

AVALIAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE DIFERENTES MÉTODOS DE COLHEITA DE SANGUE VENOSO NAS ANÁLISES LABORATORIAIS DE EQUINOS

INTERFERENCE OF DIFFERENT VENOUS BLOOD DRAWING METHODS IN EQUINE LABORATORY ANALYSIS

H. WAJNSZTEJN^{1*}, M. C. C. S. MELLO², B. L. SANTOS²,
P. J. SANCHEZ¹, A. C. R. C. PORTO¹

RESUMO

Diversos fatores podem alterar uma amostra de sangue, sejam estes relacionados a técnica de obtenção, manuseio e acondicionamento ou a afecções que acometem o paciente. O objetivo desse estudo foi avaliar a interferência de diferentes métodos de colheita de sangue venoso nos resultados de exames bioquímicos comumente solicitados na prática clínica de equinos. A metodologia aplicada envolveu a avaliação de amostras obtidas de 14 equinos machos clinicamente saudáveis, sem distinção entre raça e idade. Cada animal foi submetido a punção nas veias jugulares direita e esquerda com o uso de agulha e seringa e pelo sistema de tubo à vácuo. As amostras foram submetidas a dosagens de hemoglobina livre, aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase, potássio, glicose, hematócrito, proteína plasmática total, proteína total sérica e fibrinogênio. Os resultados demonstraram que, com exceção do fibrinogênio, não houve diferença entre os grupos. Conclui-se que, respeitando todos os princípios de uma colheita de sangue ideal, não há interferência do método de colheita nos resultados desses parâmetros bioquímicos.

PALAVRAS-CHAVE: Cavalos. Diagnóstico laboratorial. Sangue venoso. Tubo à vácuo.

SUMMARY

Several factors can alter a blood sample, including the technique for obtaining, handling and conditioning or circumstance that affect the patient. The aim of this study was to evaluate the interference of different venous blood collection methods on biochemical tests commonly requested in horse clinical practice. The applied methodology involved sample evaluation obtained from 14 clinically healthy male horses, without distinction between breed and age. Each animal was punctured in the right and left jugular veins using a needle and syringe and the vacuum tube system. The samples were submitted to free hemoglobin, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, potassium, glucose, hematocrit, total plasma protein, serum total protein and fibrinogen measurement. The results showed that, with the exception of fibrinogen, there was no difference between groups. It was possible to conclude that, respecting all the principles of an ideal blood collection, there is no method's interference on this biochemical parameters.

KEY-WORDS: Horses. Laboratorial diagnosis. Vacuum tube. Venous blood.

¹ Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Sorocaba (UNISO).

² Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Sorocaba (UNISO).

*Autor para correspondência: henry.vet@prof.uniso.br

INTRODUÇÃO

Na clínica médica de equinos, testes laboratoriais, além de auxiliarem o diagnóstico e prognóstico de enfermidades (OLIVEIRA et al., 2016), são ferramentas rotineiramente empregadas para avaliar a capacidade atlética (MELO et al., 2013; CORRÊA et al., 2010).

Dentre os exames mais pesquisados destacam-se hemograma, dosagens de albumina sérica, glicose sanguínea, enzimas creatinoquinase, aspartato aminotransferase e desidrogenase láctica, alguns minerais, além de bilirrubinas, gamaglutamil transferase, ureia, creatinina, colesterol total, triglicérides, proteína total, fosfatase alcalina, lactato sérico e fibrinogênio (OLIVEIRA et al., 2016; MELO et al., 2013; CORRÊA, et al., 2010; MARTINS-FILHO et al., 2007; BENESI, et al., 2006).

Na medicina, demonstrou-se a interferência de diferentes métodos de colheita de sangue venoso nos resultados de exames laboratoriais (MORAIS et al., 2018; BASTOS et al., 2010; SOWEMIMO-COCKER, 2002). Variáveis pré-analíticas relacionadas à incorreta homogeneização, centrifugação (LIPPI et al., 2011), ao tempo até o processamento e armazenamento devem ser consideradas, por alterarem a estabilidade da amostra (OLIVEIRA et al., 2016) e por contribuírem para a lise eritrocitária (LIPPI et al., 2011).

