

# EFEITO DO CONGELAMENTO E DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DO SORO SANGUÍNEO DE CÃES NA DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

## *EFFECT OF FREEZING AND STORAGE TIME OF BLOOD SERUM OF DOGS FOR THE DETERMINATION OF BIOCHEMICAL PARAMETERS*

Giselle Sanches PINELI<sup>1</sup>; Rodrigo Prevedello FRANCO<sup>2</sup>; Tatiana de Sousa BARBOSA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Marília (UNIMAR) / Programa de Residência em Medicina Veterinária;

<sup>2</sup>UNIMAR/ Docente em Medicina Veterinária; <sup>3</sup>Universidade de Vila Velha (UVV) / Docente em Medicina Veterinária. vetrpf@yahoo.com.br

---

### RESUMO

Com o propósito de avaliar o efeito do congelamento e o tempo de armazenamento do soro sanguíneo de cães na determinação de parâmetros bioquímicos, foi utilizado neste trabalho um *pool* de amostras de soro sanguíneo de 32 cães, que foram congeladas a -20°C e armazenadas em pequenas alíquotas por até 180 dias. Todos os animais foram provenientes do atendimento do Hospital Veterinário da Universidade de Marília-UNIMAR, Marília-SP e as amostras foram processadas no Laboratório de Patologia Clínica. As alíquotas foram analisadas nos dias 0, 20°, 30°, 45°, 60°, 90°, 120° e 180° e os parâmetros determinados foram ureia, creatinina, colesterol, albumina, ALT, GGT e FA. Os resultados permitiram concluir que todos os parâmetros analisados permaneceram estáveis, exceto o GGT, que foi o que mais variou durante todo o tempo e temperatura analisados.

Palavras-chave: Cães. Estabilidade do Soro. Tempo de Armazenamento.

---

### ABSTRACT

*With the purpose of assessing the effect of freezing and storage time of blood serum of dogs in determining the biochemical parameters, this work was carried out in the laboratory of clinical pathology at the veterinary hospital of UNIMAR – University of Marília – in the state of São Paulo. In this study a pool of samples obtained from 32 dogs was used, and these samples were frozen until they reached 20 degrees, and they were stored in small aliquots up to 180 days. These aliquots were analyzed on days 0, 20, 30, 45, 60, 90, 120 and 180, and the analyzed parameters were urea, creatinine, cholesterol, albumin, ALT, GGT and FA. The results showed that all the analyzed parameters remained stable, except the GGT, which was the most unstable throughout time and temperature analyzed.*

*Keywords: Dogs. Serum stability. Storage time.*

---

## INTRODUÇÃO

Na prática da clínica veterinária a bioquímica do sangue é um valioso aliado no auxílio do diagnóstico e acompanhamento terapêutico (SILVEIRA, 1988). As determinações bioquímicas no sangue podem incluir a mensuração de qualquer uma das diversas substâncias encontradas no plasma sanguíneo, como ureia, proteínas plasmáticas totais e albumina e as enzimas fosfatase alcalina (FA) e alanina aminotransferase (ALT), que são geralmente as mais utilizadas para a mensuração (BUSH, 2004).

Desde o nascimento até a idade madura os constituintes bioquímicos variam significativamente, nos quais os processos adaptativos do organismo no metabolismo energético, proteico e mineral são empregados como indicador no perfil bioquímico, oferecendo interpretação do funcionamento hepático, renal, pancreático, ósseo, muscular, cardíaco, do sistema nervoso e trato gastrointestinal (GONZÁLES e SILVA 2003; BENESI *et al.*, 2009). Consideram-se fatores de variabilidade que influenciam na análise bioquímica a espécie animal, a raça, o sexo, a idade e o manejo (BENESI *et al.*, 2009), assim como as variações no estado reprodutivo, os processos patofisiológicos, o estresse, a hidratação, a dieta, a utilização de drogas, a coleta da amostra e sua manipulação (MEYER, 1995; KANEKO *et al.*, 1998). Logo após a coleta e processamento da amostra com a retração do coágulo a temperatura ambiente, o soro obtido deve ser analisado rapidamente no espectrofotômetro. Caso haja necessidade de armazenamento por um período mais prolongado, o soro deve ser congelado e armazenado em temperatura de -70°C (THRALL, 2006).

