

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

HEMÓLISE INTERFERE NA MENSURAÇÃO DOS
BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÃES

Luciana de Moraes
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**HEMÓLISE INTERFERE NA MENSURAÇÃO DOS
BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÃES**

Luciana de Moraes

Orientador: Prof. Adj. Paulo César Ciarlini

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestra em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2016

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Morais, Luciana de

M792h

Hemólise interfere na mensuração dos biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo em cães / Luciana de Moraes.

Araçatuba: [s.n], 2016

45f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof Adj. Paulo César Ciarlini

1. Cães. 2. Antioxidante 3. Erro analítico, 4. Hemoglobina . I. T.

CDD 636.0896



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Hemólise interfere na mensuração dos biomarcadores plasmáticos de estresse
oxidativo em cães

AUTORA: LUCIANA DE MORAIS

ORIENTADOR: PAULO CESAR CIARLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL,
área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora;


Prof. Dr. PAULO CESAR CIARLINI
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba -
UNESP


Profa. Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba -
UNESP


Profa. Dra. ANA CLAUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Araçatuba, 31 de agosto de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCIANA DE MORAIS – Natural de São Paulo, São Paulo, nascida em 04 de abril de 1981, filha de Maria Helena Tida de Moraes e João Aparecido de Moraes. Em 2008, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Paulista - UNIP, onde se graduou como Médica Veterinária em dezembro de 2012 com Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “O uso racional da transfusão de sangue em cães” sob orientação do Prof.^o Fábio Futema. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, *Campus* de Araçatuba – SP (FMVA), em março de 2014, sob orientação do Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini, obtendo bolsa de mestrado vinculada à CAPES. Desde então tem participado dos Projetos de Pesquisa do grupo com os temas relacionados ao estresse oxidativo e metabolismo oxidativo.

“As criaturas que habitam esta terra
em que vivemos; sejam elas seres
humanos ou animais, estão aqui para
contribuir, cada uma com sua
maneira peculiar, para a beleza
e a prosperidade do mundo”.

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS pela oportunidade da vida.

Aos meus familiares, em especial tios maternos, por terem me proporcionado uma infância digna, auxiliando na formação do meu caráter, tenho a plena certeza de que sem eles eu não teria trilhado o caminho certo da vida.

A minha amada mãe Maria Helena, que me proporcionou a oportunidade de me tornar médica veterinária. Obrigada ao meu irmão Juliano, ao meu pai João, por fazerem parte da minha vida. Ao meu marido Vinicius, companheiro incondicional, que há 18 anos esta ao meu lado auxiliando-me e amparando-me com gestos, palavras, atos e que se faz presente em todos os momentos, enfim obrigada por me fazer sentir tão amada. Obrigada por serem a minha referência, e sempre estarem presentes na minha vida, cada um ao seu modo, porém de uma forma indispensável.

Ao meu orientador de mestrado Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini por todo apoio e ensinamentos transmitidos durante esse período. Exemplo de competência, ética e profissionalismo.

Obrigada aos meus filhos de quatro patas, é impossível citar todos, então me resumo em agradecer a todos os filhos de quatro patas que já passaram pela minha vida. Por vocês e por todos os outros que ainda virão, prometo esforçar-me para sempre estar apta a ajudá-los.

Aos amigos do Laboratório Clínico Veterinário do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, que foram peças fundamentais em meu desenvolvimento, e que de alguma forma me proporcionaram a evolução como ser humano e profissional.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado durante o primeiro ano do curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade oferecida para a realização do curso de Mestrado.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram na execução dessa pesquisa, sem vocês nada disso seria possível!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.	12
1 Contextualização do problema.	12
2 Pesquisa bibliográfica	12
3 Hemólise	16
4 Erros analíticos devido à hemólise.....	18
5 A interferência da hemólise nos biomarcadores de estresse oxidativo	20
6 Objetivos	21
REFERÊNCIAS.....	22

CAPÍTULO 2 – HEMÓLISE INTERFERE NA MENSURAÇÃO DOS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES	28
1 INTRODUÇÃO	30
2 MATERIAL E MÉTODO	32
2.1 Seleção dos animais	32
2.2 Obtenção das amostras	32
2.3 Ensaio da hemólise mecânica	33
2.4 Análise estatística	35
3 RESULTADOS.....	35
4 DISCUSSÃO	37
5 CONCLUSÃO	41
6 REFERÊNCIAS.....	41

HEMÓLISE INTERFERE NA MENSURAÇÃO DOS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES

RESUMO - A mensuração de biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo (BPEO) tem sido largamente empregada para avaliar o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Devido sua função de carrear oxigênio os eritrócitos são ricos em antioxidantes, entretanto os efeitos da hemólise sobre o BPEO de cães são desconhecidos. Considerando que dentre todas as várias fontes de erro analítico, a hemólise é a mais importante na rotina laboratorial, investigamos o efeito da hemólise *in vitro* sobre os principais BPEO de cães. Para tal, amostras de sangue total de 19 cães clinicamente saudáveis foram hemolisadas em diferentes graus por ação mecânica. Amostras controle contendo baixa concentração de hemoglobina (Hb) no plasma foram comparadas com quatro graus de hemólise mecânica (<0,36; 0,36-0,60; 0,61-1,0; 1,1-4 g/L Hb). Imediatamente após a hemólise foram mensuradas as concentrações plasmáticas de ácido úrico (AU), albumina, bilirrubina, gama glutamiltransferase (GGT), capacidade antioxidante total (TAC) e concentração de oxidante total (TOC). Os erros relativos causados pelos diferentes graus de hemólises foram calculados e confrontados com o erro total aceitável (ETA) e com limite de erro permitido (LEP) empregados nos programas de controle de qualidade de exames laboratoriais. Foi observado que mesmo pequeno grau de hemólise gera algum erro analítico não aceitável (ETA e/ou LEP) nos biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo mensurados, exceto na bilirrubina. Foi possível concluir que a hemólise é um fator limitante para avaliação do estresse oxidativo sistêmico mensurado no plasma, podendo causar erros que potencialmente comprometem o diagnóstico clínico e investigativo.

Palavras chaves: antioxidante, bias, erro analítico, hemoglobina, oxidante.

HEMOLYSIS INTERFERE IN THE MEASUREMENT OF BIOMARKERS PLASMATIC OF OXIDATIVE STRESS IN DOGS

ABSTRACT - The measurement of plasma biomarkers of oxidative stress (PBOE) has been widely used to assess the imbalance between oxidants and antioxidants. Due to its function of carrying oxygen red blood cells are rich in antioxidants, however the effects of hemolysis on PBOE dogs are unknown. Whereas among all the various sources of analytical error, hemolysis is the most important in the laboratory routine, we investigated the effect of hemolysis "in vitro" on the main PBOE dogs. For this purpose, whole blood samples from 19 healthy dogs were hemolyzed in different degrees by mechanical action. Control samples containing low concentration of hemoglobin (Hb) levels in plasma were compared with four degrees of hemolysis mechanics (<0.36 , from 0.36 to 0.60, 0.61 to 1.0, 1.1 to 4 g/L Hb). Immediately after the hemolysis were measured plasma concentrations of uric acid (UA), albumin, bilirubin, gamma glutamyl transferase (GGT), total antioxidant capacity (TAC), and total oxidant concentration (TOC). The relative errors caused by different levels of hemolysis were calculated and compared with the total acceptable error (TAE and allowed error limit (LEP) employees in quality control programs for laboratory tests. Even if it was observed small degree of hemolysis generates some not acceptable analytical error (TAE and / or LEP) in plasma biomarkers of oxidative stress measured, except in bilirubin. It was concluded that hemolysis is a limiting factor for the assessment of systemic oxidative stress measured in plasma, may cause errors that potentially compromise the clinical and investigative diagnosis.

Keywords: analytical error, antioxidant, bias, hemoglobin, oxidant.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Contextualização do problema

Hemólise refere-se à ruptura das hemácias, na qual ocorre a liberação do conteúdo intracelular (SNYDER et al., 2004), sendo um acontecimento comum e desfavorável na rotina laboratorial. A hemólise é responsável por 40% a 70% das amostras inadequadas nos laboratórios humanos (LIPPI et al., 2008). É a razão mais frequente para a rejeição de amostras, quando comparada com outros erros pré-analíticos e analíticos, uma vez que influencia na confiabilidade dos resultados de vários parâmetros laboratoriais (LIPPI et al., 2006).

A mensuração dos biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo tem despertado grande interesse científico, em particular nos estudos sobre doenças associadas com excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou diminuição da capacidade antioxidante (DURAK et al., 2001).

O cálculo do erro causado pela hemólise *in vitro* obtido mecanicamente tem sido considerado como mais adequado do que outros protocolos hemolíticos. Para quantificar a interferência da hemólise no erro analítico, vários cálculos tem sido empregados, sendo um dos mais comuns o cálculo de interferência da hemoglobina (SONNTAG, 1986). O limite de erro permitido (LEP) preconizado por Tonks (1963) é considerado um importante parâmetro para distinguir se um valor é normal ou anormal. A *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA, 1988), recomenda que o erro sistemático e o erro aleatório não ultrapassem 50% e 25% do erro total aceitável (ETA) baseados em requisitos clínicos (MENDES; ROMANO, 2010). A interferência da hemólise nas amostras bioquímicas na rotina veterinária foi escassamente investigada, mas até o momento não há estudos que tenham avaliado a interferência da hemólise nos marcadores de estresse oxidativo.

2 Pesquisa bibliográfica

Em busca de evidências sobre o efeito da hemólise nos marcadores de estresse oxidativo em cães foi realizada uma revisão de literatura sistemática sobre o tema. A pergunta para a realização da revisão foi estruturada com os três elementos (situação, intervenção e desfecho) conceituados na Medicina Baseada em Evidências, conforme preconizado por Castro (2001).

