitoras a ligação EPO-EPO-R ativa a proliferação e nas precursoras promove a maturação. Esses efeitos são mediados por uma harmoniosa regulação positiva da expressão e da atividade do fator de transcrição eritróide maior (GATA 1). Do contrário, membros da família do fator de necrose tumoral (TNF) induzem à morte do eritroblasto ou há sua diferenciação mobilizada pela ativação da clivagem pela caspase do GATA 1 (ZEUNER et al., 2012).

A anemia pode ser classificada como regenerativa ou arregenerativa dependendo da contagem de reticulócitos e contagem global de hemácias. As principais causas da anemia regenerativa são: anemia hemolítica autoimune; anemia imunomediada por doença infecciosa como por erliquiose; babesiose; distúrbios metabólicos; anormalidades de membrana (deficiência de fosfofrutocinase) e danos oxidativos (intoxicações). As principais causas de anemia arregenerativa incluem: perda sanguínea por hemorragia; aplasia ou infiltração da medula óssea (mielofibrose, leucemia, mieloma); deficiência de ferro (que pode ser regenerativa quando órgãos-estoque o liberam); anemia da doença inflamatória ou crônica e deficiência de eritropoietina (falência renal) (SIGRIST, 2008).

A anemia causa aumento da frequência cardíaca, da frequência respiratória e do débito cardíaco, que são mecanismos compensatórios que nem sempre são suficientes para prevenir a hipóxia tecidual (MORIKAWA et al., 2010).

Anemia e hemorragia constituem risco para complicações cardiológicas em pacientes pós-operados, devido a hipotensão e, secundariamente, a má oxigenação decorrente da hipovolemia, fazendo-se necessária a transfusão sanguínea (GOLDMAN, 2012). As indicações para transfusão sanguínea estão relacionadas à anemia, devido à perda sanguínea, hemólise ou não produção de hemácias pela medula óssea (MORIKAWA et al., 2010).

A indicação primária para transfusão de sangue é a instabilidade hemodinâmica causada por choque hemorrágico. No entanto, muitas transfusões ocorrem como tratamento rotineiro de anemia em pacientes críticos, porém estáveis, hemodinamicamente. Em pacientes críticos com doença cardiovascular isquêmica ou sepse, a transfusão tem mais importância para promover a saturação de oxigênio do que para elevar o hematócrito (GILLISS et al., 2011).

A intensidade de uma hemorragia é o fator determinante para se realizar uma transfusão em um procedimento cirúrgico e identificar a origem do sangramento para ocorrer a hemostasia. O nível de hemoglobina e o histórico de perda sanguínea são fatores que devem ser identificados no período pré-operatório, bem como alterações nos mecanismos de coagulação (HERNANDEZ et al., 2012).

Em hemorragias, anemia acompanhada de hipoproteinemia ou anormalidades de coagulação seguidas de anemia, transfundindo-se 2 mL de sangue total por Kg de peso do animal, há um aumento do hematócrito em 1% (SIGRIST, 2008).

Os pacientes com sangramento gastrointestinal com ou sem hipertensão portal devem ser transfundidos quando há hipovolemia e redução da hemoglobina com incapacidade no transporte de oxigênio. Transfusões sanguíneas com volumes baixos (estratégia restritiva) representam redução do sangramento, devido à diminuição do fluxo sanguíneo esplênico e ao restabelecimento da pressão e da coagulação (LAINE, 2013).

O tratamento do paciente canino hemorrágico envolve uma rápida iniciativa para a sobrevivência. Se o animal encontra-se em choque hipovolêmico, inicia-se a estabilização clínica, seguida da terapia anti-hemorrágica. A ressuscitação está diretamente ligada à reposição de sangue com a monitoração da restauração volêmica final, aporte de oxigênio e cessação da hemorragia. Um rápido histórico deve ser inquirido sobre doenças pré-existentes, alguma exposição a toxinas, terapias medicamentosas e em situações de hemorragia interna (cavitária) que submetam o paciente a procedimento cirúrgico corretivo imediato (BRAINARD, 2008).

Posner et al. (2013) recomendam que em um valor de hemoglobina menor que 7g/dL, um volume globular menor que 20%, lactato crescente ou instabilidade da homeostasia, deve-se proceder a transfusão sanguínea.

Os cães com volume globular abaixo de 20% podem apresentar hipóxia do miocárdio e abaixo de 12% a transfusão já torna-se crítica. Esses pacientes tendem a apresentar sérias complicações circulatórias, respiratórias e no metabolismo como resultado da anemia. Então como um guia das manifestações clínicas do paciente que requer transfusão sanguínea temos: apresentação de anemia aguda; progressivo decréscimo do volume globular; sinais clínicos de anemia ao exame físico e hipóxia; fraqueza e ou adinamia; taquicardia e síncope (SILVESTRINI et al., 2011).

2.3 CARACTERÍSTICAS DOS TIPOS SANGUÍNEOS CANINOS

As hemácias apresentam antígenos de superfície que são glicoproteínas ou glicolipídios que são classificadas em tipos sanguíneos com a terminologia DEA, *Dog Erythrocyte Antigen*; são polimórficos e espécie-específicos sendo detectados por reações imunológicas, usando-se anticorpos (LANEVSKI; WARDROP, 2001; KIRKMAN, 2010; ESTEVES et al., 2011; FERREIRA et al., 2011).

As bases bioquímicas e moleculares do grupo sanguíneo DEA 1.1 são pouco esclarecidas. Há escassos estudos que avaliam as proteínas de membrana de eritrócitos DEA 1.1 positivo e negativo, com pesos moleculares que variam de acordo com os métodos de pesquisa de anticorpos e de eletroforese. Por *immunoblotting* corre uma banda de 50 a 200 kD nos DEA 1.1, enquanto testes usando menos antissoro específico identificou-se uma banda de proteína de 85 kD em eritrócitos 1.2 positivos. Estes estudos não foram aprofundados e necessitam de trabalhos adicionais para definir as características bioquímicas e de genética molecular desse antígeno (ACIERNO et al., 2014).

Devido ao fato dos cães não portarem aloanticorpos de importância clínica adquiridos naturalmente, os grupos sanguíneos têm sido alvo de investigações experimentais da produção de aloanticorpos após sensibilização via transfusão sanguínea. Mais de 12 tipos sanguíneos foram descritos nos cães, mas eles não são bem determinados por causa de limitada viabilidade ou falta de reagentes de tipificação, além de carência de estudos comparativos entre os diferentes sistemas de grupos sanguíneos e reagentes (NOVAIS, 1999; BLAIS et al., 2007; ACIERNO et al., 2014; KOHN et al., 2014).

A falta de aloanticorpos naturais exclui a necessidade de se obter sangue de tipo específico na primeira transfusão, no entanto, não exclui o risco de sensibilização deste receptor (NOVAIS, 1999; LACERDA, 2005). A aloimunização e reações hemolíticas pós-transfusionais surgem a partir do quarto dia pós-transfusão (KESSLER et al., 2010).

Uma padronização internacional foi proposta para sete grupos sanguíneos diferentes. No entanto, apenas cinco destes são avaliados, porque para eles há antissoros específicos: DEA 1 (1.1, 1.2, 1.3), 3, 4, 5 e 7 (LACERDA, 2005; BLAIS et al., 2007). Os grupos

DEA 6 e 8 foram reconhecidos na Segunda Oficina Internacional em Imunogenética Canina, mas por não haver antissoros disponíveis para esses antígenos, juntamente com a dificuldade em obtê-los, os estudos acerca desses grupos são escassos (LACERDA, 2005; ESTEVES et al., 2011). Esses dois grupos também são pouco frequentes, e transfusões incompatíveis com eles geralmente não resultam em sinais clínicos de reação transfusional, embora a meia-vida dos eritrócitos transfundidos possa ser diminuída (LANEVESCHI; WARDROP, 2001). Atualmente estabeleceu-se sete grupos (DEA 1.1, 1.2, 1.3, 3, 4, 5 e 7) com seis antígenos viáveis (DEA 1.1, 1.2, 3, 4, 5 e 7) (IAZBIK et al., 2010).

Blais et al., (2007) descobriram um antígeno eritrocitário denominado Dal, após a identificação de um aloanticorpo em um cão que recebeu transfusão sanguínea a partir de um canino da raça dálmata, sendo rara em alguns cães desta raça. Após sensibilização via transfusão, o desenvolvimento de anticorpos anti-Dal pode resultar em transfusões ineficientes ou reações transfusionais hemolíticas, se um sangue com o tipo Dal positivo for utilizado.

Existe uma classificação japonesa baseada em quatro anticorpos monoclonais: Shigeta (SGT) A, B, D e E, no entanto, sua correlação com o sistema DEA não tem sido bem definida, à exceção do SGT A, o qual é comparado ao DEA 3, razão pela qual esta classificação não é reconhecida internacionalmente (LACERDA, 2005; BLAIS et al., 2007).

Segundo Dodds (2005), os cães não apresentam anticorpos naturais contra outros grupos antigênicos de sangue canino. E, para Lacerda (2005), estes aloanticorpos podem estar presentes antes do animal sofrer exposições a outro tipo sanguíneo, pois sua expressão pode ocorrer por meio de uma exposição a organismos, como plantas, bactérias, protozoários e helmintos, que, por possuírem moléculas similares ou idênticas aos antígenos encontrados na superfície dos eritrócitos, podem levar a uma reação cruzada. Os anticorpos antieritrocitários são formados apenas após a exposição a um tipo sanguíneo diferente, seja por uma transfusão de sangue ou por via transplacentária. Também existem testes disponíveis comercialmente para a detecção do tipo DEA 1.1, os quais podem ser realizados nos cães doadores e receptores (TOCCI; EWING, 2009).

Os tipos sanguíneos são de característica autossômica dominante, por isso há predomínio em cães com proximidade genética (fator racial) ou consanguinidade (IAZBIK et al., 2010).

O DEA 1.1 é considerado dominante sobre o DEA 1.2, que só pode ocorrer nos cães DEA 1.1 negativos. Em algumas raças o DEA 1.1 é muito prevalente. Mas esses estudos de prevalência sempre advém de anticorpos policlonais, não informando uma gradação da expressão do DEA 1.1. Pois, baseada na variabilidade de suas expressões, indivíduos com reações fraca a forte DEA 1.1 e os DEA 1.1 negativos precisam ser investigados. E ainda há uma proposta para o DEA 1.3, mas os reagentes não estão disponíveis para investigações (FERREIRA et al., 2011; ACIERNO et al., 2014).

A transfusão do sangue DEA 1.2 para o receptor DEA 1.1 negativo que possua aloanticorpos anti DEA 1.2 resulta em uma meia-vida das hemácias transfundidas de 12 horas (LANEVSKI; WARDROP, 2001).

A prevalência do grupo DEA 4 é muito alta na população canina, e a importância deste grupo está no fato de que raramente ocorrem anticorpos naturais anti DEA 4, e os cães DEA 4 negativos, ao serem transfundidos com sangue DEA 4 positivo, não apresentam hemólise intra ou extravascular. Dessa forma, os cães positivos apenas para DEA 4 são considerados "doadores universais" (NOVAIS, 2003).

Para Iazbik et al. (2010) doador universal é o cão que for negativo para DEA 1.1, DEA 1.2, DEA 3, DEA 5 e DEA 7 e positivo para DEA 4, que apresenta uma prevalência mundial de 98 a 100%. Até o momento foi reportado apenas uma reação transfusional em um cão devido a presença de aloanticorpos contra o DEA 4 em um receptor. E, para Blais et al. (2007) este cão ainda precisa ser Dal negativo.

O DEA 7 é um antígeno não eritrocitário que é adsorvido na superfície celular. Os cães DEA 7 negativos podem ter naturalmente aloanticorpos anti DEA 7, mas sua importância ainda é discutida (LANEVSKI; WARDROP, 2001).

Em vários países a prevalência do DEA 1.1 varia entre 45 a 64% (KOHN et al., 2014), porém para Acierno et al. (2014) sua prevalência varia de 100% a menos de 10%, mas estimando-se que internacionalmente a proporção seja de 50%.

Um levantamento da frequência dos grupos sanguíneos em uma população de cães doadores de sangue no Rio Grande do Sul/Brasil, feito em cães de raças variadas, encontrou-se o perfil apresentado no Quadro 1, em que também são comparados perfis obtidos em São Paulo/Brasil, com animais doadores, além de dados obtidos de levantamento semelhante realizado nos Estados Unidos, Portugal e Espanha.

Quadro 1 - Frequência dos grupos sanguíneos em uma população de cães doadores no Rio Grande do Sul/Brasil, São Paulo/Brasil, Estados Unidos, Portugal e Espanha

	DEA 1.1	DEA 1.2	DEA 3	DEA 4	DEA 5	DEA 7
Brasil-RS ESTEVES, et al. (2011)	61%	22%	7%	100%	9%	16%
USA GIGER et al. (2005)	33 a 51%	4 a 51%	5 a 24%	56 a 98%	8 a 22%	8 a 45%
USA IAZBIK et al.(2010)	24,60%	–	–	–	–	–
Brasil-SP NOVAIS, et al. (1999)	51,33%	40%	–	–	–	–
Portugal FERREIRA et al. (2011)	56,90%	–	–	–	–	–
Espanha MESA-SANCHES et al. (2014)	53,40%	–	–	–	–	–

Fonte: Organizado pela autora.

2.4 REAÇÕES TRANSFUSIONAIS

Apesar dos hemocomponentes poderem salvar vidas também apresentam riscos, não garantindo uma segurança absoluta. Reações imunomediadas podem ser causadas por células alogênicas ou proteínas. E complicações não imunomediadas também podem ocorrer (CRAWFORD et al., 2013).

A segurança da transfusão sanguínea depende da conexão entre as funções do recrutamento e da seleção dos doadores que reduz o alto risco de transmissão de infecções. Cada doação tem que ser testada para os patógenos transmissíveis hematologicamente. Enquanto os testes são feitos, as doações sanguíneas são processadas por separação dos hemocomponentes (concentrado de hemácias, plaquetas plasma etc) (FRANKLIN, 2012).

Os modelos de testes são variados, mas para detecção de doenças que se encontram em período de "janela", tempo em que, no momento da coleta do sangue, este está infeccioso, porém os testes de triagem não detectam tal estado, tem sido implementado o teste de ácido nucléico (NAT). Assim, foram encurtados esses períodos de infecções e reduzido o risco estimado dos mesmos (GOODNOUGH, 2003).

A reação transfusional ocorre quando há interação entre anticorpos (aglutininas) do plasma do receptor com os antígenos (aglutinógenos) do eritrócito do doador. Essa ligação pode levar à aglutinação das células do doador, que conseqüentemente gera um bloqueio microvascular e hemólise (KIRKMAN, 2010).

É importante avaliar o paciente que recebe transfusão sanguínea para que sejam detectados, precocemente, a ocorrência de reações transfusionais já ocorridas e suspeita de doenças imunomediadas, devido à sua influência na sobrevivência das células transfundidas (MORIKAWA et al., 2010).

A melhor maneira para se prevenir contaminações e reações adversas dos receptores é eliminando as transfusões desnecessárias. E os programas de doadores devem obedecer a uma normatização de práticas transfusionais adequadas e padronizadas (FRANKLIN, 2012).

