

Agregação e Sedimentação Eritrocitária Utilizando VHS (Velocidade de Hemossedimentação) e Espectrofotometria UV-Vis

Giuliano S. Martins^a; Antonio V. Cardoso^a; Guilherme A. Marcondes^a

^aLaboratório de Reologia, Setor de Análises Químicas,
Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC)
Av. José Candido da Silveira nº 2000, CEP 31170-000, Belo Horizonte (MG), Brasil.
e-mail: giulianos@ufmg.br, antonio.cardoso@cetec.br, guilhermemeja@yahoo.com.br

RESUMO

A agregação eritrocitária excessiva está intimamente ligada à ocorrência de alguns processos patológicos e diretamente relacionada ao fenômeno de sedimentação eritrocitária. Neste trabalho investigamos as características cinéticas do processo de agregação e sedimentação eritrocitária. Para este estudo foram realizados ensaios de VHS (Velocidade de Hemossedimentação) com sangue suíno (hematócrito H de 20%, 25%, 30% e 35%) e absorvância em função do tempo, utilizando espectrofotometria UV-Vis, em amostras de sangue suíno (hematócrito de 1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 30%) e sangue humano (hematócrito de 5%, 10%, 15% e 20%). Os ensaios de VHS indicaram que a sedimentação diminui com o aumento do hematócrito (H); entretanto, nos ensaios de espectrofotometria o fenômeno não é observado. O VHS é uma técnica essencialmente macroscópica enquanto a espectrofotometria fornece informações que facilitam uma análise da microestrutura do sangue e a compreensão das etapas dos processos de agregação e sedimentação. É possível distinguir, com o UV-Vis, quatro regiões no processo: a- Região I onde ocorre a agregação eritrocitária; b- Região II onde ocorre crescimento dos agregados e termina o início da sedimentação; c- Região III onde ocorre a sedimentação da amostra; e d- Região IV, um platô que indica a parte final do processo de sedimentação.

Palavras chaves: VHS, agregação eritrocitária, velocidade de hemossedimentação.

Erythrocyte Sedimentation and Erythrocyte Aggregation Using ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate) and UV-Vis Spectrophotometry

ABSTRACT

Erythrocyte aggregation is at the root of many pathological processes and directly related to the phenomenon of erythrocyte sedimentation. Here we have investigated the kinetic characteristics of the erythrocyte aggregation and erythrocyte sedimentation of **swine blood samples** using the ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate) technique and the UV-Vis spectrophotometer (absorbance) at a fixed wavelength (655 nm) versus time(seconds) of **swine** and **human blood samples**. For the ESR experiments of swine blood we have used samples with different hematocrits H= 20%, 25%, 30% e 35%. For the UV-Vis experiments of swine blood samples we have used the hematocrits H= 1%, 5%, 10%, 15% and 20% at a fixed 655 nm wavelength and for the human blood the hematocrits chosen were H=5%, 10%, 15% and 20%. Blood sedimentation rate data has been measured at 300s intervals during a period of 10,000s. While the UV-Vis assays had been carried through during 1.200s with data acquisition every 1s. ESR results show that the sedimentation rate of swine blood decreases as the hematocrit increases while the reverse phenomenon occurs in the UV-Vis experiments. From the ESR it is possible to distinguish three regions: I-the red blood cell aggregation process which is a plateau; II- the sedimentation process and III- a plateau indicating the end of sedimentation. With the UV-Vis it is possible to observe the sedimentation in much more detail with at least four regions: I-the aggregation slope; II-The aggregation and growth of rouleaux followed by an “avalanche” of erythrocyte sedimentation; III-the sedimentation; IV- end of sedimentation.

Keywords: ESR, erythrocyte aggregation, erythrocyte sedimentation speed.

1 INTRODUÇÃO

Desde a Antiguidade Clássica é sabido que uma amostra de sangue colocada em um tubo vertical, em repouso, leva a sedimentação os eritrócitos. As primeiras observações a respeito da velocidade de sedimentação ocorreram na Grécia Antiga; os gregos utilizavam estas observações para constatar a presença de enfermidades [1].

O conceito de velocidade de hemossedimentação (VHS) foi introduzido em 1918 pelo médico e cientista sueco Robin Fahraeus (1888-1968). Fahraeus observou, em 1921, que suspensões sanguíneas mais diluídas possuíam uma taxa de sedimentação maior [2].

