

## EFEITO DO EDTA SOBRE O TESTE DE REDUÇÃO DO TETRAZÓLIO NITROAZUL (NBT) PARA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS DE EQUINOS

EDTA EFFECTS ON THE TETRAZOLIUM NITROBLUE TEST (NBT) TO THE EQUINE NEUTROPHIL OXIDATIVE METABOLISM EVALUATION

A. C. R. A. SILVA<sup>1</sup>, T. C. VALADARES<sup>1</sup>, B. F. M. ALMEIDA<sup>1</sup>, P. C. CIARLINI<sup>1\*</sup>

### RESUMO

Objetivou-se comparar a capacidade dos neutrófilos reduzirem o NBT em amostras sanguíneas colhidas com heparina e EDTA. Para tal, sangue total de 30 eqüinos SRD sadios, adultos e de ambos os sexo foram divididas em dois tubos, um contendo heparina sódica (10U/mL) e o outro EDTA potássico (1,8mg/mL). Imediatamente após a colheita realizaram-se os testes de redução espontânea e estimulada do NBT. Em ambas as provas de redução do NBT, amostras colhidas com heparina apresentaram maior destruição celular, formação de precipitado e de agregados celulares do que as tratadas com EDTA. A média de redução espontânea do NBT em amostras com EDTA (5,93%) não diferiu das obtidas com heparina (4,2%). Na prova estimulada, a média de neutrófilos redutores de NBT em amostras com EDTA (10,43%) foi menor ( $p < 0,05$ ) do que as obtidas com heparina (36,1%). Conclui-se que o EDTA pode ser utilizado com vantagens em relação à heparina na prova de redução espontânea do NBT, entretanto, o efeito quelante deste anticoagulante compromete a produção de superóxido em neutrófilos estimulados com extrato bacteriano.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anticoagulante. Metabolismo oxidativo. Neutrófilos.

### SUMMARY

The aim of the present study was to compare the neutrophils ability to reduce NBT in blood samples collected with heparin and EDTA. For this purpose, blood samples from 30 horses were collected of non-defined mix breed, healthy, adults and from both sexes animals, the samples were divided into two tubes, one containing sodium heparin (10U/mL) and other potassium EDTA (1.8 mg/mL). Immediately after the blood collection, the tests of spontaneous and stimulated reduction of NBT were conducted. In both reducing NBT tests, heparinized samples had higher cell destruction, precipitate and cellular aggregates in comparison with those treated with EDTA. The average of spontaneous NBT reduction in samples with EDTA (5.93%) did not differ from those obtained with heparin (4.2%). In stimulated test, the NBT reduction average of neutrophils in samples with EDTA (10.43%) was lower ( $p < 0.05$ ) than those obtained with heparin (36.1%). It is concluded that EDTA can be used with advantages over heparin in the spontaneous NBT reduction test, however, the anticoagulant chelating effect compromises neutrophils superoxide production when stimulated with bacterial extract.

**KEY WORDS:** Anticoagulant. Oxidative metabolism. Neutrophils.

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Curso de Medicina Veterinária.  
\* Autor para correspondência: Rua Clóvis Pestana, n. 793 – Jardim Dona Amélia. CEP 16050-680 Araçatuba-SP. E-mail: ciarlini@fmva.unesp.br

## INTRODUÇÃO

Os neutrófilos por meio da fagocitose e do metabolismo oxidativo detêm importante papel na defesa do organismo contra infecções e constituem a primeira linha de defesa celular (VUORTE, 1996). Bactérias ativam na membrana dos neutrófilos a enzima NADPH oxidase responsável pela “explosão respiratória” que por meio da produção de superóxido e derivados oxidantes têm ação bactericida (BEIL, 1992).

Park et al. (1968) desenvolveram um teste citoquímico de redução do tetrazólio nitroazul (NBT), útil para avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, em que a atividade oxidativa é mensurada pela presença de formazan proveniente da redução do NBT pelo superóxido (BIER, 1989). No método estimulado de NBT (NBT-E) são adicionadas endotoxinas, permitindo revelar as reações falso-negativas da redução espontânea do NBT (PARK & GOOD, 1970).

O teste do NBT não estimulado (NBT-NE) em equinos foi utilizado pela primeira vez por POLI & Mantelli (1974). Posteriormente Frymus et al. (1985) observaram que em cavalos sadios este teste não sofre influência da idade e que o metabolismo oxidativo dos neutrófilos dessa espécie é semelhante ao dos humanos.