Pergunta: A hemólise *in vitro* interfere nos marcadores de estresse oxidativo? Situação: marcadores plasmáticos de estresse oxidativo; Intervenção: hemólise *in vitro*; Desfecho: interferência, erro analítico, bias. Tal pergunta gerou a seguinte estratégia para busca na base de dados da Pubmed: (("haemolysis"[All Fields] OR "hemolysis"[MeSH Terms] OR "hemolysis"[All Fields]) AND (("bias (epidemiology)"[MeSH Terms] OR ("bias"[All Fields] AND "(epidemiology)"[All Fields]) OR "bias (epidemiology)"[All Fields] OR "bias"[All Fields]) OR (analytic[All Fields] AND error[All Fields]) OR interference[All Fields])) AND (("dogs"[MeSH Terms] OR "dogs"[All Fields] OR "dog"[All Fields]) OR ("dogs"[MeSH Terms] OR "dogs"[All Fields] OR "canine"[All Fields])). A busca localizou 18 publicações, sendo que nenhuma foi utilizada devido a não atender os objetivos do trabalho.

A revisão foi expandida para outros bancos de dados: Portal de Pesquisa da Capes gerando a seguinte estratégia: *plasma biochemistry AND "haemolysis", hemolysis dog AND errors, interferences*. A busca resultou em 162 artigos, sendo apenas dois deles selecionados por atenderem aos objetivos propostos (ALMEIDA et al., 2011; HAWKINS et al., 2006) (Tabela 1).

Como suplemento de pesquisa em banco de dados, a busca foi expandida para o Google Acadêmico: *hemolysis, preanalytical variability, chemistry, errors, interferences* obteve-se 1.310 referências. Novo filtro foi adicionado: - bias. Resultando em 768 trabalhos. Destes, sete foram utilizados por atender aos objetivos (Tabela 1).

Devido à escassez de artigos relacionados à interferência da hemólise nos marcadores de estresse oxidativo, a revisão incluiu a estratégia que contempla a interferência da hemólise em pelo menos um parâmetro bioquímico de nosso interesse (ácido úrico, albumina, bilirrubina, gama-glutamyltransferase, capacidade total antioxidante, concentração total oxidante). A revisão sistemática foi realizada no período de 18.01.2016 até 29.06.2016. Não houve limitação quanto ao idioma, data de publicação ou tipo de estudo. Levando-se em consideração a metodologia empregada e a pergunta investigativa, foram selecionados nove artigos que tenham avaliado o efeito da hemólise em pelo menos um dos seis marcadores de estresse oxidativo avaliados nesse trabalho. Foram excluídos todos os trabalhos não relacionados com a hemólise *in vitro*; ou quando relacionados, mensuravam outros tipos de marcadores biológicos ou os que utilizaram metodologias diferentes.

Outros artigos de conceito geral sobre hemólise e estresse oxidativo foram utilizados ao longo da revisão como forma de priorizar o entendimento do tema e introduzir ideias básicas para assuntos mais complexos, propostos nos artigos que iremos discutir na Tabela 1.

Tabela 1 – Resumo das metodologias e principais resultados de estudos sobre a interferência da hemólise nos parâmetros bioquímicos

Referências	Espécie	Tipo de hemólise	Concentração de hemoglobina	Parâmetros analisados	Método Analítico	Erro relativo	Resultados
MARTINO et al., 2015	Suínos	Agitação	Hemólise visual classificada: 1+ : Grau 1 2+ : Grau 2 3+ : Grau 3	Ácido úrico (AU) Albumina GGT Hemoglobina (Hb)	Albumina: Bacilo Calmette-Guérin; Bilirrubina: 2.5 diclorofenildiazônio; AU:enzimático Uricase hb=cianohemoglobina (570/600 nm)	Não calculado	Albumina: ↓ Bilirrubina e AU: valores inexatos frente a hemólise
ALMEIDA et al., 2011	Cães Bovinos Equinos	Contaminação Hb e congelamento	94g/L 96.4g/L 108.5g/L	Ácido úrico (AU) Albumina GGT Hemoglobina (Hb)	AU: 33 a 151% AU: enzimático-colorimétrico (Uricase/POD); Albumina: verde de bromocresol; GGT: cinético UV segundo IFCC; Hb: cianohemoglobina (540nm)	AU: 33 a 151% (bovinos) e 74 a 131% (equinos) Albumina: 8% cães; 7% equinos e 6% bovinos ; no menor grau de hemólise erro de 68% equinos e maiores graus o erro variou - 39% a -74%	AU: ↑ linear em bovinos e equinos; Albumina: hemólise não interferiu no resultado final; GGT: na menor [] de hemólise em equinos ↑ e hemólise em graus maiores promoveu uma diminuição nos valores
KOSEOGLU, 2011	Humano	Trauma mecânico	I: 0-0.10g/L II: 0.10-0.50g/L III: 0.51-1.00g/L IV: 1.01-2.50g/L V: 2.51-4.50g/L	Ácido úrico (AU) Albumina GGT Hemoglobina (Hb)	AU: enzimático-colorimétrico (Uricase/UV); Albumina: verde de bromocresol; GGT: cinético UV segundo IFCC; Hb: cianohemoglobina (540nm)	Não calculado	Bilirrubina ↓ em 100% das amostras; GGT ↑; Albumina e AU apresentaram valores baixos quando comparados aos valores da ASVCP.

BRAININA et al., 2009	Humano	Congelamento		TAS	Radox	Não calculado	A hemólise nas amostras sanguíneas interfere na leitura dos antioxidantes realizados pelo método da fotometria.
HAWKINS et al., 2006	Papagaio	Refrigeração	1 (++) : hemólise moderada 2 (++) : hemólise severa	Albumina Hemoglobina (Hb)	Albumina: Não relatado Hb: espectrofotômetro (Beckman DU640, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)	Não calculado	Hemólise ↑ [] potássio, fósforo, albumina e lactato desidrogenase.
LIPPI et al., 2006	Humano	Diluição	0.16g/L 0.30g/L 0.60g/L 1.30g/L 2.60g/L 5.10g/L 10.3g/L 20.6g/L	AU Albumina Bilirrubina GGT Hemoglobina	AU: enzimático-colorimétrico (Uricase/Peroxidas e); Albumina: verde de bromocresol; Bilirrubina: sulfanílico diazotado; GGT: Szasz-Persijn; Hb: cianohemoglobina (UV-1700nm)	Não calculado	Albumina e GGT ↓ Amostras com valores de hb > 20.6g/L: AU, BT e Albumina não apresentaram # estatística. BT e GGT sofreram alta interferência da hemólise
BONINI, 2002	Humano	Comparou resultados dos últimos 8 anos, para verificar a quantidade de exames que ficaram fora do valor de referência				Não calculado	Hemólise é a maior causa de rejeição das amostras

LEARD, 1990	Cães	Lavagem das hemácias com solução salina	1- 0mg/dl 2- 19mg/dl 3- 48mg/dl 4- 96mg/dl 5- 192mg/dl 6- 385mg/dl	AU Albumina	Testes realizados no CentrifChem System 500 Baker instrument	Não calculado	AU não apresentou diferença estatística nos graus de hemólise Albumina - significativo em todos os graus
SONNTAG, 1986	Humano	Congelamento	0.80g/L 1.70g/L 2.50g/L 3.40g/L 4.20g/L 5.00g/L 5.80g/L 6.60g/L	AU Albumina Bilirrubina GGT Hemoglobina	AU: Catalase/AIDH; Albumina: Immuno-nephelometry; Bilirrubina: não relatado; GGT: γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide; Hb: cianohemoglobina	Não calculado	Albumina ↓ (método eletroforese); Hb >6.6g/L causou relevante interferência clínica na determinação de albumina e AU ↓. Bilirrubina ↓, o efeito da hemólise foi confirmado. GGT ↓ na [] de 3.0g/l devido a presença da glicina que é um conhecido inibidor da enzima GGT.

3 Hemólise

A hemólise envolve a ruptura das células vermelhas do sangue e libera seu conteúdo no plasma ou soro, sendo uma questão importante e de grande preocupação nos campos clínicos (SON et al., 2014). Pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro* (KOSEOGLU et al., 2011), e a liberação do conteúdo intracelular, acresce ao plasma ou soro, uma coloração avermelhada devido à liberação da hemoglobina, além de enzimas, proteínas e carboidratos (TELEN; KAUFMAN, 2004).

A incidência de hemólise *in vivo* é de 3,2% (CARRARO et al., 2000), enquanto que a forma *in vitro* é a razão mais frequente para a rejeição de amostras (KOSEOGLU et al., 2011), quando comparada com outros erros pré-analíticos e analíticos, uma vez que influencia na confiabilidade dos resultados de vários parâmetros laboratoriais (LIPPI et al., 2006). A hemólise *in vitro* tem sido desde sempre uma grande preocupação para os laboratórios clínicos em todo o mundo e pode ocorrer inicialmente na obtenção da amostra e continuar através do processamento e da análise, sendo as principais causas: coleta e o manuseio

inadequado da amostra, temperaturas inadequadas, agitação durante o transporte, homogeneização ou na centrifugação (LASSEN; WEISER, 2007). Amostras hemolisadas ou a presença de hemoglobina visível podem levar a problemas nos testes de diagnóstico, tais como baixa sensibilidade, seletividade e resultados inespecíficos (SON et al., 2014), comprometendo a precisão dos testes bioquímicos (HAWKINS et al., 2006).

