

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

GABRIEL PIERIN WIEDMER

PRESERVAÇÃO DA GLICOSE SANGUÍNEA IN VITRO: EFEITO DO
FLUORETO/EDTA COMPARADO AO GEL SEPARADOR COM ATIVADOR
DE COAGULAÇÃO

CURITIBA

2016

GABRIEL PIERIN WIEDMER

PRESERVAÇÃO DA GLICOSE SANGUÍNEA IN VITRO: EFEITO DO
FLUORETO/EDTA COMPARADO AO GEL SEPARADOR COM ATIVADOR
DE COAGULAÇÃO

Artigo apresentado junto ao Curso de Especialização em Análises Clínicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de especialista.

Orientador: Prof. Geraldo Picheth.

CURITIBA

2016

RESUMO

Introdução: A determinação da glicemia é um ensaio de alta demanda na rotina laboratorial pelo auxílio-diagnóstico e monitorização de alterações do metabolismo, como o diabetes. Após a coleta do sangue, células continuam a consumir a glicose, processo denominado glicólise *in vitro*. Agentes e procedimentos antiglicolíticos devem ser implementados para evitar a redução da concentração da glicose *in vitro* e propiciar resultados confiáveis.

Objetivo: avaliar o efeito do tempo e temperatura sobre a glicemia em amostras de sangue obtidas na presença de fluoreto de sódio/EDTA comparado a presença de gel separador com ativador de coágulo, em condições que mimetizam a rotina laboratorial.

Materiais e Métodos: 46 pacientes, de ambos os sexos, adultos (18-60 anos), foram coletados plasma (BD Vacutainer[®] Fluoreto/EDTA) e soro (BD Vacutainer[®] SST[®] II Advance[®]), e a glicemia, dosada pelo método da glicose oxidase-peroxidase/reação de Trinder, comparada em diferentes tempos e temperaturas antes da centrifugação da amostra.

Resultados e Discussão: os indivíduos da pesquisa foram divididos em dois grupos de 23 indivíduos cada, sendo as amostras submetidas a diferentes condições de tempo e temperatura. No grupo I as amostras foram mantidas em banho de gelo (2-4°C) na primeira hora após a coleta e posteriormente mantidas a temperatura ambiente (20-25°C), sendo então centrifugadas após 1, 2 e 3h após a punção sanguínea. No grupo II, a glicemia foi quantificada em intervalos de 1, 3, 5, 8, 24h após a punção sanguínea, sendo imediatamente armazenadas e mantidas durante a primeira hora em banho de gelo e a temperatura ambiente nas horas subsequentes. A concentração da glicose do soro e do plasma do Grupo I e II não apresentaram diferença entre as médias ($P>0,05$) após as diferentes condições de armazenamento. A redução máxima da concentração de glicose no tempo de 24 horas, foram de 9% e 10% para soro e plasma respectivamente.

Conclusão: Nosso estudo mostra que reduzindo a temperatura imediatamente após a coleta, tubos de coleta de soro com gel separador e ativador de coagulação podem ser utilizados na rotina laboratorial para a determinação da glicemia em substituição à amostra coletada com fluoreto de sódio.

Palavras-Chave: Glicólise, Tubos à Vácuo, Glicemia, Agentes Antiglicolíticos, fase Pré-Analítica.

ABSTRACT

Introduction: Determination of glucose is highly demanded in a laboratory routine for diagnosis and monitoring of metabolic disorders, as diabetes. After the blood collection, cells continue to consume glucose, process called in vitro glycolysis. Antiglycolytic compounds and procedures should be implemented in order to avoid reduction in the concentration of glucose in vitro and provide reliable results.

Objective: Evaluate the effect of time and temperature on the glucose in blood samples obtained in the presence of sodium fluoride / EDTA compared to the presence of separating gel with clot activator under conditions that mimic the laboratory routine.