Alf Westergreen publicou um artigo, em 1924, intitulado “A Reação de Sedimentação”, neste artigo Westergreen descreve uma técnica para determinação da VHS [3]. Esta técnica ainda é largamente utilizada com pequenas modificações em relação ao método original [4]. O ensaio de VHS é utilizado para determinação de processos infecciosos e inflamatórios tais como tuberculose, doenças reumáticas, linfomas e alguns tipos de câncer [5, 6, 7]. Os mecanismos físico-químicos do processo de sedimentação originam-se da agregação dos eritrócitos (formação de rouleaux), das características das células sanguíneas e dos elementos do plasma [8, 9].

Alguns autores identificam o balanço de cargas elétricas existente entre os eritrócitos e o plasma como causa da agregação eritrocitária [10]. Também a concentração de fibrinogênio é considerada como uma das proteínas de maior influência no processo de agregação [11]. As principais macromoléculas que contribuem para o aumento da VHS em ordem decrescente seriam o fibrinogênio, α -globulina e a γ -globulina. Por outro lado, as principais macromoléculas que contribuem para a redução na velocidade de hemossedimentação são as albuminas e as lectinas [12].

O ensaio de VHS possui uma série de limitações tais como falta de especificidade, dependência em relação ao tempo de coleta de amostra, modificações nos valores da VHS durante o ensaio e precisão [13].

O valor da VHS modifica-se em relação à idade sendo maior nas pessoas mais velhas [14, 15]. Atribui-se um valor de 0,85mm/h a cada cinco anos de idade acrescidos para espécie humana. O sexo também é responsável por características diferenciadas na velocidade de sedimentação tendendo a ser maior nos homens [16].

Devido aos fatores mencionados nos parágrafos anteriores é necessária uma maior compreensão do fenômeno de sedimentação eritrocitária. Nesse estudo, as técnicas de espectrofotometria UV-VIS e VHS (método Westergreen) e o fenômeno da agregação eritrocitária foram utilizadas em conjunto para a investigação do fenômeno de hemossedimentação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e Armazenagem do Sangue

As amostras de sangue de animais obtidas para essa pesquisa foram provenientes de animais destinados ao abate e consumo humano. As amostras de sangue suíno foram coletadas em matadouros existentes na região metropolitana de Belo Horizonte, e coletadas por agentes do Serviço Sanitário do Ministério da Agricultura, em tubos Falcon de 50mL contendo EDTA (etilenodiaminatetracetato) na proporção de uma 10 μ l para cada 5ml de sangue. O EDTA mantém a morfologia do eritrócito, não interfere nos mecanismos que levam a sedimentação e aumenta a estabilidade da amostra [17]. Posteriormente, o sangue foi armazenado e transportado a uma temperatura de aproximadamente 10°C. Em laboratório, as amostras foram conservadas em refrigerador também a ~10°C [18]. Os ensaios foram realizados em, no máximo, uma hora após a coleta.

As amostras de sangue humano foram coletadas, no momento da realização dos ensaios, por um técnico em patologia clínica do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) segundo protocolo aprovados pelo Comitê de Ética daquela universidade [19]. Foram coletados 10mL de sangue por ensaio com a adição de EDTA (10 μ l para cada 5mL).

2.2 Determinação do Hematócrito

O hematócrito (H), que é aproximadamente igual à relação $\left(\frac{\text{volume} \cdot \text{de} \cdot \text{hemácias}}{\text{volume} \cdot \text{total} \cdot \text{do} \cdot \text{sangue}} \right) (\%)$,

das amostras foi determinado utilizando-se uma micro-centrífuga (Centimicro, modelo 211, marca Fanem) e cartão de leitura de hematócrito. As amostras de sangue foram centrifugadas em tubos capilares (quatro tubos por centrifugação) durante 10 minutos. Após centrifugação, os tubos eram lidos com auxílio de um cartão de leitura de hematócrito. O valor final do hematócrito foi a média aritmética dos valores dos quatro tubos.

2.3 Ensaio de VHS

Para realização do ensaio de VHS os hematócritos foram ajustados para 20%, 25%, 30% e 35% através da adição de plasma autólogo. As amostras com hematócritos ajustados eram colocadas em pipetas do tipo Westergreen e posicionados em suportes adequados, todas em posição vertical. Em seguida mediu-se a queda da coluna de eritrócitos, os ensaios foram realizados em triplicata. A queda da coluna de eritrócitos foi medida em intervalos de tempo de 5 minutos até o momento da estabilização das leituras.

O resultado final foi obtido a partir da média aritmética dos resultados para cada hematócrito em uma curva de sedimentação em função do tempo. As médias e os desvios foram calculados com auxílio de software comercial para tratamento de dados (EXCEL).