Na rotina dos laboratórios veterinários de análises clínicas, tradicionalmente os técnicos examinam visualmente as amostras, verificando a aparência do soro/plasma comparando com um gráfico de integridade da amostra baseado na cor (LIPPI et al., 2006). Esta avaliação da hemólise é demorada, limitada pela subjetividade e dificuldade em discernir diferenças sutis na cor entre amostras hemolisadas e ictéricas (SIMUNDIC et al., 2009). Porém, a inspeção visual ainda é empregada na maioria dos laboratórios veterinários que não utilizam sistema de automação capaz de quantificar o índice de hemólise (IH). O método da inspeção visual para detecção de hemólise, quando comparado a outros métodos de quantificação de hemoglobina, como Harboe, Drabkin, ou analisadores automáticos, mostra-se altamente impreciso (GKOUMASSI et al., 2012). Mesmo quando a hemólise não é visível, existe uma descarga dos constituintes celulares no soro ou plasma (THOMAS, 2002), deste modo a hemólise invisível é uma causa importante para a obtenção de falsos resultados, portanto, deve ser detectada antes do procedimento laboratorial (KOSEOGLU et al., 2011). Atualmente existem analisadores de laboratórios humanos, que conseguem quantificar a hemoglobina livre através de medidas de absorbância no soro ou plasma em diferentes comprimentos de onda e a concentração de hemoglobina livre é relatada como "índice de hemólise" - IH (CLSI, 2012).

A hemólise pode interferir nos testes laboratoriais através do extravasamento do conteúdo eritrocitário; interferência na coloração da reação pela hemoglobina; diluição dos constituintes séricos; aumento da turbidez; interação química com os reagentes durante a análise e interferência na coloração devido a reação da hemoglobina (ALLEMAN, 1990). A turbidez resultante da hemólise interfere diretamente na dosagem bioquímica sérica obtida por espectrofotometria (YÜCEL e DALVA, 1992).

A liberação de componentes intraeritrocitários, seja na hemólise *in vivo* ou *in vitro*, pode levar a um aumento mensurável da concentração de analitos em relação

ao plasma/soro e alguns destes componentes pode interferir nas reações de outros analitos. Assim como o pigmento da hemoglobina também pode interferir na leitura da amostra (LIPPI et al., 2006; O'NEILL; FELDMAN, 1989).

Amostras hemolisadas são comuns e de ocorrência desfavorável nas práticas laboratoriais, sendo muitas vezes consideradas inadequadas para testes de rotina devido à interferência biológica e analítica. A frequência de hemólise *in vitro* e pré-analítica pode ser reduzida por meio da aplicação de medidas, como padronização da coleta com o uso de materiais adequados (LIPPI et al., 2006).

4 Erros analíticos devido à hemólise

Hemólise é a fonte de erro pré-analítica mais comum na rotina laboratorial, sendo responsável por quase 60% das amostras rejeitadas (BONINI et al., 2002; PLEBANI et al., 1997).

Os erros analíticos causados devido a hemólise podem ocorrer por três mecanismos diferentes, dependendo do mecanismo envolvido: 1. Aumento, se a concentração eritrocitária do analito for maior que a do plasma e diminuição se esta condição for inversa; 2. O pigmento da hemoglobina provoca um aumento em sistemas analíticos cujo produto final da reação é mensurado em absorbância com comprimento de onda baixo (300-500 nm) e 3. A hemoglobina pode interferir com certas reações químicas, inibindo a diazotização na determinação da bilirrubina ou alterando o pH em medições contínuas de atividade enzimática (SONNTAG, 1986). Para O'Neill e Feldman, 1989, a hemólise pode interferir aumentando a absorbância do analito devido a presença de hemoglobina, ou então, atuar diretamente sobre as reações enzimáticas de um método utilizado, devido a alteração do pH que a hemólise causa.

Embora os laboratórios possuam equipamentos com sistemas capazes de testar automaticamente e, eventualmente, corrigir a interferência da hemólise, não há relatos que compararam a eficiência de diferentes plataformas analíticas para identificação e classificação de amostras com hemólise (LIPPI et al., 2009).

O cálculo dos erros analíticos causados pela hemólise *in vitro* obtida mecanicamente são mais adequados do que os obtidos em ensaios, cuja hemólise foi simulada, sendo utilizados para avaliar o quanto a hemólise interfere no resultado final (SONNTAG, 1986).

Para avaliar o efeito da hemólise no perfil bioquímico várias metodologias têm sido empregadas. Entretanto a maioria dos estudos tem se limitado a calcular o *bias*, sinônimo de erro sistemático, onde se compara a diferença média das amostras hemolisadas em relação ao controle (FLATLAND et al., 2010), no controle estatístico da qualidade o *bias* é usado como a dimensão do erro sistemático (BASQUES, 2009).

Os exames laboratoriais equivalem até 75% das informações pertinentes à decisão na clínica humana (WESTGARD; DARCY, 2004). Para minimizar falhas de diagnóstico, o limite de erro permitido (LEP) preconizado por Tonks (1963) é considerado um importante parâmetro para distinguir se um valor é normal ou anormal, para tanto valores de referência são essenciais para o cálculo dos erros analíticos, em particular para estabelecer o limite de erro permitido (LEP). O LEP estabelece que o limite de variabilidade não pode ultrapassar 25% do intervalo de confiança do método analítico (TONKS, 1963).

LEP - Calculado a partir do intervalo de referência de um parâmetro

$$\frac{\text{Valor Referência } > - \text{Valor de Referência } <}{(\text{Valor de Referência } < + \text{Valor de Referência } >) / 2} \times 25$$

A *Clinical Laboratory Improvement Amendments*, (CLIA 1988), recomenda que o erro sistemático e o erro aleatório não ultrapassem 50% e 25% do erro total aceitável (ETA), baseados em requisitos clínicos (MENDES e ROMANO, 2010), no qual o erro sistemático é a diferença entre o valor encontrado e o valor real, e o erro aleatório refere-se ao erro analítico positivo ou negativo, cuja direção não pode ser confiável e através desses dois erros obtêm-se o erro total aceitável (CLIA, 1988).

O erro relativo expressa valores em porcentagem (%) ou seja, quantos por cento a hemólise causa de alteração em relação à amostra não hemolisada. Assim, o cálculo ocorre pela seguinte fórmula: $(V_h - V_n) / V_n \times 100$, em que V_h corresponde à amostra hemolisada e V_n à amostra não hemolisada (ALMEIDA, 2011). Enquanto para a interpretação do erro relativo usou-se o LEP_c estabelecido em laboratório, com o LEP_L calculado com valores de literatura e o erro total aceitável estabelecido pela *ASVCP Guidelines Allowable Total Error* (HARR et al., 2013).

5 A interferência da hemólise nos biomarcadores de estresse oxidativo

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes do organismo (PEAKE; SUZUKI, 2004), a produção exagerada e contínua de oxidantes consome as defesas antioxidantes, levando ao dano celular (ZAMZAMI et al., 1996). As defesas antioxidantes protegem o organismo das ERO, assim, a ausência ou falha dessa defesa favorece a morte celular (WOLKMER et al., 2009).

A avaliação dos marcadores de estresse oxidativo, se realizada corretamente, pode ser útil para monitorar o estado de várias doenças, bem como avaliar os efeitos sobre o organismo humano (BRAININA et al., 2009). Existem vários métodos para avaliação do estresse oxidativo, sendo necessário utilizar mais de um marcador, pois a alteração de um pode mascarar o resultado do outro parâmetro (CELLI, 2011).

Os estudos sobre as alterações dos marcadores de estresse oxidativo são escassos e contraditórios e o envolvimento desses antioxidantes endógenos tem sido comprovado em algumas infecções em diferentes espécies.

A interferência da hemólise nas amostras bioquímicas de cães na rotina veterinária tem sido investigada (ALMEIDA et al., 2011; JACOBS et al., 1992; O'NEILL; FELDMAN, 1989), mas até o momento não há estudos que tenham avaliado a interferência da hemólise nos biomarcadores de estresse oxidativo.

Sabe-se que diferenças quanto à sensibilidade de equipamentos, manipulação e a maneira que a amostra sofreu a interferência da hemólise (ISMAIL et al., 2005) bem como o tempo para análise, podem causar um comprometimento da amostra (EREL, 2005; 2004; GLICK et al., 1989). Dependendo do método utilizado, a hemólise pode interferir no resultado final aumentando ou diminuindo os resultados de certos testes bioquímicos (LEARD et al., 1990; LASSEN; WEISER, 2007).

Segundo Lippi et al., 2006 a hemólise é quase que indetectável por inspeção visual quando o valor de hemoglobina é inferior a 0,6g/L.

O aumento do ácido úrico devido a hemólise foi anteriormente descrito em humanos (GLICK et al., 1989), equinos e bovinos (ALMEIDA et al., 2011). Yücel e Dalva (1992), relataram que a hemoglobina humana causa decomposição prematura do peróxido de hidrogênio necessário para a reação que quantifica o ácido úrico. Leard et. al. (1990), quantificaram o ácido úrico e albumina no soro de

cães e observaram um aumento nos valores desses marcadores frente à hemólise.

O aumento dos valores de albumina em plasma hemolisado foi relatado em amostras séricas de cães (ALMEIDA et al., 2011; LEARD et al., 1990).

A hemoglobina livre interfere na formação da cor por diazônio na mensuração da bilirrubina sérica (YÜCEL; DALVA, 1992). Entretanto o efeito da hemólise na quantificação de bilirrubina é contraditório. Há relato que concentrações de hemoglobina maior que 0,8g/L geram resultados de bilirrubina sérica falsamente diminuídos (SONNTAG, 1986), porém este efeito inibidor da diazotização causado pela hemólise não foi observado por outros investigadores (O'NEILL; FELDMAN, 1989).