Comprovadamente em humanos, o metabolismo oxidativo dos neutrófilos e dos monócitos sofre influência direta do anticoagulante utilizado (FREITAS, 2008). Assim, a heparina promove maior destruição de células que o EDTA, mais formação de agregados celulares e maior quantidade de precipitado do NBT, devido à formação do complexo de NBT com heparina e fibrinogênio antes do NBT ser absorvido pelo neutrófilo (ROTHWELL & DOUMAS, 1975).

Considerando que o EDTA é o anticoagulante mais utilizado na rotina clínico-laboratorial veterinária e que não há consenso quanto ao seu efeito sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, objetivou-se avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de equinos por meio do teste de redução do tetrazólio de nitroazul (NBT) em sangue heparinizado e com EDTA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados 30 equinos de tração, sendo todos adultos com idade média de 5 anos, sem raça definida e de ambos os sexos (15 machos e 15 fêmeas), encaminhados ao Hospital Veterinário do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Campus Araçatuba. Para avaliar a higidez, todos equinos foram submetidos a um exame físico geral, conforme preconizado por FEITOSA (2008). Animais com alterações no exame clínico ou leucograma foram excluídos do estudo.

### Colheita e acondicionamento das amostras

Utilizando-se agulhas hipodérmicas descartáveis 25x8mm próprias para tubos com pressão negativa,

foram colhidos 4 mL de sangue de cada animal. Imediatamente após, utilizando pipetas automáticas com ponteiros estéreis, foi transferido 0,5 mL de sangue para um tubo plástico estéril contendo heparina sódica<sup>2</sup> (10U/mL) e outros 3,0 mL para tubos contendo EDTA-potássico<sup>3</sup> (1,8mg/mL). Todas as amostras sanguíneas foram mantidas refrigeradas até o momento do processamento laboratorial.

### Teste de redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT)

As amostras sanguíneas colhidas com EDTA e heparina, para fins de comparação, foram simultaneamente submetidas aos testes de redução não estimulada (NBT-NE) e estimulada (NBT-E) do tetrazólio nitroazul pelo método citoquímico descrito por CIARLINI et al. (2004). Para o método estimulado do teste de redução do NBT foi utilizado o estimulante comercial<sup>4</sup> na proporção de 10µl/mL de sangue. Para cada amostra foram feitas duas lâminas de esfregaços sanguíneos tingidas com o corante hematológico comercial<sup>5</sup>. A porcentagem de células reductoras de NBT foi estabelecida a partir da contagem de 100 neutrófilos. A identificação e a intensidade das reações foram avaliadas com o auxílio de um sistema de imagem<sup>6</sup>.

### Leucograma

A contagem total de leucócitos foi realizada com auxílio de um contador eletrônico de células veterinário<sup>7</sup> previamente calibrado para espécie equina, conforme recomendações do fabricante. A contagem diferencial de 100 leucócitos foi feita em esfregaços sanguíneos tingidos com corante hematológico panótico rápido comercial<sup>4</sup>, segundo as recomendações e critérios de JAIN (1986).

### Análise Estatística

Com auxílio de um programa computacional estatístico<sup>8</sup>, após o estudo das distribuições das variáveis quanto à normalidade e homocedasticidade, conforme preconizado por ZAR (1984) utilizou-se o teste Wilcoxon para estimar significância das diferenças entre as variáveis dos grupos experimentais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores da contagem total de leucócitos ( $11,9 \pm 2,83 \times 10^9/L$ ), segmentados ( $5,85 \pm 2,08 \times 10^9/L$ ), linfócitos ( $4,24 \pm 1,70 \times 10^9/L$ ), monócitos ( $0,51 \pm 0,28 \times 10^9/L$ ) e eosinófilos ( $0,79 \pm 0,51 \times 10^9/L$ ) ficaram dentro dos limites de normalidade considerados por

<sup>2</sup> Liquevine® 5000UI/mL, Roche, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup> BD Vacutainer® K2EDTA 1,8mg/mL, Franklin Lakes, New Jersey, USA.

<sup>4</sup> Munolan® 10 mL, ALLERGAN, Guarulhos-SP, Brasil

<sup>5</sup> Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais-PR

<sup>6</sup> Image Pro Plus, Media Cybernetics, USA

<sup>7</sup> CELM CC 530, CELM, São Paulo, Brasil

<sup>8</sup> SAS/STA Software, Statistical Analysis System Institute, 1997, USA.

Cunha et al. (2008) e excluem alterações hematológicas compatíveis com processo inflamatório.