Em análises clínicas o congelamento é utilizado na tentativa de evitar a degradação da amostra. As influências do tempo e da temperatura adequada são essenciais para se obter uma correta interpretação dos compostos do sangue. Por esse motivo essa questão precisa ser avaliada, pois a maneira na qual as amostras são armazenadas será relevante no resultado final (SPINELLI *et al.*, 2012). De tal maneira que resultados inconsistentes ou conclusões equivocadas no diagnóstico e prognóstico das suspeitas clínicas devem ser evitados (DEVANAPALLI *et al.*, 2002).

Fernandes *et al.* (2001), em seu estudo realizado com soro e plasma canino, verificaram que a ureia se conserva por mais tempo na amostra sérica refrigerada por até 30 dias, enquanto que a creatinina permaneceu instável durante o congelamento por até 72h. O soro apresentou ser mais estável que o plasma em todas as condições de estoque estabelecida.

Enquanto que no estudo de Oliveira *et al.* (2011), realizado em cordeiros, constatou-se que o tempo de armazenamento das amostras congeladas a -20°C causou alterações nos resultados para as análises de proteína total, fósforo e magnésio, e ao dosar as determinações séricas de AST, colesterol e ureia não diferiram estatisticamente nos diferentes tempos de armazenamento.

Com o intuito de verificar a estabilidade do soro sanguíneo de cães, este trabalho teve como objetivo analisar a influência do tempo de congelamento na determinação de parâmetros bioquímicos da ureia, creatinina, colesterol, albumina, alanina aminotransferase (ALT), gama- glutamil-transferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA).

## MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade de Marília – UNIMAR – na cidade de Marília-SP. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em uso animal da Universidade de Marília-SP (CEUA-Unimar), onde foi analisado e aprovado com o protocolo nº 96.

Utilizou-se um *pool* de amostras de soro sanguíneo de 32 cães, que foram coletadas sem anticoagulante e centrifugadas imediatamente após colheita com a retração do coágulo a temperatura ambiente.

A primeira amostra após o processamento foi analisada e utilizada como tempo controle (dia 0). O restante das amostras foi acondicionada em pequenas alíquotas em tubos eppendorffs, congelados e armazenados no freezer a -20°C até o processamento das amostras nos dias 20°, 30°, 45°, 60°, 90°, 120° e 180° para a análise dos parâmetros séricos de ureia, creatinina, colesterol, albumina, ALT, GGT e FA.

As amostras para cada dia analisado foram misturadas, escolhidas aleatoriamente e descongeladas a temperatura ambiente. Utilizaram-se *kits* comerciais da Labtest e as análises laboratoriais foram determinadas em um analisador bioquímico semiautomático (BIOPLUS 200 ®). Os dados obtidos foram analisados observando-se, assim, suas variâncias e as médias comparadas. Foram testadas quanto ao teste de normalidade para comparar os tempos. As análises foram efetuadas empregando-se o programa computacional Graf Pad.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada constituinte bioquímico sanguíneo analisado os valores médios obtidos estão demonstrados na tabela 1 nos determinados tempos de conservação.

Tabela 1 – Constituinte bioquímico sanguíneo analisado e seus valores médios nos determinados tempos de conservação.

	<b>ALBUMINA</b>	<b>ALT</b>	<b>GGT</b>	<b>FA</b>	<b>CREAT- k</b>	<b>UREIA</b>	<b>COLES TEROL</b>
	(g/dl)	(UI/L)	(U/I)	(U/I)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
<b>dia 0</b>	<b>2,1</b>	<b>41,0</b>	<b>7,0</b>	<b>107,0</b>	<b>2,7</b>	<b>69,0</b>	<b>161,0</b>
<b>20° dia</b>	<b>1,8</b>	<b>36,0</b>	<b>7,0</b>	<b>74,0</b>	<b>1,8</b>	<b>93,0</b>	<b>264,0</b>
<b>30° dia</b>	<b>2,0</b>	<b>36,0</b>	<b>7,0</b>	<b>99,0</b>	<b>2,1</b>	<b>84,5</b>	<b>232,5</b>
<b>45° dia</b>	<b>2,4</b>	<b>41,0</b>	<b>7,0</b>	<b>111,5</b>	<b>2,0</b>	<b>97,5</b>	<b>151,0</b>
<b>60° dia</b>	<b>2,9</b>	<b>24,0</b>	<b>15,0</b>	<b>115,6</b>	<b>2,3</b>	<b>73,5</b>	<b>206,5</b>
<b>90° dia</b>	<b>2,2</b>	<b>54,0</b>	<b>7,0</b>	<b>82,0</b>	<b>2,0</b>	<b>85,0</b>	<b>220,5</b>
<b>120° dia</b>	<b>2,2</b>	<b>52,0</b>	<b>7,0</b>	<b>91,0</b>	<b>1,2</b>	<b>84,0</b>	<b>243,0</b>
<b>180° dia</b>	<b>2,2</b>	<b>57,0</b>	<b>7,0</b>	<b>74,0</b>	<b>2,0</b>	<b>84,0</b>	<b>194,0</b>