Methods: Plasma samples (BD Vacutainer™ fluoride / EDTA) and serum (BD Vacutainer™ SST® Advance® II) were compared for the quantification of glucose (glucose oxidase-peroxidase/Trinder reaction). Blood samples of 46 adult patients (18-60 years) of both sexes were used in both experiments.

Results and Discussion: the researched patients were divided into two groups of 23 people, and samples evaluated in different conditions of time and temperature. In the group I, samples were kept in ice bath (2- 4°C) in the first hour after collection and later kept at room temperature (20- 25°C), and then centrifuged at 1, 2 and 3 hours after blood collection. In the group II, the blood glucose was measured at intervals of 1, 3, 5, 8, 24 hours after the blood collection, immediately stored and maintained in ice bath during the first hour and the room temperature in the subsequent hours. The concentration of serum glucose and plasma in the Group I and II showed no difference between ($p > 0.05$) after different storage conditions. The maximum reductions in the glucose concentration in 24 hours were 9% and 10% for serum and plasma respectively.

Conclusion: Our study shows that reducing the temperature immediately after the blood collection, serum collection tubes using separating gel with clot activator can be used in the laboratory routine for the determination of glucose in order to replace the samples collected with sodium fluoride.

Keywords: Glycolysis, Vacuum Tubes, Glycaemia, Antiglycolytic Agents, Pre-Analytical Phase.

INTRODUÇÃO

Glicemia denomina a quantificação do principal monossacarídeo, a glicose, no sangue. O metabolismo da glicose é uma fonte energética e relevante como esqueleto de carbono para outras vias metabólicas sendo essencial para todas as células [2,3].

A dosagem da glicose sanguínea é um dos exames mais solicitados em todo o mundo devido á importância do diagnóstico precoce do Diabetes *mellitus*, patologia de início silencioso, muito prevalente e com elevada morbimortalidade [1].

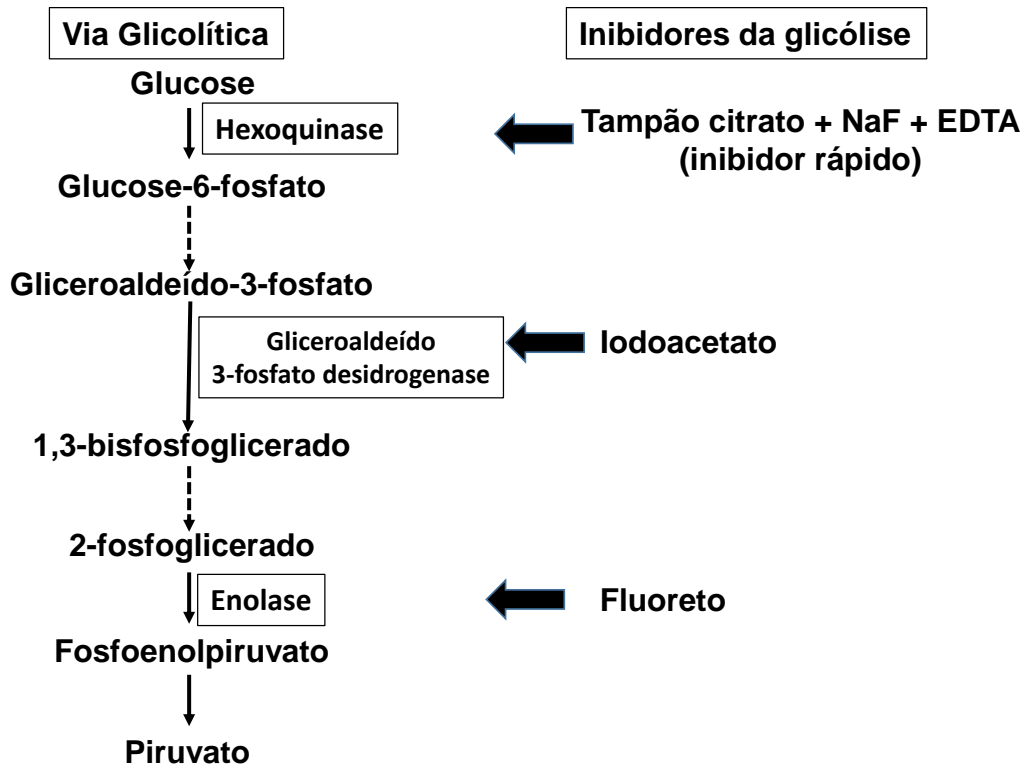
A precisão e exatidão na determinação da glicemia são elementos importantes para o diagnóstico e monitoramento de diversas patologias [4]. Entre os principais fatores pré-analíticos que podem afetar o resultado da glicemia está o “efeito e o controle da glicólise in vitro” [5,6].