As consequências adversas numa transfusão de sangue compatível são reações não hemolíticas como febril, supressão imune, contagem plaquetária decrescente, injúria aguda pulmonar (TRALI, *Transfusion-related acute lung injury*) e urticária. As reações febris não hemolíticas em transfusões com sangue sem leucorredução podem ocorrer por vários mecanismos: reconhecimento imune dos leucócitos do doador pelo receptor por anticorpos anti-leucocitários; destruição de plaquetas; e transferência passiva de citocinas inflamatórias do doador (LA-GAMMA; BLAU, 2012). Porém não se estima que a destruição de plaquetas seja imunomediada, pois Lucidi et al. (2011), em pesquisa de grupos sanguíneos nas plaquetas pela técnica de citometria de fluxo não detectaram antígeno DEA 1.1 em sua superfície. Mas a reação febril pode também ser um indicador precoce de uma reação maior como hemólise e sepse (DAVIDOW, 2013). Há também a reação de sobrecarga associada à transfusão (TACO, *Transfusion-associated circulatory overload*) que advém do aumento da pressão oncótica, o que em pacientes extremamente hipotensos pode gerar grave edema periférico. E, o volume exagerado transfundido pode levar à edema pulmonar (LA-GAMMA; BLAU, 2012; DAVIDOW, 2013).

As reações pós-transfusionais podem ser classificadas em imunomediadas e não imunomediadas, bem como agudas e tardias (FELDMAN; SINK, 2007). As agudas são tipicamente IgM mediadas e as tardias IgG mediadas. A hemólise na reação IgM mediada se inicia pela ligação dos anticorpos IgM ao seu correlato antígeno levando à ativação do complemento, formação do complexo de ataque à membrana e hemólise intravascular. As reações IgG mediadas são mais comuns, porém menos graves e relacionadas à aloimunização proveniente de transfusão com tipo sanguíneo diferente (HOD et al., 2008; KIRKMAN, 2010; ALVES et al., 2012).

Segundo Abrams-Ogg (2000), os principais sinais inespecíficos que podem ocorrer em uma reação pós-transfusional imunomediada aguda são: fraqueza, depressão, tremores musculares, agitação, vocalização, polipneia, taquicardia, arritmias, hipotensão, parada cardiopulmonar (quando o receptor está anestesiado), salivação, vômitos, diarreia, micção, convulsões, coma, angioedema e urticária. As reações imunomediadas tardias envolvem: hemólise, púrpura pós-transfusional, isoeritrólise neonatal e imunossupressão. Já as reações não imunomediadas agudas incluem: hemólise pré-transfusional dos eritrócitos do doador devido estocagem longa, hipervolemia, contaminação bacteriana, toxicidade por citrato, coagulopatia e trombose, além de

hiperamonemia, hipofosfatemia, hipercalemia, hipotermia, embolismo por ar, microembolismo pulmonar e acidose. No que se refere às reações não imunomediadas tardias, observa-se, como principais consequências, a transmissão de doenças infecciosas e hemossiderose por excesso de ferro (HARREL; KRISTENSEN, 1995).

As reações agudas imunológicas são causadas por reações de hipersensibilidade tipo I ou tipo II. A tipo I apresenta sinais de anafilaxia, enquanto a tipo II causa hemólise aguda. As reações não imunológicas estão relacionadas aos hemocomponentes pela estocagem ou administração (HALDANE, 2008; SIGRIST, 2008; DAVIDOW, 2013).

Há um fenômeno conhecido como imunomodulação relacionada à transfusão (TRIM, *Transfusion-related immunomodulation*) por causa da ação imunossupressora dos hemocomponentes sem interferir na produção de aloanticorpos. A transfusão estimula a imunidade humoral e inibe a imunidade celular. Mas, em modelos experimentais com animais ambas as respostas ocorrem. Há também a hipótese de que quando ocorre uma transfusão o sangue carrega produtos que contém fatores de crescimento que estimulam o crescimento bacteriano e que o ferro de órgãos-estoque que estão circulando servem de substrato para o crescimento de bactérias ferrofílicas que não se caracteriza por TRIM (ZIMRING, 2013).

Com relação à incompatibilidade sanguínea, os sinais clínicos são crise hemolítica aguda, hemoglobinúria e hemoglobinemia. Também é comum a presença de hipertermia. Essa reação hemolítica é mediada por IgG. Na reação hemolítica tardia, o hematócrito é reduzido rapidamente, dentro de três a cinco dias, após a transfusão sanguínea, e, além disso, outras reações podem ocorrer, devido às reações alérgicas e às proteínas plasmáticas mediadas por IgE. Reações aos leucócitos e às plaquetas são reações febris não hemolíticas, que ocorrem após transfusão de sangue total ou de produtos plaquetários, presumivelmente devido à resposta imune do receptor a antígenos leucocitários do doador ou às substâncias bioativas. Trombocitopenia pós-transfusional pode ocorrer muito raramente dentro de uma a duas semanas e dura até dois meses, pois a resposta imune é generalizada e os anticorpos do receptor atacam suas próprias plaquetas, sendo apenas responsiva à terapia imunossupressora (LACERDA, 2005).

A incidência de reações transfusionais agudas em cães varia de 2,9% a 28,49%, sendo que as mais comuns são de natureza não hemolítica febril, hipersensibilidade alérgica, lesão pulmonar e contaminação bacteriana (PINCELLI et al., 2010).

Lesões de estocagem levam ao decréscimo da sobrevivência dos eritrócitos transfundidos por causa das mudanças na morfologia, desarranjos metabólicos e danos oxidativos (CALLAN et al., 2013). O pH do sangue estocado tende a declinar com o acúmulo dos ácidos láctico e pirúvico promovendo a redução da 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG). Sua redução aumenta a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, no entanto decai logo após a transfusão. A concentração de hemoglobina livre cresce proporcionalmente com a hemólise do sangue estocado e reage com o óxido nítrico circulante mais que a hemoglobina celular resultando em vasoconstrição (KISIELEWICZ; SELFI, 2014).

Vieira e Bognato (2009) realizaram trabalho de pesquisa com 186 cães pós-transfundidos, no período de 2006 a 2008, sobre a prevalência de reações transfusionais, em que os receptores passaram por prova de compatibilidade por reação cruzada como pré-requisito para realização das transfusões. Desses cães, 28,49% apresentaram reações agudas adversas, tanto com concentrado de hemácias como com concentrado de plaquetas e sangue total. Com o concentrado de hemácias, as reações achadas após as transfusões compatíveis foram as seguintes: êmese (59,2%); angioedema (18,5%); hipertermia (11,1%); dispneia (11,1%); eritema (3,7%) e tremores (3,7%). Nas transfusões com sangue total, as reações foram: êmese (66,6%); angioedema (11,1%); hipertermia (11,1%) e urticária (11,1%). Apenas um animal desse estudo veio a óbito, 24 horas após ter apresentado reação hemolítica, e os outros cães foram tratados com dexametasona (0,5mg/Kg/via subcutânea), com completa remissão dos sinais e sintomas.

Pincelli et al. (2010) avaliaram reações transfusionais em 113 cães transfundidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, no período de 2006 a 2008, em que o método utilizado para verificar a compatibilidade sanguínea foi também a reação cruzada lenta em tubos. Dos animais que receberam sangue total, encontrou-se 16,9% de reações, e dos que receberam concentrado de hemácias, 11,5% apresentaram reações. Neste estudo, ocorreram reações em quinze (13,27%) cães, representadas por: urticária (9 em 15); hemólise imunomediada intravascular aguda (2 em 15); sobrecarga

circulatória (2 em 15); hipertermia (1 em 15) e vômito (1 em 15). Esses animais foram tratados com prometazina (0,2 a 1 mg/Kg/via subcutânea) e hidrocortisona (50 mg/Kg/IV). Dois animais que apresentaram sobrecarga circulatória vieram a óbito após dois e onze dias, respectivamente.

Lemos et al. (2010) em trabalho de avaliação hematológica em cães pós-transfundidos uma hora e sete dias após encontraram melhora dos animais de 50%, porém, os valores de eritrócitos, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média estavam abaixo daqueles de referência para a espécie. Todos os animais encontravam-se trombocitopênicos e, quanto ao leucograma apresentaram leucopenia na primeira avaliação e após 7 dias, com exceção dos neutrófilos e eosinófilos.

De forma resumida temos: reações imunológicas, como reações alérgicas de hipersensibilidade tipo I; reações hemolíticas; reações febris não hemolíticas; TRALI; TRIM; e sobrevida curta dos eritrócitos. E, reações não imunológicas, como sepse, toxicidade por citrato, hipocalcemia, TACO, hiperamonemia, hipofosfatemia e transmissão de doenças infecciosas (LA-GAMMA; BLAU, 2012; DAVIDOW, 2013).

2.5 MÉTODOS DE TIPIFICAÇÃO E ANÁLISE DE COMPATIBILIDADE SANGUÍNEA

O princípio básico de todos os métodos de tipificação de sangue canino é uma reação visível de hemoaglutinação entre os antígenos de superfície dos eritrócitos e o reagente monoclonal ou policlonal do antissoro conhecido (ESTEVES, 2008; LACERDA et al., 2011; BLOIS et al., 2013; KHON et al., 2014).

A prova de reação cruzada (*Cross-matching*) foi primeiramente descrita em 1907, relacionada à medicina humana e modificada várias vezes. O método alternativo é a aglutinação em gel, comparável à prova em tubo. A prova de reação cruzada negativa, tanto na reação maior como na reação menor, não garante uma sobrevida das hemácias transfundidas ao receptor nem elimina completamente o risco de reações pós-transfusionais. Reações pós-transfusionais tardias são causadas pela formação de anticorpos logo após a transfusão sanguínea (TOCCI; EWING, 2009).

A prova de reação cruzada pode ser realizada através de uma técnica rápida em lâmina de microscopia ou pela técnica lenta em tubos de ensaio, conforme preconizado por Lanevschie; Wardrop (2001). Esta prova é semiquantitativa, e, quando positiva, baseia-se na aglutinação ou hemólise, verificada após a combinação de uma gota de concentrado de eritrócitos do doador de sangue, lavadas com solução salina, e duas gotas de soro ou plasma do receptor, para realização da prova de reação cruzada maior. Alternativamente, mistura-se uma gota de concentrado de eritrócitos do receptor, também lavadas com solução salina com duas gotas de soro ou plasma do doador para se ter a prova de reação cruzada menor (TOCCI; EWING, 2009).

A hemoaglutinação na prova de reação cruzada ocorre quando crescentes concentrações de IgG e IgM estão cobrindo a superfície do eritrócito. Para que essas reações não sejam confundidas com alguma patologia, deve-se proceder três lavagens dos eritrócitos a serem testadas, porque outras proteínas na superfície celular podem estar contribuindo para a aglutinação (BRAINARD, 2008).

Uma amostra de sangue com intensa hemólise, *rouleaux* ou aglutinação dificulta a visualização e a interpretação da prova de reação cruzada, e os receptores que apresentam autoanticorpos e autoaglutinação podem evidenciar resultados errôneos na tipificação do sangue (TOCCI; EWING, 2009).

O propósito da tipificação sanguínea e da prova de reação cruzada maior e menor é prevenir transfusões incompatíveis que levam a reações transfusionais imunomediadas (FELDMAN; SINK, 2007).

A determinação do tipo sanguíneo em cães com anemia hemolítica auto imune é um desafio por causa da própria autoaglutinação que persiste apesar das lavagens dos eritrócitos (BLOIS et al., 2013).

Vários são os métodos de tipificação sanguínea em cães e, dentre as primeiras técnicas que foram inicialmente utilizadas na rotina laboratorial veio a *Standard* gel, que utiliza anticorpos monoclonais para o tipo DEA 1.1. (KESSLER et al., 2010); a aglutinação em tubo, utilizada para pesquisa de DEA 1.1, 1.2, 3, 4 e 7 (KESSLER et al., 2010); o gel estendido ou coluna de gel, que apresenta um painel de células positivas conhecidas e o antissoro canino policlonal para pesquisa de DEA 1.1, 1.2, 3, 4, 7 e Dal (TOCCI; EWING, 2009; KESSLER et al., 2010; BLOIS et al., 2013). Além dessas técnicas

utiliza-se também o *Cross-matching/Coombs*, padronizado com amostras de cães tipificados usando o gel *Coombs* onde avalia também autoaglutinação e controle do doador (NOVAIS, 1999; WEINGART et al., 2004; TOCCI; EWING, 2009; KESSLER et al., 2010; DAVIDOW, 2013), e o Teste de 96 poços (96W), onde placas de 96 poços são usadas com volumes de antissoro e hemácias lavadas e extraídas do procedimento de tipificação em tubo (KESSLER et al., 2010). A Cromatografia é a técnica amplamente utilizada pela sua praticidade na rotina de bancos de sangue veterinários; utiliza uma tira de papel absorvente que é inserida em amostra de sangue com anticoagulante e depois no poço contendo o diluente. Uma marcação imunocromatográfica será evidenciada quando reagir com o anticorpo monoclonal (SETH et al., 2011; DAVIDOW, 2013; ACIERNO et al., 2014). Cães com baixa expressão de DEA 1.1 geralmente apresentam um resultado fraco positivo (BLOIS et al., 2013). Outra técnica também bem difundida é o Método do cartão, onde um cartão possui um reagente liofilizado que é reconstituído com um diluente e determina positividade ou não para o DEA 1.1 com área de teste e controle (TOCCI; EWING, 2009). A Tipagem reversa, usa uma metodologia de hemoaglutinação na qual se pesquisa aloanticorpos do tipo sanguíneo conhecido a partir de sangue com ácido etilenodiamínico tetracético (EDTA). É um teste que pode ser feito nos animais que receberam transfusão de sangue com tipo conhecido para detectar se ocorreu produção de anticorpos contrários ou não que se baseia na prova de reação cruzada utilizando-se um antissoro conhecido (LACERDA et al., 2011). O Teste do Cartucho (*Cartridge*) é uma técnica que consiste em um único cartucho com três canais capilares usado em um analisador e aplica-se para diagnosticar o DEA 1.1, usando anticorpo monoclonal, sendo de uso mais restrito por requerer equipamento de leitura especializado (BLOIS et al., 2013; KHON et al., 2014). E, a Citometria de Fluxo, usada para pesquisa do tipo DEA 1.1, utilizando o anticorpo monoclonal de origem murina, restrita ainda à pesquisa experimental, por ainda não ter sido definido nenhuma técnica padrão ouro de tipificação sanguínea na Medicina Veterinária (LUCIDI et al., 2011; ACIERNO et al., 2014). Essa técnica também foi desenvolvida para detecção de títulos de anticorpos anti-AB em humanos do grupo O submetidos a transplante renal de doador do grupo sanguíneo A2 (CETINKAYA et al., 2012).

Para identificar anticorpos antieritrocitários, a técnica de citometria de fluxo pode ser aplicada com vistas à detecção de indivíduos incompatíveis para transfusão sanguínea.

A citometria de fluxo tem uma ampla aplicação na hematologia veterinária, incluindo a identificação de células-tronco hematopoiéticas, contagens celulares diferenciais da medula óssea, quantificação de reticulócitos, pesquisa de eritroparasitas, detecção de anticorpos anti-eritrocitários, contagem diferencial de leucócitos, imunofenotipagem de linfócitos e de plaquetas reticuladas (NAKAGE, et al., 2005). E também na pesquisa de antígenos para tipificação sanguínea em eritrócitos (LUCIDI et al., 2011; ACIERNO et al., 2014).

Essa tecnologia permite verificar características físico-químicas de células ou partículas suspensas em meio fluido. Utiliza anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos e necessita de controles isotípicos para definição da região negativa (*background*). Esses controles são constituídos por imunoglobulinas do mesmo isotipo e fluorocromo dos anticorpos teste, sendo o isotiocianato de fluoresceína (FITC) o marcador fluorescente mais utilizado na conjugação de anticorpos. Os controles isotípicos têm como função definir a fluorescência inespecífica (células negativas) e as regiões fluorescentes (células positivas) (GOLIM et al., 2007; LUCIDI et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a cinética de anticorpos antieritrocitários DEA 1.1 em cães após terem recebido uma transfusão de sangue do grupo DEA 1.1 positivo através da citometria de fluxo e da prova de reação cruzada, para estabelecimento de possíveis associações entre as duas avaliações.

