

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE HEMÓLISE UTILIZANDO DIFERENTES
MÉTODOS DE COLHEITA DE SANGUE VENOSO EM EQUINOS**

***COMPARATIVE EVALUATION OF HEMOLYSIS USING DIFFERENT VENOUS
BLOOD DRAWING METHODS IN EQUINES***

RESUMO

Diversos fatores podem promover a lise eritrocitária em uma amostra de sangue, sejam estes relacionados a técnica de obtenção, manuseio e acondicionamento ou a afecções que acometem o paciente. O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência de hemólise em diferentes métodos de colheita de sangue venoso. A metodologia aplicada envolveu a avaliação de amostras, obtidas de 14 equinos saudáveis, machos, sem raça definida, com idades entre 4 e 15 anos. Cada animal foi submetido a punção nas veias jugulares direita e esquerda com o uso de agulha e seringa e pelo sistema de tubo à vácuo. As amostras foram submetidas a dosagens de hemoglobina livre, aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), potássio, glicose, hematócrito, proteína plasmática total (PPT), proteína total sérica (Ptn total sérica) e fibrinogênio. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre os padrões de hemólise nos diferentes grupos, vez que foram respeitados todos os princípios de uma colheita de sangue ideal. Conclui-se que nenhuma técnica foi mais eficaz para impedir a ruptura celular.

Palavras-chave: Cavalos. Diagnóstico laboratorial. Hemólise. Tubo à vácuo.

ABSTRACT

The method of collection of biological materials is of great relevance because it may interfere directly in samples' degree of haemolysis, therefore leading to alterations in the results of several parameters. The aim of this study was to evaluate the incidence of haemolysis related to diverse venous blood collection methods. Methodology included the evaluation of samples obtained from 14 healthy equines, grade males, between 4 and 15 years of age. Each animal was submitted to venous puncture in left and right jugular veins, with both syringe and needle and vacuum tube system. Samples were submitted to dosages of free haemoglobin, AST (aminotransferase aspartate), LDH (lactate dehydrogenase), potassium, glycosis, haematocrit, TSP (total serum protein), TPP (total plasmatic protein), and fibrinogen. Results showed that there was no statistic difference among haemolysis patterns in the different groups, in all ideal blood drawing principles being maintained. It was concluded that none of the techniques was more efficient in the avoidance of cellular rupture.

Keywords: Equine. Laboratorial diagnosis. Haemolysis. Vacuum tube.

INTRODUÇÃO

A hemólise pode ser definida como a liberação de hemoglobina e demais componentes de dentro das hemácias, indicando assim danos às membranas celulares (BUSH, 2004). No processo de lise eritrocitária ocorre a liberação do pigmento vermelho da hemoglobina, proteínas estruturais, enzimas, lipídios e carboidratos no soro ou plasma (TELEN; KAUFMAN, 2004). Tal alteração pode ocorrer de forma patológica ou ainda durante ou após o procedimento de coleta (BUSH, 2004).

Podem ser apontadas como causas de hemólise durante e após a colheita de sangue: trauma direto, como sucção excessiva durante a aspiração da amostra; força excessiva para expelir o sangue da seringa; colheita de sangue em tubo a vácuo para grandes volumes; estase sanguínea excessiva durante o garrote; agitação excessiva do tubo durante a homogeneização; congelamento da amostra; centrifugação do sangue em velocidade inadequada ou por longo período; lipemia, que promove a fragilidade mecânica das hemácias pela alteração lipídica da membrana; contato com solução hipotônica, levando a ruptura do eritrócito pelo efeito osmótico; contato com substâncias químicas, como álcool, éter, ácidos, entre outros; além disso, calor excessivo durante o armazenamento e longos atrasos no processamento (BUSH, 2004).

A lise das hemácias pode afetar os testes laboratoriais por meio de cinco mecanismos distintos: extravasamento do conteúdo eritrocitário, efeito diluidor dos constituintes séricos, interferência na coloração da reação pela hemoglobina, aumento da turbidez e interação química com os reagentes nas análises (ALLEMAN, 1990).