De acordo com os valores obtidos até o 180° dia não houve diferenças da albumina nas amostras de soro congeladas a -20°C, observadas também nos estudos de Davy *et al.* (1984), nos quais a albumina se apresentou estável por 48 horas e em 24 horas somente sob refrigeração, no plasma de sagui. Wittwer *et al.* (1986) concluíram que não houve variações significativas a 4° e 0°C por até 72 horas no soro de bovinos. E também no trabalho de Bordignon *et al.* (1995) não se detectou qualquer alteração quanto ao tempo de congelamento de -20° que foram comparados em suínos. Diferentemente de Comis (2006), que conclui que a albumina nas amostras congeladas a -20° C no 180° dia de armazenagem mostraram diferenças entre os valores nos 60° e 90° dias em equinos.

Para a ALT não houve alteração na estabilidade até o 180° dia analisado, assim como Rosato (2007) concluiu em seu estudo que a atividade sérica de ALT não sofreu alteração significativa até o 90° dia de estocagem a 25°C e 30 dias a 4°C em cães.

Já na análise da enzima GGT houve alterações significantes nos tempos de armazenagem sob congelamento até o 180° dia. No estudo de Comis (2006), para os tempos 0, 12, 24, 36, 48 horas e 7, 15, 30, 60, 180 dias em temperaturas de -20°C e -76°C, respectivamente, nenhuma variação foi encontrada em equinos.

A fosfatase alcalina, no presente estudo, demonstra-se estável à temperatura de congelamento de -20° C até o 180° dia analisado, que se opõe aos resultados obtidos por Doretto (1996); Mundim (2004) e Comis (2006) a -20°C até o 180° dia. Já Hanok e Kuo (1968) encontraram estabilidade nas amostras mantidas por até 38 dias de conservação no soro sanguíneo humano.

Nas amostras séricas da creatinina no trabalho de Fernandes et al. (2001), sob congelamento a -20°C, os valores foram diferentes a partir de 30 dias em cães que se contrapõem no presente trabalho, que se manteve estável a -20°C por 180 dias.

A análise da estabilidade da ureia no presente estudo até o 180° dia sob congelamento de -20°C apresentou um aumento, porém não significante. No estudo de Fernandes et al. (2001), que utilizaram soro mantido a -20°C por até 60 dias para a espécie canina, assim como Wittwer (1986), em que o soro foi mantido A -25°C por 12 meses e também Doretto (1996), em soro mantido entre -5° e -25°C por 90 dias, mantiveram-se estáveis em bovinos.

O **PAREI AQUI** colesterol não apresentou diferença significativa no estudo de Oliveira (2001), sob armazenagem a -20° C em 28 dias, em cordeiros. Confirmando a estabilidade do colesterol neste trabalho até 180° dia analisado também observado no trabalho de Spinelli (2012), na qual as amostras plasmáticas de rato permaneceram estáveis em todas as condições de estoque estabelecidas. Thorensen et al. (1995), verificaram instabilidade na amostra de cães mantidas a -20° C e -70° C.

## CONCLUSÃO

A influência do tempo de congelamento do soro sanguíneo de cães na determinação de parâmetros bioquímicos nos permitiu concluir que a atividade sérica da albumina, ALT, FA, ureia, creatinina e colesterol foram os que mais se mantiveram estáveis durante os tempos analisados. Já a atividade sérica do GGT, foi o que mais variou durante todo o tempo e temperatura analisados.

## REFERÊNCIAS

AHSAN, S.; AFZAL, M.; AKHTAR, S. Effect of Storage on Some constituents of Camel Serum. *Australian Veterinary Journal*, v.72, p.212-5, 1995.