As potenciais alterações nos resultados de exames causadas por hemólise, lipidemia e hiperbilirrubinemia variam com a substância pesquisada e método utilizado (THRALL et al., 2012). Sabe-se que a coloração e a turbidez decorrentes da hemólise interferem sobre a dosagem bioquímica sérica obtida por espectrofotometria (FRANK et al., 1975; YÜCEL; DALVA, 1992; MERWE; REYERS, 2007; LASSEN; WEISER, 2007), principalmente em reações colorimétricas de ponto final (ALMEIDA et al., 2011) e quando a leitura é feita na faixa de luz de 540-590 nm, espectro no qual a absorção de luz da hemoglobina é maior (O'NEILL; FELDMAN, 1989).

Ainda que existam revisões sobre a forma ideal para a colheita de sangue venoso, observam-se variações no procedimento de punção entre diferentes laboratórios e profissionais (BASTOS et al., 2010). Na clínica de equinos também é possível observar tais variações entre diferentes profissionais, todavia, não há consenso no que se refere à correlação entre métodos de colheita e consequentes alterações em exames laboratoriais. Diante disso, esse estudo teve por objetivo avaliar a interferência de diferentes métodos de colheita de sangue venoso de equinos hípidos em exames laboratoriais comumente solicitados na rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da

Universidade de Sorocaba (UNISO) sob o protocolo nº 111/2017.

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

Para as colheitas de sangue, os equinos foram individualmente contidos com cabresto e mantidos em repouso. Foi procedida a antisepsia da pele e pelo com algodão e álcool 70° INPM, seguindo-se a venóclise das veias jugulares direita e esquerda, com o uso de agulhas 22G e agulhas hipodérmicas 25 x 0,8 mm, próprias para seringas estéreis, com bico *luer lock*, de 60 mL ou tubos a vácuo (BD Vacutainer®).

O Grupo Controle (GC) foi composto por amostras de sangue obtidas pelo método tradicional (seringa e agulha 25 x 0,8 mm) e acondicionamento no frasco após abertura da tampa (retirado o vácuo). Já nos grupos testados, utilizou-se o vácuo do frasco, sendo o Grupo 1 composto por amostras colhidas com agulhas 22G (próprias para acoplar no frasco) e o Grupo 2, por agulhas hipodérmicas 25 x 0,8 mm, com deslizamento do sangue da seringa pela lateral do frasco. Todas as amostras foram colhidas no mesmo dia, pela mesma pessoa.

Durante a colheita, as amostras foram aleatoriamente identificadas por meio de números (1 a 14) e de letras (A a O) e anotadas em planilha própria para a descaracterização das mesmas durante o seu processamento, acondicionadas em isopor com gelo e enviadas, dentro do intervalo de 4 horas, a um laboratório particular para as dosagens séricas e plasmáticas. As amostras foram processadas no período máximo de 10 horas.

Para as análises de Aspartato aminotransferase (AST), Lactato desidrogenase (LDH), potássio (K) e proteína total sérica (PT), preservou-se as amostras refrigeradas em tubo à vácuo sem anticoagulante. As amostras destinadas para a dosagem de hemoglobina livre (HbL), hematócrito (Ht), proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio foram preservadas refrigeradas em tubos com anticoagulante (EDTA) e as utilizadas para a mensuração de glicose, refrigeradas em tubos com fluoreto de sódio (como inibidor glicolítico). As amostras destinadas à dosagem de hemoglobina livre foram envolvidas em papel alumínio para evitar possíveis alterações degenerativas e igualmente refrigeradas. Para as mensurações de AST, LDH, K, PT e glicose, utilizou-se espectrofotômetro semi-automatizado da marca Brasmed modelo Biovet Smart® e respectivos “kits” comerciais da marca Bioclin®.