Tanto em cães (ALMEIDA et al., 2011) como em humanos (LIPPI et al., 2006) há relatos de que a hemólise causa diminuição da atividade de GGT sérica na presença de menor concentração de hemoglobina. Almeida et al. (2011), demonstrou que os valores séricos de GGT de equinos aumentou, sugerindo que esse aumento se deve à interferência do pigmento da hemoglobina, enquanto que maiores graus de hemólise levaram à liberação de enzimas proteolíticas e de inibidores intra-eritrocitários os quais afetaram a estabilidade da enzima. Essa interferência é provavelmente causada por sobreposição espectral e por uma reação química entre hemolisado e componentes intraeritrocitários (LIPPI et al., 2006).

A *ASVCP Guidelines Allowable Total Error* (HARR et al., 2013), estabelece o ETA como referência para a maioria dos programas de controle de qualidade dos laboratórios clínicos, entretanto não estabelece estes valores para o TAC e TOC. Também não há valores de referência confiáveis para o TAC e TOC plasmático de cão, há apenas valores de pequenos grupos controles de estudos experimentais (ALMEIDA et al., 2013). Existem até o momento dois relatos de que a hemólise em humanos não interfere na quantificação da TAC plasmática (KAMPA et al., 2002; EREL, 2004) e Brainina et al. (2009), relatam que a TAC sofre alta interferência perante a hemólise, entretanto os três trabalhos existentes não avaliaram o erro causado pela hemólise.

6 Objetivo

Testar a hipótese de que a hemólise interfere no resultado dos marcadores de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, B.F.; ZUCATTO, A.S.; VIEIRA, R.F.C.; SOEIRO, C.S.; VIOL, M.A.; BOMFIM, S.R.M.; CIARLINI, P.C. Efeito da hemólise sobre o perfil bioquímico sérico canino, bovino e equino. **Medicina Veterinária**, v. 5, n. 1, p.12-17, 2011.

BASQUES, J.C. Usando controles no laboratório clínico. **Labtest**, p. 01-54, 2009.

BONINI, P.; PLEBANI, M.; CERIOTTI, F.; RUBOLLI, F. Errors in Laboratory Medicine. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 691–698, 2002.

BRAININA, Kh.Z.; ALYOSHINA, L.V.; GERASIMOVA, E.L.; KAZAKOV, Ya.E.; IVANOVA, A.V.; BEYKIN, B.; BELYAEVA, T.I.; USATOVA, T.I.; KHODOS, M.Ya. New electrochemical method of determining and blood fractions antioxidant activity. **Electroanalysis**, v. 21, n. 3-5, p. 618-624, 2009.

CARRARO, P.; SERVIDIO, G.; PLEBANI, M. Hemolyzed specimens: A reason for rejection or a clinical challenge? **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 306-307, 2000.

CASTRO, A. A. **Revisão sistemática e meta-análise**. 2001. Disponível em: <<http://www.metodologia.org/meta1.PDF> > Acesso em: 11 fev. 2016.

CELI, P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, n. 2, p. 233-240, 2011.

CLIA. Public Law 100-578. **Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988**. Stat 42 USC 201. H.R. 5471, 1988.

CLSI. Hemolysis, Icterus and Lipemia/Turbidity Indices as Indicators of Interference in Clinical Laboratory Analysis. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 32, n. 10, p. 1-14, 2012.

DURAK, I.; KAÇMAZ, M.; ÇİMEN, M.Y.B.; BÜYÜKKOÇAK, Ü.; ÖZTÜRK, S. Blood oxidant/antioxidant status of atherosclerotic patients. **International Journal of Cardiology**, v. 77, p. 293-297, 2001.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 1103-1111, 2005.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generations, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 277-285, 2004.

FLATLAND, B.; FREEMAN, K.P.; FRIEDRICH, K.R.; VAP, L.M.; GETZY, K.M.; EVANS, E.W. ASVCP quality assurance guidelines: control of general analytical factors in veterinary laboratories. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n.3, p. 264-277, 2010.

GKOUMASSI, E.; DIJKSTRA-TIEKSTRA, M.J.; HOENTJEN, D.; WILDT-EGGEN, J. Hemolysis of red blood cells during processing and storage. **Transfusion**, v. 52, p. 489-492, 2012.

GLICK, M.R.; RYDER, K.W.; GLICK, S.J.; WOODS, J.R. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from hospitalized patients. **Clinical Chemistry**, v. 35, p. 837-839, 1989.

HARR, K.E.; FLATLAND, B.; NABITY, M.; FREEMAN, K.P. ASVCP guidelines: allowable total error guidelines for biochemistry. **Veterinary Clinical Pathology**, v.42, p. 424-436, 2013.

HAWKINS, M.G.; KASS, P.H.; ZINKL, J.G.; TELL, L.A. Comparison of biochemical values in serum and plasma, fresh and frozen plasma, and hemolyzed samples from orange-winged Amazon parrots (*Amazona amazonica*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 2, p. 219-225, 2006.

ISMAIL, A.; SHINGLER W.; SENEVIRATNE, J.; BURROWS, G. In vitro and in vivo hemolysis and potassium measurement. **British Medical Journal**, v. 330, p. 949, 2005.

JACOBS, R.M.; LUMSDEN, J.H.; GRIFT, E. Effect of bilirubinemia, hemolysis, and lipemia on clinical chemistry analytes in bovine, canine, equine and feline sera. **Canadian Veterinary Journal**, v. 33, p. 605-608, 1992.

KAMPA, M.; NISTIKAKI, A.; TSAOUSIS, V.; MALIARAKI, N.; NOTAS, G.; CASTANAS, E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. **BMC Clinical Pathology**, v. 2, n. 3, p. 1-16, 2002.

KOSEOGLU, M.; HUR, A.; ATAY, A.; ÇUHADAR, S. Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. **Biochemia Medica**, v. 21, n. 1, p. 79-85, 2011.

LASSEN, E.D.; WEISER, G. Tecnologia laboratorial em Medicina Veterinária. In: THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007, p. 3-36.

LEARD, B.L.; ALSAKER, R.D.; PORTER, W.P.; SOBEL, L.P. The effect of haemolysis on certain canine serum chemistry parameters. **Laboratory Animals**, v. 24, p. 32-35, 1990.

LIPPI, G.; SALVAGNO, G.L.; MONTAGNANA, M.; BROCCO, G.; GUIDI, G.C. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, n. 3, p. 311-316, 2006.

LIPPI, G.; BLANCKEAERT, N.; BONINI, P.; GREEN, S.; KITCHEN, S.; PALICKA, V.; VASSAULT, A.J.; PLEBANI, M. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 6, p. 764–772, 2008.

LIPPI, G.; SALVAGNO, N.B.; GIAVARINA, D.; GREEN, S.; KITCHEN, S.; PALICKA, V.; VASSAULT, A.J.; PLEBANI, M. Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, p. 934-939, 2009.

MARTINO G. D.; STEFANI, A.L.; LIPPI, G.; GAGLIAZZO, L.; MCCORMICK, W.; GABAI, G., BONFANTI, L. The degree of acceptability of swine blood values at increasing levels of hemolysis evaluated through visual inspection versus automated quantification. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 3, p. 306-312, 2015.

MENDES, M.E.; ROMANO, P. **Validação de sistema analítico**. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: Controllab, 2010, p. 119-143.

O'NEILL, S.L.; FELDMAN, B.F. Hemolysis as a Factor in Clinical Chemistry and Hematology of the Dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 18, n. 3, p. 58-68, 1989.

PEAKE, J.; SUZUKI, K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. **Exercise Immunology Review**, v.10, p.129-141, 2004.

SIMUNDIC, A.M.; NIKOLAC, N.; IVANKOVIC, V.; FERENEC-RUZIC, D.; MAGDIC, B.; KVATERNIK, M.; TOPIC, E. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye? **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 11, p. 1361–1365, 2009.

SNYDER, J.A.; ROGERS, M.W.; KING, M.S.; PHILLIPS, J.C.; CHAPMAN, J.F.; HAMMETT-STABLER, C.A. The impact of hemolysis on Ortho-Clinical Diagnostic's Eci and Roche's elecsys immunoassay systems. **Clinica Chimica Acta**, v. 384, p. 181-187, 2004.

SON, J.H.; LEE, S>H.; HONG, S.; PARK, S.; LEE, J.; DICKEY, A.M.; LEE, L.P. Hemolysis-free blood plasma separation. **Lab Chip**, v. 14, p. 2287-2292, 2014.

SONNTAG, O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 24, p. 127-139, 1986.

TELEN, M.J.; KAUFMAN, R.J. The mature erythrocyte. In: GREER, J.P. **Wintrobe's clinical hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, p. 217-247.

THOMAS, L. Haemolysis as influence and interference factor. *Biochimica Clinica*, v. 26, n. 2, p. 95-98, 2002. Disponível em: <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol13no4/130401002.htm>. Acesso em: 05 abril 2016.

TONKS, D.B. A study of accuracy and precision of clinical chemistry determinations in 170 canadian laboratories. **Clinical Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 217-233, 1963.

WESTGARD, J.O.; DARCY, T. The truth about quality: medical usefulness and analytical reliability of laboratory tests. **Clinica Chimica Acta**, v. 346, p. 3-11, 2004.

WOLKMER, P.; DA SILVA, S. A.; TRAESEL, C. K.; PAIM, F. C.; CARGNELUTTI, J. F.; PAGNONCELLI, M.; PICADA, M. E.; MONTEIRO, S. G.; LOPES, S. T. D. A. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 41-46, 2009.

YÜCEL, D.; DALVA, K. Effect of in vitro hemolysis on 25 common biochemical tests. **Clinical Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 575-577, 1992.