BENESI, F. J. *et al.* Perfil bioquímico de algumas enzimas no plasma sanguíneo de potras da raça Brasileiro de Hipismo (BH) criadas em Colina, Estado de São Paulo. *Brazilian Journal of veterinary Research Animal Science*, São Paulo, v.46, n. 4 , p. 288-295, 2009.

BORDIGNON, L. A. F. *et al.* Concentração de metabólitos do soro sanguíneo de suínos armazenado em diferentes temperaturas e períodos. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 1995. v. 2, p. 168.

BUSH, B.M. *Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais*. São Paulo: Editora Roca, 2004. p. 7.

COMIS, M. B. *Influência do tempo e temperatura sobre a estabilidade do soro e plasma sanguíneos de equinos Mangalarga Marchador*. 2006. Tese (Dissertação Pós- Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

DAVY, C. W.; JACKSON, M. R.; WALKER, M. J. Stabilities of Some Constituents of Marmoset (*Callithrix jacchus*) Plasma under Various Conditions of Storage. *Clinical Chemistry*, v.30, n. 1, 101-104, 1984.

DEVANAPALLI, B.; BERMINGHAM, M. A.; MAHAJAN, D. Effect on long-term storage at -80 C on the various lipid parameters in stored plasma samples. *Clín. Chen Acta*, v.3, n. 322, p. 179-181, 2002.

DORETTO, J. S. *Influência do tempo e da temperatura de armazenagem sobre a estabilidade de alguns constituintes do soro sanguíneo de bovinos*. 1996. 49f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 1996.

EHSANI, A. *et al.* Serum constituent's analyses in dairy cows: effects of duration and temperature of the storage of clotted blood. *Research in Veterinary science*, Bridgewater, v. 85, n.3, p. 473-475, 2008.

FERNANDES, S. T.; TEIXEIRA, M. N.; SANTOS, E. S. Influência da temperatura e do tempo de armazenamento nas dosagens bioquímicas de ureia e creatinina em soro ou plasma caninos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.53, n.6, p. 717-721, 2008.

GONZÁLEZ, F. H. D; SILVA, S. C. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. Porto Alegre: UFRGS, 2003. P. 198.

HANOK, A.; KUO, J. The Stability of a reconstituted serum for the assay of fifteen chemical constituents. *Clín. Chen*, v.14, n.1, p. 58-59, 1968.

HOWARD, D. L. *et al.* Proteína total, albumina e globulinas no plasma de potras sadias da raça brasileiro de hipismo em crescimento. *Ars Veterinária. Jaboticabal*, SP, v.24, n.2, 077-082, 2008.

KANEKO, J.J; HARVEY, J. W; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, 932p.

LOPES, S. T.; BIONDO A. W; SANTOS, A. P. *Manual de Patologia Clínica Veterinária*. 3. ed. Santa Maria, 2007.

MEYER, D. J; COLESE. H.; RICH, L. J. *Medicina de Laboratório Veterinária: Interpretação e Diagnóstico*. São Paulo: Editora Roca, 1995, p.5.

OLIVEIRA, F.S. *et al.* Efeito do congelamento e do tempo de armazenamento do soro sanguíneo de cordeiros na determinação de parâmetros bioquímicos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n.2, p.717-722, 2011.

ROSATO, N. P. *Estabilidade de constituintes bioquímicos frente a diferentes temperaturas e períodos de estocagem, em amostras de soro de cães hígidos*. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP, Campus de Jaboticabal. JABOTICABAL, SÃO PAULO, Fevereiro de 2007.

SILVA, S. L.; FLAGLIARI, F. F.; CESCO, F. T. R. S. Atividade sérica das enzimas AST, ALP e GGT de caprinos das raças Anglo - Nubiana e Saanen criados nos estados de São Paulo e Paraíba. *Ars Veterinária*, Jaboticabal, SP, Vol. 20, n. 1, 022-027, 2004.

SPINELLI, M. O. *et al.* Efeito da temperatura e tempo no armazenamento de metabólitos no plasma de ratos Wistar recém-desmamados. *RESBCAL*, São Paulo, v.1, n.4, pg. 317-321, set./out./nov. 2012- 317.

THRALL, M.A. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: Editora Roca, 2007. p.39.

WITTWER, F., BOHNWALD, H., KLAASEN, R. Efecto del tiempo, temperatura de conservacion y del anticoagulante (EDTA/NaF) en muestras para perfiles metabolicos. *Arch. Med. Vet.*, v. 18, p. 43-51, 1986.