A determinação do Ht foi obtida utilizando-se capilares e microcentrifuga da marca Fanem modelo 210 IEC® e a leitura feita em cartão

apropriado do mesmo fabricante. O fibrinogênio plasmático foi obtido através da técnica de precipitação pelo calor, descrita por Schalm et al. (1975) *apud* Souza et al. (2006), com utilização de capilares e microcentrífuga descrita. A Hb foi calculada pelo método de Drabkin & Austin (1932), com o auxílio de “kit” comercial em espectrofotômetro Bioplus modelo 200F®.

Os dados foram armazenados no Excel for Windows Explorer® e feita Análise de Variância (ANOVA) de uma via, com posterior comparação de médias no Software GraphPad®. Para descrição dos resultados, as premissas de normalidade e

homocedasticidade foram adequadamente atendidas e o nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias e respectivos desvios padrão dos valores do hematócrito (Ht), proteína sérica total (PT), proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio, assim como seus respectivos valores de referência encontram-se descritos na Tabela 1. Esses resultados, em todos os grupos apresentados, mantiveram-se dentro dos valores de referência para as categorias estudadas, segundo Kaneko et al. (2008).

Tabela 1 - Médias e desvios padrão de hematócrito (Ht), proteína sérica total (PT), proteína plasmática total (PPT) e fibrinogênio nos diferentes grupos propostos, com os respectivos valores de referências (KANEKO et al., 2008).

Parâmetros Analisados	Grupo Controle (n=14)	Grupo 1 (n=14)	Grupo 2 (n=14)	Valores de Referência (un.)
Ht	32,00 ± 1,77	32,21 ± 1,90	32,93 ± 2,49	24 – 44 %
PT	5,51 ± 0,46	5,36 ± 0,54	5,51 ± 0,47	5,2 – 7,9 g/dL
PPT	7,05 ± 0,38	7,06 ± 0,38	7,03 ± 0,36	6,0 – 8,0 g/dL
Fibrinogênio	292,86 ± 103,26	207,14 ± 103,26	242,86 ± 82,07	100 – 400 mg/dL

Apesar da influência da idade nos parâmetros hematológicos já ter sido avaliada em diferentes raças de equinos (RALSTON et al., 1988; McFARLANE et al., 1998, 2001; CEBULJ-ADUNC et al., 2003; SATUE et al., 2008), no presente estudo, não houve efeito ($p>0,05$) de idade ou raça em nenhuma das variáveis estudadas.

Os valores médios de fibrinogênio plasmáticos revelaram diferença estatística entre os grupos testados. Esse fato poderia ser explicado pela grande variação dos valores de referência na categoria animal estudada (100 a 400 mg/dL). Com exceção desse parâmetro, a análise de variância não apontou diferença estatística ($P>0,05$) entre o Grupo Controle e os Grupos 1 e 2 para nenhum dos valores médios aqui testados. Bush (2004) sugere que

aumentos dos índices de PPT e fibrinogênio poderiam ser constatados na avaliação por refratometria, em razão da diminuição da transmissão de luz induzida por turbidez na amostra lipêmica ou degeneração dos eritrócitos. Mas essa informação não é consenso, uma vez que Thrall et al. (2012) afirmam que hiperbilirrubinemia e hemólise não interferem no valor de proteína total do soro, embora a hemólise possa dificultar a verificação da linha de demarcação do refratômetro.

As médias e respectivos desvios padrão de glicose, potássio, lactato desidrogenase (LDH), hemoglobina livre (HbL), aspartato aminotransferase (AST), assim como seus respectivos valores de referência encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Médias e desvios padrão de glicose, potássio, hemoglobina livre (HbL), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) nos diferentes grupos propostos, com os respectivos valores de referência (KANEKO et al., 2008).