3.2 ESPECÍFICOS

- Selecionar amostras de sangue dos cães doadores e classificar DEA 1.1 positivo e DEA 1.1 negativo;
- Verificar compatibilidade através da prova de reação cruzada lenta para proceder a transfusão sanguínea;
- Traçar perfil hematológico e bioquímico dos animais receptores, através dos exames de hemograma, proteínas plasmáticas totais, gama-glutamil transferase (γ GT) e creatinina nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-transfusão;
- Pesquisar a cinética dos anticorpos antieritrocitários (anti-DEA 1.1) nos animais receptores, através da citometria de fluxo, no sangue colhido nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-transfusão;
- Comparar a intensidade do resultado da prova de reação cruzada de animais receptores com a cinética dos anticorpos antieritrocitários encontrados nos dias 7, 14, 21 e 28 para subsidiar procedimentos de uma nova transfusão sanguínea.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto recebeu aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto das Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia através do Parecer n° 048/2013 (17/01/2013) (ANEXO A). Os proprietários dos animais do estudo foram informados da metodologia do trabalho e concordaram voluntariamente assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) cujo modelo encontra-se no Apêndice A.

4.1 GRUPO DE ANIMAIS DOADORES DE SANGUE

Foram utilizados 30 cães; 16 do sexo masculino e 14 do sexo feminino, que participam do programa de doação de sangue para o banco de sangue da Clínica Veterinária Diagnose Animal, em Salvador – BA. Esses doadores, de diferentes raças, tinham idade média de 4,8 anos, apresentavam peso médio de 34,7 Kg. Todos eram submetidos a exame clínico e laboratoriais para diagnóstico de erliquiose, babesiose, dirofilariose, brucelose e leishmaniose como preconiza o hemocentro veterinário.

4.2 GRUPO DE ANIMAIS RECEPTORES DE SANGUE

4.2.1 Cálculo Amostral

Com base em análise estatística de margem de 95% de confiabilidade na amostragem, em que se observa na literatura uma fração de sucesso de 90%, o cálculo amostral levou em consideração uma fração de sucesso em torno de 75%, utilizando um erro de 5% e um intervalo de confiança dos testes, correspondendo a 95% (APÊNDICE B) Seguindo-se esse cálculo, o estudo foi realizado com 33cães com indicação de transfusão sanguínea, encaminhados a partir de clínicas veterinárias de Salvador. Esses animais receptores foram catalogados e submetidos aos procedimentos no momento do internamento, sendo seus perfis discriminados na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição das raças, idade, peso, sexo e condição clínica dos 33 cães que receberam transfusão com sangue DEA 1.1

Animal	Raça	Idade	Peso (Kg)	Sexo (M/F)	Desordem clínica
1	Rottweiler	12 anos	40	M	Neoplasia
2	Yorkshire	10 anos	3	M	Erliquiose
3	Rottweiler	6 anos	32	F	Erliquiose
4	Chow Chow	8 anos	4	F	Erliquiose e babesiose
5	Pincher	11 anos	3,2	F	Anemia hemolítica
6	S.R.D.	5 anos	15	M	Erliquiose
7	Yorkshire	2 anos	11	F	Erliquiose
8	Schinauzer	7 anos	9	M	Hemangioma
9	Poodle	6 anos	4	M	Erliquiose
10	Rottweiler	5 anos	20	F	Má absorção intestinal
11	Poodle	17 anos	3,3	M	Erliquiose
12	S.R.D.	1 anos	8	F	Cinomose
13	S.R.D.	3 meses	3	M	Erliquiose
14	Maltês	8 anos	2,2	F	Erliquiose
15	Poodle	10 anos	4	F	Anemia hemolítica
16	Golden R.	5 anos	35	F	Erliquiose
17	S.R.D.	12 anos	7	F	Anemia hemolítica
18	S.R.D.	8 anos	12	F	Erliquiose
19	Akita	4 anos	33	F	Erliquiose e babesiose
20	Yorkshire	10 anos	2,4	F	Piometra e neoplasia mamária
21	Poodle	15 anos	2,5	M	Erliquiose
22	Pit Bull	4 anos	32,6	M	Erliquiose e babesiose
23	S.R.D.	5 anos	9	F	Fleigmão de membro
24	Rottweiler	4 anos	32	F	Erliquiose e babesiose
25	Labrador	12 anos	35	M	Erliquiose e babesiose
26	Pit Bull	5 anos	28	M	Erliquiose
27	Rottweiler	7 anos	29,6	M	Erliquiose
28	Yorkshire	2 anos	2,8	F	Hemangioma
29	Poodle	11 anos	10	F	Erliquiose
30	Poodle	13 anos	7,3	F	Piometra
31	Poodle	7 anos	4	M	Erliquiose
32	Poodle	7 meses	3,7	M	Erliquiose
33	S.R.D.	4 anos	17	F	Erliquiose e babesiose

Fonte: Autoria própria.

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A tipificação sanguínea dos cães doadores foi realizada por técnica cromatográfica através do *kit* comercial Alvedia[®] (Limonest-França), seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante. Foram colocadas três gotas da solução tampão, seguidas de 3 μ L de sangue total com EDTA a 5% e após homogeneização por sete segundos, as amostras foram depositadas nas tiras e procedeu-se a evidenciação ou não de reação seguida da leitura como evidenciado na Figura 1.

Amostras classificadas DEA 1.1, tiveram suas bolsas de sangue total destinadas à transfusão sanguínea no grupo receptor, com tipos sanguíneos desconhecidos.

Figura 1- Cromatografia para tipificação sanguínea de animais doadores: (A) Início, (B) Visualização da linha controle



A

B

Fonte: Autoria própria.

4.3.1 Provas de reação cruzada lenta em tubos

Antes da primeira transfusão, os receptores foram submetidos à prova de reação cruzada em tubo com o doador DEA 1.1 positivo. Nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-transfusão, cada receptor foi submetido a novas provas de reação cruzada.

Os animais do estudo, submetidos à prova de reação cruzada, foram considerados seu próprio controle, antes de receberem a transfusão, visto que não tinham sido ainda

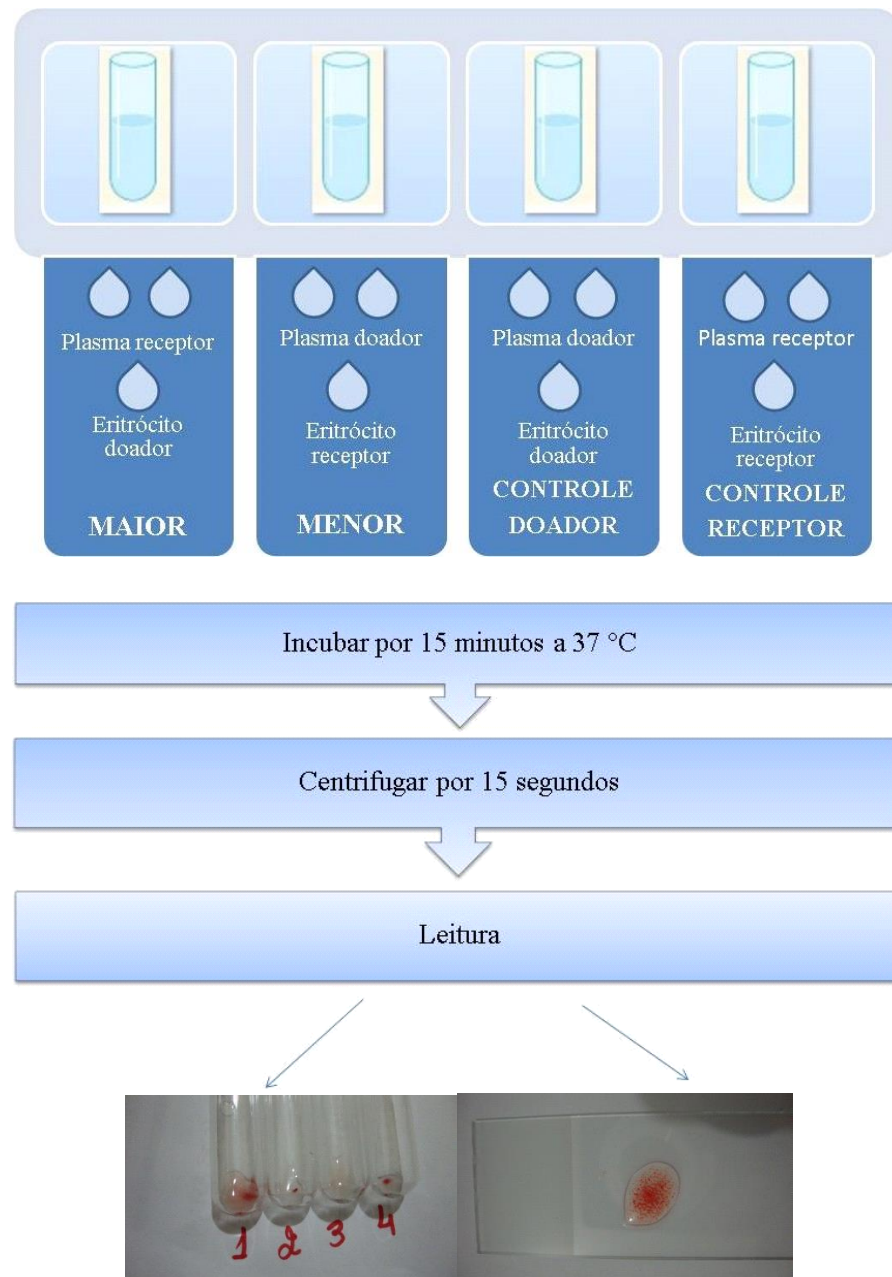
sensibilizados. Quanto aos doadores, o grupo controle dos animais positivos para o DEA 1.1 foi composto por aqueles que se mostraram negativos para esse antígeno.

A prova de reação cruzada seguiu a técnica descrita por Lanevski; Wardrop (2001) esquematizada na figura 3. As amostras de sangue total de cada doador e receptor foram centrifugadas para obtenção de plasma, a 2200 g (3500 rpm) por 3 minutos. A seguir, procedeu-se à lavagem dos eritrócitos ressuspensos em solução NaCl 0,9 % (solução salina) centrifugados a 2200 g (3500 rpm) por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido por mais duas vezes. Os eritrócitos foram ressuspensos em solução salina a 4% (200µL/4,8 mL) e a seguir, dispostos em tubos identificados como: "maior", "menor", "controle doador" e "controle receptor". No tubo da reação cruzada maior, colocou-se 2 gotas de plasma do receptor e 1 gota da suspensão de eritrócitos do doador; no tubo da reação cruzada menor, 2 gotas de plasma do doador e 1 gota da suspensão de eritrócitos do receptor; no controle do doador, 2 gotas de plasma e 1 gota da suspensão de eritrócitos, ambos do doador; finalmente, no controle receptor, 2 gotas de plasma e 1 gota de suspensão de eritrócitos, ambos do receptor. Em seguida os tubos foram incubados por 15 minutos a 37°C e centrifugados por 15 segundos a 2200 g (3500 rpm). Os resultados foram avaliados após agitação dos tubos para ressuspensão das células, seguida de observação contra a luz, para avaliar aglutinação e/ou hemólise, sendo a aglutinação também confirmada microscopicamente. A interpretação dos achados das provas de reação cruzada seguiu o escore de aglutinação preconizado por Gibson (2007) esquematizado no quadro abaixo:

Quadro 2 - Graduação da aglutinação da prova de reação cruzada em cruces

4+	um agregado sólido de células
3+	vários largos agregados de células
2+	medianos agregados de células/luz de fundo (<i>background</i>) clara
1+	pequenos a microscópicos agregados de células/luz de fundo (<i>background</i>) avermelhado turvo
+/-	microscópicos agregados
0	ausência de agregados

Fonte: Gibson (2007).

Figura 2 - Técnica da prova de reação cruzada lenta em tubos

Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Acompanhamento pós-transfusão

No ato de cada coleta semanal de sangue realizou-se o hemograma e as avaliações bioquímicas das proteínas plasmáticas totais e séricos de creatinina e gama-glutamil transferase. Os hemogramas foram realizados pela técnica de citometria de fluxo por contagem automática pelo analisador automatizado de hematologia (Roche) como da leitura do diferencial de leucócitos em lâmina. E as dosagens de proteínas totais e as análises das concentrações de creatinina e gama-glutamil transferase pelo analisador automático de química clínica (Roche).

4.3.3 Citometria de Fluxo para pesquisa de anticorpos anti-DEA 1.1

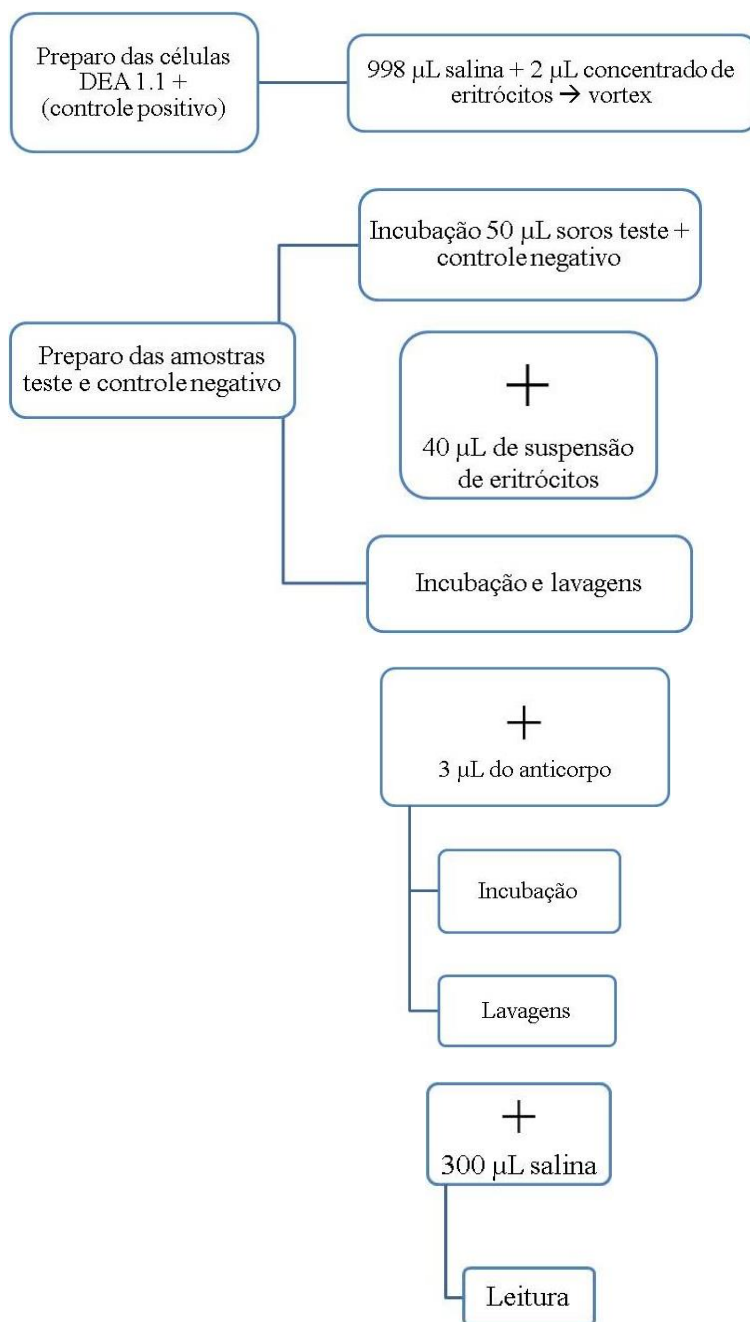
Nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-transfusão, cada receptor foi também submetido à pesquisa de anticorpos anti-DEA 1.1, por meio de citometria de fluxo com o anticorpo policlonal da Serotec[®] (Bio-Rad/USA).