Pode-se ainda destacar que de modo direto, a coloração e a turbidez decorrentes da hemólise interferem sobre a dosagem bioquímica sérica obtida por espectrofotometria (FRANK et al., 1975; YÜCEL; DALVA, 1992; MERWE; REYERS, 2007; LASSEN;

WEISER, 2007), sendo que tal interferência é maior quando a leitura é feita na faixa de luz entre 540-590 nm, espectro no qual a absorção de luz da hemoglobina é maior (O'NEILL; FELDMAN, 1989).

O estudo teve por objetivo comparar e avaliar a ocorrência de hemólise a partir de diferentes métodos de colheita de sangue venoso de equinos hípidos, comprovada por testes laboratoriais de rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Sorocaba (UNISO) sob o protocolo nº 111/2017.

Para realização desse estudo foram utilizados 14 equinos, clinicamente saudáveis, machos, sem raça definida, com idades entre 4 e 15 anos, provenientes de propriedade localizada na cidade de Sorocaba/SP. Os animais foram mantidos em piquetes, receberam diariamente 1 kg de concentrado duas vezes ao dia, sal mineral uma vez ao dia, volumoso do tipo gramínea batatais à vontade, bem como água fresca e limpa *ad libitum*.

Para as colheitas de sangue, os equinos foram individualmente contidos com cabresto. Foi procedida a antissepsia da pele e pelo com algodão e álcool 70° INPM, seguindo-se a venóclise das veias jugulares direita e esquerda com o uso de agulhas 25 x 0,8 mm, próprias para seringas estéreis, com bico *luer lock*, de 60 mL ou tubos a vácuo. Do lado direito punccionou-se pelo método a vácuo e foram colhidas cinco amostras de sangue venoso em volume suficiente para o preenchimento de 2 tubos com anticoagulante (EDTA), 2 tubos secos e 1 em tubo com fluoreto de sódio. Do lado esquerdo punccionou-se pelo método tradicional, com uso de agulha e seringa, obtendo-se 40 mL de sangue venoso, que foi fracionado em 10 partes e transferido em volume adequado para 4 tubos com anticoagulante

(EDTA), 4 tubos secos e 2 tubos com fluoreto de sódio, com e sem a introdução da agulha na tampa do tubos, respeitando-se em ambos os casos o tempo de vinte segundos e uma inclinação da seringa de 45°. Todas as amostras foram colhidas no mesmo momento, pela mesma pessoa (Figura 1).

Durante a colheita, as amostras foram aleatoriamente identificadas por meio de números (1 a 14) e de letras (A a O) e anotadas em planilha própria para a descaracterização das mesmas durante o seu processamento, acondicionadas em isopor com gelo e enviadas para laboratório particular para as dosagens séricas e plasmáticas, em tempo adequado.

Para as análises de AST, LDH, potássio e proteína total sérica, preservou-se as amostras refrigeradas em tubo à vácuo sem anticoagulante. As amostras destinadas para a dosagem de hemoglobina livre, hematócrito, proteína plasmática total e fibrinogênio foram preservadas refrigeradas em tubos com anticoagulante (EDTA) e as utilizadas para a mensuração de glicose, refrigeradas em tubos com fluoreto de sódio (como inibidor glicolítico). As amostras destinadas à dosagem de hemoglobina livre foram envolvidas em papel alumínio para evitar possíveis alterações degenerativas e igualmente refrigeradas. Para as mensurações de AST, LDH, potássio, proteína total sérica e glicose, utilizou-se espectrofotômetro semi-automatizado da marca Brasmed modelo Biovet Smart® e respectivos “kits” comerciais da marca Bioclin®. A determinação do hematócrito foi obtida utilizando-se capilares e microcentrífuga da marca Fanem modelo 210 IEC® e a leitura feita em cartão apropriado do mesmo fabricante. O fibrinogênio plasmático foi obtido através da técnica de precipitação pelo calor, descrita por SCHALM et al. (1975), com utilização de capilares e microcentrífuga descrita. A hemoglobina livre foi calculada pelo método de Drabkin & Austin (1932), com o auxílio de “kit” comercial em espectrofotômetro Bioplus modelo 200F®.

Os dados foram armazenados no Excel for Windows Explorer® e feita Análise de Variância (ANOVA) de uma via, com posterior comparação de médias pelo teste de Tukey

no Software PAST® (Paleontological Statistics – 3.24). Para descrição dos resultados, as premissas de normalidade e homocedasticidade foram adequadamente atendidas e o nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos realizados na medicina já avaliaram a interferência do uso de diferentes métodos de colheita de sangue venoso nos padrões de hemólise, ora realizado pelo sistema a vácuo ora pelo método tradicional da seringa e agulha (GRANT, 2003; BASTOS et al., 2010).

