BIOQUIMICO PLASMÁTICO DE CÃES: EFEITOS DOS DIFERENTES ANTICOAGULANTES EM COMPARAÇÃO COM O SORO

Bianca Ressetti da Silva, Marcelle Mareze, Margarete Kimie Falbo, Itacir Eloi Sandini, Priscila Michelin Groff

Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO, Curso de Medicina Veterinária, Guarapuava, PR. E-mail: biaressetti@hotmail.com

RESUMO

Na rotina clínica veterinária são utilizados diferentes tipos de anticoagulantes, escolhidos de acordo com o exame a ser solicitado. Animais agitados, agressivos, de difícil contenção e de pequeno porte podem ser fatores limitantes quando se deseja aliquotar a amostra em tubos com diferentes anticoagulantes. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos anticoagulantes: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), citrato de sódio e fluoreto de sódio associado ao EDTA, nos resultados dos exames bioquímicos de rotina realizados em cães e compará-los com o soro. Amostras de sangue de 10 cães clinicamente saudáveis foram colhidas e acondicionadas em tubos contendo cada anticoagulante e um tubo sem anticoagulante para obtenção do soro. As concentrações de albumina, alanina aminotransferase (ALT), cálcio, colesterol total, creatinina, fósforo, glicose, proteína total (PT) e uréia foram medidas por espectofotometria. Verificou-se que o plasma obtido com o anticoagulante EDTA resultou em alterações nas dosagens de glicose, colesterol e cálcio. Amostras obtidas com citrato de sódio tiveram resultados inferiores ao do soro em todos os parâmetros avaliados, com exceção da ALT. O anticoagulante fluoreto de sódio associado ao EDTA, apenas nas dosagens de uréia e glicose, não resultou em alterações estatísticas quando comparado ao soro. Desta forma, o soro é a amostra mais confiável para determinar o perfil bioquímico de cães, porém alguns exames bioquímicos podem ser realizados com o plasma com EDTA como a creatinina, ALT, uréia, albumina, PT e fósforo.

Palavras-chave: citrato; EDTA; exames bioquímicos; fluoreto; cães.

PLASMATIC BIOCHEMICAL OF DOGS: EFFECTS OF DIFFERENT ANTICOAGULANTS COMPARED TO SERUM

ABSTRACT

Different types of anticoagulants are used in the routine of a veterinary clinic, which are chosen based on the exam to be performed. Agitated, aggressive, of hard contention and small size animals can be a limiting factor when it is wished to separate samples into tubes with different anticoagulants. Therefore, this study had as the objective evaluate the effects of anticoagulants: EDTA, sodium citrate and sodium fluorite associated with EDTA, in the results of routine plasma biochemistry performed in dogs and compare it with serum. Blood samples of 10 clinically healthy dogs were collected and placed in different tubes with each anticoagulant and one without to obtain serum. Albumin, alanine aminotransferase (ALT), calcium, total cholesterol, creatine, phosphorus, glucose, total protein (PT) and urea concentrations were measured by spectophotometric. It was found that plasma obtained with EDTA anticoagulant resulted in dosage alterations for glucose, cholesterol and calcium. Samples obtained with sodium citrate presented results lower than serum in all analyzed parameters, except for ALT. The anticoagulant sodium

fluorite with EDTA only didn't result in statistical differences when compared to serum in the parameters of urea and glucose. Thus, serum is the most trustworthy sample to determine the biochemical profile of dogs, however some biochemical's can be performed with plasma with EDTA such as creatine, ALT, urea, albumin, PT and phosphorus.
Keywords: citrate; EDTA; biochemical tests; fluoride; dogs.

INTRODUÇÃO

Informações importantes sobre o estado clínico de um animal e seu prognóstico podem ser fornecidas por meio dos exames bioquímicos séricos (GONZÁLEZ et al., 2001). Para que os resultados dos testes sejam confiáveis, é necessário que a qualidade das amostras seja otimizada, portanto, deve ser dada a devida importância à fase pré-analítica, que inclui fatores técnicos, tais como a escolha do anticoagulante (BRAUN et al., 2015).

