

Samuel Diomário da Rosa, Maria de Lurdes Ugioni Bristot², Maria Fernanda Locks Topanotti², Cristiane Damiani Tomasi^{1,2}, Francine Felisberto², Francieli Silva Vuolo², Fabricia Petronilho², Felipe Dal Pizzol^{1,2}, Cristiane Ritter^{1,2}

Efeito da transfusão de concentrado de hemácias sobre parâmetros de inflamação e estresse oxidativo em pacientes criticamente enfermos

Effect of red blood cell transfusion on parameters of inflammation and oxidative stress in critically ill patients

1. Unidade de Tratamento Intensivo do Hospital São José – Criciúma (SC), Brasil.

2. Laboratório de Fisiopatologia Experimental e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense - Criciúma (SC), Brasil.

Trabalho realizado na Unidade de Tratamento Intensivo do Hospital São José – Criciúma (SC), Brasil.

Conflitos de interesse: Nenhum.

Submetido em 24 de Novembro de 2010

Aceito em 03 de Março de 2011

Autor correspondente:

Cristiane Ritter
Laboratório de Fisiopatologia Experimental - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde - Universidade do Extremo Sul Catarinense
Av. Universitária, 1105
CEP: 88806-000 – Criciúma (SC), Brasil.
E-mail: crr@unesc.net

RESUMO

Introdução: Transfusão de concentrado de hemácias é freqüentemente prescrita nas unidades de terapia intensiva. Durante muito tempo a transfusão de hemácias era vista como tendo benefícios clínicos óbvios. Entretanto nos últimos anos a prática de transfusão sanguínea tem sido examinada de uma forma mais cautelosa, levando a investigações a respeito dos benefícios transfusionais, incluindo aqui o fato de os efeitos imunomoduladores relacionados à transfusão podem aumentar o risco de morbimortalidade dos pacientes.

Objetivos: Avaliar o efeito da transfusão de concentrado de hemácias e sua relação com a produção de citocinas inflamatórias e dano oxidativo em pacientes criticamente enfermos admitidos em uma unidade de terapia intensiva.

Métodos: Foram analisados durante 6 meses, no ano de 2008, pacientes internados na unidade de terapia intensiva que realizaram transfusão de concentrado

de hemácias. Foram analisados os níveis séricos pré e pós transfusionais de interleucina-6 (IL-6), proteínas carboniladas e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Resultados: Houve diminuição dos níveis séricos de IL-6 pós-transfusionais e um aumento significativo tanto para TBARS quanto para proteínas carboniladas. No entanto não houve significância estatística entre os níveis séricos de IL-6, TBARS antes e após transfusão de concentrado de hemácias e a taxa de mortalidade. Contudo ocorreu significância da relação dos níveis pós transfusionais de proteínas carboniladas e mortalidade.

Conclusão: Transfusão de concentrado de hemácias é associada a aumento dos marcadores de dano oxidativo e diminuição de IL-6 em pacientes criticamente enfermos.

Descritores: Eritrócitos; Transfusão de eritrócitos; Estresse oxidativo; Interleucina-6; Unidades de terapia intensiva

INTRODUÇÃO

A anemia é um problema comum em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI). Até o terceiro dia da admissão, aproximadamente 95% dos pacientes apresentam anemia.⁽¹⁾ Por tal motivo, transfusões de concentrado de hemácias (CH) são freqüentemente prescritas nas UTIs.⁽²⁾