Na rotina da clínica de equinos também é possível observar variações no procedimento de venoclise entre diferentes profissionais, todavia, não foram encontradas pesquisas que avaliem a relação entre os métodos de colheita e a lise eritrocitária nas amostras obtidas de equinos, bem como a sua interferência no resultado de exames laboratoriais, razão pela qual executou-se o presente estudo.

No presente estudo não foi detectada diferença entre os grupos ropostos ($p>0,05$) para os valores médios de Ht (Figura 2a) e Hb livre (Figura 2b). As médias encontradas para os valores de hematócrito e hemoglobina livre encontram-se descritos na tabela 1.

Verificou-se que, embora exista uma pequena diferença numérica entre os parâmetros selecionados para mensurar a hemólise nas amostras de sangue, os três métodos de colheita empregados não promoveram diferenças no presente estudo, divergindo dos dados apresentados por Bastos et al. (2010) e por Grant (2003), que utilizaram amostras de sangue humano e revelaram disparidade significativa no nível de hemólise entre os diferentes métodos de colheita.

Grant (2003) sugere que o aumento dos níveis de hemólise nas amostras está

relacionado com as características técnicas do flebotomista, assertiva com a qual Bastos et al. (2010) anui, vez que o uso da seringa permite o controle e ajuste da pressão exercida para a sucção da amostra, minimizando danos celulares, enquanto o sistema a vácuo não permite tal ajuste. Os resultados obtidos na presente pesquisa corroboram as conclusões citadas, vez que, todas as amostras foram coletadas por um único e experiente médico veterinário, respeitando-se ao máximo todas as premissas de uma colheita ideal de sangue venoso, o rápido acondicionamento e processamento das amostras, para minimizar ao máximo eventuais alterações degenerativas nas amostras, circunstâncias que se não forem devidamente respeitadas podem levar à discrepâncias nos resultados entre os métodos.

Não foi detectada diferença entre os grupos propostos para os valores médios de AST (Figura 3a), LDH (Figura 3b), glicose (Figura 3c) e potássio (Figura 3d). As médias encontradas para os valores de AST, LDH, glicose e potássio encontram-se descritos na tabela 2.

Segundo BUSH (2004), os resultados que apontam o aumento significativo dos níveis de aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase, bem como pequenos aumentos de glicose e potássio são parâmetros indicativos de eritrólise.

As enzimas AST e LDH, bem como o potássio estão presentes em dosagens elevadas no interior das hemácias e, portanto, estão correlacionados a ocorrência de ruptura celular. Por outro lado, a coloração avermelhada das amostras hemolisadas também pode interferir na absorbância colorimétrica por espectrofotometria dos exames bioquímicos séricos para dosagem de glicose, de modo que a elevação desse parâmetro também pode refletir a lise de eritrócitos (FRANK et al., 1975; BASTOS et al. 2010). O níveis de potássio intraeritrocitários também são altos e a proporção de hemólise, evidenciada pela dosagem de hemoglobina livre, interfere diretamente na concentração sérica desse íon, sendo este o parâmetro cujo aumento é mais sensível, consoante constatado por Frank et al. (1975).

Os resultados obtidos no presente estudo não apontaram índices excessivos de hemólise, capazes de alterar a coloração e turbidez das amostras e influenciar a dosagem bioquímica sérica obtida por espectrofotometria, conforme apontado por Frank et al. (1975); Yücel e Dalva (1992), Merwe e Reyers (2007) e Lassen e Weiser (2007) e, por conseguinte, os diferentes tratamentos eleitos não promoveram interferências dos níveis de séricos de AST, glicose e potássio.

Vale registrar que os animais foram submetidos a colheita aproximadamente 30 minutos após a ingestão de alimento concentrado e tal circunstância também não promoveu dosagens séricas de glicose superiores aos valores de referência para a espécie.