Parâmetros Analisados	Grupo Controle (n=14)	Grupo 1 (n=14)	Grupo 2 (n=14)	Valores de Referência (un.)
Glicose	113,57 ± 24,32	112,14 ± 22,72	112,43 ± 23,85	75 – 115 mg/dL
Potássio	5,87 ± 1,50	5,64 ± 1,19	5,93 ± 1,28	2,4 – 4,7 mmol/L
LDH	666,29 ± 162,08	673,21 ± 167,21	666,07 ± 178,65	162 – 412 U/L
HbL	0,18 ± 0,09	0,20 ± 0,09	0,21 ± 0,09	Não validados
AST	299,84 ± 64,29	302,57 ± 62,48	299,97 ± 62,47	226 – 366 U/L

As médias de glicemia não apresentaram diferença entre os grupos, e mantiveram-se dentro dos valores de referência (70 a 115 mg/dL). Já os níveis de potássio encontrados no presente estudo, apesar de não apresentarem diferença, foram mais altos que os descritos por Kaneko et al. (2008) como valores de referência para a categoria (2,4 a 4,7 mmol/L), assim como as médias da atividade de LDH, que se apresentaram acima do limite superior para a categoria (162 a 412 UI/L), sem diferença entre os grupos testados ($P>0,05$).

Levando-se em consideração que valores elevados na atividade de LDH, associados à hipercalemia e hipoglicemia seriam indicativos de hemólise em animais (THRALL et al., 2012), os dados do presente estudo sugerem detecção de hemólise pela metodologia analítica proposta em todos os grupos testados, vez que os animais foram submetidos à colheita aproximadamente 30 minutos após a ingestão de alimento concentrado e tal circunstância poderia ter elevado as dosagens séricas da glicose acima dos valores de referência (THRALL et al., 2012), pois, a absorção e utilização da glicose a partir do trato intestinal de mamíferos são influenciadas por um complexo eixo entero-insular, pouco estudado em cavalos (De GRAAF-ROELFSEMA, 2014). Segundo Thrall et al. (2012), animais monogástricos apresentam, normalmente, aumento pós-prandial na concentração de glicose, que normalmente desaparece dentro de 4 h.

Em relação ao potássio, ainda que bovinos e equinos tenham altas concentrações desse íon dentro dos eritrócitos e um quadro acentuado de hemólise poderia resultar em falso aumento de sua concentração sérica, as plaquetas também contêm potássio intracelular abundante, que é liberado quando elas são ativadas, e uma pseudo-hiperpotassemia poderia ocorrer se grandes quantidades de potássio extravasarem das células durante ou após a retirada sanguínea (THRALL et al., 2012).

No presente estudo, apesar do aumento do potássio em todos os grupos testados, um indício de que não se confirmou a lise eritrocitária foi a ausência de correlação positiva entre os níveis de potássio e os de hemoglobina livre, liberada em casos de hemólise intravascular para formar complexos com a haptoglobina (THRALL, et al., 2012).

No tocante à dosagem de LDH, caso os animais não estivessem em atividades esportivas constantes, os índices poderiam ser considerados acima dos valores de referência. Porém, Muñoz et al. (2012) reforçam que a raça do animal, o tipo de treinamento físico, o tipo de trabalho, sua intensidade e duração influenciam nas concentrações séricas dessa enzima. Bacalhao (2008) dosou LDH em equinos em treinamento para vaquejada e encontrou valores médios de 609,5 UI/L para os animais em repouso e 814,8 UI/L para os animais após a atividade física. Andreazzi et al. (2014), observaram atividade sérica de LDH entre 275 a 578 UI/L, com uma média de 422,2 UI/L no repouso e

entre 255 a 575 UI/L, com média de 435,5 UI/L, após exercício, em equinos praticantes de hipismo clássico.