A glicólise é uma sequência de reações que promove a degradação da glicose para fornecer energia, ATP, ao organismo [7]. O processo contempla 10 reações enzimáticas, divididas em dois estágios de cinco reações. Com objetivo maior, o primeiro estágio é responsável pela fosforilação da glicose formando a glicose-6-fosfato, processo irreversível com posterior clivagem formando o gliceraldeído-3-fosfato na quinta e última etapa do primeiro estágio, processo que consome dois ATP. No segundo estágio o gliceraldeído-3-fosfato através de uma série de reações é convertido a duas moléculas de piruvato, metabólito final da glicólise. Desta forma a glicólise segue produzindo outras quatro moléculas de ATP, o que compensa o consumo de duas moléculas de ATP utilizado na primeira fase para fosforilar a glicose, e o agente oxidante deste processo é o NAD⁺ que se converte em NADH. As enzimas que participam de todo o processo são responsáveis pela regulação constante de ATP e demais produtos glicolíticos [8].

Vários métodos permitem minimizar e estabilizar a redução da glicose sanguínea, promovido pela glicólise [5,9,10]. Entre esses estão: (i) a centrifugação e decantação do plasma em até uma hora após a colheita da amostra; (ii) refrigeração durante o transporte; (iii) adição de agentes antiglicolíticos, como o iodo acetato, o fluoreto de sódio, a manose ou uma

mistura que promove a acidificação do soro [11]. A **figura 1** mostra os principais agentes antiglicolíticos e seus sítios de atuação na via glicolítica.

Figura 1 – Principais sítios da via glicolítica associados aos principais agentes antiglicolíticos.



Adaptado de Lehninger et al, 2000.

Entre os agentes antiglicolíticos utilizados, o uso do fluoreto de sódio é o mais popular, pelo baixo custo, facilidade de dissolução e após a inibição enzimática, manter estável a glicemia por longo período [3]. O fluoreto atua inibindo a metaloenzima enolase (hidrolase 2-fosfo-D-glicerato), enzima responsável pela conversão do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, na nona e penúltima fase da via glicolítica [12]. O fluoreto é usualmente combinado com o anticoagulante EDTA (1mg por mL de sangue), agente que promove a quelação do cálcio, eficiente anticoagulante, permitindo que se utilize menor quantidade de fluoreto (2mg por mL de sangue), evitando efeito osmótico e hemólise, observado quando o uso isolado do fluoreto (10mg por mL de sangue) é utilizado como anticoagulante e inibidor da glicólise [13].

Sendo a enolase uma enzima localizada nas reações finais da glicólise, a inibição completa da via ocorre cerca de três horas após a adição do fluoreto. Portanto o fluoreto não é um agente antiglicolítico de ação imediata[14,15].