Diversos estudos têm avaliado a epidemiologia da transfusão sanguínea em UTIs na última década.⁽³⁾ O estudo europeu “ABC trial” demonstra que 37% dos pacientes foram transfundidos (4,8 ± 5,2 Unidades (U) de sangue em média) durante sua internação na UTI. Além disto, em pacientes com mais de uma semana de internação este número aumenta para 73%.⁽⁴⁾ Confirmando-se estas percentagens pode-se também citar outro estudo “CRIT study” onde foi constatado que 44% dos pacientes americanos receberam concentrado de hemácias (4.6 ± 4.9 U em

média) durante sua internação em UTI.⁽¹⁾

Durante grande parte do século passado a transfusão de hemácias era vista como tendo benefícios clínicos óbvios. Entretanto nos últimos 20 anos a prática de transfusão sanguínea tem sido examinada de uma forma mais cautelosa, impulsionada num primeiro momento por preocupações relacionadas a infecções transmitidas por transfusões, em particular o vírus da imunodeficiência adquirida.⁽⁵⁾ Nesse sentido vem se notando uma dramática e progressiva redução deste tipo de complicação. Isto se deve ao resultado de extensa pesquisa para caracterizar patógenos transmitidos por transfusões, desenvolvimento de estratégias para mensurar as taxas de infecções em doadores e receptores de sangue, caracterização da dinâmica da viremia inicial, e implementação de critérios mais restritivos de elegibilidade para doação e aumento da sensibilidade de métodos laboratoriais de *screening*.⁽⁶⁾

Embora as infecções relacionadas à transfusão (IRT) tenham sido inicialmente o foco das práticas transfusionais, outros fatores como a imunomodulação e a idade do sangue têm se tornado mais importantes. A avaliação dos riscos da transfusão, por sua vez, levou a investigações a respeito dos benefícios desta terapia.⁽⁷⁾ Tem se tornado evidente que os efeitos imunomoduladores relacionados à transfusão podem aumentar os riscos de doenças, como infecções nosocomiais, recorrência de neoplasias e o possível desenvolvimento de doenças auto-imunes.⁽⁸⁾

Apesar de os mecanismos da imunomodulação relacionada à transfusão (IMRT) terem sido bastante debatidos, a compreensão deste fenômeno ainda não está completa. Dentre os diversos mecanismos postulados, três são responsáveis por grande parte dos estudos: deleção clonal, indução de anergia, e imunossupressão. A supressão clonal corresponde à inativação e remoção de linfócito alorreativos que, por exemplo, causam rejeição de aloenxertos; anergia implica na não responsividade imune e a supressão imunológica refere-se à resposta celular inibida por um mecanismo celular ou por citocinas.⁽⁹⁾ Além dos mecanismos supracitados, o armazenamento sanguíneo poderia levar a alterações físico-químicas das hemácias como perdas de fosfatos orgânicos, alteração de membranas e produção e liberação de citocinas inflamatórias.⁽¹⁰⁾

A interleucina-6 (IL-6) é produzida por muitos tipos de células, incluindo os linfócitos B e T, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, neurônios e células gliais. Ela possui funções dentre as quais a indução da febre, promoção da maturação e diferenciação dos linfócitos B, estimulação da proliferação e diferenciação dos linfócitos T, indução da produção de proteínas de fase aguda (ex. proteína C reativa) pelos hepatócitos, e estímulo do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.⁽¹¹⁾ Estresse oxidativo é um elemento importante em diversos fenômenos fisiológicos e patológicos. Embora os

eritrócitos contenham um extenso sistema de defesa antioxidante, o dano oxidativo das proteínas e lipídios de membrana contribui para a senescência das células normais resultando em uma vida mais curta pela lesão celular.^(12,13) Desde que foi demonstrado que o dano oxidativo em pacientes críticos está relacionado com pior prognóstico, a medida do estresse oxidativo obteve relevância clínica importante.^(14,15)

Neste sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da transfusão de concentrado de hemácias e sua relação com a produção de citocinas inflamatórias e dano oxidativo em pacientes criticamente enfermos admitidos em uma UTI.

MÉTODOS

O estudo de coorte foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São José de Criciúma (número CAAE - 0004.0.379.139-08), Santa Catarina. Foram avaliados todos os pacientes de idade superior a 18 anos admitidos nos 20 leitos da UTI Geral, durante 6 meses, no ano de 2008, sendo incluídos no estudo os pacientes que receberam transfusão de CH e aceitaram participar do estudo. Considerou-se no presente estudo bolsas de concentrado de hemácias não irradiadas e não leucodepletadas, sendo que os pesquisadores não influenciaram o médico assistente na indicação da transfusão. Os pacientes foram seguidos até o óbito ou por 28 dias para determinação da mortalidade. Neste período foram coletadas informações clínicas relevantes para posterior análise.