Independentemente do anticoagulante utilizado, os valores médios de neutrófilos redutores de NBT na prova não estimulada obtidos foram superiores aos 1,69% relatados por Frymus et al. (1985) para cavalos, porém semelhantes aos 5% descritos por Ciarlini et al. (1997) para éguas resistentes a endometrite. Os valores médios de NBT-NE relatados por LAPOSY et al. (2000) foram muito superiores (13,7%) aos demais estudos descritos na literatura. Acreditamos que tal discrepância se deve em parte ao fato de LAPOSY et al. (2000) terem utilizado amostras com 20U de heparina/mL de sangue, concentração de anticoagulante bem mais elevada do que a recomendada. Segundo Hohn & Lehrer (1974), concentrações de heparina superiores a 10U podem interferir no teste de redução do NBT promovendo maior ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Os valores médios de redução espontânea do NBT (Tabela 1) de amostras com EDTA e heparina ficaram dentro da faixa de normalidade (0-8%) considerada por Poli & Mantelli (1974), não obstante 33,3% dos valores individuais tenham sido superiores a este intervalo. Tais valores elevados de redução do NBT em 10 animais do estudo provavelmente estão relacionados a doenças não identificadas pelo exame clínico e leucograma, talvez porque ainda estivessem em uma fase sub-clínica inicial, colaborando com estudos anteriores que indicam a precocidade deste teste para o diagnóstico de infecções em relação aos demais exames laboratoriais de rotina (ROTHWELL & DOUMAS, 1975). Como os animais não foram acompanhados por um período maior, não foi possível a constatação dessas patologias.

A taxa espontânea de redução do NBT de sangue heparinizado não diferiu significativamente do obtido com EDTA (Tabela 1), sugerindo que este sal pode ser utilizado como anticoagulante para obtenção de sangue para o teste de redução espontânea, conforme verificado por Wan et al. (1992) e Gordon et al. (1994),

porém contrariando estudos anteriores que preconizam o uso da heparina (ROTHWELL & DOUMAS, 1975).

Já o fato de a taxa de redução do NBT ter sido inferior em amostras tratadas com EDTA na prova estimulada e não na prova de redução espontânea (Tabela 1), tais achados estão de acordo com as observações de Dewald & Baggiolini (1985) e Kehrlí & Goff (1989). Na prova de redução espontânea do NBT não ocorreu diferença entre os anticoagulantes, provavelmente porque a reação ocorreu à custa do cálcio intracelular, não sofrendo interferência do efeito quelante do EDTA. Já na prova estimulada, as amostras contendo EDTA apresentaram menor taxa de redução do NBT possivelmente devido ao efeito quelante desse sal ter comprometido a disponibilidade de cálcio necessário para manter a ativação dos neutrófilos. A importância do cálcio extracelular para o metabolismo oxidativo dos neutrófilos também foi advogada por Kehrlí & Goff (1989). Segundo estes autores, embora o cálcio ionizado utilizado para a ativação dos neutrófilos derive de compartimentos intracelulares, a fonte extracelular de cálcio deve ser importante para manter a ativação destes granulócitos.

A porcentagem de redução do NBT-E foi superior quando se utilizou a heparina, provavelmente devido este anticoagulante favorecer a formação de precipitados do corante e fibrinogênio. Como descrito por Rothwell & DoumaS (1975), o precipitado formado pelo complexo NBT-fibrinogênio aumenta a fagocitose e conseqüentemente o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Assim, a excessiva ativação dos neutrófilos e induzida pela heparina pode levar as células à degeneração, sendo estes fatores os responsáveis pela dificuldade na contagem dos neutrófilos no teste de redução do NBT. Esses achados estão de acordo com o relatado por Vuorte et al. (1996) de que o anticoagulante que proporciona maior ativação celular, também permite maior destruição das células. Diferentemente, ao exame citológico, as amostras colhidas com EDTA apresentaram-se bem preservadas, com células íntegras e sem precipitados do corante, tornando a contagem dos neutrófilos mais fácil e rápida.

**Tabela 1** - Valores médios  $\pm$  desvio-padrão (amplitude), medianas e amplitude da porcentagem (%) de neutrófilos redutores do NBT de equinos na prova não estimulada (NE) e estimulada (E) de acordo com o anticoagulante utilizado (Heparina sódica ou EDTA-K).

	<i>Anticoagulante</i>	<i>Média <math>\pm</math> Desvio-padrão (Amplitude)</i>	<i>Mediana</i>
<b>NBT-NE (%)</b>	Heparina	4,20 $\pm$ 4,94 (0-22)	3,0 <sup>a</sup>
	EDTA	5,93 $\pm$ 10,29 (0-50)	2,0 <sup>a</sup>
<b>NBT-E (%)</b>	Heparina	36,10 $\pm$ 19,69 (5-87)	34,0 <sup>c</sup>
	EDTA	10,43 $\pm$ 9,26 (0-32)	8,0 <sup>b</sup>

\*Letras coincidentes na mesma coluna indicam que existe diferença significativa (P<0,05).