Na busca de acurácia na quantificação da glicemia, a atenção da fase pré-analítica é imprescindível[4]. Fatores rotineiros influenciam diretamente no consumo da glicose *in vitro*, como o tempo e a temperatura em que a amostra de sangue é mantida, e o volume globular do indivíduo. A fase pré-analítica é muito importante e bastante propensa a erros durante os ensaios, processo que envolve diferentes profissionais de diversos setores, desde a obtenção do material biológico até o seu preparo para a análise final [6]. Estima-se que esta fase é responsável por até 70% dos erros analíticos de um exame. Muitos destes erros acontecem devido à falta de orientações do paciente fornecida pelo médico e laboratório clínico, e durante a coleta e preparo da amostra [6].

A Sociedade Brasileira de Patologia Clínica recomenda o uso de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, sal sódico ou potássico) na proporção de 1,2 a 2,0 mg e fluoreto de sódio (NaF, sal sódico ou potássico) na proporção de 2,0 a 4,0 mg por mL de sangue total [13,14]. Porém, o NaF pode levar mais de duas horas para inibição completa e estável da via glicolítica, período considerado crítico devido à queda da glicemia nos primeiros instantes após a coleta em temperatura laboratorial de (20 a 25°C) [15,16,21]. A demora na inibição da glicólise *in vitro* se deve a difusão lenta do fluoreto para entrar nas células e principalmente o tempo para que inibida a enolase, todas as demais etapas acumulem substratos e promovam o bloqueio glicolítico [12,15].

Diferentes métodos para impedir a glicólise, e conseqüente perda da glicose *in vitro*, como o resfriamento da amostra logo após a punção sanguínea é um procedimento aceito por reduzir o metabolismo celular [16,17].

Neste estudo, o objetivo foi avaliar o efeito da redução da temperatura em tubos sem adição de agentes antiglicolíticos, comparando com a inibição clássica promovida pelo fluoreto de sódio/EDTA em condições de rotina laboratorial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de sangue venoso sem restrição de jejum, foram coletadas em tubos a vácuo contendo ativador de coagulação e gel separador (Vacutainer® SST® II Advance®) e fluoreto de sódio/EDTA (Vacutainer®; NaF 6,0mg, Na₂EDTA 12,0mg) da companhia Becton Dickinson (BD do Brasil). O sangue venoso homogeneizado obtido por venopunção foi usado para determinar a glicose por método enzimático colorimétrico com a enzima glicose oxidase, quantificada com o sistema automatizado Vitalab E-Flexor, fabricado pela empresa Vital Scientific – uma empresa com o Certificado ISO 9000 e registrada no FDA. Os testes foram realizados com reagente Gold Analisa pelo método enzimático glicose oxidase (GOD).

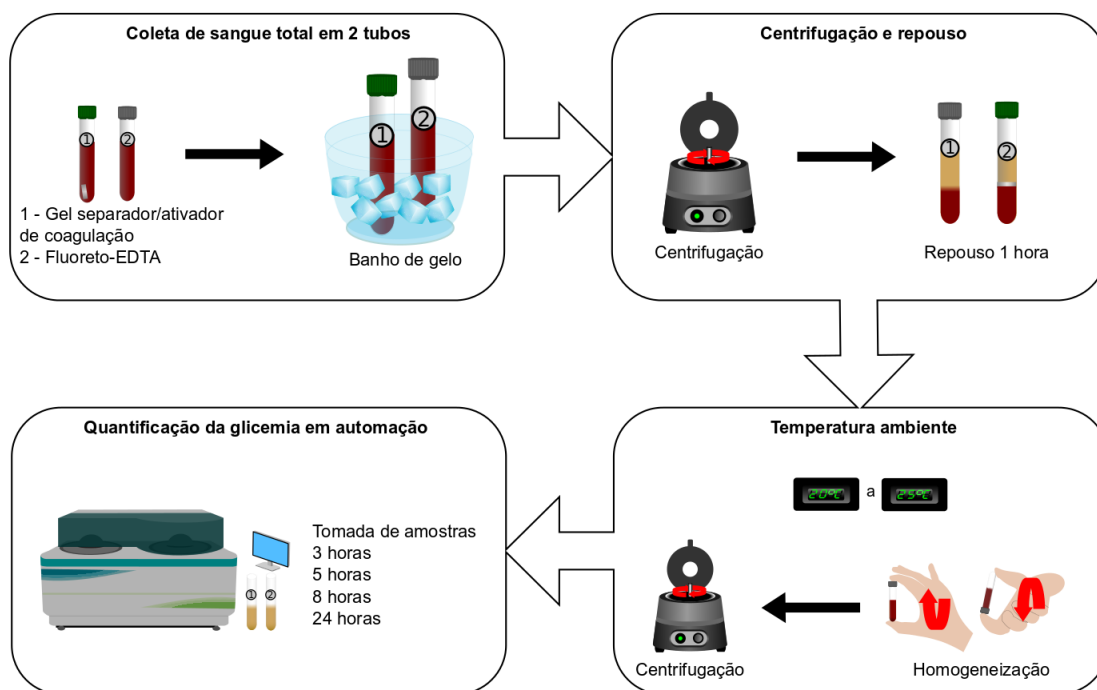
Este estudo piloto de modelo analítico foi desenvolvido no Laboratório de Análises Clínicas Visão na seção de bioquímica, apresentando certificação “Excelente” pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ). As amostras de sangue venoso obtidas de 46 voluntários adultos (18-60 anos) de ambos os sexos, foi realizado dois estudos distintos.