No tocante à dosagem de LDH, registrou-se índices acima dos valores esperados para os três métodos de colheita, fato que pode ser reflexo do pequeno padrão de eritrólise verificado pela análise dos valores obtidos na dosagem de hemoglobina livre. Segundo Scheffer e González (2003), qualquer intensidade de hemólise é prejudicial a dosagem de LDH, vez que o extravasamento de enzimas eritrocitárias incrementa a atividade total dessa enzima no plasma. Bastos et al. (2010) constatou aumento similar, sugerindo a necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso no procedimento de obtenção das amostras para a sua análise.

Igualmente, não foi detectada diferença entre os grupos propostos para os valores médios de PPT (Figura 4a) e Ptn Total sérica (Figura 4b). Foi verificada diferença estatística marginalmente significativa ($p=0,09$) entre os tratamentos para os valores médios de fibrinogênio (Figura 4c). As médias e os erros padrão encontrados para os valores de PPT, Ptn total sérica e fibrinogênio encontram-se descritos na tabela 3. Pelos mesmos motivos acima indicados, não foram notadas alterações dos níveis de proteína total sérica.

Os índices de proteína plasmática total e fibrinogênio também não sofreram alterações relacionadas ao tipo de colheita e permaneceram dentro dos valores de referência para a

espécie. Sugere-se que aumentos desses parâmetros poderiam ser constatados na avaliação por refratometria, em razão da diminuição da transmissão de luz induzida pela degeneração dos eritrócitos (BUSH, 2004).

CONCLUSÃO

Demonstrou-se que, quando respeitados todos os princípios de uma colheita ideal visando minimizar alterações nas amostras, nenhuma das técnicas propostas foi mais eficaz para impedir a ruptura celular. Além disso, todas as técnicas propostas no estudo foram satisfatórias a ponto de não interferir nos resultados dos exames laboratoriais dos parâmetros avaliados.

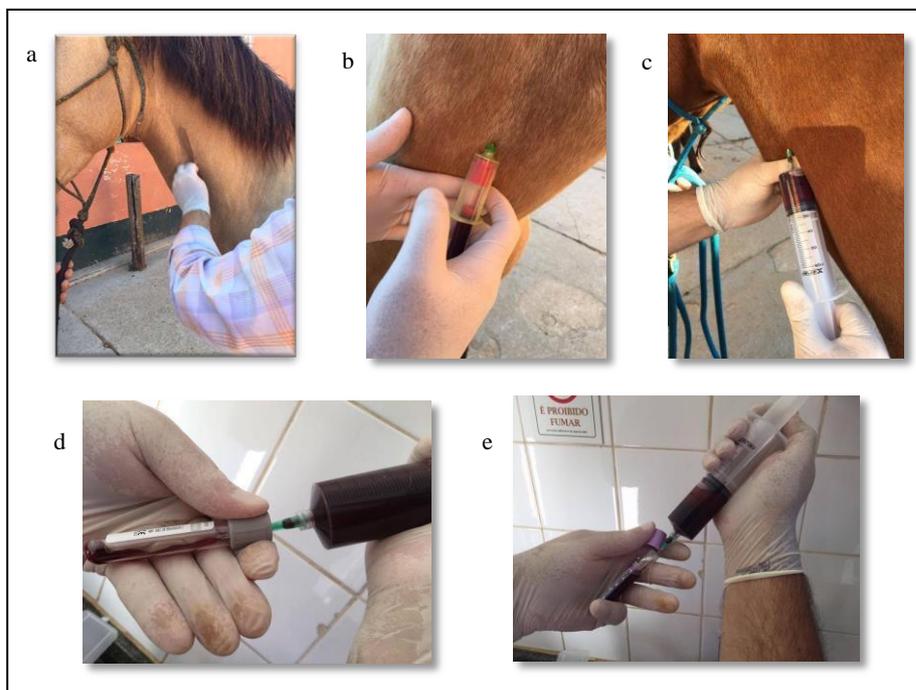


Figura 1. Antissepsia do local de venóclise e dos tratamentos realizados: a) Antissepsia da pele e pelo com álcool 70° INPM; b) Punção de sangue venoso pelo método a vácuo; c) Punção de sangue venoso pelo método tradicional (com agulha e seringa); d) Transferência do sangue para o tubo com tampa e e) Transferência do sangue para o tubo sem tampa.

Fonte: Arquivo pessoal.