A pesquisa de anticorpos anti-DEA 1.1 seguiu a metodologia utilizada por Lucidi et al. (2011) modificada (Laboratório de Imunologia I.C.S. – UFBA). Os procedimentos de dupla marcação consistem em que hemácias marcadas com anticorpos não conjugados foram submetidos a uma segunda reação utilizando-se um anticorpo secundário conjugado a um fluorocromo, o que impede simultânea quantificação de múltiplos marcadores em células individuais. Para cada amostra, houve reações controle por meio de células da mesma amostra, porém, não submetidas à marcação e células marcadas com um anticorpo de isotipo igual que não se conjugou especificamente a qualquer antígeno diferente das hemácias. As células não marcadas corrigiram a autofluorescência e a intensidade de fluorescência do anticorpo irrelevante foi relacionada à reação de fundo. (NAKAGE et al., 2005; RAMOS-VARA et al., 2011).

O procedimento experimental se resume na centrifugação de 2 mL de sangue total em EDTA, com 6 milhões de eritrócitos/dL conhecidamente DEA 1.1 positivo, a 2200 g (3500 rpm) por 3 minutos; o plasma foi desprezado e o concentrado de eritrócitos ressuspendido com solução salina no mesmo volume do plasma desprezado. A seguir, 2 µL desse concentrado foram misturados com 998 µL de solução salina e homogeneizados em vortex. As amostras teste e o controle negativo, cada uma contendo 50 µL, foram incubadas a 56°C por 10 minutos, e em seguida, incubada com 40 µL da

solução de eritrócitos diluídos em temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras de soro com a suspensão de eritrócitos foram lavadas com salina a 2200 g (3500 rpm) por 3 minutos, 3 vezes. Foram acrescentados nos soros dos frascos a serem testados e no controle negativo 3 μ L do anticorpo IgG anti-cão em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida os soros foram lavados com salina a 2200 g (3500 rpm) por 3 minutos 2 vezes para serem ressuspensos todos os frascos em 300 μ L de salina, e por fim, realizadas as leituras no citômetro. As células controle no teste da citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos anti-DEA 1.1 foram sempre as mesmas hemácias de um cão doador de sangue DEA 1.1 positivo. O anticorpo anti-DEA 1.1 pesquisado no teste, foi obtido do soro dos animais receptores de sangue testados em que foi adicionado o IgG total policlonal conjugado com FITC.

A Figura 3 representa o diagrama metodológico da citometria de fluxo para pesquisa de anticorpos anti-DEA 1.1 utilizada neste estudo.

Figura 3 - Técnica de citometria de fluxo

Fonte: Autoria própria.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas utilizadas neste estudo foram destinadas a avaliar os achados descritivos dos hemogramas, proteínas plasmáticas totais, creatinina, γ GT, resultados das provas de reação cruzada lenta em tubos e os resultados da citometria de fluxo da pesquisa de anticorpos anti- DEA 1.1 com média e desvio padrão dos 33 indivíduos pesquisados nas quatro semanas. A comparação entre as semanas foi realizada pelo teste ANOVA em todas as variáveis, com exceção da prova de reação cruzada por tratar-se de variável ordinal, sendo analisadas pelo teste qui quadrado de Pearson. Todas as análises foram realizadas no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 17.0 e os gráficos através do programa *Graph Pad Prism* versão 5.

5 RESULTADOS

Os dados mostram resultados de um estudo descritivo, analítico, em séries temporais com variáveis quantitativas e qualitativas.

5.1 DETERMINAÇÃO DOS TIPOS SANGUÍNEOS DOS CÃES DO GRUPO DOADORES DE SANGUE

No grupo de animais doadores, formado por 30 cães de diversas raças, com idade e peso médio respectivamente, de 4,8 anos e 34,7 kg, verificou-se que 60 % (18 animais) correspondia ao tipo sanguíneo DEA 1.1 positivo. (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação das raças, idade, peso, sexo e tipo sanguíneo de 30 cães doadores de sangue

Animal	Raça	Idade (anos)	Peso (Kg)	Sexo	DEA1.1 positivo
1	Afeganhound	7	28	F	1
2	Afeganhound	2	28	M	1
3	Afeganhound	8	35	M	1
4	Afeganhound	5	35	M	1
5	Afeganhound	2	30	M	1
6	Afeganhound	2	30	M	1
7	Afeganhound	2	28	F	1
8	Afeganhound	5	29	M	1
9	American S. T.	4	35	F	0
10	American S. T.	5	38	M	0
11	Bull Terrier	5	37	M	0
12	Bull Terrier	8	33	F	0
13	Bulldog Americano	8	38	M	0
14	Bulldog Inglês	5	33	M	0
15	Bulldog Inglês	4	30	F	0
16	Doberman	7	42	F	0
17	Fila Brasileiro	3	45	F	1
18	Golden Retriever	5	38	F	0
19	Labrador	4	40	M	1
20	Labrador	5	37	F	1
21	Pastor Alemão	4	35	F	0
22	Pastor de Malinois	4	35	M	1
23	Pastor de Malinois	4	36	M	1
24	Pastor de Malinois	3	33	F	1
25	Pastor de Malinois	5	38	F	1
26	Pastor de Malinois	4	38	M	1
27	Pastor de Malinois	5	35	F	1
28	Pit Bull	7	30	F	1
29	S.R.D.	6	34	M	0
30	S.R.D.	7	35	M	0

DEA: 1= positivo; 0 = negativo

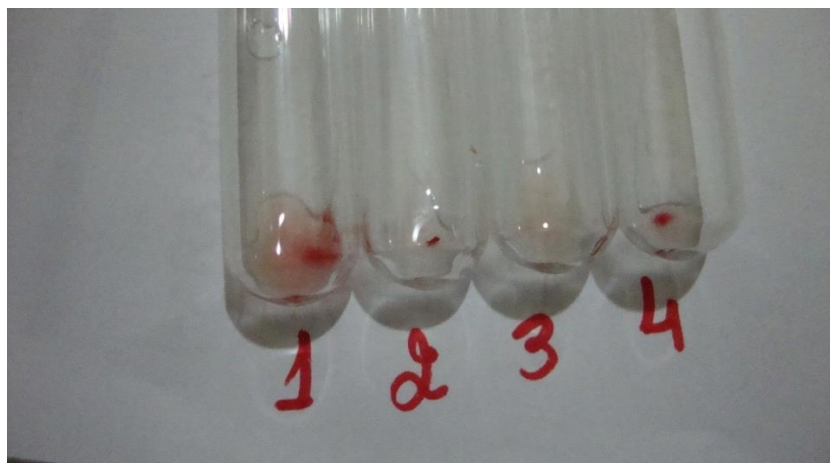
Fonte: Autoria própria.

O grupo de animais receptores, composto de 33 cães que receberam transfusão sanguínea dos doadores DEA 1.1 positivo foi estudado ao longo de quatro semanas, pelo hemograma, determinação das proteínas plasmáticas totais e de creatinina e γ GT séricas. Todos os animais tinham indicação de receber transfusão sanguínea e, como condição de recebê-la, eram submetidos à prova de compatibilidade feita através da prova de reação cruzada lenta em tubos.

5.2 PROVAS DE REAÇÃO CRUZADA LENTA EM TUBOS

Os resultados foram baseados no grau de hemácias precipitadas, e classificadas segundo Gibson (2007) com intensidade variável de 0 a 4 cruces. Os mesmos foram condizentes com o comportamento imunológico dos animais receptores, os quais tinham tipos sanguíneos desconhecidos. Essa cinética de anticorpos foi evidenciada em quinze animais (45%). As figuras de 4 a 6 ilustram os achados da técnica e, a Tabela 3 os resultados das provas de reação lenta em tubos. A Figura 7 apresenta resultados das provas de reação cruzada após tratamento estatístico do conjunto de dados obtidos e listados na Tabela 5 (APÊNDICE C), demonstrando a cinética dos anticorpos evidenciados pela prova de reação cruzada lenta no dia da transfusão sanguínea e a cada sete dias pós-transfusão.

Figura 4 - Tubos da prova de reação cruzada; 1 = aglutinação positiva da reação cruzada maior, 2 = aglutinação negativa da reação cruzada menor, 3 = autocontrole do doador normal, 4 = autocontrole do receptor normal



Fonte: Autoria própria.

Figura 5 - Apresentação em lâmina e em tubo da amostra com aglutinação positiva

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 - Resultado da intensidade de cruces da prova de reação cruzada lenta em tubos nas quatro semanas avaliadas

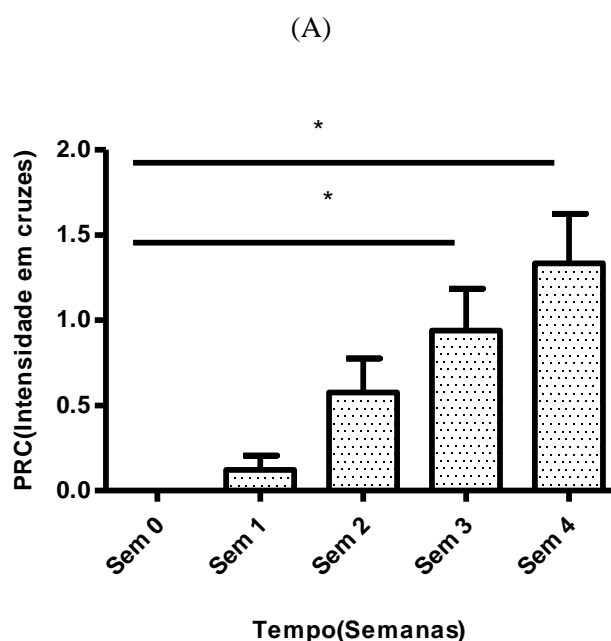
Escore (cruzes)	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
0	31	26	22	19
2	2	2	4	4
3	0	5	5	4
4	0	0	2	6

(n)= 33

Fonte: Autoria própria.

Figura 6 - Cinética da prova de reação cruzada lenta em tubos (PRC) nos cães submetidos à transfusão sanguínea com sangue DEA 1.1 positivo

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
PRC (n)=33	0,121 ± 0,4846	0,576 ± 1,1465	0,939 ± 1,4129	1,333 ± 1,6708



Nota: Resultados expressos em média e desvio padrão (A) com reatividade das amostras classificadas por cruces (B) (Pearson;p=0,011). Fonte: Autoria própria.

5.3 ACOMPANHAMENTO PÓS-TRANSFUSÃO

O acompanhamento laboratorial serviu para avaliar a resposta terapêutica frente às diversas patologias que cada receptor apresentava no momento da transfusão. Procurou-se verificar se as transfusões de sangue com tipo sanguíneo diferente teriam comportamento hematológico e bioquímico discordante ou não do que ocorresse com tipo DEA 1.1. Todos os animais do estudo, segundo os médicos veterinários

solicitantes, no momento da transfusão, apresentavam valores hematológicos indicativos de ser realizado esse procedimento terapêutico, com volume globular abaixo de 20% e hemoglobina inferior a 7 g/dL.

5.3.1 Análises de sangue total e plasmática

5.3.1.1 Hemograma

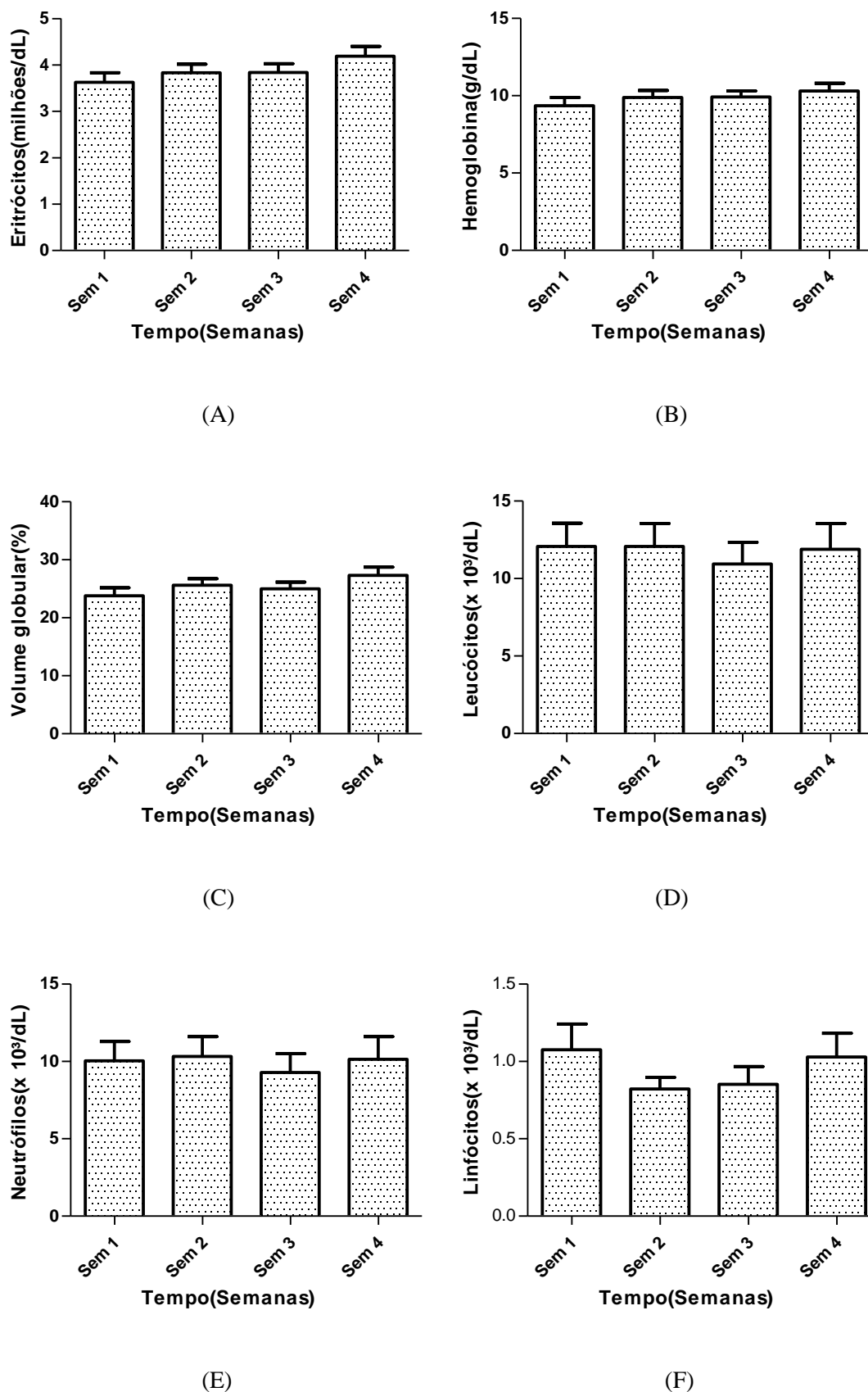
Os hemogramas semanais avaliaram a manutenção das células transfundidas, bem como sua produção pelos animais receptores. O conjunto dos resultados de diferentes parâmetros analisados em cada animal estudado foram tabulados nas tabelas 6-A a 6-G (APÊNDICE C) e, os resultados globais dos 33 animais do grupo são apresentados como média e desvio padrão na Tabela 4. A Figura 7 ilustra em gráficos os parâmetros dos hemogramas dos 33 animais nas 4 semanas avaliadas.