O grupo I foi composto por 23 colaboradores, submetidos à venopunção para coleta de 3 tubos de soro e 3 tubos de plasma de cada indivíduo, após coletadas foram armazenadas em banho de gelo entre 2-4°C. Os tubos receberam identificação para análise após 1, 2 e 3 horas, sendo as amostras de plasma como P1, P2 e P3, e amostras de soro como S1, S2 e S3 respectivamente. A cada hora, as amostras foram centrifugadas para realização da dosagem da glicose sanguínea.

O grupo II foi composto por outros 23 indivíduos submetidos à coleta de 2 tubos de soro e 2 tubos de plasma, as amostras foram submetidas somente à primeira hora em banho de gelo fundido 2 - 4°C, nesta etapa as amostras foram centrifugadas (3000rpm) para dosagem da primeira hora, pipetando uma alíquota de 100 microlitros de cada amostra para dosagem glicêmica, sendo que dois tubos foram congelados para controle e os outros dois ressuspensos e armazenados em temperatura ambiente (20°-25°C) para as próximas dosagens serem realizadas consecutivamente em 3, 5, 8 e 24 horas após a punção sanguínea. A Figura 2 resume as principais etapas deste experimento.

As amostras com hemólise, presença de coágulos ou volumes inadequados foram excluídas do estudo(6).

Figura 2 – Fluxograma das principais etapas experimentais do grupo II. Estudo do efeito da refrigeração da amostra sobre a glicemia.