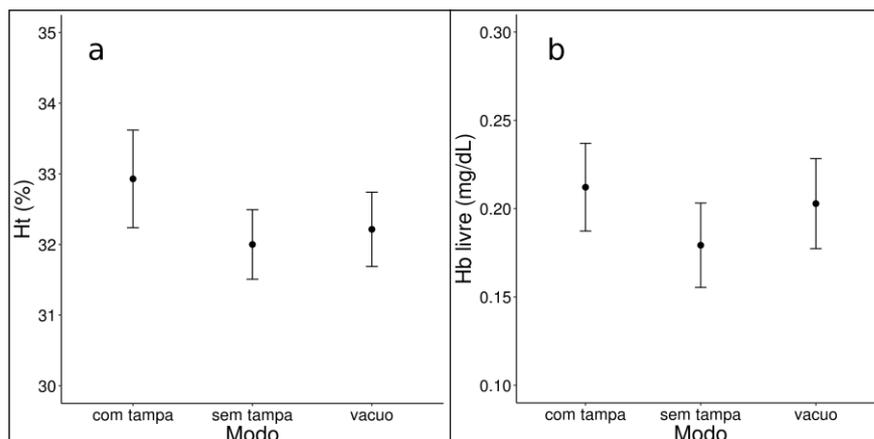


Figura 2: Representação gráfica das médias e do erro padrão dos resultados obtidos para a mensuração de: a) Hematócrito (%) e b) Hemoglobina livre (mg/dL), utilizando três métodos de colheita de sangue venoso (com tampa, sem tampa e a vácuo).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 1: Valores médios e valores de referência relativos ao Hematócrito e a Hemoglobina livre nos diferentes métodos propostos.

Parâmetros Analisados	Média com Tampa	Média sem Tampa	Média Vácuo	Valor de Referência
Ht (%)	32,92	32,00	32,21	32 – 52
Hb Livre (mg/dL)	0,21	0,17	0,2	nc*

Fonte: Elaboração própria. Legenda: * = não consta

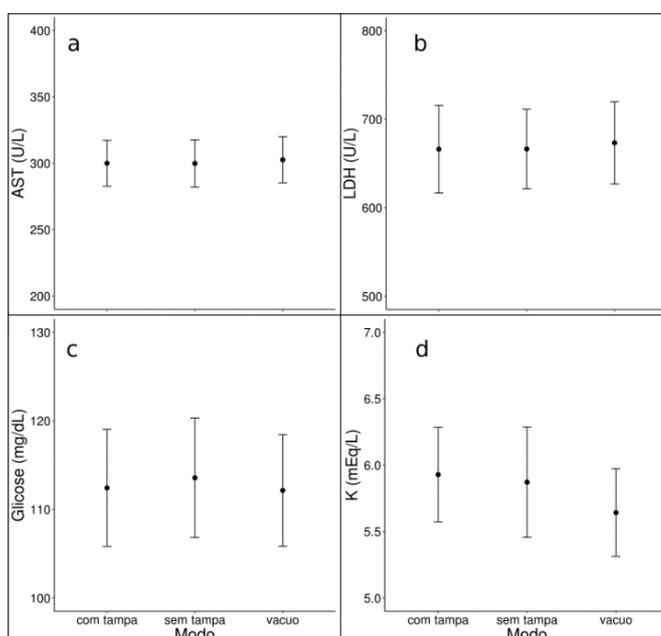


Figura 3: Representação gráfica das médias e do erro padrão dos resultados obtidos para a mensuração de: a) Aspartato aminotransferase (U/L), b) Lactato desidrogenase (U/L), c)

Glicose (mg/d/L) e d) Potássio (mEq/L), utilizando três métodos (modos) de colheita de sangue venoso (com tampa, sem tampa e à vácuo).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 2: Valores médios e valores de referência relativos a Aspartato aminotransferase, Lactato desidrogenase, Glicose e Potássio nos diferentes grupos propostos.

Parâmetro Analisado	Média com Tampa	Média sem Tampa	Média Vácuo	Valor de Referência
AST (U/L)	299,97	299,84	302,57	205 – 555
LDH (U/L)	666,07	666,28	673,21	162 – 412
Glicose (mg/dL)	112,42	113,57	112,14	72 – 114
Potássio (mEq/L)	5,92	5,87	5,64	2,40 – 5,20

Fonte: Elaboração própria.