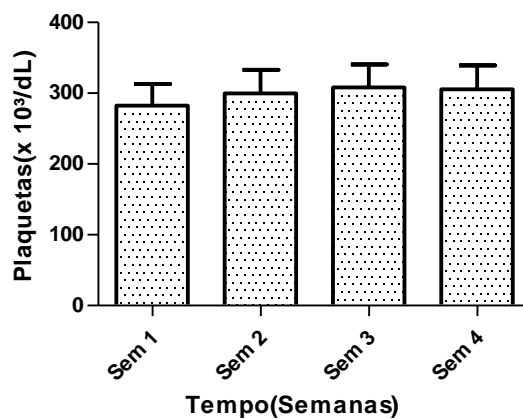
Tabela 4 - Evolução do perfil hematológico pós-transfusão sanguínea com o tipo DEA 1.1 positivo

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Hemácias(milhões/dL)	3,624 ±1,1888	3,833 ±1,0376	3,839 ±1,0842	4,188 ± 1,2366
Hemoglobina(g/dL)	9,358 ±3,1080	9,891 ±2,5833	9,918 ±2,2634	10,315 ±2,8570
Volume globular(%)	23,818 ±7,7478	25,061 ±6,4804	25,000 ±6,7361	27,303 ±8,3235
Leucócitos(x10 ³ /dL)	12,079 ±8,5814	12,076 ±8,4986	10,948 ±8,0411	11,891 ±9,5950
Neutrófilos(x10 ³ /dL)	10,047 ±7,1478	10,330 ±7,3354	9,294 ±6,9764	10,137 ±8,4464
Linfócitos(x10 ³ /dL)	1,075 ±0,9610	0,822 ±0,4342	0,852 ±0,6574	1,030 ±0,8778
	282,242	302,394	308,212	292,818
Plaquetas(x10 ³ /dL)	177,6667	±196,0237	±185,9717	±198,8298

(n) = 33 animais; Valores de referência: Hemácias: 5,5-8,5(milhões/dL); Hemoglobina: 12,0-18,0(g/dL); Volume globular: 37-55(%); Leucócitos: 6,0-17,0(x10³/dL); Neutrófilos: 3,0-11,5(x10³/dL); Linfócitos: 1,0-4,8(x10³/dL); Plaquetas: 200-500(x10³/dL) (JAIN, N.C., 1993). Fonte: Autoria própria.

Figura 7 - Evolução de parâmetros hematológicos em cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo





(G)

Nota: Resultados expressos em média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos (A, B, C, D, E, F, G) sem diferenças estatisticamente significantes. Fonte: Autoria própria.

5.3.1.2 Proteínas plasmáticas totais

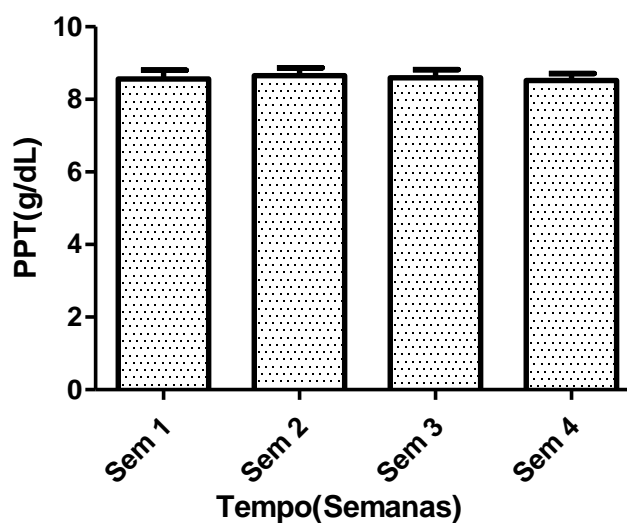
As proteínas plasmáticas totais foram avaliadas como indicadores do processo inflamatório que cada animal pós-transfundido se encontrava. Como o processo inflamatório exerce influência na redução dos eritrócitos, esse parâmetro é importante no estudo. Os resultados globais são apresentados como média e desvio padrão, com sua ilustração na Figura 8. Os resultados do banco de dados encontram-se no Apêndice C, na Tabela 7.

Figura 8 - Evolução das dosagens das proteínas plasmáticas totais – PPT (g/dL) dos cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 3
Proteínas(g/dL)	8,567 ±1,3411	8,442 ±1,1054	8,644 ±1,2946	8,541 ±1,0978

(n) = 33 animais; Valor de referência: 6,0-8,0 (JAIN, N.C., 1993).

(A)



(B)

Nota: Resultados expressos em média e desvio padrão (A) das proteínas plasmáticas totais sem diferenças estatisticamente significantes (B). Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Análises séricas

5.3.2.1 Dosagens séricas de creatinina

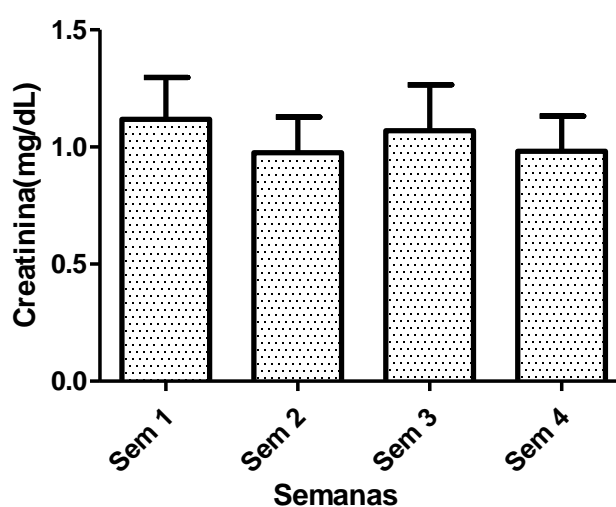
As análises séricas de creatinina tiveram o propósito de avaliar lesões renais nos animais pós-transfundidos, visto que os rins sendo órgãos sítio da produção de eritropoietina apresentam papel relevante na hematopoiese, mesmo que esse indicador seja tardio. Os resultados globais são apresentados com os valores de média e desvio padrão e com sua ilustração na Figura 9. Os resultados do banco de dados encontram-se no Apêndice C na Tabela 8.

Figura 9 - Evolução das dosagens séricas de creatinina (mg/dL) dos cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Creatinina(mg/dL)	1,118 ±1,0230	0,976 ±0,8775	1,070 ±1,1232	0,982 ±0,8604

(n) = 33 animais; Valor de Referência: 0,5 – 1,5 mg/dL (KANEKO, J.J. et al.,1997).

(A)



(B)

Nota: Resultados expressos em média e desvio padrão (A) das dosagens séricas de creatinina sem diferenças estatisticamente significantes (B). Fonte: Autoria própria.

5.3.2.2 Dosagens séricas de gama-glutamil transferase

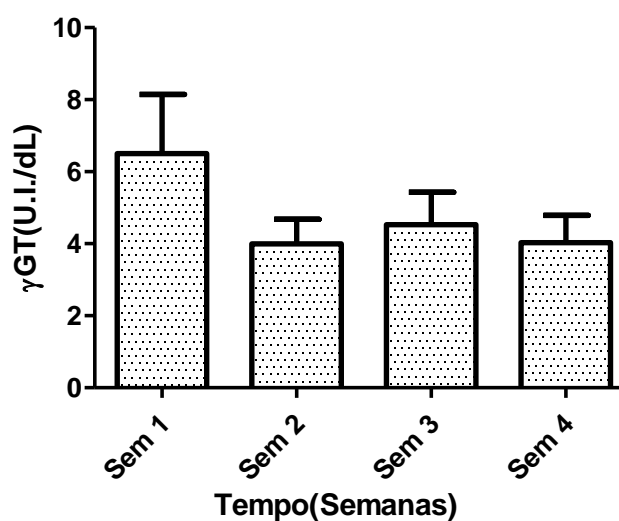
As análises séricas de gama-glutamil transferase foram avaliadas nos cães pós-transfundidos como indicador de lesão hepática, pois os animais do estudo eram portadores de diversas patologias que podem gerar perda sanguínea crônica. Os resultados globais são apresentados com os valores de média e desvio padrão e com sua ilustração na Figura 10. O conjunto dos resultados por animal estudado encontra-se no Apêndice C Tabela 9.

Figura 10- Evolução das dosagens séricas de gama-glutamil transferase (U.I./dL) de cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
γ GT(U/dL)	6,503 \pm 9,4343	3,997 \pm 3,9300	4,533 \pm 5,1693	4,030 \pm 4,3523

(n) = 33 animais; Valor de Referência: 1-10 U/dL(KANEKO, J.J. et al.,1997).

(A)



(B)

Nota: Resultados expressos em média e desvio padrão (A) das dosagens séricas de gama-glutamil transferase sem diferenças estatisticamente significantes (B). Fonte: Autoria própria.

5.4 AVALIAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO

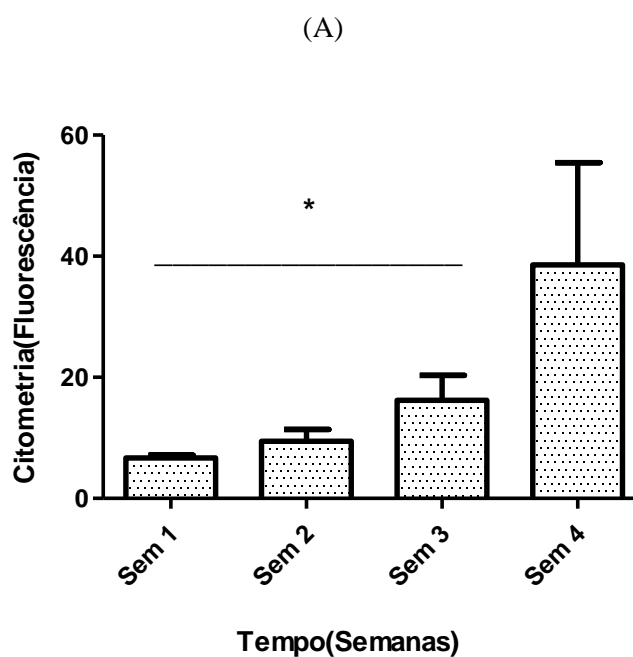
As amostras dos 33 cães receptores foram congeladas a -4°C ao longo de quatro semanas, totalizando 132 alíquotas submetidas à citometria de fluxo para detecção de anticorpos anti-DEA 1.1. O ponto de corte foi definido a partir da comparação dos resultados negativos das provas de reação cruzada com os resultados encontrados na citometria de fluxo. Os valores encontrados na citometria de fluxo dos indivíduos que tinham prova de reação cruzada negativa tiveram valores que variaram de 4 a 14,6 em intensidade de fluorescência. As amostras que obtiveram valores maiores de 14,6 foram

consideradas positivas, o que oscilou de 15 até 538,99. A análise por citometria de fluxo evidenciou a cinética dos anticorpos positivos para o antígeno DEA 1.1 ao longo do período estudado onde encontramos nove animais positivos (27%). Os resultados dessa análise são apresentados com valores de média e desvio padrão e com sua ilustração na Figura 11. Os dados globais encontram-se na Tabela 10 no Apêndice C.

Figura 11 - Cinética da detecção de anticorpos anti-DEA 1.1 positivo em cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Citometria de fluxo	6,705 \pm 2,4519	8,979 \pm 11,1094	15,380 \pm 23,6426	53,282 \pm 130,3695

(n) = 33 animais.



Nota: Resultados expressos em média e desvio padrão (A) com reatividade das amostras classificadas por intensidade de fluorescência (B) (ANOVA;p=0,017). Fonte: Autoria própria.

5.5 AVALIAÇÃO FINAL DAS VARIÁVEIS DO ESTUDO

Dentro da estatística descritiva, as análises inferenciais das variáveis com os demais tratamentos estatísticos utilizados no estudo apresentaram diferença estatisticamente significativa na pesquisa de anticorpos anti-DEA 1.1, por citometria de fluxo, entre os períodos avaliados (ANOVA;p=0,017) como evidenciado na Tabela 11 no Apêndice C. As diferenças observadas foram entre as semanas 1 e 4 (Tukey;p=0,026) e entre as semanas 2 e 4 (Tukey;p=0,038), onde a diferença média é significativa até 0,05, demonstradas na Tabela 12 no Apêndice C.

Os testes de Qui-quadrado foram feitos para encontrar um valor de dispersão para as variáveis qualitativas da pesquisa avaliando a correlação entre elas. Este teste paramétrico não dependeu das médias e variâncias e apresentou um valor de significância de 0,011 no teste de Pearson evidenciado na Tabela 13 (APÊNDICE C) (CONTI, 2014).

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram que a população dos animais do grupo de doadores de sangue é representada por 60% de indivíduos positivos ao tipo DEA 1.1, semelhante ao que foi apresentado na literatura como parâmetro de tipificação na população canina brasileira (NOVAIS et al., 1996; ESTEVES et al., 2011). Segundo Acierno et al. (2014) a população mundial de cães oscila numa prevalência de 10 a 100%, e esse tipo sanguíneo torna-se mais prevalente em grupos raciais ou de consanguinidade próxima, sendo que em populações mistas geneticamente estabelece-se uma estimativa mundial de 50% .

Cada hemograma pode respaldar o efeito benéfico das transfusões, tanto no que se refere à série vermelha quanto na série branca, plaquetas e da mesma forma, as proteínas totais. Os valores de eritrograma (contagem global de hemácias, hemoglobina e volume globular) apresentaram-se medianamente abaixo da normalidade porém, ainda sem indicação de realização de nova transfusão. Por sua vez, o leucograma apresentou

valores dentro da normalidade, bem como as plaquetas e as proteínas plasmáticas totais. Os resultados encontrados em todos os cães, independente da positividade ou não, nas provas sorológicas que evidenciam produção de aloanticorpos– reação cruzada lenta em tubos e citometria de fluxo –condizem com uma medula óssea ativa na produção dos elementos figurados, apesar das diversas patologias que os receptores apresentavam. De todos os parâmetros do hemograma, os que ficaram mais estáveis dentro dos valores da normalidade após cada transfusão sanguínea foram as plaquetas. O que demonstra uma boa resposta terapêutica em pacientes que foram pancitopênicos por variadas causas, principalmente erliquiose. Não houve trombocitopenia pós-transfusional como relatada por La Gamma; Blau (2012) e Lemos (2010) sendo concordante com os achados de Lacerda (2005) que a considera uma reação rara.

As dosagens de creatinina foram realizadas para avaliar a função renal, visto que os rins são responsáveis pela produção da eritropoietina que sinaliza à medula óssea para a produção sanguínea, e os valores se mantiveram dentro dos padrões de normalidade. Segundo Lopes et al. (2010), em humanos, valores altos de creatinina, que cursam com estado nutricional de caquexia, é fator de mortalidade mais alto quando comparados aos pacientes com hipercreatininemia mas que apresentam estado nutricional equilibrado. Por isso todos os pacientes foram recomendados a receber suplementação férrica, como estimulante da eritropoiese, e reforço alimentar, considerando que a produção celular não estivesse prejudicada por ausência ou redução de eritropoietina e sim, por extenuação corpórea por diversas patologias.

O fato dos animais apresentarem valores de creatinina também dentro da normalidade nos leva a excluir possíveis quadros de insuficiência renal, pois pacientes insuficientes apresentam contagem plaquetária diminuída, devido à hipofunção da medula óssea, levando à hemorragias (BRAINARD, 2008). A lesão renal aguda frequentemente resulta de isquemia por agentes tóxicos ou infecciosos, afetando o glomérulo e sua porção tubular, e as concentrações séricas de creatinina mantêm-se na faixa da normalidade até que mais de 66% dos néfrons passem a ser afuncionais, demonstrando que é um marcador específico de baixa sensibilidade, caracterizando-se como tardio (FREITAS et al., 2014).

Sabe-se que o fígado é órgão fundamental na filtração e metabolização sanguínea, bem como a produção de fatores de coagulação importantes na hemostasia secundária

(BRAINARD, 2008). As avaliações da γ GT verificaram, de forma sucinta, a função hepática no período pós-transfusional, uma vez que os pacientes eram hipovolêmicos, com patologias variadas e no curso do estudo, receberam tratamentos diversos. Os resultados encontrados apresentaram valores dentro da normalidade. Entre os testes de função hepática realizados no diagnóstico de hepatopatias, a γ GT tem sido relatada como marcador das desordens hepatobiliares e apesar dela ter sua maior concentração no tecido renal e pancreático sua importância clínica está ligada ao diagnóstico de colestase e de lesões hepáticas de caráter inflamatórias e tóxicas como as que acompanham as patologias dos transfundidos (VALADARES, apud VIDAL et al., 2009).