Análise estatística

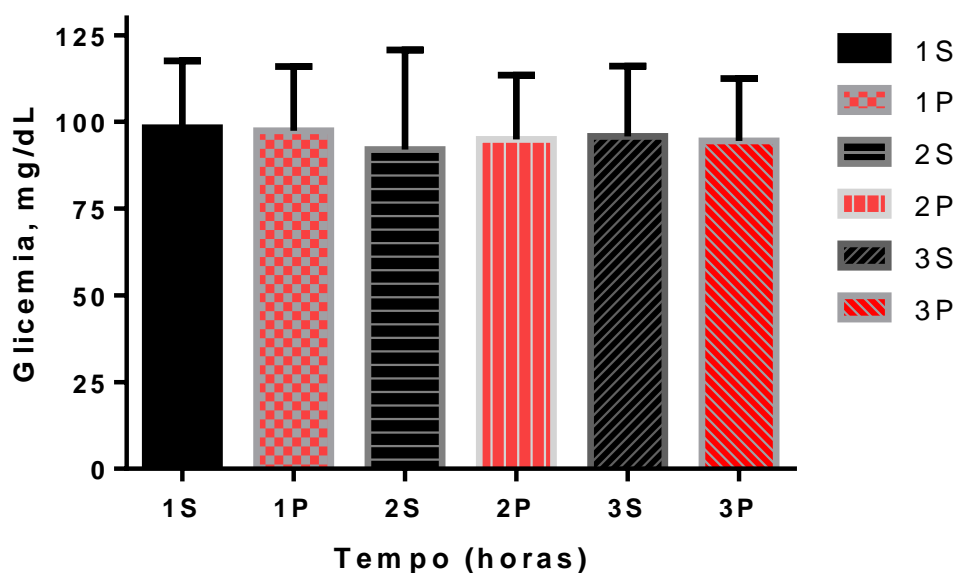
As concentrações de glicose em todos os experimentos apresentaram distribuição normal com o teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações foram realizadas pelo teste t-Student (bidirecional) ou ANOVA (one-way) para comparações múltiplas. O *software* Statistica para Windows versão 8.1 (StatSoftInc, OK, USA) foi utilizado nas análises. Um valor de probabilidade menor que 5% ($P < 0,05$) foi considerado significativo em todas as análises.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

A comparação entre concentrações de glicose em soro coletado com gel separador e ativador de coagulação e plasma com fluoreto/ETDA está mostrado na **figura 3**. As amostras dos 23 pacientes testados, mantidos por 1, 2 e 3 horas em banho de gelo não apresentaram diferença significativa

($P>0,05$). Esta figura mostra os resultados do Grupo I, representados por S, as amostras de soro, e P, as amostras de plasma durante as consecutivas três primeiras horas após a punção sanguínea.

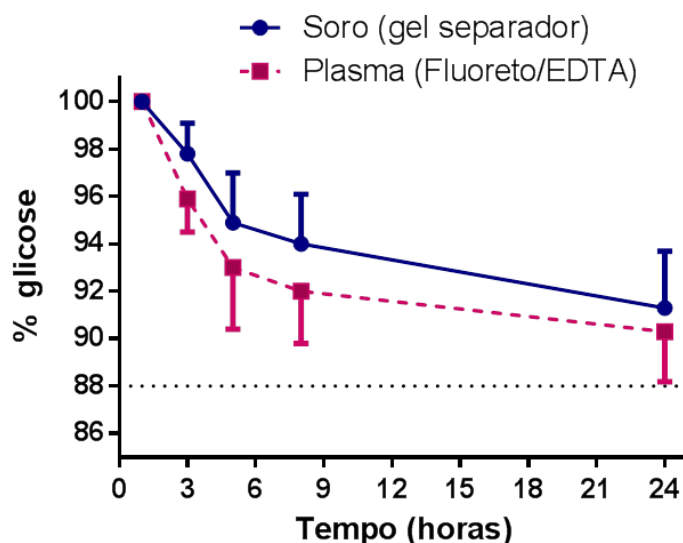
Figura 3 – Comparação entre a concentração de glicose entre soro mantidos em banho de gelo por até 3 horas.



Amostras de soro (S, ativador de coagulação e gel separador) e plasma (P, NaF/EDTA) foram mantidas por 1, 2 e 3 horas em banho de gelo (2-4°C). Os valores são apresentados como média (± 1 -Desvio Padrão). Não há diferença significativa entre soro e plasma ou entre dos tempos testados para todas as amostras (teste t-Student, $P>0,05$).

É possível concluir neste experimento que a reduzindo a temperatura do sangue na primeira hora após a coleta, preserva a glicólise de forma similar em soro e plasma fluoretado. A **figura 4** mostra os resultados obtidos do Grupo II.

Figura 4 – Comparação entre soro e plasma da glicemia em diferentes tempos.