Antes da transfusão e 12 horas após, uma amostra de sangue foi coletada para determinação dos níveis séricos de interleucina (IL)-6 e do estresse oxidativo. A medida dos níveis de IL-6 foi realizada através de kits de ELISA segundo recomendação do fabricante (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), como um marcador geral da resposta pró-inflamatória.

A medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinada como um indicador de estresse oxidativo. Resumidamente, as amostras foram misturadas com 1ml de ácido tricloroacético a 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico 0,67% e então aquecidas em um banho de água fervendo por 15 minutos. TBARS foi determinada pela absorção que 535 nm usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído por miligrama de proteína.⁽¹⁶⁾

O dano oxidativo à proteínas foi avaliado pela determinação de grupos carbonil baseado na reação com dinitrofenilhidrazina. As proteínas foram precipitadas pela adição ácido tricloroacético a 20% e então dissolvido em dinitrofenilhidrazina e a absorbância foi lida em 370 nm.⁽¹⁷⁾

Os dados foram incluídos para análise estatística no *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Comparação entre

variáveis categóricas foi realizada pelo teste de qui-quadrado. As variáveis contínuas foram comparadas com o teste t ou com Mann-Whitney U conforme distribuição das variáveis. Comparação dos níveis de IL-6 e marcadores de estresse oxidativo pré e pós-transfusão foram comparados com teste t para variáveis dependentes. Valores são expressos como frequência (%), média + desvio padrão ou mediana intervalo interquartis. Em todas as análises foi adotado como nível para significância estatística um p-valor < 0,05.

RESULTADOS

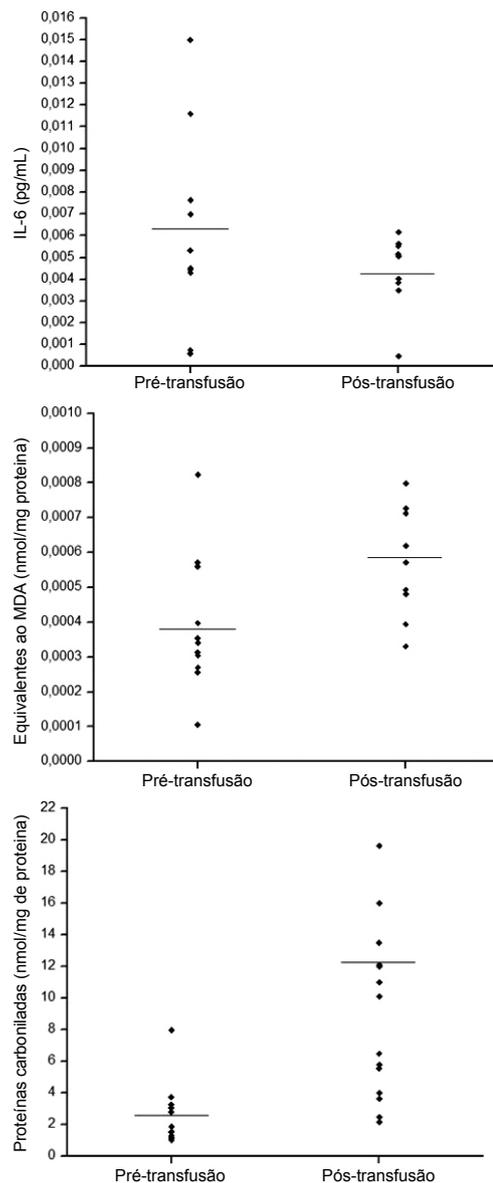
Durante o período de estudo, foram analisados 322 pacientes da UTI geral do Hospital São José, dentre os quais 40 pacientes que receberam concentrado de hemácias foram avaliados. A tabela 1 demonstra características clínicas e demográficas quando comparados os grupos que receberam e não receberam transfusão sanguínea. Os grupos não apresentam diferenças significativas nas variáveis demográficas, no escore *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II* (APACHE II) e no *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) do primeiro dia de internação. A média de hemoglobina pré-transfusional foi de 6.8 ± 3.2 g/dl com um hematócrito de $20.8 \pm 9.9\%$ caracterizando uma transfusão restritiva.⁽¹⁸⁾ De acordo com a tabela 1, dos 40 pacientes estudados 14 pacientes foram a óbito (35%), e 26 receberam alta hospitalar (65%). Quando comparados aos pacientes que não receberam transfusão percebe-se aumento significativo da mortalidade no grupo transfundido ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Características clínico-demográficas dos pacientes incluídos no estudo