Com produção ou não dos aloanticorpos, esses dois indicadores bioquímicos evidenciaram que cada animal transfundido apresentou o mesmo comportamento e que a resposta terapêutica estava satisfatória. Isso demonstrou que independente do tipo sanguíneo do doador canino ser igual ou distinto do receptor a resposta clínica foi adequada.

As transfusões de sangue total deste estudo foram indicadas por uma variedade de condições incluindo hipóxia celular, devido a perda sanguínea, anemia hemolítica auto-imune, hemoprodução diminuída pela medula óssea, de origem infecciosa ou imunomediada ou ainda, infecções por hemoparasitas. Foi verificado durante a realização das provas de reação cruzada, que alguns pacientes apresentavam autoaglutinação. Segundo Rogers (2008) a destruição dos eritrócitos se inicia a partir da ligação da IgG ou IgM e complemento com a membrana celular, o que pode confundir com uma reação por presença de aloanticorpos pós-transfusionais. Por sua vez, durante a realização da citometria de fluxo do estudo, no momento da incubação dos soros teste a 56°C, ocorreu a inativação do complemento, o que otimizou a técnica no que se refere a essa interferência na aglutinação (LUCIDI et al., 2011). Para McDevitt et al. (2011) o sangue coletado para as transfusões precisa apresentar células viáveis antes e após o procedimento. Por isso, no presente estudo, cada transfusão foi realizada com sangue de no máximo dois dias de coletado, evitando lesão de estocagem hemolítica como descrita por Duggan et al. (2014). Todos os pacientes eram submetidos à prova de reação cruzada como condição básica para se proceder a transfusão, seguindo a técnica preconizada por Lanevski; Wardrop (2001), e interpretação segundo Gibson (2007). Nesse trabalho observou-se na prova de reação cruzada lenta em tubos que a

positividade foi marcadamente progressiva da segunda para a quarta semana, sendo que em alguns indivíduos ocorreu uma redução no parâmetro de uma cruz (1+) na quarta semana. Nos indivíduos que apresentaram a citometria de fluxo positiva, o crescimento foi evidenciado numericamente desde a primeira semana, com progressão positiva até a quarta semana, atestando uma grande especificidade da técnica. Houve indivíduos com reação cruzada lenta em tubos positiva, mas que na citometria de fluxo, não apresentava resultado positivo, o que leva a crer que se tratasse de indivíduos com autoanticorpos e autoaglutinação típica de anemia hemolítica autoimune ou reativos a outro tipo sanguíneo que não o DEA 1.1, como foi citado por Blois et al. (2013).

Conforme foi observado, apenas nove (27%) dos animais avaliados nas quatro semanas, mostraram positividade ao antígeno DEA 1.1 na citometria de fluxo, enquanto na prova de reação cruzada lenta, quinze (45%) dos animais foram positivos a esse teste. Dos nove positivos na citometria de fluxo apenas o animal de número 8 não foi positivo na prova de reação cruzada lenta, vindo a apresentar leve positividade (fluorescência numérica de 20 para um ponto de corte de 14,7) somente na terceira semana de estudo. Isso evidencia que a prova de reação cruzada lenta em tubos tem caráter semiquantitativo e por isso, com baixo título de anticorpos, a aglutinação não foi perceptível (TOCCI; EWING, 2009). Ademais, há animais DEA 1.1 com variadas intensidades de positividade, de fraca a intensa, que seus estímulos à produção de aloanticorpos poderão corresponder à essa intensidade, levando à compreensão de que o animal 8 pudesse ter recebido um sangue DEA 1.1 de intensidade fraca (ACIERNO et al., 2014). Os que apresentaram fluorescência mais alta sempre obtiveram positividade na prova de reação cruzada lenta. Esses achados evidenciam a seguinte relação entre as duas técnicas: a citometria de fluxo mostrou-se ser uma técnica de alta especificidade, enquanto a prova de reação cruzada lenta em tubos se mostrou de alta sensibilidade, ainda que possa apresentar resultados falso positivos, levando a entender que a comparação entre as duas não é exata. Como a própria literatura discorre, ainda não existe uma técnica para tipificação sanguínea padrão ouro e a citometria de fluxo, por sua alta especificidade e pela possibilidade de detecção de aloanticorpos, foi utilizada por Acierno et al. (2014) em busca de uma padronização da tipificação sanguínea. A citometria de fluxo confirmou ser técnica muito específica para a pesquisa de aloanticorpos, porém de pouca acessibilidade por causa do alto custo. E, a prova de

reação cruzada lenta em tubos, por ser de baixo custo ainda é muito acessível à rotina clínica, a habilitando como escolha para testes pré-transfusionais.

Transfusão sanguínea representa a exposição mais comum a uma grande concentração de antígenos além de ser uma complexa e variada terapia celular. Seus efeitos geram uma direta aloimunização, que foi o alvo da pesquisa de anticorpos desse estudo (ZIMRING, 2013). Não está esclarecido ainda se cães DEA 1.1 fracamente positivos podem desencadear uma resposta de aloanticorpos como a que ocorre em cães fortemente DEA 1.1 positivos (ACIERNO et al., 2014).

Para realizar a padronização da técnica obteve-se amostras de células com antígeno DEA 1.1 em intensidades distintas, onde aquelas de alta intensidade não apresentaram boa fluorescência e amostras de média intensidade apresentaram boa fluorescência. O antígeno primário desse estudo foi proveniente de um animal que apresentava uma reação DEA 1.1 média positiva. Nessa pesquisa de anticorpos pela citometria de fluxo foram usados anticorpos policlonais (Serotec) anti-cão de origem ovina, que são intrinsecamente variáveis, múltiplos, e suas reações de aglutinação parecem depender distintamente da concentração do antissoro usado (ACIERNO et al., 2014). A sensibilização de cada soro a ser testado era dependente de cada doador DEA 1.1 que variou de pouco a fortemente positivo. Por isso cada resultado positivo apresentava valores distintos entre as amostras mesmo que elas apresentassem uma gradação de intensidade. O soro controle negativo foi obtido de animal conhecidamente DEA 1.1 negativo e a mesma amostra foi utilizada em todo estudo. A técnica da citometria de fluxo deste estudo seguiu a metodologia utilizada por Lucidi et al. (2011) com ajustes devido adaptação ao antígeno eritrocitário, visto que seu seguimento original foi com plaquetas. A técnica da citometria de fluxo para pesquisa do tipo DEA 1.1 preconizada por Acierno et al. (2014) utilizou o marcador FITC conjugado ao anticorpo policlonal anti-murino de origem caprina, e em nosso estudo o FITC foi conjugado ao anticorpo anti-cão de origem ovina, na qualidade de anticorpo secundário para reagir com a ligação anticorpo primário anti DEA 1.1 positivo na detecção do mesmo.

Neste estudo os resultados positivos comprovam, como na tipagem reversa, que ao haver uma reação antígeno-anticorpo, aquele tipo sanguíneo do soro testado é qualquer outro que não o pesquisado (LACERDA, 2011). E, os dados comparativos podem subsidiar os testes pré-transfusionais e contribuir para o controle de reações pós-

transfusionais de incompatibilidade, especialmente em animais acometidos de patologias, as quais demandam sucessivas transfusões, que, com frequência, costumam evoluir para óbito.

7 CONCLUSÕES

Os resultados da pesquisa de anticorpos e da prova de reação cruzada comprovam que a técnica de citometria de fluxo é de alta especificidade e sensibilidade, e que a prova de reação cruzada lenta em tubos pode confundir resultados de incompatibilidade sanguínea com autoaglutinação.

A resposta terapêutica dos animais pós-transfundidos segundo os achados de hemograma, proteínas plasmáticas totais, creatinina e γ GT foi adequada independentemente do tipo sanguíneo do receptor ter sido igual ou não ao do doador.

A produção de anticorpos anti-DEA 1.1 em receptores, que ocorre após a sensibilização, permite estabelecer um prognóstico de que na eventualidade desse paciente receptor vir a precisar de nova transfusão sanguínea, torna-se proibitivo receber um sangue novamente DEA 1.1 positivo, a fim de que não ocorram reações transfusionais.

Os animais que não apresentaram resultado positivo para as provas de reação cruzada, bem como na citometria de fluxo após a transfusão sanguínea, foram considerados de qualquer outro grupo sanguíneo diferente do DEA 1.1 positivo.

REFERÊNCIAS

ABRAMS-OGG, A. Practical blood transfusion. In: DAY, M.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J. Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine. 1 ed. Hampshire: British Small Animal Veterinary Association, 2000. Cap. 2, p. 263-303.

ACIERNO, M.M.; RAJ, K.; GIGER, U. DEA 1 expression on dog erythrocytes analysed by immunochromatographic and flow cytometric techniques. **Journal Veterinary Internal Medicine**, Melbourn, p. 1-7, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.12321/abstract>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

AHRENS, N. et al. Coexistence of autoantibodies and alloantibodies to red blood cells due to blood transfusion. **Transplantation and Cellular Engineering**, v. 47, p. 813-816, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1537-2995.2007.01194.x/abstract>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

ALVES, V.M. et al. Pesquisa de aloimunização após transfusão de concentrados de hemácias em um estudo prospectivo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 34, n. 3, p. 1-7, 2012. Disponível em: <<http://scielo.br/rbhh>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

BATOR, S.M. Blood transfusion: friend and foe. **The Journal of Lancaster General Hospital**, Lancaster, v. 6, n. 4, p. 107-113, 2011. Disponível em: <http://jlg6_4.indd>. Acesso em: 28 mar. 2014.

BLAIS, M.C. et al. Canine dal blood type: A red cell antigen lacking in some dalmatians. **Journal Veterinary Internal Medicine**, Melbourn, v. 21, n. 2, p. 281-286, 2007.

BLAIS, M.C. et al. Lack of evidence of pregnancy - induced alloantibodies in dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**, Melbourn, v. 23, p. 462-465, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2009.0286.x/abstract>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

BLOIS, S.L.; RICHARDSON, D.M.; ABRAMS-OGG, A.C.G. Comparison of a gel column blood typing method and a point-of-care cartridge for dog erythrocyte antigen 1.1. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, Malden, v. 23, n. 3, p. 340-343, 2013. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vec.12052/abstract>>. Acesso em: 28 de mar. 2014.

BOCHIO, M.N. et al. Avaliação do volume globular antes e após a transfusão sanguínea: estudo retrospectivo. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano XV, n. 86, p. 68-70, mai./jun., 2010.

BOVENS, C.; GRUFFYDD - JONES, T. Xenotransfusion with canine blood in the feline species: review of the literature. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Thousands Oaks, v. 15, n. 2, p. 62-67, 2012. Disponível em:

<<http://www.sagepublications.com/content/15/2/62>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

BRAINARD, B.M. The bleeding patient: diagnosis and assessment. In: INTERNATIONAL VETERINARY EMERGENCY AND CRITICAL CARE SYMPOSIUM, 14, 2008, Phoenix. *Proceeding...U.S.A.*, 2008, p.105-110.

BUEHLER, P.W. et al. Blood aging, safety, and transfusion: capturing the "radical" menace. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 9, p. 1713-1728, 2011. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2010.3447>>. Acesso em: 28 de mar. 2014.

CALLAN, M.B. et al. Transfusion of 28 - day - old leucoreduced or non - leucoreduced stored red blood cells induces an inflammatory response in health dogs. **Vox Sanguinis**, n. 105, Malden, p. 319-327, 2013. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vox.12058/abstract>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

CETINKAYA, P.A.F. et al. Flow cytometric detection of anti-AB antibody titers in blood group o recipients of blood group A2 donor kidneys. **Transplantation Proceedings**, Melbourn, v. 44, p. 1706-1709, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/.transproceed.2012.05.051>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

CONTI, F. **Muitas dicas**. Disponível em: <http://www.cultura.ufpa.br/dicas/-Laboratório de Informática - ICB - UFPA>. Acesso em: 1 de jun. 2014.

CRAWFORD, K. et al. Infectious agent screening in canine blood donors in the United Kingdom. **Journal of Small Animal Practice**, Malden, v. 54, p. 414-417, 2013.

Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jsap.12109/abstract>>.

Acesso em: 28 mar. 2014.

DAVIDOW, B. Transfusion medicine in small animals. **Veterinary Clinical Small Animal**, Philadelphia, n. 43, p. 735-756, 2013. Disponível em:

<<http://www.vetsmall.theclinics.com - dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2013.03.007>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

DODDS, W.J. Practical veterinary transfusion medicine. In: WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 30., 2005, México City. *Anais...* México: World Small Animal Veterinary Association, 2005, p. 1-4.

DUGGAN, J.M. Blood transfusion: old blood, new blood or no blood. **Internal Medicine Journal**, v. 41, p. 358-359, 2011. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1445-5994.2011.02455.x/abstract>>.

Acesso em: 28 mar. 2014.

ESTEVES, V.S. **Frequência de tipos sanguíneos em uma população de cães de raça de Porto Alegre e região metropolitana**. 2008. 51 f Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

ESTEVES, V.S. et al. Frequencies of DEA blood types in a purebreed canine blood donor population in Porto Alegre, R.S., Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 178-181, fev., 2011.

FASTAG, E.; VARON, J.; STERNBACH, G. Richard Lower: the origins of blood transfusion. **The Journal of Emergency Medicine**, London, v. 44, n. 6, p. 1146-1150, 2013.

FELDMAN, B.F.; SINK, C.A. Hemoterapia para o clínico de pequenos animais. São Paulo: Roca, 2007. 104p.

FERREIRA, R.R.F.; GOPEGUI, R.R.; MATOS, A.J.F. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal. **Veterinary Clinical Pathology**, Manhattan, v. 40, n. 2, p. 198-200, 2011. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2011.00311.x/abstract>>.

Acesso em: 28 mar. 2014.

FREITAS, G.C.; VEADO, J.C.C.; CARREGARO, A.B. Testes de avaliação de injúria renal precoce em cães e gatos. **Semina: ciências agrárias**. Londrina, v. 35, n. 1, p. 411-426, jan./fev., 2014.

FRANKLIN, I.M. Blood transfusion safety: a new philosophy. **Transfusion Medicine**, St. Louis, v.22, p. 377-382, 2012.

GIBSON, G. Transfusion Medicine. In: KING, L.G.; BOAG, A. 2.ed. **BSAVA Manual of Canine and Feline Emergency and Critical Care**. 2. Ed: BSAVA, 2007. Cap. 14, p. 2015-227.

GIGER, U; STIEGER, K.; PALOS, H. Comparison of various canine blood-typing methods. **Animal Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 66, n. 8, p. 1386-1392, 2005.

GILLISS, B.M.; LOONEY, M.R.; GROOPER, M.A. Reducing noninfectious risks of blood transfusion. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 115, n. 3, p. 635-649, 2011.

GOLDMAN, L. Bleeding is rarely good for you. **Circulation**, New York, n. 126, p. 169-171, 2012.

GOLIM, M.A. et al. Conjugação e validação de controle isotópico IgG₁-FITC para uso em citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, n.4, São José do Rio Preto, out./dez., p. 1-12, 2007. Disponível em:

<<http://www.scielo.php>>. Acesso em: 21 jan., 2014.

GOODNOUGH, L.T. Risks of blood transfusion. **Critical Care Medicine**, New Jersey, v. 31, n. 12, suppl., p. 678-686, 2003.