Os anticoagulantes são aditivos que inibem a coagulação do sangue, de forma que a concentração da substância a ser mensurada não sofra alterações (MOHRI et al., 2007). O hemograma é realizado com o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e para a maioria dos exames bioquímicos o soro é o mais indicado, mas o plasma quando obtido com anticoagulantes específicos pode ser igualmente válido e em certas condições preferíveis ao soro (MOHRI; REZAPOOR, 2009). O fluoreto de sódio é recomendado para análises de glicose sérica (YOUNG, 2008) e o citrato de sódio é bastante usado para testes de coagulação (MOHRI et al., 2007). Devido o tempo requerido para a completa coagulação da amostra para obtenção do soro, o uso do plasma é indicado também em situações de emergência (PRAMINA et al., 2013).

Entretanto, nos pacientes de pequeno porte ou de difícil contenção, geralmente a quantidade de sangue colhida é insuficiente para ser aliquotada em diversos tubos com diferentes anticoagulantes e também pode haver momentos em que a colheita de uma nova amostra seja inviável. Portanto, nesses casos, saber qual anticoagulante não afetará o resultado de determinado analito a ser mensurado contribuirá para uma correta interpretação dos valores bioquímicos dos animais.

Nesse contexto, este trabalho foi realizado com o intuito de avaliar o efeito dos anticoagulantes na dosagem de vários analitos utilizados na rotina e compará-los com o soro de cães.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado com aprovação do Comitê de Ética da Universidade Estadual do Centro Oeste, em Guarapuava - PR, Campus CEDETEG (034/2014). O estudo foi realizado com 10 cães saudáveis conforme metodologia utilizada por Cerón et al. (2004), cujos proprietários concordaram com o procedimento de colheita de sangue. Esses animais foram escolhidos de forma aleatória, sendo de raças variadas, de médio a grande porte, com idade média de 3,0 anos (± 1,15 anos), sendo 5 machos e 5 fêmeas.

As colheitas de sangue foram realizadas por punção da veia cefálica, com agulha 25x7 mm e seringas de 10 mL. A partir de cada cão foram obtidos 10 mL de sangue que em seguida foram acondicionados em tubos esterilizados com os seguintes anticoagulantes: 0,05 mL de EDTA 10% para 2,5mL de sangue, 0,05 mL (Glistab®) 12 g/dL fluoreto de sódio + 6 g/dL EDTA para 2,5 mL de sangue, 0,34 mL de citrato de sódio 3,2% para 3,0 mL de sangue e 2,0 mL de sangue em um tubo sem anticoagulante.

As amostras foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UNICENTRO, onde foi realizada a centrifugação dos tubos a 2000 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos para a obtenção do soro e plasma, os quais foram armazenados em micro tubos de plástico, identificados com os nomes dos animais e acondicionados a -20°C até a realização dos exames.

Os parâmetros bioquímicos analisados foram: albumina, cálcio, colesterol total, creatinina, fósforo UV, glicose, proteína total (PT) e uréia por meio de colorimetria e ALT (alanina aminotransferase) por meio de reação cinética, todos por espectofotometria em analisador semi-automático Bioplus 200®. Em todos os exames foram utilizados kits comerciais Labtest®.

Os dados foram submetidos à análise da variância e, quando significativo a 5% de probabilidade, as médias foram comparadas entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade por meio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, encontram-se os resultados dos parâmetros bioquímicos avaliados realizados com soro e comparados com o plasma obtido com diferentes anticoagulantes.

O soro ou o plasma heparinizado ainda é preferido para realização dos exames bioquímicos, pois o uso de outros anticoagulantes pode interferir em alguns métodos analíticos ou alterar a concentração de alguns parâmetros (GUDER, 2001). A heparina é o anticoagulante mais usado para analises bioquímicas em vários laboratórios, entretanto apresenta variações em alguns analitos como relatado por Thorensen et al. (1992), Cerón et al. (2004) e Pramina et al. (2013) em que encontraram alterações nas dosagens de cálcio ionizado, potássio, albumina e sódio, além da desvantagem do custo elevado (YOUNG, 2008), justificando a preferência da utilização do soro neste trabalho.

A utilização de anticoagulantes possui duas vantagens: a possibilidade de centrifugação imediata, importante nos casos emergenciais e o rendimento maior da

amostra que é de 15 a 20% em relação ao soro (GUDER, 2001).