| | Transfusão | | Valor de p |
|------------------------------|---------------|---------------|------------|
| | Sim (N=40) | Não (N=292) | |
| Idade | 51 ± 17 | 57 ± 16 | 0,1 |
| Sexo masculino | 25 | 220 | 0,6 |
| APACHE II | 11 (5 – 20) | 10 (5 – 18,5) | 0,8 |
| SOFA | $6,3 \pm 4,4$ | $4,2 \pm 3,8$ | 0,2 |
| Motivo da internação | | | |
| Monitorização pós-operatório | 13 | 100 | 0,4 |
| Sepses | 5 | 25 | |
| Cardiovascular | 10 | 80 | |
| Neurológico | 4 | 40 | |
| Respiratório | 5 | 50 | |
| Outros | 3 | 57 | |
| Óbitos (%) | 14 (35) | 75 (25) | <0,05 |

APACHE - *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*; SOFA - *Sequential Organ Failure Assessment*. Dados apresentados como média + DP ou mediana (25-75).

Quando comparado os níveis séricos de IL-6 pré e pós-transfusionais observa-se uma diminuição significativa deste parâmetro inflamatório ($p=0,002$). Por outro lado quando se analisa os parâmetros oxidativos observamos um aumento significativo tanto para TBARS quanto para proteínas carboniladas. ($p < 0,001$ para ambos) (Figura 1).