Conforme relatado por Scheffer e González (2003), qualquer intensidade de hemólise é prejudicial a dosagem de LDH, vez que o extravasamento de enzimas eritrocitárias incrementa a atividade total dessa enzima no plasma. Apesar do presente estudo não apontar diferença entre os grupos ($P>0,05$), o teste de Pearson não demonstrou correlação positiva entre as atividades de LDH e valores de HbL, reforçando o entendimento de que a mensuração de LDH pode ser má interpretada na avaliação de hemólise, em caso de animais atletas. Tal fato suporta os achados de Bastos et al. (2010), que confirmam a necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso no procedimento de obtenção das amostras para essa análise.

Verificou-se que os três métodos de colheita de sangue venoso empregados não promoveram diferenças nos parâmetros supracitados, divergindo em parte dos dados a apresentados por Bastos et al. (2010) e por Grant (2003), que utilizaram amostras de sangue humano. Além das diferenças nas dosagens de hemoglobina, Bastos et al. (2010) obtiveram resultados opostos aos do presente estudo na atividade de LDH.

Grant (2003) sugere que alterações nas amostras relacionam-se às características técnicas do flebotomista. Os resultados obtidos na presente pesquisa sustentam tais sugestões, vez que não houve diferença entre os grupos ($P>0,05$), quando as amostras foram colhidas por um único e experiente médico veterinário, respeitando-se ao máximo todas as premissas de uma colheita ideal de sangue venoso, para minimizar ao máximo eventuais alterações nas amostras.

Algumas discrepâncias nos resultados, além das alterações das amostras, podem estar relacionadas à metodologia analítica utilizada. É fato que as reações colorimétricas de ponto final parecem ser as mais afetadas pela hemoglobina livre porque uma única leitura da absorbância é realizada ao final da reação. Como a concentração de hemoglobina é constante, as dosagens cinéticas sofrem menos efeito de hemólise neste método porque são realizadas várias leituras e quantificadas apenas as variações de absorbância que expressam a concentração da substância a ser dosada. Entretanto, a hemólise intensa também pode interferir nos métodos cinéticos elevando a absorbância para além da linearidade do teste (ALLEMAN, 1990).

Os resultados do presente estudo para os parâmetros analisados não apontaram índices detectáveis de hemólise, lipemia ou hiperbilirrubinemia e podem ser aplicados a laboratórios que adotam metodologias e equipamentos similares. A interferência da lise eritrocitária, lipemia e bilirrubinemia sobre cada sistema analítico bioquímico deve ser determinada por cada laboratório considerando suas particularidades metodológicas e de equipamento.

CONCLUSÃO

Conclui-se que, com exceção do fibrinogênio, não houve interferência nos resultados dos parâmetros avaliados. Ressalta-se a importância da realização da colheita de sangue venoso seguindo os princípios ideais, diminuindo assim as alterações pré analíticas, que podem levar ao comprometimento nas interpretações clínicas.

REFERÊNCIAS

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

ANDREAZZI, M. A.; PRESTES, K. M. R.; JUNIOR, C. C. C.; SIMONELLI, S. M. Avaliação dos níveis séricos de enzimas musculares em equinos praticantes do hipismo clássico. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.10, n.19, p.366-376, 2014.

BACALHAO M. B. M. Avaliação enzimática muscular em equinos (*Equus caballus*, Linnaeus, 1758) em treinamento para vaquejada, sob repouso e pós atividade física. **Monografia** (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande. 79p. 2008.

BASTOS, M. S.; BERNER, A. A.; RAMOS, E. R. P; Avaliação do grau de hemólise e sua interferência em análises bioquímicas de amostras obtidas por diferentes técnicas de coleta de sangue venoso. **V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica**, CESUMAR, 2010. Disponível em: <http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/quin_mostra/marina_souza_bastos.pdf>. Acesso em : 14 março. 2017.