O tempo de 1 hora foi considerado 100%. Dosagens da glicemia de 23 indivíduos foram convertidas em porcentagem em relação à medida de 1 hora de cada amostra. As amostras imediatamente após a coleta foram submersas em gelo (2-4°C) e após a 1 hora mantidas a temperatura ambiente (20-25°C). Comparações entre as concentrações entre soro e plasma para os mesmos tempos não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) em todo o período do experimento.

Após 24h foi observado uma redução média na glicemia de 9% e 10%, para o soro e plasma respectivamente. A análise dos experimentos, sugerem que o soro centrifugado e mantido em tubo com gel separador, apresenta perfil reduzido na glicólise com padrão semelhante ao plasma.

Cuidados no procedimento de preparo da amostra são fatores chave para uma adequada dosagem glicêmica. O inibidor NaF é recomendado, porém a perda da glicose sanguínea deve ser considerada, levando em conta a baixa eficiência quando utilizado isoladamente[18]. A dosagem da glicose utilizando o soro como amostra, mostrou-se benéfica, devido trazer facilidades e economia para paciente e ao laboratório. Como estes aditivos antiglicolíticos impedem o uso para análise de outros exames bioquímicos, um maior volume de amostra do paciente é necessário para os diferentes tubos de recolha de sangue. No laboratório, seguindo procedimentos adequados, menor número com os tubos de recolha gastos e também menor volume de amostras ocupando os analisadores bioquímicos, o que representa maior rapidez e praticidade durante as análises. Henry et al.[9] recomenda o uso de soro se este for separado (sem contaminação com células sanguíneas), no máximo até 30 minutos da coleta.

Já Burtis e Ashwood [10] relatou que não é seria necessário o uso do flúor se o soro for separado dentro de 60 minutos após a coleta sanguínea. Nestes estudos tanto Henry *et al* [9] quanto Burtis e Ashwood *et al* [10], relatam haver maior degradação da glicose com um volume corpuscular médio (VCM) elevado.

O uso isolado do fluoreto de sódio não é considerado um eficiente antiglicolítico [19]. A acidificação do sangue descrito inicialmente por Uchida *et al* [29] é um procedimento que inibe a glicólise. Um tampão de citrato de pH > 6,0 inibe as enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase que operam no início da via glicolítica, [11]. O uso do citrato é indicado pela Associação Americana de Química Clínica (AACC), técnica amplamente utilizada na Europa por ser considerada eficiente para o bloqueio da glicólise [12,18]. A glicose mantida em tampão de citrato com pH entre 5.3-5.9 se mantém estável por 10 horas em temperatura ambiente [18]. Schrotet *et al*. (2007) cita que o tempo para se obter o soro é maior, e que esta metodologia não caberia a muitos pontos de coleta sanguínea.

A busca de um aditivo ideal para preservar a glicose sanguínea inclui vários requisitos como, ter boa solubilidade, ser eficaz em baixa concentração, ser resistente a temperatura ambiente, ser atóxico e de baixo custo [22,23]

Substanciado pelo presente estudo, é possível propor que o soro adequadamente coletado (imediatamente refrigerado ou realizando a centrifugação no máximo 1h após a coleta), possa substituir o uso do plasma fluoretado para quantificação da glicemia. Os tubos de fluoreto podem ser indicados para situações onde não se possa garantir o processamento da amostra em tempo hábil, como em coletas realizadas em locais distantes, onde o sangue total é transportado sem a separação do plasma, não eliminando a necessidade de resfriamento para satisfatória preservação glicêmica.

Em síntese, nosso estudo mostra que reduzindo a temperatura imediatamente após a coleta, os tubos de coleta de soro com gel separador e ativador de coagulação podem ser utilizados na rotina laboratorial para a determinação da glicemia em substituição à amostra coletada com fluoreto de sódio. Uma vez centrifugado, o tubo de soro é capaz de manter a glicemia de forma similar ao fluoreto por até 24 horas. A metodologia aplicada neste trabalho é compatível com a maioria dos laboratórios clínicos e permite, sem

prejuízo, suprimir um tubo de recolha de sangue, minimizando custos e otimizando o processamento das amostras.