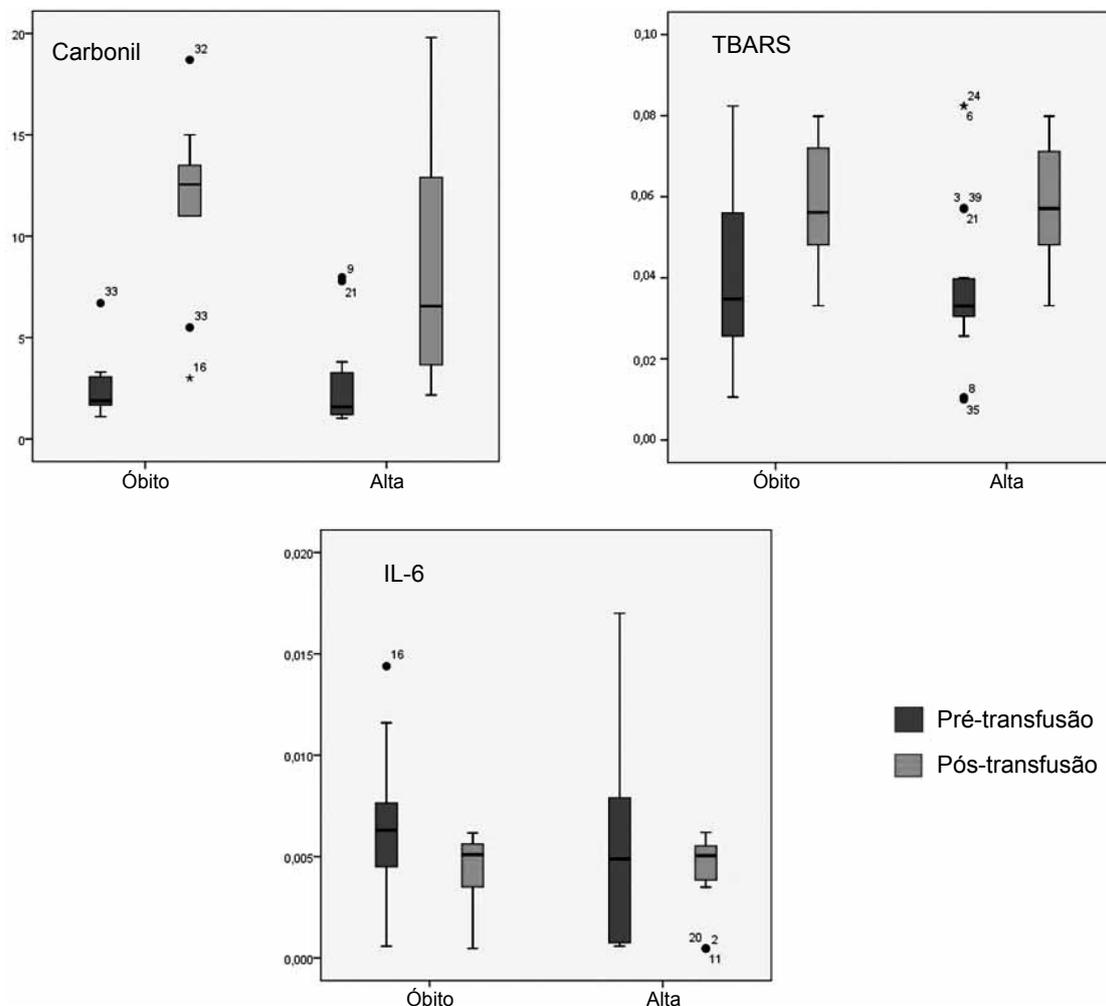
Total de 322 pacientes admitidos em uma UTI geral, dentre os quais 40 pacientes que receberam concentrado de hemácias foram avaliados. Antes da transfusão e 12 horas após, uma amostra de sangue foi coletada para determinação dos níveis séricos de interleucina (IL)-6 e do estresse oxidativo, e comparou-se os níveis pré e pós-transfusional através de teste t. Observa-se uma diminuição da IL-6 ($p=0,002$) e um aumento significativo tanto para TBARS quanto para proteínas carboniladas ($p < 0,001$ para ambos). IL-6 – interleucina-6; MDA – Malondialdeído; TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Figura 1 - Comparação dos marcadores oxidativos e inflamatórios pré e pós transfusionais em pacientes criticamente enfermos.

Porém, não houve significância estatística ao analisarmos a relação entre os níveis séricos de IL-6 antes ($p=0,783$) e após ($p=0,970$) transfusão de CH e a taxa de mortalidade. Igualmente, a relação entre TBARS pré ($p=0,663$) e pós ($p=0,887$) transfusional e a mortalidade também não foi significativa. Do mesmo modo, não houve significância dos índices de carbonil antes ($p=0,808$) da transfusão de CH e mortalidade. Porém, ocorreu relação significativa entre os níveis de proteínas carboniladas após a transfusão ($p=0,047$) e a mortalidade (Figura 2). O delta de variação pós-pré transfusional não apresentou relação significativa com mortalidade para IL-6 ($p=0,725$) e TBARS ($p=0,633$), mas apresentou para proteína carbonilada ($p=0,04$).

DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos a influência da transfusão de CH em pacientes internados em uma UTI geral, e a produção da IL-6, uma citocina que está intimamente associada com a resposta inflamatória e a qual é produzida por células imunes e outros tipos de células como células endoteliais, queratinócito e do epitélio intestinal.⁽¹¹⁾ Encontramos uma redução significativa nos níveis séricos de IL-6 após a transfusão de CH, conotando um efeito imunossupressor deste tipo de transfusão. Por outro lado não foi encontrada uma relação entre os níveis séricos de IL-6 e a taxa de mortalidade. Avaliamos ainda os níveis dos marcadores de dano oxidativo, TBARS e carbonil pré e pós transfusionais, demonstrando um aumento nos níveis de TBARS e carbonil após trans-



Total de 322 pacientes admitidos em uma UTI geral, dentre os quais 40 pacientes que receberam concentrado de hemácias foram avaliados. Antes da transfusão e 12 horas após, uma amostra de sangue foi coletada para determinação dos níveis séricos de interleucina (IL)-6 e do estresse oxidativo, conforme detalhado em Materiais e Métodos. Comparou-se as diferenças dos níveis dos marcadores pré e pós-transfusão com desfecho dos pacientes com uso de teste-t separadamente conforme o desfecho. Apenas observou-se relação significativa entre os níveis de proteínas carboniladas após a transfusão ($p=0,047$) e a mortalidade. TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; IL-6 – interleucina-6.

Figura 2 - Relação marcadores oxidativos e inflamatórios com mortalidade em pacientes criticamente enfermos submetidos a transfusão sanguínea.

fusão de hemácias e uma relação positiva entre aumento nos níveis de carbonil e mortalidade nesta população. Estes resultados sugerem que a transfusão sanguínea em pacientes criticamente enfermos pode apresentar efeitos agudos deletérios e estes efeitos podem ter relação com desfecho dos pacientes, auxiliando no entendimento da relação de hemotransfusão com mortalidade encontrado em revisões sistemáticas da literatura.⁽⁵⁾

A transfusão de sangue alogênico resulta na infusão de grandes quantidades de antígenos estranhos em formas solúveis e associados a células. A persistência destes antígenos na circulação do receptor pode criar condições que permitam o desenvolvimento de supressão imune.⁽¹⁹⁾ Diversos estudos têm sugerido que os possíveis agentes causais seriam formados pela série branca sanguínea, mas os componentes sanguíneos que mediarão este efeito não estão bem definidos.⁽²⁰⁾ A imunomodulação relacionada às transfusões tem mostrados certos benefícios, incluindo aumento da sobrevida do transplante renal, redução do risco de aborto espontâneo recorrente, e diminuição da gravidade de doenças autoimunes, como a artrite reumatóide⁽²¹⁾ ou recorrência da doença de Crohn.⁽²²⁾ Por outro lado, têm-se encontrado possíveis efeitos prejudiciais IMRT, causando aumento da recorrência do câncer, infecções cirúrgicas, falência de múltiplos órgãos e mortalidade geral.⁽²¹⁾ A redução nos níveis de IL-6 demonstrada pode refletir imunossupressão, somando-se como uma nova evidência na literatura dos efeitos imunomoduladores da transfusão de hemocomponentes. Ao contrário de nossos achados, Avall et al. encontraram um aumento significativo desta citocina ao analisar pacientes cirúrgicos que receberam transfusão de sangue total autólogo quanto os que receberam unidades de sangue alogênicas,⁽²³⁾ entretanto estes autores não compararam estes grupos contra pacientes que não receberam transfusão sanguínea.

Mesmo as hemácias tendo alta capacidade antioxidante, pode-se observar que as mesmas possuem uma demanda de antioxidantes aumentada quando armazenadas, devido a exposição a diversos fatores, como exposição a luz e agitação, altas concentrações de glicose, liberação de radicais livres pelos leucócitos, entre outros.⁽²⁴⁾ Durante o armazenamento as hemácias sofrem uma mudança químico-estrutural que pode afetar seu desempenho pós-transfusional.⁽²⁵⁾ Essas mudanças estão associadas a uma série de alterações, incluindo uma depleção de adenosina trifosfato e 2,3-difosfoglicerato (DPG), perda da maleabilidade, vesiculação, perda fosfolipídica, oxidação protéica e peroxidação lipídica da membrana das hemácias, podendo contribuir para conseqüências clínicas adversas, como diminuição de transporte de oxigênio.^(26,27) Wardle et al., demonstraram um aumento nos níveis urinário pós-transfusionais em neonatos pré-termos de malondialdeído, evidenciando uma relação de transfusão com peroxidação lipídica.⁽²⁸⁾