BENESI, F. J.; RODRIGUES, M. N. S.; HOWARD, D. L.; NORONHA, T. A.; SOUZA, P. M.; LEAL, M. L. R.; MIRANDOLA, R. M. S.; FERNANDES, W. R. Influência do sexo e da idade nos valores séricos das bilirrubinas, AST e GGT de cavalos da raça mangalarga. **Ars Veterinaria**, v.22, n.2, p.103-111, 2006.

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

CORRÊA, K. S.; MATTOSO, C. R. S.; SILVA, C. F. G. K. T.; LAGOS, M. S.; TAKAHIRA, R. K.; LOPES, R. S. Enzimas musculares e eletrólitos em equinos submetidos a esforço físico prolongado, suplementados com acetato de tocoferol e selênio. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.1, p.85-93, 2010.

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

De GRAAF-ROELFSEMA, E. Glucose homeostasis and the enteroinsular axis in the horse: A possible role in equine metabolic syndrome. **Veterinary Journal**, v.199, p.11–18, 2014

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

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

KANEKO, J. J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6.ed. San Diego: Academic, 2008.

KOURI, T.; SILOAHO, M; POHJAVAARA, S; KOSKINEN, P; MALMINIEMI, O.; POHJANYLANDER, P.; PUUKKA, R. Pre-analytical factors and measurement uncertainty. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v.65, p.463–476, 2005.

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

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, p.143-153, 2011.

MARTINS-FILHO, L. P.; FAGLIARI, J. J.; MORAES, J. R. E.; SAMPAIO, R. C.; OLIVEIRA, J. A.; LACERDA NETO, J. C. Estudo clínico e laboratorial da fase prodromica da laminite equina induzida por sobrecarga de carboidrato. **Ars Veterinaria**, v.23, n.1, p.032-039, 2007.

MELO, S. K. M.; LIRA, L. B.; ALMEIDA, T. L. A. C.; REGO, E. W.; CORDEIRO-MANSO, H. E. C. C.; MANSO-FILHO, H. C. Hematological parameters and blood biochemistry in pleasure horses in tropical region. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.2, p.208-215, 2013.

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

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation & Diagnosis**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 2004.

MORAIS, L.; BOSCO, A. M.; BAPTISTTIOLLI, L.; TORRECILHA, R. B. P.; VALADARES, T. C.; HOFFMANN, D. J.; CIARLINI, P. C. Hemólise

interfere na mensuração dos biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.3, p.713-721, 2018.

MUÑOZ, A.; SANTISTEBAN, R.; RUBIO, M. D.; AGÜERA, E. I.; ESCRIBANO, B. M.; CASTEJÓN, F. M. Locomotor, cardiocirculatory and metabolic adaptations to training in Andalusian and Anglo-Arabian horses. **Research in Veterinary Science**, v.66, n.1, p.25-31, 1998.

OLIVEIRA, A. F. X.; RAIMUNDO, J. M.; PIRES, M. S.; AMARO, G. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, A. T.; BOTELHO, C. F. M.; MACHADO, C. H.; ALMEIDA, F. Q.; BALDANI, C. D. Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento na determinação de parâmetros bioquímicos séricos e plasmáticos de equinos Quarto de Milha. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.38 (Supl.2), p.11-16, 2016.

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

SCHALM, O. W.; JAIN, N. C.; CARROL, E. J. **Veterinary Hematology**. 3ªed., Philadelphia: Lea & Febiger, p.609; 1975

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

SOUZA, M. V. et al. Concentração de Fibrinogênio no Plasma Sanguíneo de Equinos da Raça Mangalarga Marchador por Diferentes Métodos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 1, n. 1, p.382-386, maio 2006. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/20669/artigo.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 29 jul. 2019.

SOWEMIMO-COCKER, S. O. Red Blood Cell Hemolysis During Processing. **Transfusion Medicine Reviews**, v.16, n.1, p.46-60, 2002.

STOCKHAM, S. L. Interpretation of equine serum biochemical profile results. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.11, n.3, 1995.

YIN, P.; LEHMANN, R.; XU, G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.407, p.4879-4892, 2015.

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