HALDANE, S. Transfusion therapy - your questions answered. In: INTERNATIONAL VETERINARY EMERGENCY AND CRITICAL CARE SYMPOSIUM, 14, 2008, Phoenix: *Proceedings...U.S.A.*, p. 785-789, 2008.

- HARREL, K.A.; KRISTENSEN, A.T. Canine transfusion reactions and their management. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, Philadelphia, v.25, p. 1333-1364, 1995.
- HERNANDEZ, S.L.H. et al. Factors associated with the need for blood transfusion during hysterectomy. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, Philadelphia, v.118, p. 239-241, 2012.
- HOD, E.A.; ZIMRING, J.C.; SPITALNIK, S.L. Lessons learned from mouse models of hemolytic transfusion reactions. **Current Opinion Hematology**, Massachusetts, v.15, n. 6, p. 601-605, 2008.
- IAZBIK, M.C. et al. Prevalence of dog erythrocyte antigens in retired racing greyhounds. **Veterinary Clinical Pathology**, New Jersey, v. 39, n. 4, p. 433-435, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2010.00261.x/abstract>>. Acesso em: 28 mar. 2014.
- JAIN, N. C. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea & Fabiger, 1993. 417 p.
- JUNQUEIRA, P.C.; ROSENBLIT, J.; HAMERSCHLAK, N. Histórico da hemoterapia no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 201-207, 2005.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, H.W.; BRUSS, M.L. Appendixes. In: **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 885-905.
- KELLETT - GREGORY, L. M. et al. Autologous canine red blood cell transfusion using cell salvage devices. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 82-86, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vec.12017/abstract>>. Acesso em: 28 mar. 2014.
- KESSLER, R.J. et al. Dog erythrocyte antigens 1.1, 1.2, 3, 4, 7, and dal blood typing and cross-matching by gel column technique. **Veterinary Clinical Pathology**, New Jersey, v. 39, n. 3, p. 306-316, 2010.

KISIELEWICZ, C.; SELF, I. A. Canine and feline blood transfusions: controversies and recent advances in administration practices. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, New Jersey, p. 1-10, 2014.

KIRKMAN, E. Blood groups. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, Philadelphia, v. 11, n. 6, p. 232-235, 2010.

KOHN, B.; CLASSE, G.; WEINGART, C. Clinical evaluation of the Quick Vet/ Rapid Vet canine dog erythrocyte antigen 1.1 blood-typing test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Athens, v.24, n.3, p.539-545, 2014. Disponível em: <<http://www.sagepublications.com> - DOI:10.1177/1040638712442880>. Acesso em: 28 mar. 2014.

LACERDA, L.A. Transfusão sanguínea em veterinária: desafios a vencer. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2. 2005, Porto Alegre. *Anais...*Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005, p. 62-81.

LACERDA, L.A. et al. Titulação de aloanticorpos anti-A e anti-B em gatos domésticos sem raça definida em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 1, p. 51-55, 2011.

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

LA GAMMA, E. F., BLAU, J. Transfusion-related acute gut injury: feeding, flora, flow, and barrier defense. In: SEMINAR IN PERINATOLOGY. 2012, New York. *Proceedings...*v. 36, p. 294-305, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2012.04.011>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

LAINE, L. Blood transfusion for gastrointestinal bleeding. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 1, n. 368, p. 75-76, 2013.

LEAROYD, P. The history of blood transfusion prior to the 20th century - Part 1. **Transfusion Medicine**, London, v. 22, p. 308-314, 2012.

LEAROYD, P. The history of blood transfusion prior to the 20th century - Part 2. **Transfusion Medicine**, London, v. 22, p. 372-376, 2012.

LEMOS, D.S.A.; NOVAIS, A.A.; NOGUEIRA, A.F.S. Avaliação laboratorial de cães após transfusão de sangue total. **Veterinária e Zootecnia**, Araçatuba, v. 17, supl.1, p. 67, 2010.

LOPES, A.A. et al. Independent and joint associations of nutritional status indicators with mortality risk among chronic hemodialysis patients in the dialysis outcomes and practice patterns study. **Journal of Renal Nutrition**, v. 20, n. 4, p. 224-234, 2010. Disponível em: <<http://ro.uow.edu.au/hbspapers/3057>>. Acesso em 28 mar. 2014.

LUCIDI, C.A. et al. Flow cytometric assessment of canine erythrocytes and platelets for dog erythrocyte antigen 1.1. **Veterinary Clinical Pathology, American Society for Veterinary Clinical Pathology**, New Jersey, v. 40/4, p. 435-443, 2011.

MENDES, A.B. Métodos Estatísticos. Disponível em: <<http://www.cin.ufpe.br/~fnj/estatística/ANOVA.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

McDEVITT, R.I.; RUAUX, C.G.; BALTZER, W.I. Influence of transfusion technique on survival of autologous red blood cells in the dog. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 21, n. 3, p. 209-216, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-4431.2011.00634.x/abstract>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

McMICHAEL, M.A. et al. Effect of leukoreduction on transfusion - induced inflammation in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 1131-1137, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2010.0561.x/abstract>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

MESA-SANCHEZ, I.; GOPEGUI - FERNANDEZ, R.R.; GRANADOS - MACHUCA, M.M. Prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in galgos (Spanish Greyhounds). **Veterinary Record**, London, v. 10, p. 1-3, 2014. Disponível em: <<http://www.veterinaryrecord.bmj.com>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

MORIKAWA, M.K. et al. Monitoração e avaliação clínica da eficácia da transfusão de sangue total e concentrado de hemácias em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v. 30, n. 8, p.665-669, 2010. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/>>. Acesso em: 10 fev. 2012.

NAKAGE, A.P.M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, jul./ago., p. 325-329, 2005.

NOVAIS, A.A. **Prevalência dos antígenos eritrocitárias caninos em cães domésticos e investigação dos parâmetros hematológicos e da ocorrência de antígenos eritrocitários em lobos-guará e cachorros-do-mato**. 2003. 63 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Campus de Jaboticabal, São Paulo.

NOVAIS, A.A.; SANTANA, A.E.; VINCENTIN, L.A. Prevalência do grupo sanguíneo DEA 1 (subgrupos 1.1 e 1.2) em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) criados no Brasil. **Brazilian Veterinary Journal Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 1-8, 1999.

PATTERSON, J. et al. In vitro lysis and acute transfusion reactions with hemolysis caused by inappropriate storage of canine red blood cell products. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, p. 927-933, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2011.0737.x/abstract>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

PINCELLI, V.A. et al. Incidência e tratamento de cães com reações transfusionais agudas. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano XV, n. 86, p.62-66, mai./jun., 2010.

POSNER, L.P.; WILLCOX, J.L.; SUTER, S.E. Apheresis in three dogs weighing <14 Kg. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, New Jersey, v.40, p.403-409, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vaa.12026/abstract>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

RAMOS-VARA, J.A.; AVERY, A.C.; AVERY, P.R. Técnicas avançadas de diagnóstico. In: RASKIN, R.E., MEYER, D.J. **Citologia clínica de cães e gatos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 395-437, 2011.

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

ROGERS, E.A.P. Immune-mediated hemolytic anemia. In: INTERNATIONAL VETERINARY EMERGENCY AND CRITICAL CARE SYMPOSIUM, 14., 2008, Phoenix. *Proceedings...* U.S.A., 2008.

SANTOS, F.W.R. et al. Post - transfusions red cell disorders and medical emergencies.

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 29, n. 4, p. 1-5, 2007.

Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

SETH, M.; JACKSON, K.U.; GIGER, U. Comparision of five blood typing methods for the feline AB blood group system. **Animal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 72, n. 2, p. 203-209, 2011.

SHORT, J.L. et al. Accuracy of formulas used to predict post-transfusion packed cell volume rise in anemic dogs. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 22, n. 4, p. 428-434, ago., 2012. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-4431.2012.00773.x/abstract>>.

Acesso em: 28 mar. 2014.

SIGRIST, N.E. Anemia and transfusion in critical illness. In: INTERNATIONAL VETERINARY EMERGENCY AND CRITICAL CARE SYMPOSIUM, 14, 2008, Phoenix. *Proceedings...U.S.A.*, 2008, p. 781-783.

SILVESTRINI, P. et al. Canine packed red blood cell transfusions in Spain.

Companion Clinical Pathology, v.20, p.195-199, 2011. Disponível em:

<<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00580-009-0949-x>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

TOCCI, L.J.; EWING, P.J. Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine: an overview of pre transfusion testing. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, Malden, v. 19, p. 66-73, 2009.

VALADARES, J.E. et al. Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, London, v. 141, n. 21, p. 574-575. In: VIDAL, I.F.et al. Níveis séricos da gama-glutamyltransferase em cães com e sem infecção natural por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 3, p. 749-751, 2009.

VIEIRA, J.; BOGNATO, R.K.; GONÇALVES, S. Acute transfusion reactions after the administration of Whole blood and blood components in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, n. 29, supl, 2009.

VIEIRA, J.; BOGNATO, R.K.; GONÇALVES, S. Hematocrit monitoring in blood-donor dogs. In: WORLD CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 34., 2009, São Paulo. *Proceedings...* Brazil: World Small Animal Veterinary Association, 258 p., p. 129-130, 2009.

XENOCOSTAS, A. et al. Erythropoietin is equally effective as fresh-blood transfusion at reducing infarct size in anemic rats. **Critical Care Medicine**, New Jersey, v. 38, n. 11, p. 2215-2221, 2010.

ZEUNER, A. et al. Concise Review: Stem cell-derived erythrocytes as upcoming players in blood transfusion. **Stem Cells - Translational and Clinical Research**, New Jersey, v. 29, p. 1587-1596, 2012. Disponível em: <<http://www...com-doi:10.1002/stem.1136>>. Acesso em: 28 mar. 2014.

ZIMRING, J.C. Regulation of immune responses by RBC transfusion. **International Society of Blood Transfusion**, Manchester, n. 8, p. 181-184, 2013.

ANEXO A– Certificado do CEUA



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **048/2013**, intitulado **“Pesquisa de anticorpos caninos ANTI-DEA 1.1 por citometria de fluxo em cães pós-transfundidos com sangue de doador DEA 1.1”**, sob a responsabilidade da Professora Doutora Maria de Fátima Dias Costa, lotada no Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **17 de janeiro de 2014**.

Salvador, 17 de janeiro de 2014.

Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez
Coordenadora da CEUA-ICS

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisa de anticorpos caninos anti-DEA 1.1 por citometria de fluxo em cães pós-transfundidos.

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar do trabalho científico: *Pesquisa de anticorpos caninos anti-DEA 1.1 por citometria de fluxo em cães pós-transfundidos*, realizada no Instituto de Ciências da Saúde - UFBA. O objetivo da pesquisa é identificar a produção de anticorpos anti-DEA 1.1 em pacientes que receberam transfusão de sangue de doador DEA 1.1 positivo, através da citometria de fluxo, e comparar com a intensidade da reação cruzada desses receptores e doadores. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: no dia da transfusão sanguínea do seu animal, será coletado uma amostra de 4 ml de sangue para serem realizados: exame de compatibilidade sanguínea; uma dosagem de creatinina, para avaliação renal; uma dosagem de gGT (gama glutamil transferase), para avaliação hepática, e hemograma, para avaliação de sua anemia. A cada 7 dias, repetiremos esses exames e faremos a pesquisa de anticorpos produzidos pelo mesmo contra os eritrócitos do sangue recebido. No total, serão feitas 5 avaliações hematológicas durante 4 semanas. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você recusar-se a participar ou mesmo desistir, a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Os benefícios esperados são: avaliar o aproveitamento do sangue recebido durante a transfusão, bem como o estado geral de saúde, graus de anemia e comprometimento dos rins e fígado dos receptores.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode contactar **Suzana Claudia Spínola dos Santos, à Rua dos Radialistas, 209, na Clínica Veterinária Diagnose Animal, nos telefones (71) 3351-2960 e (71) 9978-2188** ou procurar a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia, na Avenida Reitor Miguel Calmon, s/nº, no telefone (71) 3283-8958, ou ceuaics@ufba.br.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida e assinada, entregue a você.

Salvador, ____ de _____ de _____.

Suzana Claudia Spínola dos Santos

RG: 02922748-82

CRMV: BA-1544

Eu, _____ (nome por extenso), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura: _____

Data: _____

APÊNDICE B – Cálculo amostral do estudo:

$$X_{\text{máx}} = p + Z\sqrt{p(1-p)/N}, \text{ o que dá}$$

$$X_{\text{máx}} - p = Z\sqrt{p(1-p)/N}$$

$$(X_{\text{máx}} - p)^2 = Z^2 p(1-p)/N, \text{ o que resulta para N o valor:}$$

$$N = \frac{Z^2 p(1-p)}{(X_{\text{máx}} - p)^2} \text{ ou } N = \frac{Z^2 p(1-p)}{d^2}$$

Considerando-se:

p - Fração de sucesso

Z - O número de desvios-padrão

X_{máx} - O valor máximo do atributo quantificado

N - Tamanho da amostra

$$\mathbf{Z = 1,96}$$

$$\mathbf{p = 0,75}$$

$$\mathbf{d = X_{\text{máx}} - p = 0,90 - 0,75 = 0,15}$$

$\mathbf{N = 1,96^2 \cdot 0,75 (1 - 0,75)/0,15^2}$, o que corresponde a um valor aproximado de 32,0133 indivíduos.

APÊNDICE C – Banco de dados

Tabela 5- Resultado da prova de reação cruzada lenta em tubos (em cruces) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Animal	Antes	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	0	0	0	0	2
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	2
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	2
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	4
15	0	0	0	2	4
16	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	4	4
19	0	0	3	4	4
20	0	0	0	0	0
21	0	0	3	3	3
22	0	0	3	3	0
23	0	0	2	2	3
24	0	0	0	2	3
25	0	0	0	0	0
26	0	2	3	3	4
27	0	2	3	3	4
28	0	0	0	0	0
29	0	0	2	3	3
30	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0
33	0	0	0	2	2

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6-A – Contagem de hemácias (milhões/dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Valor de referência: 5,5-8,5 (JAIN, N.C.,1993)

Animal	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	5.2	5.5	5.9	5.2
2	4.7	4.9	4.7	5.6
3	3	3.3	4.1	4.5
4	5.2	4.5	4.3	5
5	2.7	4.3	1.6	1.2
6	1.7	3.4	4	4.6
7	2.9	3.1	3.7	4.2
8	3.9	4.6	4.2	4.1
9	5.7	5	5.5	5.3
10	4.9	5.9	4.6	3.1
11	4.4	2.3	1.8	2.3
12	1.6	2.5	3.1	3.8
13	2.6	3	3.3	3.7
14	2.9	3.7	4	4.4
15	4.1	3.5	3	3
16	3.6	4.2	4.3	5.2
17	1.3	1.3	1.9	2.4
18	4.8	4.7	4.6	4.9
19	4.5	4.2	5.1	5.4
20	3.6	3.7	2.5	7.2
21	3.4	3.1	2.9	2
22	3.4	3.2	2.9	2.4
23	4.1	4	4.5	5.1
24	3.6	3.7	4	4.4
25	2.7	3.6	4.2	4.2
26	4	3.2	2.4	3.8
27	3.9	4.3	4.5	4.5
28	4.2	5.3	5.3	5.3
29	4.8	4.5	4.3	4.5
30	4.5	4.4	4.2	4.5
31	1	2.1	4.4	4.5
32	4.5	4.9	4.5	5
33	2.2	2.6	2.4	2.9

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6-B – Concentração de hemoglobina (g/dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Valor de referência: 12,0-18,0 (JAIN, N.C.,1993)