## CONCLUSÕES

O EDTA potássico, na proporção de 1,8mg/mL sangue, não compromete o metabolismo oxidativo do neutrófilo de equinos, podendo ser utilizado como anticoagulante no teste de redução espontânea do NBT.

O metabolismo oxidativo de neutrófilos de cavalos ativados com extrato bacteriano, avaliado pelo teste estimulado de redução NBT, é subestimado quando o sangue é colhido com EDTA.

## AGRADECIMENTO

À agência financiadora FAPESP pela bolsa auxílio (processo 03/04795-6) e pelo apoio à pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- BEIL, W. J., MEINARDUS, H. G., NEUGEBAUER, D. C., SORG, C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **Journal of Leukocyte Biology** v.52, p.135, 1992.
- BIER, O. G., MOTA, I., SILVA, W. D. Imunodeficiência. In: BIER, O. G., MOTA, I., SILVA, W. D. **Imunologia Básica e Aplicada**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1989. Cap.15, p.370.
- CIARLINI, P. C., BARROS, P. C., LOPES, C. M. Q., KOHAYAGAWA, A., KRAUSE, A., LAPOSY, C. B. Leucograma, fibrinogênio plasmático e capacidade bactericida dos neutrófilos de éguas susceptíveis e resistentes à endometrites. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.21, p.123-126, 1997.
- CIARLINI, P. C., PATRÍCIO, R. F., COUTO, R., BONELLO, F. L. Efeito da vacina polivalente sobre o leucograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.71, p.323-327, 2004.
- CUNHA, A. P., BELLO, A. C. P. P., LEITE, R. C., MELO, M. M., BRAZ, G. F., RIBEIRO, A. C. C. L., OLIVEIRA, P. R. Avaliação de parâmetros clínicos e hematológicos de equinos submetidos a um programa de controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, n.1, p.113-120, 2008.
- DEWALD, B., BAGGIOLINI, M. Activation of NADPH oxidase in human neutrophils. Synergism between fMLP and neutrophil products PAF and LTB<sub>4</sub>. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.128, p.297-304, 1985.
- FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico**. São Paulo: Roca. 2004. 807p.
- FREITAS, M., PORTO, G., LIMA, J. L. F. C., FERNANDES, E. Isolation and activation of human neutrophils *in vitro*. The importance of the anticoagulant used during blood collection. **Clinical Biochemistry**. v.41, p.570-575, 2008.
- FRYMUS, T., DEGÓRSKI, A., KOWALSKI, B., CRISMN, M. Nitroblue Tetrazolium Reduction Test and Serum Lysozyme Assay in Newborn Arabian Foals and Mares. **Zentralblatt Fur Veterinarmedizin**. v.32, p.280-286, 1985.
- GORDON, M. Y. Origin and development of neutrophils. In: HELLEWELL, P. G., WILLIAMS, T. J. **Immunopharmacology of neutrophils**. London: Academic Press Limited, 1994. p.1-26.
- HOHN, D. C., LEHRER, R. I. Mechanism of the heparin effect on the Nitroblue-Tetrazolium slide test. **American Society for Microbiology**. v.10, n.4, p.772-775, 1974.
- JAIN, N. C. Hematologic techniques. In: JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. Chap.2, p.20-86.
- KEHRLI, M. E., GOFF, J. P. Periparturient hypocalcemia in cows: Effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function. **Journal of Dairy Science**. v.72, p.1188-1196, 1989.
- LAPOSY, C. B., BALARIN, M. R. S., ATHAIDE, D. F., LOPES, R. S., KOHAYAGAWA, A., TAKAHIRA, R. K., SOUZA, C. Avaliação hematológica e metabolismo oxidativo dos
- PARK, B. H., FIKRIG, S. M., SMITHWICK, E. M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils - a diagnostic aid. **Lancet**. v.7, p.532-4, 1968.
- PARK, B. H., GOOD, R. A. NBT test stimulated. **Lancet**, v.19, p.616, 1970.
- POLI, G., MANTELLI, F. Il "test" NBT negli animali domestici; valori normali. **Clínica Veterinária**. v.97, p.241-247, 1974.
- ROTHWELL, D. J., DOUMAS, B. T. The effect of heparin and EDTA on the NBT test. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**. n.85, p.950-956, 1975.
- VUORTE, J., JANSSON, S. E., REPO, E. Standardization of a flow cytometric assay for phagocyte respiratory burst activity. **Scandinavian Journal of Immunology**. v.43, p.329-334, 1996.
- WAN, T. S., TAM, A. Y., YEUNG, C. Y. Effects of anticoagulants and incubation time on neutrophil nitroblue tetrazolium score. **Biol Signals**. n.1, p.167-172, 1992.
- ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984. 718p.