ZAMZAMI, N.; MARCCHETTI, P.; CASTEDO, M.; HIRSCH, T.; SUSIN, S.A.; MASSE, B.; KROEMER, G. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. **FEBS Lett**, v. 384, p. 53-57, 1996.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2 - HEMÓLISE INTERFERE NA MENSURAÇÃO DOS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES

L. Morais, A. M. Bosco¹, L. Baptisttiolli¹, R. B. P. Torrecilha¹, T. C. Valadares, D. Hoffmann, P. C. Ciarlini^{1*}

¹ Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Rua Clóvis Pestana, 793, CEP 16050-680, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

*ciarlini@fmva.unesp.br

RESUMO - A mensuração de biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo (BPEO) tem sido largamente empregada para avaliar o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Devido sua função de carrear oxigênio os eritrócitos são ricos em antioxidantes, entretanto os efeitos da hemólise sobre o BPEO de cães são desconhecidos. Considerando que dentre todas as várias fontes de erro analítico, a hemólise é a mais importante na rotina laboratorial, investigamos o efeito da hemólise *in vitro* sobre os principais BPEO de cães. Para tal, amostras de sangue total de 19 cães clinicamente saudáveis foram hemolisadas em diferentes graus por ação mecânica. Amostras controle contendo baixa concentração de hemoglobina (Hb) no plasma foram comparadas com quatro graus de hemólise (<0,36; 0,36-0,60; 0,61-1,0; 1,1-4 g/L Hb). Imediatamente após a hemólise foram mensuradas as concentrações plasmáticas de ácido úrico (AU), albumina, bilirrubina, gama glutamiltransferase (GGT), capacidade antioxidante total (TAC) e concentração de oxidante total (TOC). Os erros relativos causados pelos diferentes graus de hemólises foram calculados e confrontados com o erro total aceitável (ETA) e com limite de erro permitido (LEP) empregados nos programas de controle de qualidade de exames laboratoriais. Foi observado que mesmo pequeno grau de hemólise gera algum erro analítico não aceitável (ETA e/ou LEP) nos biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo mensurados, exceto na bilirrubina. Foi possível concluir que a hemólise é um fator limitante para avaliação do estresse oxidativo sistêmico mensurado no plasma, podendo causar erros que potencialmente comprometem o diagnóstico clínico.

Palavras chaves: antioxidante, bias, erro analítico, hemoglobina, oxidante.

HEMOLYSIS INTERFERE IN THE MEASUREMENT OF BIOMARKERS PLASMATIC OF OXIDATIVE STRESS IN DOGS

ABSTRACT - The measurement of plasma biomarkers of oxidative stress (PBOE) has been widely used to assess the imbalance between oxidants and antioxidants. Due to its function of carrying oxygen red blood cells are rich in antioxidants, however the effects of hemolysis on PBOE dogs are unknown. Whereas among all the various sources of analytical error, hemolysis is the most important in the laboratory routine, we investigated the effect of hemolysis "in vitro" on the main PBOE dogs. For this purpose, whole blood samples from 19 healthy dogs were hemolyzed in different degrees by mechanical action. Control samples containing low concentration of hemoglobin (Hb) levels in plasma were compared with four degrees of hemolysis (<0.36, from 0.36 to 0.60, 0.61 to 1.0, 1.1 to 4 g/L Hb). Immediately after the hemolysis were measured plasma concentrations of uric acid (UA), albumin, bilirubin, gamma glutamyl transferase (GGT), total antioxidant capacity (TAC), and total oxidant concentration (TOC). The relative errors caused by different levels of hemolysis were calculated and compared with the total acceptable error (TAE) and allowed error limit (LEP) employees in quality control programs for laboratory tests. Even if it was observed small degree of hemolysis generates some not acceptable analytical error (TAE and / or LEP) in plasma biomarkers of oxidative stress measured, except in bilirubin. It was concluded that hemolysis is a limiting factor for the assessment of systemic oxidative stress measured in plasma, may cause errors that potentially compromise the clinical diagnosis.

Keywords: analytical error, antioxidant, bias, hemoglobin, oxidant.

1 Introdução

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes do organismo (PEAKE; SUZUKI, 2004), a produção exagerada e contínua de espécies reativas de oxigênio (ERO) consome as defesas antioxidantes, levando ao dano celular (ZAMZAMI et al., 1996). Os antioxidantes impedem a ação das ERO de modo a proteger a integridade e funcionalidade celular (TAVAZZI et al., 2000). A mensuração de biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo tem despertado grande interesse científico, em particular nos estudos sobre doenças associadas com excesso de ERO ou diminuição da capacidade antioxidante (DURAK et al., 2001).

A hemoglobina é a principal proteína que carrega o oxigênio nos eritrócitos, para tal este tipo celular contém um rico sistema antioxidante capaz de evitar lesões oxidativas e consequente hemólise (ÇİMEN BURAK 2008; JOHNSON et al., 2005).

Doenças hemolíticas, colheita e/ou manuseio inadequado das amostras, excesso de pressão na seringa ou no tubo, altas temperaturas, traumas durante a homogeneização ou centrifugação inadequada são as principais causas de hemólise (LASSEN; WEISER, 2007; LIPPI et al., 2011; MARTINO et al., 2015).

A liberação de componentes intraeritrocitários devido a hemólise *in vivo* ou *in vitro* pode levar a erros analíticos por três diferentes mecanismos: 1. Aumento, se a concentração eritrocitária do analito é maior que a do plasma e diminuição se esta condição for inversa; 2. O pigmento da hemoglobina provoca um aumento em sistemas analíticos cujo produto final da reação é mensurado em absorbância com comprimento de onda baixo (300-500 nm) e 3. A hemoglobina pode interferir com certas reações químicas, inibindo a diazotização na determinação da bilirrubina ou alterando o pH em medições contínuas de atividade enzimática (SONNTAG, 1986).

Muitos laboratórios rejeitam as amostras hemolisadas sem critérios, na maioria das vezes tendo como base uma avaliação visual da amostra. Erros analíticos podem ocorrer em alguns parâmetros bioquímicos de amostras com hemólise moderada ou quase indetectável por inspeção visual (hemoglobina sérica menor que 0,6 g/L), de modo que a resposta bastante heterogênea e imprevisível para hemólise em vários parâmetros, impede a adoção de medidas corretivas com base no grau de hemólise visual (LIPPI et al., 2006). Portanto há um consenso de que a detecção da hemólise por inspeção visual é demorada, pouco confiável uma vez que é arbitrária, dificilmente reprodutível, não rastreável e pouco sensível

(SIMUNDIC et al., 2009). O ponto de corte para considerar uma amostra como sendo hemolisada foi fixado em 0,5 g/L de hemoglobina, que é um valor que pode também ser identificado por inspeção visual da amostra (LIPPI et al., 2011). A inspeção visual ainda é empregada na maioria dos laboratórios veterinários que não utilizam sistema de automação capaz de quantificar o índice de hemólise (IH), sendo que nos laboratórios humanos ainda está em fase de padronização e validação do IH para evitar e corrigir os erros (LIPPI et al., 2011; GOYAL; SCHMOTZER, 2015).

O cálculo do erro causado pela hemólise *in vitro* obtido mecanicamente tem sido considerado como mais adequado do que outros protocolos hemolíticos (SONNTAG, 1986). Para quantificar a interferência da hemólise no erro analítico, vários cálculos tem sido empregados, sendo um dos mais comuns o cálculo de interferência da hemoglobina (F), onde o valor da amostra hemolisada (c) é subtraído do valor da mesma amostra não hemolisada (Co) e dividido pelo valor de Co, de modo que valores maiores que 0,1 são considerados relevantes (Sonntag, 1986). O método analítico e a instrumentação podem ter diferentes sensibilidades ao grau de hemólise para determinados analitos (GLICK et al., 1989; YÜCEL; DALVA, 1992). É recomendado que cada laboratório avalie os efeitos da hemólise, uma vez que a interferência varia de acordo com o analisador e o método utilizado (O'NEILL; FELDMAN, 1989).

A hemólise é responsável por 40% a 70% das amostras inadequadas nos laboratórios humanos (LIPPI et al., 2008). Dentre todas as várias fontes de erros, a hemólise é a mais importante na rotina laboratorial (LIPPI et al., 2011). É provável que este viés seja ainda maior nos laboratórios veterinários que diferentemente dos humanos, pois normalmente recebem amostras sanguíneas colhidas e transportadas por terceiros. Não obstante, estudos sobre a interferência da hemólise sobre o perfil bioquímico plasmático de cães utilizado na rotina clínica veterinária foram estudados (O'NEILL; FELDMAN, 1989; JACOBS; LUMSDEN; GRIFT, 1992), porém nenhum desses estudos avaliaram o erro relativo causado pela hemólise. São ainda escassas as informações sobre a interferência da hemólise na mensuração dos biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo, em especial na espécie canina (ALMEIDA et al., 2011).

Neste sentido, nós investigamos o grau de erro analítico causado pela hemólise *in vitro* nos principais antioxidantes plasmáticos, na capacidade antioxidante total e na concentração de oxidantes total do plasma de cães.

2 Material e Métodos

O experimento ocorreu de acordo com os princípios éticos em uso de animais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (Protocolo FOA- N° 2015/00726).

2.1 Seleção dos animais

Foram selecionados 19 cães, sendo machos (n=6) e fêmeas (n=13), de diferentes raças e idade (1 a 5 anos). Todos considerados clinicamente saudáveis, sem alterações no exame físico geral e laboratoriais (hemograma completo e concentração plasmática de albumina, bilirrubina total, ureia, creatinina, colesterol, triglicérides, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA).

Foram excluídos do estudo animais soro positivos para leishmaniose visceral pelo método ELISA (Lima et al., 2003) ou tratados nas últimas 72 horas com qualquer medicação.