Animal	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	13.2	12.4	12.6	13.7
2	12.4	12.8	11.5	13.9
3	7.9	8.2	9.8	11
4	12.1	10	9.5	11.2
5	7.4	11.1	7.3	3.9
6	4	7.5	9.7	10.3
7	8.4	8.7	9.9	10
8	10.8	11.6	10.4	10.4
9	15	14	14.2	14.2
10	10.4	13.7	10	7.6
11	12	6.8	5.8	7.1
12	3.4	5.9	7.6	8.8
13	6.7	8.3	8.6	8.4
14	8.1	10.6	11.4	11.9
15	10.9	10	8.2	6.5
16	9.6	11.7	11.2	11.1
17	3.5	3.9	5	6.1
18	11.9	10.9	11	12.1
19	12.5	10.2	12	11.5
20	12	12.5	10.9	15
21	8.1	7.7	7.1	5.1
22	7.3	6.8	7	5.3
23	10.5	11.8	13.7	14.4
24	9.6	9.9	10.8	11.4
25	7.8	9.7	11.1	10.9
26	10.7	8.7	7.1	11
27	9.3	11.4	11	10.9
28	9.4	13.3	13.1	12.1
29	12.2	11.9	11.5	11.7
30	11.7	10.9	9.8	11.2
31	2.4	5.4	11.1	11.9
32	12.1	12	10.7	12.5
33	5.5	6.1	6.7	7.3

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6-C – Proporção de volume globular (%) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Valor de referência: 37–55 (JAIN, N.C.,1993)

Animal	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	32	34	31	33
2	30	31	29	36
3	20	22	27	30
4	30	27	25	29
5	16	28	11	8
6	11	22	25	29
7	21	22	26	30
8	26	30	26	27
9	37	33	36	35
10	29	34	26	20
11	29	16	14	17
12	10	15	20	24
13	18	20	21	23
14	19	26	27	30
15	27	23	20	16
16	24	28	27	31
17	9	9	13	16
18	28	26	26	28
19	35	30	37	44
20	26	28	20	43
21	22	19	18	13
22	21	20	18	13
23	29	28	30	33
24	22	23	26	28
25	19	23	27	27
26	28	23	17	29
27	29	30	30	28
28	29	36	35	35
29	32	30	28	29
30	28	27	27	28
31	6	14	38	35
32	30	33	27	34
33	14	17	17	20

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6-D – Contagem de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Valor de referência: 6,0-17,0 (JAIN, N.C.,1993)

Animal	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	11.8	14.6	17.5	14.3
2	5.8	4.6	4.9	6.6
3	9.9	10.6	7.9	17.3
4	10.4	4.3	6	7.7
5	11.9	24.5	12.3	11.1
6	13.8	8.3	5.7	8.2
7	1.2	1.1	2.4	2.9
8	11.1	10.5	8.4	10.5
9	10.3	9.2	10.9	13.3
10	14.3	11.2	14	13.8
11	11.1	14.7	14.1	11.5
12	7.9	18.7	6.1	30.4
13	8.5	8.1	9.1	14.6
14	4	16.5	18	6.6
15	47.4	38.4	48.6	56.6
16	4.8	3.8	4	5.9
17	15.9	23.8	8.4	18.8
18	12.2	10.7	11.2	11.8
19	6.5	8.5	6.6	7
20	25.6	11.5	6.6	11.7
21	4.2	4.4	7.6	3.4
22	6.5	9.2	10.1	4
23	8.7	10.9	6.3	7.7
24	23	37.8	21	15
25	12.9	8	6	8.4
26	10.3	10.1	12.8	6.9
27	25.4	16.7	17.3	13.9
28	6.9	8.9	8.7	11
29	10.8	7.8	9.3	9.8
30	13.6	10.6	11.1	8.3
31	19.2	7.4	13.3	9.4
32	7.1	6.5	8.4	5.7
33	5.6	6.6	6.7	8.3

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6-E – Contagem de neutrófilos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Valor de Referência: 3,0-11,5 (JAIN, N.C.,1993)

Animal	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	10.62	13.14	14	12.87
2	4.93	3.95	4.06	5.61
3	7.92	8.9	6.32	16.08
4	9.36	3.44	5.04	6.46
5	8.33	20.82	10.2	7.1
6	11.04	5.81	4.56	7.38
7	0.91	0.81	2.16	2.32
8	9.43	9.24	7.3	9.45
9	9.27	8.28	9.81	11.97
10	12.87	9.52	12.04	11.59
11	9.99	13.67	12.69	10.35
12	6.87	17.39	5.24	28.27
13	6.8	6.64	7.28	10.51
14	2.96	13.86	16.2	5.28
15	40.29	34.56	41.31	48.11
16	3.5	2.85	3.36	4.66
17	13.35	21.42	7.05	17.48
18	10.85	8.23	7.84	8.26
19	5.2	6.8	4.88	4.41
20	20.48	10.35	4.95	9.36
21	2.94	2.94	6.84	2.92
22	5.98	8.37	9.09	3.6
23	6.96	9.15	5.29	6.54
24	20.7	29.1	18.9	13.5
25	11.22	6.56	5.04	7.22
26	9.27	9.39	12.16	6.55
27	18.54	14.52	16.08	12.78
28	5.38	7.65	6.96	9.24
29	9.61	6.55	8.09	8.33
30	12.64	9.32	10.1	6.8
31	11.9	6.14	8.64	7.33
32	6.39	5.78	7.14	4.73
33	5.04	5.74	6.09	7.47

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6-F – Contagem de linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Valor de Referência: 1,0-4,8 (JAIN, N.C.,1993)

Animal	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	0.7	0.73	1.75	0.71
2	0.4	0.41	0.49	0.46
3	1.08	1.06	0.94	0.69
4	0.52	0.51	0.54	0.61
5	2.61	2.2	1.59	3.66
6	1.65	1.9	0.68	0.57
7	0.18	0.16	0.14	0.29
8	0.77	0.84	0.67	0.63
9	0.3	0.46	0.43	0.39
10	0.71	0.67	0.7	1.1
11	0.66	0.44	0.56	0.46
12	0.79	0.56	0.48	0.91
13	1.02	0.81	0.91	2.77
14	0.64	1.32	0.72	0.72
15	0.94	1.15	1.45	3.39
16	0.81	0.45	0.32	0.88
17	1.59	1.19	0.75	0.37
18	0.97	1.39	1.56	2.24
19	0.65	0.68	0.85	1.89
20	3.07	0.57	1.12	1.98
21	0.67	0.92	0.45	0.37
22	0.32	0.36	0.5	0.28
23	1.3	1.09	0.56	0.69
24	0.92	0.75	0.63	0.6
25	0.9	0.88	0.54	0.67
26	0.51	0.4	0.38	0.27
27	2.79	1	0.69	0.55
28	1.17	0.89	1.04	1.1
29	0.75	0.78	0.83	1.07
30	0.54	0.63	0.77	1.16
31	4.8	0.96	3.85	1.5
32	0.42	0.52	0.84	0.68
33	0.33	0.46	0.4	0.33

Fonte: Autoria própria.

Tabela 6-G – Contagem de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Valor de Referência: 200-500 (JAIN, N.C.,1993)

Animal	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	374	529	607	374
2	154	129	168	137
3	135	218	240	250
4	281	315	278	393
5	191	411	326	481
6	303	344	470	477
7	15	35	30	12
8	320	799	676	686
9	20	138	260	257
10	401	200	166	134
11	330	610	613	626
12	192	228	374	11
13	202	166	185	296
14	793	600	600	898
15	311	212	222	228
16	88	149	138	175
17	400	604	741	467
18	317	419	314	289
19	200	222	216	234
20	411	385	283	367
21	83	104	120	101
22	387	258	399	135
23	142	48	108	69
24	478	569	551	532
25	206	300	222	231
26	318	227	334	314
27	511	465	250	238
28	714	356	342	270
29	142	159	108	132
30	274	497	370	326
31	385	76	291	316
32	171	187	100	142
33	65	20	69	65

Fonte: Autoria própria.

Tabela 7 – Dosagem de proteínas plasmáticas totais (g/dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Valor de Referência: 6,0 – 8,0 (JAIN, N.C.,1993)

Animal	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	8	8.1	8.9	8
2	11.8	10.8	10.5	10
3	8	7.9	8.1	8
4	8	7.9	7.9	8.2
5	9.7	8.8	6.3	8
6	6	7	7.1	6.8
7	9	8	8.2	9
8	9	8	8.2	9
9	8	8	7.6	8
10	7.2	8	8	7
11	8.2	8	7.8	7.8
12	6	7	7	8.2
13	7	6.1	6	6.1
14	8.2	8	8	8
15	9	9	9	9.7
16	9.2	8	10	8
17	9	9	8.8	8.1
18	9.8	8.2	8	8.8
19	7	8	8	8.8
20	8.2	7.5	8.2	8.4
21	10.1	10.2	11	10
22	11	11	11	9.7
23	8	8.8	8.3	8.4
24	9	8.2	9.9	10
25	8.8	9.1	9.1	9.1
26	8	9.2	10	9.7
27	10.2	10.2	10.2	10
28	6.2	7	7	6.8
29	10.3	10.2	10.5	10.9
30	8.6	8	7.8	8
31	8	9.1	9.2	9
32	9.4	8	8	7.6
33	8.8	8.3	10	8.2

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 – Dosagem de creatinina sérica (mg/dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Valor de Referência: 0,5–1,5 (KANEKO, J.J. et al.,1997)

Animal	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	2.5	0.5	0.6	0.6
2	0.7	0.6	0.6	0.6
3	0.8	1	0.7	0.7
4	0.8	0.8	0.6	0.6
5	0.3	0.3	0.6	0.5
6	0.4	0.7	0.6	1
7	0.6	0.6	0.4	0.7
8	0.6	0.5	0.6	0.5
9	1.1	0.8	0.6	1.8
10	0.6	0.5	0.5	0.6
11	1.5	1.4	3.8	1.4
12	0.3	0.4	1.3	0.4
13	0.4	0.9	0.3	0.7
14	1.5	0.7	1.3	0.7
15	0.9	0.3	0.5	0.4
16	2.1	0.9	1.2	1.3
17	0.9	3.6	2.9	2.1
18	0.8	1.1	1	1.1
19	0.7	1.1	1.7	0.9
20	0.6	1	0.8	0.5
21	1.4	1.6	0.9	0.8
22	0.8	0.7	0.8	1.1
23	0.7	0.5	0.4	0.5
24	0.7	0.6	0.7	0.5
25	1.1	1	1.2	1.4
26	5.7	4.6	5.9	5.2
27	0.6	0.6	0.6	1.2
28	1.1	1	0.6	0.7
29	1.3	1.1	0.6	1
30	1.6	1.4	1.3	1.1
31	2.9	0.6	0.8	0.9
32	0.4	0.4	0.4	0.4
33	0.5	0.4	0.5	0.5

Fonte: Autoria própria.

Tabela 9 – Dosagem de γ GT sérica (U.I./dL) de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Valor de Referência: 1-10 (KANEKO, J.J. et al.,1997)

Animal	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	1	4	3	3.5
2	1	1	1	2
3	1	1.1	1	1
4	8	4	1	9.5
5	6	6	2	11
6	2	1	1	1
7	2.7	1	1	1
8	3	2	3	1
9	41	17	15	6
10	1	1	1	3
11	7	4	5.6	3.4
12	2	3	2	2.2
13	4	3.7	1.8	1
14	5.4	4	3.2	2.4
15	5	4	8	9.8
16	11.6	7.1	5	2.3
17	1	17	23	22
18	3	6	4.3	1
19	1	1	2.1	8
20	22	7	9.2	1.5
21	5	5	8	1
22	1	1	1	1
23	3.6	2	1	2.7
24	6.3	3.6	3.6	1.8
25	14.3	8.5	7.5	7.5
26	1	1	1	1
27	1	1.3	1.7	1.5
28	1	1.2	1	4
29	36.3	1	2.5	1.1
30	6	3.3	4.5	3.7
31	4.1	3.3	17.7	7.6
32	1	2.6	4.5	3
33	5.3	3.2	2.4	4.5

Fonte: Autoria própria.

Tabela 10 - Resultados das avaliações da citometria de fluxo de 33 cães pós-transfundidos com sangue DEA 1.1 positivo.

Animal	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
1	5.7	8.26	7	7
2	6	5.4	5.2	54
3	5.3	8.98	26	15
4	5.23	5.68	6.52	5.32
5	5.4	5.55	7.94	5.4
6	6.75	4.73	5.56	7
7	4.4	4.86	5.75	6
8	5.65	5.78	20	4.9
9	5.98	6.4	6.8	3.9
10	4.8	5.2	5.45	4.8
11	4.6	5.3	4.8	5.9
12	5.6	9.5	13.64	12
13	5.4	4.75	4.92	7.68
14	4.9	4.8	16	115.51
15	5.13	5.7	31	30
16	4	4.25	4.28	5.45
17	6	6.03	6	14.4
18	5.51	5.44	5.07	7.2
19	9.64	67	136.7	179
20	9	12.8	11.2	10.2
21	11.7	5.3	6.8	14.5
22	12	5.08	5	6
23	6.17	21.02	29.2	30.16
24	5	24.9	38.02	56.62
25	10.42	12.87	14.6	10.54
26	6.79	8.68	26.83	538.99
27	5.36	6.96	10.09	7.05
28	5.6	4.93	8.33	5.07
29	6.07	5.03	9.2	11.5
30	9.83	8.8	8.43	8.05
31	4.78	5.7	4.9	7.8
32	12.9	6.17	9.38	10.14
33	9.95	9.38	33.91	65.6

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 - Resultado do teste ANOVA, com diferença estatisticamente significativa da citometria de fluxo, nas quatro semanas avaliadas.

Entre os grupos	F	Sig.
Hemácias (em milhões/dL)	1,387	0,250
Hemoglobina (em g/dL)	0,689	0,561
Volume globular (em%)	1,291	0,281
Leucócitos (x 10 ³ /dL)	0,127	0,944
Neutrófilos (x 10 ³ /dL)	0,121	0,948
Linfócitos (x 10 ³ /dL)	0,908	0,439
Plaquetas (x 10 ³ /dL)	0,119	0,949
PPT (em g/dL)	0,152	0,928
Creatinina sérica (em mg/dL)	0,167	0,919
γ GT (em U.I./L)	1,232	0,301
Citometria de fluxo (em intensidade de fluorescência)	*3,539	*0,017

Fonte: Autoria própria.

Tabela 12 - Resultado do teste Tukey da citometria de fluxo nas quatro semanas avaliadas.

Variável			95% Intervalo de confiança				
			Diferença média	Erro padrão	Sig.	Limite inferior	Limite superior
Citometria de fluxo (em intensidade de fluorescência)	S1	S2	-2,2745	16,3691	0,999	-44,885	40,336
		S3	-8,6748	16,3691	0,952	-51,285	33,936
		S4	-46,5773	16,3691	0,026	-89,188	-3,967
	S2	S1	2,2745	16,3691	0,999	-40,336	44,885
		S3	-6,4003	16,3691	0,980	-49,011	36,210
		S4	-44,3027	16,3691	0,038	-86,913	-1,692
	S3	S1	8,6748	16,3691	0,952	-33,936	51,285
		S2	6,4003	16,3691	0,980	-36,210	49,011
		S4	-37,9024	16,3691	0,100	-80,513	4,708
	*S4	*S1	46,5773	16,3691	0,026	3,967	89,188
		*S2	44,3027	16,3691	0,038	1,692	86,913
		S3	37,9024	16,3691	0,100	-4,708	80,513

Legenda: S1, S2, S3, S4 = Semanas 1, 2, 3, 4.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13 - Testes de Qui-quadrado das variáveis do estudo.

	Valor	Dp	Significância
Pearson	21,497 ^a	9	0,011
Likelihood Ratio	26,027	9	0,002
Associação linear	15,086	1	0,000
Número de casos válidos	132		

Legenda: a = 12 variáveis (75,0%) tinham expectativa de contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 2,00.

Fonte: Autoria própria.