AGRADECIMENTOS.

Agradeço ao Programa de Especialização em Análises Clínicas da UFPR, ao meu professor orientador Geraldo Picheth ao apoio e confiança, e ao Laboratório pelo apoio e custeio das análises e a todas as pessoas que de forma direta ou indiretamente colaboraram durante a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association, Diabetes Care, V. 27, Supplement 1, 01/2004.
2. Stephen A. Baldwin, Jocelyn M. Baldwin, Gustav E. Lienhard, Monosaccharide transporter of the human erythrocyte. Characterization of an improved preparation. American Chemical Society 1982.
3. Ferreira C.P. Bioquímica Básica .9.ed. São Paulo: MNP,2010.463.
4. Baynes, J.; Dominiczak, M. Bioquímica Médica. 2ª Ed. Elsevier, 2007.
5. Young, D. S. Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests. 2nd edition, AACC Press, Washington, 1997.
6. Carolina Quiroz-Arias. Erros Pre-analíticos en el Laboratorio Clínico. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud. Edificio 134 "IDELAC", Universidad del Valle, sede San Fernando. 18-16-2010.
7. Champe CP, Harley AR, Ferrier RD. Bioquímica Ilustrativa. São Paulo: Artmed editor, 2006. 533p
8. Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. Principios de Bioquímica. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.
9. Henry, J. B. (ED.) Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 19th ed. Philadelphia: Saunders, 1996.
10. Burtis, C. A.; Ashwood, E. R. (ED.) Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1999.
11. Gambino R, Piscitelli J, Ackattupathil TA, Theriault JL, Andrin RD, Sanfilippo ML, et al. Acidification of blood is superior to sodium fluoride alone as an inhibitor of glycolysis. Chin Chem. 2009;55:1019-1021
12. Lean M. Mikesch and David E. Bruns,; Stabilization of Glucose in Blood Specimens: Mechanism of Delay in Fluoride Inhibition of Glycolysis, Department of Pathology, PO Box; clinchem.2007.102160 Published April 2008.
13. BD (Brasil Diagnostics). Preanalytical Systems, São Paulo, 2009.76p.
14. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia clínica/Medicina Clínica.http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/livro_coleta_biologica2013.pdf
15. David E. Bruns and Willian C. Knowler Stabilization of Glucose in Blood Samples: why it matters Clin Chem 2009, 55:5 850-852.

16. Chan AYW, Swaminathan R, Cockram CS Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem* 1989; 35:315-317.
17. Waring WS, Evans LE, Kirkpatrick CT. Glycolysis Inhibitors Negatively Affect Blood Glucose Measurements: Potential Impact on the Reported Prevalence of Diabetes Mellitus. *J Clin Pathol.* 2007; 60:820-823. Doi:10.1136/jcp.2006.039925
18. Gambino R. Glucose: simple molecule that is not simple to quantify. *Clin Chem* 2007; 53:2040-2041.
19. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Position statement executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2011;34:1419-1423.
20. Uchida K, Matuse R, Toyoda E, Okuda S, Tomita S.A. New method of inhibiting glycolysis in blood samples. *Clin Chim Acta.* 1988;172:101-108.
21. Gambino R. Sodium fluoride: an ineffective inhibitor of glycolysis, *Ann Clin Biochem.* 2013;50:3-5.
22. Larson, L; Ohman, S. Effect of silicone-separator tubes and storage time on ionized calcium in serum. *Clin Chem* 1985, 31:169-170.
23. Schrot RJ, Patel KT, Foulis P. Evaluation of inaccuracies in the measurement of glycemia in the laboratory, by glucose meters, and through measurement of hemoglobin A1c. *Clinical Diabetes*, 2007, 25(2): 43-49