2.2 Obtenções de amostras e análises laboratoriais

Após jejum hídrico de 2 horas e jejum alimentar de 8 horas, 10 mL de sangue total foram colhidos de cada animal por punção da veia jugular, sendo que 0,5 mL foram acondicionados em tubo com EDTA-Na (1mg EDTA/mL sangue) para realização do hemograma completo e 9,5 mL acondicionados em tubos heparinizados (10 UI heparina/mL de sangue), (Vacutainer plus plastic Heparin, Becton-Dickson, New Jersey, USA) para realização do perfil bioquímico e marcadores de estresse oxidativo (Ácido úrico, Albumina, Bilirrubina, GGT, TAC, TOC). Parte do sangue heparinizado (4,5 mL) foi centrifugado a 1500xg por 10 min e o plasma obtido destinado para a mensuração do perfil bioquímico plasmático.

O hemograma completo foi determinado com auxílio de contador eletrônico de células sanguíneas (BC-2800 Vet, Mindray, China), sendo a contagem diferencial de leucócitos realizada em esfregaços sanguíneos corados com corante hematológico panótico rápido comercial (Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais- PR).

Todas as análises bioquímicas plasmáticas foram realizadas em analisador bioquímico automatizado (BS 200, Mindray, China), previamente ajustado com calibrador comercial controles níveis I e II (Biosystems, Barcelona, Spain). Utilizando conjunto de reativos comerciais (Biosystems, Barcelona, Spain), foi mensurada a concentração plasmática de ácido úrico pelo método enzimático (uricase/peroxidase); albumina pelo método do verde de bromocresol; ALT e AST pelo método enzimático UV (glutamato desidrogenase); bilirrubina total pelo método sulfanílico diazotado; colesterol pelo método enzimático (colesterol oxidase/peroxidase); creatinina pelo método cinético (picrato alcalino); proteína total plasmática pelo método do biureto; triglicerídeos pelo método do glicerol fosfato oxidase/peroxidase e ureia pelo método enzimático UV (urease/glutamato desidrogenase). Além da quantificação da concentração plasmática dos antioxidantes endógenos (albumina, ácido úrico e bilirrubina total) foi determinada a TAC pelo método de inibição de formação de cátion de ABTS[®] (2,2'-Azino diethyl-bezothiazoline sulfonic acid) descrito por Erel (2004). A TOC no plasma foi mensurada pela reação com ion férrico indicado pelo Laranja de Xilenol, em meio ácido, conforme descrito por Erel (2005). A concentração da hemoglobina plasmática foi quantificada pelo método cianohemoglobina, utilizando reagente comercial (Bioclin - Quibasa Quím. Básica Ltda, Belo Horizonte-MG).

Todas as reações bioquímicas foram processadas em duplicata a 37°C e dentro de duas horas após a obtenção das amostras.

2.3 Ensaio da hemólise mecânica

Para o ensaio de hemólise mecânica, imediatamente após a colheita, utilizando uma pipeta automática, 5 mL de sangue heparinizado de cada um dos 19 cães foram distribuídos em cinco microtubos de polipropileno tipo Eppendorf, sendo 1 mL em cada tubo, identificados como H0, H1, H2, H3 e H5. O momento H4, foi retirado do experimento por não ter alteração da concentração de hemoglobina em relação ao momento H5. Para promover a hemólise, com auxílio de uma agulha

hipodérmica de pequeno calibre (13x0,45 26G 1/2 "INJEX") e seringa de 3mL, o sangue contido no tubo H1 foi aspirado e transferido sob pressão com auxílio de uma agulha hipodérmica de calibre (125x0,8 21Gx1" "SOLIDOR") uma única vez para um microtubo de polipropileno. Este procedimento de aspiração e transferência sob pressão foi repetido duas, três e cinco vezes para se obter diferentes graus de hemólise nas amostras contidas nos tubos H2, H3 e H5 respectivamente. A amostra H0 (Controle) não foi submetida ao procedimento de lise mecânica (Tabela 1). Em seguida as amostras de sangue foram centrifugadas a 1500xg por 10 minutos e o plasma obtido protegido da luz.

Para evitar variações temporais, inter e intraensaios, todas as amostras foram processadas laboratorialmente logo após a obtenção do plasma.

Tabela 1- Protocolo de hemólise mecânica. Concentração de hemoglobina livre no plasma obtida de acordo com número de vezes que as amostras de sangue foram transferidas sob pressão em seringa acoplada à agulha de pequeno calibre

Grau de hemólise	Volume de sangue da amostra (mL)	Quantidade de vezes que o sangue foi transferido sob pressão	Concentração final de hemoglobina contida no plasma (g/L)
H0 (controle)	1.000	0	Não detectável
H1	1.000	1	<0.36
H2	1.000	2	0.36 - 0.60
H3	1.000	3	0.61 - 1.00
H5	1.000	5	1.01 - 4.00

Valores de referência dos biomarcadores de estresse oxidativo plasmáticos de 83 cães do grupo controle para valor de referência, foram obtidos pelo cálculo do intervalo de confiança 95%, para tal os valores *outliers* foram excluídos. Para todos os biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo do grupo controle foi calculado o limite de erro permitido (LEP) estabelecido por Tonks (1963) utilizando a seguinte fórmula: $VR > -VR < / (VR < + VR >) / 2 * 25$, onde VR corresponde ao valor de referência.

Dos diferentes grupos hemolíticos foi calculado o erro relativo (%) utilizando-se a seguinte fórmula: $(V_h - V_n) / V_n * 100$, em que V_h corresponde à amostra hemolisada e V_n à amostra não hemolisada.

2.4 Análise estatística

Todas as variáveis foram testadas quanto à normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Teste Bartlett). O nível de significância das diferenças entre grupos de amostras hemolisadas e o controle foram estimados pelo teste t pareado, sendo consideradas significativas p valor $<0,05$ e erro beta $<0,2$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio de um programa computacional estatístico (GraphPad software, version 5.01, 2007), exceto o poder do teste que foi calculado pelo OpenEpi (Versão 3.01, 2013).

3 Resultados

Os biomarcadores de estresse oxidativo mensurados no grupo controle corresponderam aos valores de normalidade considerados para a espécie canina (Tabela 2), exceto o ácido úrico e TAC plasmático que apresentaram maiores concentrações.

A concentração plasmática de ácido úrico aumentou proporcionalmente ao grau de hemólise, ocorrendo diferenças em baixas concentrações ($<0,36$ g/L) de hemoglobina (Figura 1A). O erro relativo médio na análise do ácido úrico plasmático foi muito superior aos erros totais aceitáveis (ETA) e limite de erro permitido (LEP) de Tonks (1963) para todos os diferentes graus de hemólise (Tabela 2).

A albumina plasmática aumentou significativamente na presença da menor ($<0,36$ g/L) e maior (1,1-4,0 g/L) concentração de hemoglobina (Figura 1B), porém nenhum grau de hemólise superou o valor do ETA (Tabela 2). Já concentrações de hemoglobina maior que 0,36 g/L geraram erros superiores aos limites de erro permitido pela ASVCP (HARR et al., 2013) (LEP_L) para albumina (Tabela 2). Diferentemente, o erro relativo médio da albumina plasmática em todos diferentes graus de hemólise ultrapassou o LEP_C calculado com os valores de referência do próprio laboratório (Tabela 2).

A hemólise não causou alteração significativa na concentração plasmática de bilirrubina (Figura 1C), sendo que o erro relativo calculado não superou o ETA e o LEP (Tabela 2).

Na presença de concentrações de 0,36-1,0 g/L de hemoglobina, a atividade de GGT plasmática diminuiu significativamente (Figura 1D). Em todos os graus de hemólise o erro relativo médio referente à GGT foi superior ao ETA e LEP considerada para espécie (Tabela 2).