Algumas importantes limitações devem ser pontuadas. Apesar de apresentar número suficiente de pacientes para realizar as

comparações entre biomarcadores pré e pós-transfusionais é notado que o tamanho de nossa amostra não permite uma análise definitiva entre a variação destes marcadores e mortalidade em pacientes criticamente enfermos. Neste sentido estudos de maior porte são necessários para esclarecer de maneira definitiva este tipo de relação. Além disto, realizamos estudo de apenas um centro que adota estratégia restritiva para realizar a transfusão, neste sentido os resultados apresentados podem não ser representativos da média das UTIs. Além disto, coletamos apenas uma amostra sanguínea, sem realizar estudo cinético dos marcadores avaliados o que poderia influenciar os resultados tendo em vista que existe variação tempo-dependente dos níveis de IL-6 após o estímulo inflamatório inicial conforme já demonstrado na literatura.^(27,29)

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que ocorreu um aumento dos marcadores de dano oxidativo e diminuição de IL-6 após a transfusão de CH, porém houve significância apenas com os níveis séricos pós-transfusionais de proteínas carboniladas ao analisarmos a relação destes parâmetros com a taxa de mortalidade.

ABSTRACT

Introduction: Red blood cell transfusions are common in intensive care units. For many years, transfusions of red blood were thought to have obvious clinical benefits. However, in recent years, the risks and benefits of blood transfusions have been examined more carefully, including the risk of increased morbidity and mortality due to transfusion-related immunomodulation effects.

Objectives: To evaluate red blood cell transfusion effects and the relationship of this procedure to the production of inflammatory cytokines and oxidative damage in critically ill patients admitted to an intensive care unit.

Methods: For 6 months in 2008, we evaluated patients admitted to an intensive care unit who underwent packed red blood cell transfusions. Pre- and post-transfusion levels of interleukin-6, carbonylated proteins and thiobarbituric acid reactive substances were assessed.

Results: Serum post-transfusion interleukin-6 levels were reduced, and thiobarbituric acid reactive substances and carbonylated proteins were significantly increased. No statistically significant relationship was found between the levels of pre- and post-transfusion interleukin-6 and thiobarbituric acid reactive substances and the mortality rate. However, there was a significant relationship between levels of post-transfusion carbonylated proteins and mortality.

Conclusion: Red blood cell transfusion is associated with increased oxidative damage markers and reduced interleukin-6 levels in critically ill patients.

Keywords: Erythrocytes; Erythrocyte transfusion; Oxidative stress; Interleukin-6; Intensive care units