Porém, na rotina clínica veterinária, muitas vezes, a quantidade de sangue colhida é insuficiente para ser aliquotada em diversos tubos com diferentes anticoagulantes, ou decide-se pela realização de outros exames após a colheita. Neste sentido, o anticoagulante EDTA que é utilizado para hematologia seria o anticoagulante de eleição se pudéssemos utilizá-lo para dosagens bioquímicas.

Neste estudo observou-se que os parâmetros do plasma com EDTA que não sofreram alteração estatística significativa quando comparados ao soro foram a creatinina, a enzima ALT, uréia, albumina, PT e fósforo, igualmente encontrado por Cerón et al. (2004), com exceção do fósforo e da albumina. Este é um resultado prático importante porque juntamente com o hemograma, esses, principalmente os três primeiros, são os exames bioquímicos mais solicitados na rotina clínica/laboratorial, e que possibilitará ao clinico, em uma necessidade, utilizar a mesma amostra de sangue do hemograma para a realização destes exames.

Para as dosagens de albumina é indicada somente a utilização do soro (kit comercial da Labtest® - verde de bromocresol), porém observou-se que não houve alterações estatísticas significativas quando comparado ao plasma com EDTA. Este resultado precisa ser avaliado com cautela, uma vez que o kit comercial utilizado, o método realizado, o analisador (BOLTEN et al., 1992) podem interferir nos resultados, uma vez que Cerón et al. (2004) encontraram resultados diferentes ao realizado neste trabalho para a albumina, o qual mostrou diferença significativa quando comparada ao soro.

Ao analisarmos os resultados obtidos com o anticoagulante citrato de sódio verificou-se que o mesmo provoca alterações estatísticas significativas (diminuição) em quase todos os parâmetros bioquímicos analisados quando comparado ao soro, com exceção da enzima ALT. Achados semelhantes foram obtidos por Cerón et al. (2004) os quais relataram ser em decorrência da diluição da amostra ocasionado pela mistura do anticoagulante utilizado na proporção de 1:9 com o sangue. Entretanto, um trabalho realizado por Mohri et al. (2007) verificaram que mesmo quando corrigidos a diluição houveram diferenças significativas nos valores de glicose, colesterol, cálcio e ALT, atribuindo como causa a inibição de reagentes cromógenos e interferência com outras reações. O mesmo acontece com outra espécie animal onde Mohri e Rezapoor (2009) verificaram diminuição nos valores de glicose, colesterol, uréia, creatinina, PT,

albumina e cálcio no plasma citratado de ovelhas.

O anticoagulante EDTA associado ao fluoreto de sódio (Glistab®) é indicado pelo fabricante para amostras de sangue de humanos para realização da mensuração da glicose, creatinina e uréia em uma única amostra. Nesse experimento verificou-se que é possível realizar a dosagem de glicose e uréia, pois não houve alterações estatísticas, mas para creatinina encontrou-se resultado diminuído quando comparado ao soro.

Tabela 1 – Comparação das médias obtidas dos exames bioquímicos realizados com soro e plasma de cães obtidos com diferentes anticoagulantes.

Anticoagulantes	Exames Bioquímicos								
	Glicose mg/dL	Colesterol mg/dL	PT g/dL	Albumina g/dL	Uréia mg/dL	Creatinina mg/dL	Fósforo mg/dL	Cálcio mg/dL	ALT UI/L
Citrato de sódio	70,90 b	178,80 c	4,99 c	2,33 c	29,50 b	0,69 b	2,62 b	8,55 b	48,20ab
EDTA	72,10 b	212,30 b	6,70 a	2,93 ab	32,20ab	0,86 a	3,21 ab	0,00 c	55,10 a
Fluoreto de sódio/EDTA	86,30 a	200,30 b	5,52 c	2,67 b	33,20 a	0,72 b	2,82 b	0,00 c	38,60 b
Soro	88,10 a	256,70 a	7,00 a	3,18 a	34,20 a	0,86 a	3,54 a	10,14a	50,80ab
Média	79,35	212,03	5,97	2,78	32,28	0,78	3,05	4,67	48,18
C. V. (%)	9,17	7,69	9,7	9,69	7,47	9,29	16,43	19,36	26,75

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

C.V. coeficiente de variação.