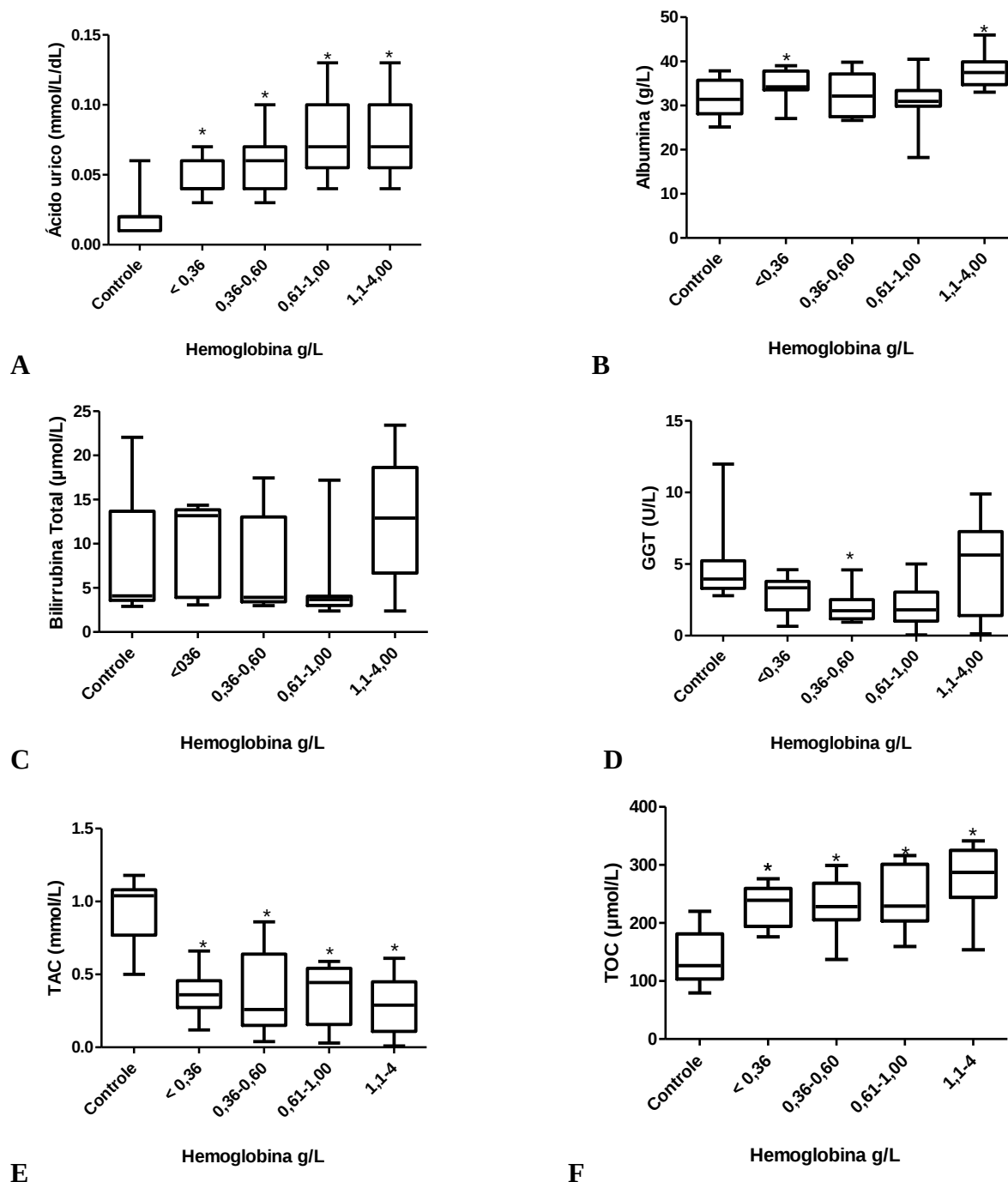


FIGURA 1 - *Boxplot* dos marcadores de estresse oxidativo plasmático de cães. Comparação de amostras não hemolisadas (controle) e os diferentes graus de hemólise. Ácido Úrico (A), Albumina (B), Bilirrubina (C), Gamaglutamiltransferase (GGT) (D), Capacidade Antioxidante Total (E) e Capacidade Oxidante Total (TOC). Os valores para o primeiro quartil, mediana e terceiro quartil são indicados em cada caixa, e as barras fora da caixa indicam valores mínimos e máximos). * indica diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$).

Mesmo pequenas concentrações de hemoglobina (<0,36 g/L) promovem uma diminuição significativa da TAC plasmática (Figura 1C) e todos os graus de hemólises causaram erro relativo médio superior ao ETA e LEP considerada para espécie (Tabela 2).

A hemólise não detectável visualmente (<0,36 g/L) promoveu um aumento significativo da TOC plasmática (Figura 1D) e todos os graus de hemólise causaram erro relativo médio superior ao LEP estimado para a espécie (Tabela 2).

Tabela 2- Valores médios e desvios padrão do grupo controle, valores de normalidade calculado (VN_C) e de literatura (VN_L), média do erro relativo de acordo com a concentração de hemoglobina livre (Hb), erro total aceitável (ETA), limite de erro Permitido de Tonks calculado (LEP_C) e de literatura (LEP_L) de diferentes marcadores de estresse oxidativo plasmático de cães

	Ácido Úrico (mmol/L)	Albumina (g/L)	Bilirrubina total (μ mol/L)	GGT (UI)	TAC (mmol/L)	TOC (μ mol/L)
Controle	0,38 $\pm$ 0,23	32,08 $\pm$ 3,65	0,29 $\pm$ 0,22	5,27 $\pm$ 2,23	0,69 $\pm$ 0,3	113,65 $\pm$ 55,61
VN_C	0,32-0,43	31,22-32,93	0,22-0,35	4,93-5,99	0,59-0,77	97,36-129,93
VN_L	0-0,12 ^{*1}	26 - 33 ^{*1}	1,71-8,55 ^{*1}	1,2-6,4 ^{*1}	0,9 ^{*2}	200 ^{*2}
Erro relativo						
Hb<0,36 g/L	287,25%	4,41%	2,04%	-34,70%	-51,08%	79,73%
Hb 0,36-0,60 g/L	281,69%	7,61%	3,57%	-42,83%	-63,23%	80,28%
Hb 0,61-1,0 g/L	248,94%	6,22%	-2,41%	-47,60%	-65,06%	69,36%
Hb 1,1-4,0 g/L	636,76%	9,92%	-0,55%	-20,32%	-64,73%	130,30%
ETA^{*3}	10%	15%	30%	20%	*NR	*NR
LEP_C	4,95%	0,89%	8,3%	3,32%	4,52%	5,01%
LEP_L	50%	5,9%	33,33%	34,21%	26,97%	19,76%

VN_C : Intervalo de confiança (95%) do grupo controle; **VN_L ^{*1}** KANEKO, et al. (2008) e **^{*2}** ALMEIDA et al. (2013); **^{*3} ETA** HARR et al. (2013); ***NR:** não relatados.

4 Discussão

Para um adequado controle de qualidade de um sistema analítico é essencial ter valores de referência específicos para cada espécie (JACOBS et al., 1992), preferencialmente obtidos com a mesma metodologia, reagentes e equipamentos

(OLIVEIRA; MENDES, 2010). Embora existam valores de referência para o perfil bioquímico de cães (KANEKO et al., 2008), estes foram determinados, utilizando conjunto de reagentes e equipamentos diferentes do empregado no presente estudo. Valores plasmáticos de TAC e TOC utilizando a mesma metodologia e equipamento são restritos a estudos experimentais com pequeno tamanho amostral (ALMEIDA et al., 2013). Os valores de normalidade dos biomarcadores de estresse oxidativo estabelecidos no presente estudo foram similares e apresentaram menor amplitude que os descritos na literatura (ALMEIDA et al., 2013; BOSCO et al., 2016), exceto o ácido úrico. Esta diferença quanto ao valor médio de ácido úrico e o intervalo de confiança de todos biomarcadores de estresse oxidativo reforça a orientação de que cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência para adequada interpretação e controle de qualidade.

Valores de referência também são essenciais para o cálculo dos erros analíticos, em particular para estabelecer o limite de erro permitido (LEP) que é considerado um importante parâmetro para distinguir se um valor é normal ou anormal. O LEP preconizado por Tonks (1963), estabelece que o limite de variabilidade não pode ultrapassar 25% do intervalo de confiança do método analítico. A *Clinical Laboratory Improvement Amendments*, (CLIA, 1988), de modo similar, recomenda que o erro sistemático e o erro aleatório não ultrapassem 50% e 25% do erro total aceitável (ETA) baseados em requisitos clínicos (MENDES e ROMANO, 2010).

Os exames laboratoriais são responsáveis por 65% a 75% das informações pertinentes à decisão médica humana (WESTGARD; DARCY, 2004), sendo a hemólise a principal fonte de erro analítico (LIPPI et al., 2008). Não obstante, estudos sobre a interferência da hemólise sobre marcadores de estresse oxidativo na espécie canina são escassos e nenhum levou em consideração o LEP. Para melhor interpretação do erro relativo causado pela hemólise em cães, nós confrontamos o LEP estabelecido em nosso laboratório, com o LEP calculada com valores de literatura e o ETA estabelecido pela *ASVCP Guidelines Allowable Total Error* (HARR et al., 2013).

O aumento do ácido úrico devido a hemólise foi anteriormente descrita em humanos (GLICK et al., 1989), equinos e bovinos (ALMEIDA et al., 2011), porém há relato que a hemoglobina humana causa decomposição prematura do peróxido de hidrogênio necessário para a reação que quantifica o ácido úrico (YÜCEL; DALVA,

1992). Nós observamos que em cães a concentração plasmática de ácido úrico aumenta proporcionalmente ao grau de hemólise, gerando um erro relativo médio muito superior ao ETA admitido pela *ASVCP Guidelines Allowable Total Error* (HARR et al., 2013) e ao LEP'_s . Estes resultados são concordantes a maioria dos estudos realizados em outras espécies e acrescenta que tal interferência compromete a interpretação clínica dos resultados de ácido úrico plasmático canino.

Acredita-se que o erro analítico na mensuração da albumina sérica canina varie não só com o grau de hemólise, como também com a metodologia e equipamento utilizado na mensuração (O'NEILL; FELDMAN, 1989). O aumento dos valores de albumina em plasma hemolisado observado neste estudo já havia sido relatado em amostras séricas de cães (LEARD et al., 1990; ALMEIDA et al., 2011) e humanos (KOSEOGLU et al., 2011). Nós observamos que nenhum grau de hemólise superou o ETA aceito pela *ASVCP* (HARR et al., 2013) para albumina, porém o erro relativo médio da albumina plasmática em todos diferentes graus de hemólise ultrapassaram o LEP_C calculado com os valores de referência do próprio laboratório e o mesmo ocorreu em relação ao LEP_L estimado da literatura quando as concentrações maior ou igual a 0,36 g/L de hemoglobina. Estes resultados confirmam que a decisão de rejeição de uma amostra hemolisada pode variar com o critério adotado (ETA ou LEP). Fica evidente que o LEP estabelecido pelo próprio laboratório para albumina e os outros biomarcadores mensurados neste estudo é muito mais exigente que os demais (ETA e LEP_L), gerando maior número de amostras rejeitadas. Isto se deve ao fato que o LEP_C reflete com maior precisão as condições analíticas, sendo portanto, um critério ideal para estudos investigativos, porém rigoroso demais para o controle de qualidade de exames laboratoriais de rotina.

A bilirrubina total plasmática de cães apresenta valores baixos na presença de concentração de hemoglobina até 1mg/L. Esta diminuição também foi observada em todas as frações de bilirrubina (total, conjugada e não conjugada). É sabido que a hemoglobina livre interfere na formação da cor por diazônio na mensuração da bilirrubina sérica (KOSEOGLU et al., 2011; YÜCEL; DALVA, 1992;). Entretanto o efeito da hemólise na quantificação de bilirrubina é contraditória. Há relato que concentrações de hemoglobina maior que 0,8g/L gera resultados de bilirrubina sérica falsamente diminuídos (SONNTAG, 1986), porém este efeito inibidor da diazotização causado pela hemólise não foi observado por outros investigadores

(O'NEILL; FELDMAN, 1989). Em cães, nós também não encontramos diferenças significativas na concentração de bilirrubina em amostras com diferentes graus de hemólise e o erro relativo médio foi muito menor que o ETA e LEP utilizados para rejeição de resultados.