REFERÊNCIAS

1. Corwin HL, Gettinger A, Pearl RG, Fink MP, Levy MM, Abraham E, et al. The CRIT Study: Anemia and blood transfusion in the critically ill—current clinical practice in the United States. *Crit Care Med.* 2004;32(1):39-52.
2. Vlaar AP, In der Maur AL, Binnekade JM, Schultz MJ, Juffermans NP. Determinants of transfusion decisions in a mixed medical-surgical intensive care unit: a prospective cohort study. *Blood Transfus.* 2009;7(2):106-10.
3. Vincent JL, Piagnerelli M. Transfusion in the intensive care unit. *Crit Care Med.* 2006;34(5 Suppl):S96-101. Review.
4. Vincent JL, Baron JF, Reinhart K, Gattinoni L, Thijs L, Webb A, Meier-Hellmann A, Nolle G, Peres-Bota D; ABC (Anemia and Blood Transfusion in Critical Care) Investigators. Anemia and blood transfusion in critically ill patients. *JAMA.* 2002;288(12):1499-507.
5. Marik PE, Corwin HL. Efficacy of red blood cell transfusion in the critically ill: a systematic review of the literature. *Crit Care Med.* 2008;36(9):2667-74. Review. Erratum in: *Crit Care Med.* 2008;36(11):3134
6. Busch MP, Kleinman SH, Nemo GJ. Current and emerging infectious risks of blood transfusions. *JAMA.* 2003;289(6):959-62.
7. Shorr AF, Corwin HL. Transfusion in critical care: where do we go from here? *Chest.* 2007;132(4):1105-6.
8. Raghavan M, Marik PE. Anemia, allogenic blood transfusion, and immunomodulation in the critically ill. *Chest.* 2005;127(1):295-307.
9. Vamvakas EC, Blajchman MA. Transfusion-related immunomodulation (TRIM): an update. *Blood Rev.* 2007;21(6):327-48.
10. Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, Telen MJ, Ortel TL, Reid TS, et al. Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(43):17063-8.
11. Alarcon LH, Fink MP. Mediators of the inflammatory response. In: Townsend CM Jr, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. *Sabiston textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice.* 18th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. p. 42.
12. Nagababu E, Rifkind JM. Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry.* 2000;39(4):12503-11.
13. Shiva Shankar Reddy CS, Subramanyam MV, Vani R, Asha Devi S. In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. *Toxicol in Vitro.* 2007;21(8):1355-64. Review.
14. Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004;7(2):161-8.
15. Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Kinoshita Y, Ogawa H.
3. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1048-52.
16. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
17. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464-78.
18. McIntyre L, Hebert PC, Wells G, Fergusson D, Marshall J, Yetisir E, Blajchman MJ; Canadian Critical Care Trials Group. Is a restrictive transfusion strategy safe for resuscitated and critically ill trauma patients? *J Trauma.* 2004;57(3):563-8; discussion 568.
19. Vamvakas EC, Blajchman MA. Transfusion-related mortality: the ongoing risks of allogeneic blood transfusion and the available strategies for their prevention. *Blood.* 2009;113(15):3406-17.
20. Madjdpour C, Spahn DR. Allogeneic red blood cell transfusions: efficacy, risks, alternatives and indications. *Br J Anaesth.* 2005;95(1):33-42. Review.
21. Despotis GJ, Zhang L, Lublin DM. Transfusion risks and transfusion-related pro-inflammatory responses. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2007;21(1):147-61.
22. Peters WR, Fry RD, Fleshman JW, Kodner IJ. Multiple blood transfusions reduce the recurrence rate of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum.* 1989;32(9):749-53.
23. Avall A, Hyllner M, Bengtson JP, Carlsson L, Bengtsson A. Postoperative inflammatory response after autologous and allogeneic blood transfusion. *Anesthesiology.* 1997;87(3):511-6.
24. Racek J, Herynková R, Holecek V, Faltyšová J, Krejčová I. What is the source of free radicals causing hemolysis in stored blood? *Physiol Res.* 2001;50(4):383-8.
25. Ho J, Sibbald WJ, Chin-Yee IH. Effects of storage on efficacy of red cell transfusion: when is it not safe? *Crit Care Med.* 2003;31(12 Suppl):S687-97.
26. Hébert PC, Tinmouth A, Corwin HL. Controversies in RBC transfusion in the critically ill. *Chest.* 2007;131(5):1583-90.
27. Kümpers P, van Meurs M, David S, Molema G, Bijzet J, Lukasz A, et al. Time course of angiotensin-2 release during experimental human endotoxemia and sepsis. *Crit Care.* 2009;13(3):R64.28.
28. Wardle SP, Drury J, Garr R, Weindling AM. Effect of blood transfusion on lipid peroxidation in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2002;86(1):F46-8.
29. van den Boogaard M, Ramakers BP, van Alfen N, van der Werf SP, Fick WF, Hoedemaekers CW, et al. Endotoxemia-induced inflammation and the effect on the human brain. *Crit Care.* 2010;14(3):R81.