Com relação aos minerais cálcio e fósforo, verificou-se ação quelante do EDTA ao cálcio, mostrando não ser possível a sua utilização nem com associação ao fluoreto de sódio (Glistab®). O plasma com EDTA revelou um nível de cálcio significantemente baixo quando comparado ao soro em amostras de cão, bovino, ovino, caprino, coelho, elefante e humano (PRAMINA et al., 2013). Cerón et al. (2004) também verificou resultados próximos a zero. Mas com relação ao fósforo não foi verificado alteração estatística significativa do soro quando comparado ao EDTA.

Para dosagem de colesterol observou-se que as amostras com anticoagulantes EDTA, fluoreto de sódio e citrato de sódio fornecem resultados diminuídos.

Os resultados encontrados no presente trabalho devem ser utilizados com cautela, uma vez que utilizamos um analisador bioquímico semi-automático e kits comerciais específicos. Estudos anteriores que compararam diferentes anticoagulantes obtiveram diferenças significativas nos resultados dependendo do analisador (BOLTEN et al., 1992).

O conhecimento de como anticoagulantes podem influenciar nos resultados das análises permite que, em casos de necessidade, outros exames sejam realizados a partir de uma mesma amostra, entretanto, mais pesquisas devem ser realizadas visando comparar os efeitos dos anticoagulantes nas análises bioquímicas. E como este trabalho foi focado em animais saudáveis, futuros estudos devem ser realizados comparando soro e plasma de animais doentes com valores bioquímicos alterados.

CONCLUSÕES

O soro é a amostra mais confiável para determinar o perfil bioquímico de cães.

Exames bioquímicos como a creatinina, ALT, uréia, albumina, PT e fósforo podem ser realizados com o plasma com EDTA.

A determinação de glicose e uréia sérica pode também ser realizada com o plasma obtido com anticoagulante -Glistab®- EDTA associado ao fluoreto de sódio.

Com o plasma citratado não houve diferença estatística significativa na dosagem sérica de ALT.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os proprietários, pela disponibilidade e a confiança que nos depositaram ao cederem seus animais de estimação para a realização dos exames.

REFERÊNCIAS

BOLTEN, A.B.; JACOBSON, E.; BJORNDAL. K.A. Effects of coagulants and autoanalyzer on blood biochemical values of loggerhead sea turtles (*Carettacaretta*). **American Journal Veterinary Research,** v.53, p.2224-2227, 1992.

BRAUN, J. P.; BOURGES-ABELLA, N.; GEFFRE, A.; CONCORDET, D.; TRUMEL, C. The preanalytic phase in veterinary clinical pathology. **Veterinary Clinical Pathology**, v.4, p.8-25, 2015. http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12206

CERÓN, J.J.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; HENNEMANN, C.; TECLES, F. The effects of diferente anticoagulants on routine canine plasma biochemistry. **The Veterinary Journal**, v. 167, p. 294-301, 2004. http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.09.009

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências Exatas, 2000. 66p.

GONZÁLEZ, F. H. D.; CARVALHO, V.; MÖLLER V.A.; DUARTE, F. R. Perfil bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinaria UFRGS**, v.29, n.1, p.1-6, 2001.

GUDER, W.G. The quality of diagnostic samples. **Blood Gas News.**, v. 10, 18-21, 2001.

MOHRI, M. ; ALLAHIARI, L. ; SARDARI, K. Effects of common anticoagulants on routine plasma biochemistry of horse and comparison with serum. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 7, p. 313–316, 2007. http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2007.05.004

MOHRI, M.; REZAPOOR, H. Effects of heparin, citrate, and EDTA on plasma biochemistry of sheep: Comparison with serum. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 111–114, 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.05.010

PRAMINA, K. V.; MINCY, P. T.; ANU JOSEPH, P.; LISHA, V.; MERCY, K. A.; RAMNATH, V. Levels of calcium, sodium and potassium in plasma as influenced by anticoagulants. **Journal Veterinary Animal Science**, v. 44, p. 72-75, 2013.

THORENSEN, S.I.; HAVRE, G.N.; MORBERG, H.; MOWNWICKEL, P. Effects storage time on chemistry results from canine blood whole, heparinized whole blood, serum and heparinized plasma. **Veterinary Clinical Pathology,** v.21, 88-94, 1992. http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-165X.1992.tb00591.x

YOUNG, D. S. Specimen Collection and Other Preanalytical Variables. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry.**6. ed. Missouri: Saunders Elsevier, p. 42-61, 2008.

Recebido para publicação em 18/08/2014
Revisado em 13/07/2015
Aceito em 12/02/2016