Tanto em cães (ALMEIDA et al., 2011) como em humanos (KOSEOGLU et al., 2011; LIPPI et al., 2006) há relatos de que a hemólise causa diminuição da atividade de GGT sérica. Nós confirmamos que mesmo um pequeno grau de hemólise não detectável visualmente diminui a atividade de GGT plasmática, causando erro relativo maior que o permitido (LEP).

ASVCP Guidelines Allowable Total Error (HARR et al., 2013), estabelece o ETA como referência para a maioria dos programas de controle de qualidade dos laboratórios clínicos, entretanto não estabelece estes valores para TAC e TOC. Também não encontramos valores de referência confiáveis para o TAC e TOC plasmático de cão, há apenas valores de pequenos grupos controles de estudos experimentais (ALMEIDA et al., 2013). Há apenas dois relatos de que a hemólise em humanos não interfere na quantificação da TAC plasmática (KAMPA et al., 2002; EREL, 2004). Nós constatamos que pequenas concentrações de hemoglobina (<0,36 g/L) causam diminuição da TAC plasmática de cães e erro relativo maior que o LEP. O eritrócito é uma célula transportadora de oxigênio e detém um rico sistema para evitar lesão oxidativa (TEDESCO et al., 2000), portanto nós hipotetizamos inicialmente que após a hemólise a liberação dos antioxidantes intraeritrocitários seriam potencialmente responsáveis por um aumento do TAC plasmático. Portanto, é razoável supor que neste caso a fonte do erro não esteja relacionada ao acréscimo de antioxidante e do pigmento hemoglobínico, mas à alguma inibição da reação entre os antioxidantes e o ABTS utilizado no método de Erel (2004), provavelmente uma alteração de pH. Podemos ainda especular que o efeito oxidativo causado pela hemólise tenha sido predominante, uma vez que mesmo pequeno grau hemolítico causou aumento significativo da TOC plasmática, gerando erros ainda maiores em relação ao LEP.

O emprego dos resultados do presente estudo deve ser limitado aos casos de hemólise mecânica *in vitro* e não outros tipos, como as doenças hemolíticas. Portanto, os erros calculados podem ser considerados para a maioria dos casos de hemólise observada na rotina laboratorial uma vez que reproduz a lise mecânica, principal causa de rejeição de amostra (ALMEIDA et al., 2011).

Neste estudo foi confirmado que mesmo um pequeno grau de hemólise gera algum erro analítico não aceitável (ETA e ou LEP) em todos os biomarcadores plasmático de estresse oxidativo mensurados, exceto a bilirrubina.

5 Conclusão

A hemólise é um importante fator que limita a avaliação do estresse oxidativo sistêmico mensurado no plasma, podendo causar erros que potencialmente comprometem o diagnóstico clínico.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B.F.; NARCISO, L.G.; MELO, L.M.; PREVE, P.P.; BOSCO, A.M.; LIMA, V.M.; CIARLINI, P.C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal** v. 198, p. 599-605, 2013.

ALMEIDA, B.F.; ZUCATTO, A.S.; VIEIRA, R.F.C.; SOEIRO, C.S.; VIOL, M.A.; BOMFIM, S.R.M.; CIARLINI, P.C. Efeito da hemólise sobre o perfil bioquímico sérico canino, bovino e equino. **Medicina Veterinária**, v. 5, n. 1, p.12-17, 2011.

BOSCO, B.M.; PEREIRA, P.P.; ALMEIDA, B.F.M.; NARCISO, G.L.; SANTOS, D.B.; NETO, A.J.S.; FERREIRA, W.L.; CIARLINI, P.C. Free p-Cresol alters neutrophil function in dogs. **International Center for Artificial Organs and Transplantation and Wiley Periodicals**, p. 1-9, 2016.

CLIA. Public Law 100-578. **Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988**. Stat 42 USC 201. H.R. 5471, 1988.

ÇİMEN BURAK, M.Y. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, p. 1-11, 2008.

DURAK, I.; KAÇMAZ, M.; ÇİMEN, M.Y.B.; BÜYÜKKOÇAK, Ü.; ÖZTÜRK, S. Blood oxidant/antioxidant status of atherosclerotic patients. **International Journal of Cardiology**, v. 77, p. 293-297, 2001.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generations, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 277-285, 2004.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 1103-1111, 2005.

GLICK, M.R.; RYDER, K.W.; GLICK, S.J.; WOODS, J.R. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from hospitalized patients. **Clinical Chemistry**, v. 35, p. 837-839, 1989.

GOYAL, T.; SCHMOTZER, C.L. Validation of Hemolysis Index Thresholds Optimizes Detection of Clinically Significant Hemolysis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 143, p. 579-583, 2015.

HARR, K.E; FLATLAND, B.; NABITY, M.; FREEMAN, K.P. ASVCP guidelines: allowable total error guidelines for biochemistry. **Veterinary Clinical Pathology**, v.42, p. 424-436, 2013.

JACOBS, R.M.; LUMSDEN, J.H.; GRIFT, E. Effect of bilirubinemia, hemolysis, and lipemia on clinical chemistry analytes in bovine, canine, equine and feline sera. **Canadian Veterinary Journal**, v. 33, p. 605-608, 1992.

JOHNSON, R.M.; JR., G.G.; RAVINDRANATH, Y.; HO, Y. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 1407-1417, 2005.

KAMPA, M.; NISTIKAKI, A.; TSAOUSIS, V.; MALIARAKI, N.; NOTAS, G.; CASTANAS, E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. **BMC Clinical Pathology**, v. 2, n. 3, p. 1-16, 2002.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Ed.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego. Academic press, 2008.

KOSEOGLU, M.; HUR, A.; ATAY, A.; ÇUHADAR, S. Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. **Biochemia Medica**, v. 21, n. 1, p. 79-85, 2011.

LASSEN, E.D.; WEISER, G. Tecnologia laboratorial em Medicina Veterinária. In: THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007, p. 3-36.

LEARD, B.L.; ALSAKER, R.D.; PORTER, W.P.; SOBEL, L.P. The effect of haemolysis on certain canine serum chemistry parameters. **Laboratory Animals**, v. 24, p. 32-35, 1990.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 485-489, 2003.

LIPPI, G.; SALVAGNO, G.L.; MONTAGNANA, M.; BROCCO, G.; GUIDI, G.C. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, n. 3, p. 311-316, 2006.

LIPPI, G.; BLANCKEAERT, N.; BONINI, P.; GREEN, S.; KITCHEN, S.; PALICKA, V.; VASSAULT, A.J.; PLEBANI, M. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 6, p. 764-772, 2008.

LIPPI, M.; PLEBANI, S.D.; CERVELLIN, G. Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 48, n. 3, p. 143-153, 2011.

MARTINO G. D.; STEFANI, A.L.; LIPPI, G.; GAGLIAZZO, L.; MCCORMICK, W.; GABAI, G.; BONFANTI, L. The degree of acceptability of swine blood values at increasing levels of hemolysis evaluated through visual inspection versus automated quantification. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 3, p. 306-312, 2015.

MENDES, M.E.; ROMANO, P. Validação de sistema analítico. Gestão da Fase Analítica do Laboratório: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: **ControlLab**, p. 119-143, 2010.

OLIVEIRA, C.A.; MENDES, M.A. Gestão da Fase Analítica do Laboratório como assegurar a qualidade na prática. **ControlLab**, v. 1, p. 1-146, 2010.

O'NEILL, S.L.; FELDMAN, B.F. Hemolysis as a Factor in Clinical Chemistry and Hematology of the Dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 18, n. 3, p. 58-68, 1989.

PEAKE, J.; SUZUKI, K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. **Exercise Immunology Review**, v.10, p.129-141, 2004.

SIMUNDIC, A.M.; NIKOLAC, N.; IVANKOVIC, V.; FERENEC-RUZIC, D.; MAGDIC, B.; KVATERNIK, M.; TOPIC, E. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye? **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 11, p. 1361–1365, 2009.

SONNTAG, O. Haemolysis as an Interference Factor in Clinical Chemistry. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 24, p. 127-139, 1986.

TAVAZZI, B.; PIERRO, D.D.; AMORINI, A.M.; FAZZINA, G.; TUTTOBENE, M.; GIARDINA, B.; LAZZARINO, G. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 684-689, 2000.

TEDESCO, I.; RUSSO, M.; RUSSO, P.; IACOMINO, G.; RUSSO, G.L.; CARRATURA, A.; FARUOLO, C.; MOIO, L.; PALUMBO, R. Antioxidant effect of red

wine polyphenols on red blood cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 114-119, 2000.

TONKS, D.B. A study of accuracy and precision of clinical chemistry determinations in 170 canadian laboratories. **Clinical Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 217-233, 1963.

WESTGARD, J.O.; DARCY, T. The truth about quality: medical usefulness and analytical reability of laboratory tests. **Clinica Chimica Acta**, v. 346, p. 3-11, 2004.

YÜCEL, D.; DALVA, K. Effect of in vitro hemolysis on 25 common biochemical testes. **Clinical Chemistry, Washington**, v. 38, n. 4, p. 575-577, 1992.

ZAMZAMI, N; MARCCHETTI, P.; CASTEDO, M.; HIRSCH, T.; SUSIN, S.A.; MASSE, B.; KROEMER, G. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. **FEBS Lett**, v. 384, p. 53-57, 1996.