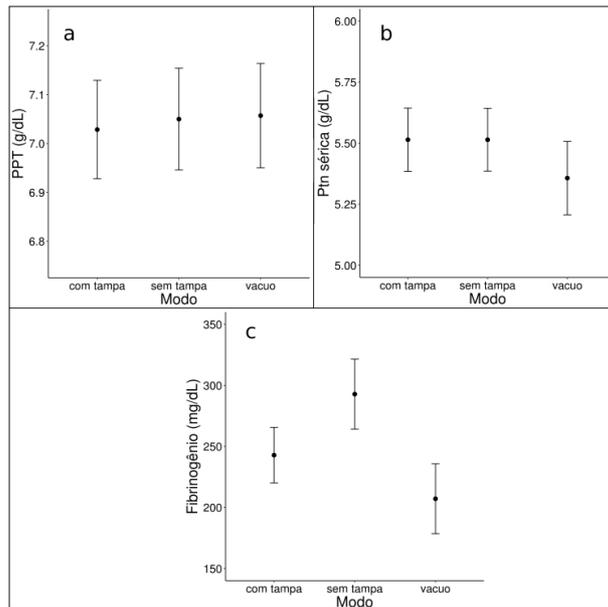


Figura 4: Representação gráfica das médias e do erro padrão dos resultados obtidos para a mensuração de: a) Proteína total plasmática (g/dL), b) Proteína total sérica (g/dL) e c) Fibrinogênio (mg/dL), utilizando três métodos (modos) de colheita de sangue venoso (com tampa, sem tampa e à vácuo).

Fonte: Arquivo pessoal.

REFERÊNCIAS

ALLEMAN, A. The effects of hemolysis and lipemia on serum biochemical constituents. **Veterinary Medicine**, New York, v.85, p.1272-1284, 1990.

BASTOS, M. S.; BERNER, A. A.; RAMOS, E. R. P; Avaliação do grau de hemólise e sua interferência em análises bioquímicas de amostras obtidas por diferentes técnicas de coleta de sangue venoso. **V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica**, CESUMAR, 2010. Disponível em:

<http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/quin_mostra/marina_souza_bastos.pdf>.

Acesso em : 14 março. 2017.

BROWN, C. M.; BERTONE, J. J. **Consulta Veterinária em 5 minutos: Espécie Equina**. Barueri, SP: Manole, p.96, 2005.

BUSH, B. M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2004. 376p.

DRABKIN, D. L; AUSTIN, J. H. Spectrophotometric studies. I. Spectrophotometric constant for common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. **Journal of Biological Chemistry**, v.98, p.719-733, 1932.

FRANK, J. J.; BERMES, E. W.; BICKEL, M. J.; WATKINS, B. F. Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. **Clinical Chemistry**, Washington, v.24, p.1966-1978, 1975.

GRANT, M. The effect of blood drawing techniques and equipment on the hemolysis of ED laboratory blood samples. **Journal of Emergency Nursery**, v.29, p.116-121, 2003.

LASSEN, E. D.; WEISER, G. Tecnologia laboratorial em Medicina Veterinária. In: THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, p.03-36, 2007.

MERWE, L.; REYERS, F. The effect of hemolysis on plasma antithrombin activity as determined by a chromogenic method. **Veterinary Clinical Pathology**, Madinson, v.36, p.55-59, 2007.

O'NEILL, S. L.; FELDMAN, B. F. Hemolysis as a factor in clinical chemistry and hematology of the dog. **Veterinary Clinical Pathology**, Madinson, v.18, p.58-68, 1989.

REED, S. M.; BAYLY, W. M. **Medicina Interna Equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.486-491.

SCHEFFER, J. F.; GONZÁLEZ, F. H. D. **Enzimologia clínica em medicina veterinária**. Porto Alegre, UFRGS, 2003. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/rev_jfss.pdf> Acesso em: 16 mai. 2017.

STOCKHAN, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.16-94, 2011.

TELEN, M. J.; KAUFMAN, R. J. The mature erythrocyte. **Wintrobe's Clinical Hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.217-247, 2004.

TRHALL, M. A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.77-91, 2015.

YÜCEL, D.; DALVA, K. Effect of *in vitro* hemolysis on 25 common biochemical tests. **Clinical Chemistry**, Washington, v.38, p.575-577, 1992.