2.4 Ensaio de Espectrofotometria

Para o ensaio espectrofotométrico, as amostras de sangue foram ajustadas para os hematócrito de 1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 30% e as amostras de sangue humano para os hematócrito de 5%, 10%, 15% e 20%. Os ensaios espectrofotométricos foram realizados no modo cinético (absorbância (A) em função do tempo) em espectrofotômetro de feixe duplo (espectrofotômetro HITACHI, modelo U3000). A cubeta de referência foi mantida vazia.

As amostras foram lidas imediatamente após ajuste do hematócrito. Para cada leitura utilizou-se 2ml de amostra, comprimento de onda de 655nm, cubeta de vidro de quartzo, com caminho óptico de 10mm e tempo total de leitura de 1200s. Os dados foram adquiridos a cada 1s. As médias e os desvios - padrão foram calculados com auxílio de software para tratamento de dados (EXCEL).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da agregação e sedimentação do sangue por VHS (Velocidade de Hemossedimentação).

A Figura 1 apresenta o resultado do ensaio de VHS (velocidade de hemossedimentação). Este resultado apresenta uma relação entre o valor do hematócrito e o processo de sedimentação. Observa-se que o processo de sedimentação necessita de um tempo maior para ocorrência nos hematócritos maiores e apresenta-se mais acelerado (taxa de sedimentação maior) nos hematócritos menores.

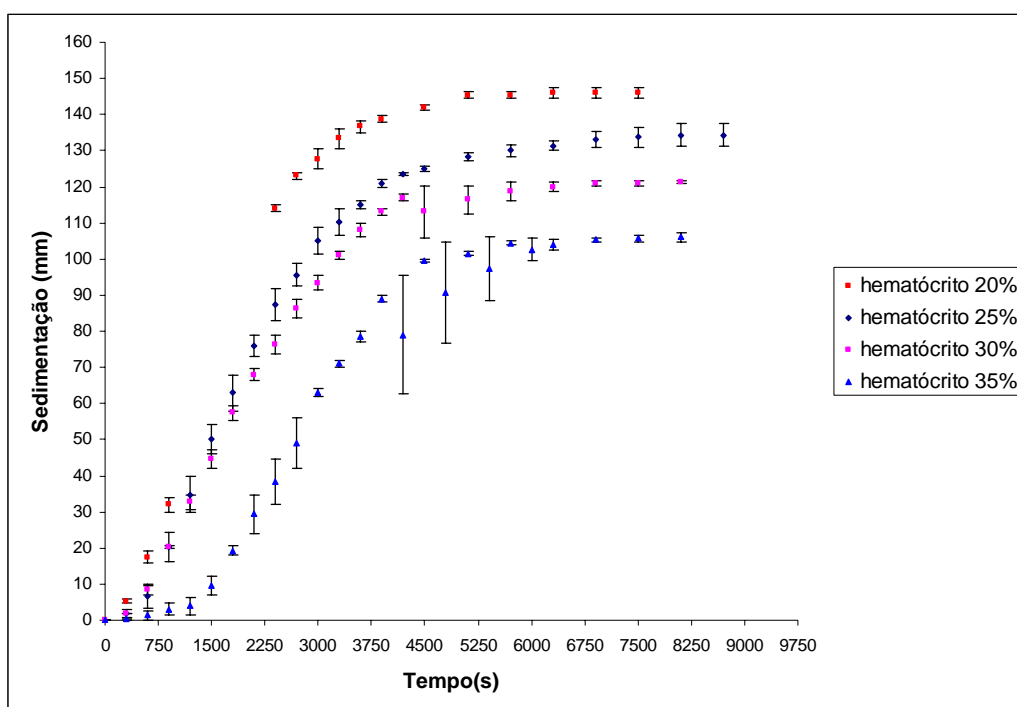


Figura 1: Ensaio de VHS (Velocidade de Hemossedimentação) realizado com amostras de sangue suíno (hematócrito (H) de 20%, 25%, 30% e 35%). Observa-se que o processo de sedimentação é mais veloz (taxa de sedimentação maior) nos hematócritos **menores** do que nos maiores.

As curvas de sedimentação no ensaio de VHS apresentam três regiões distintas (Fig.2). Um patamar inferior (Região I), que sinaliza o início do processo de agregação e caracteriza-se por uma região estável paralela à abscissa (linha do tempo). A segunda região (Região II) determina a taxa de sedimentação (mm/s); nessa região os agregados se encontram formados e o número de colisões entre as partículas reduz-se, predominando o processo de sedimentação. A terceira região (Região III) é caracterizada por um patamar que indica o fim do processo de sedimentação.

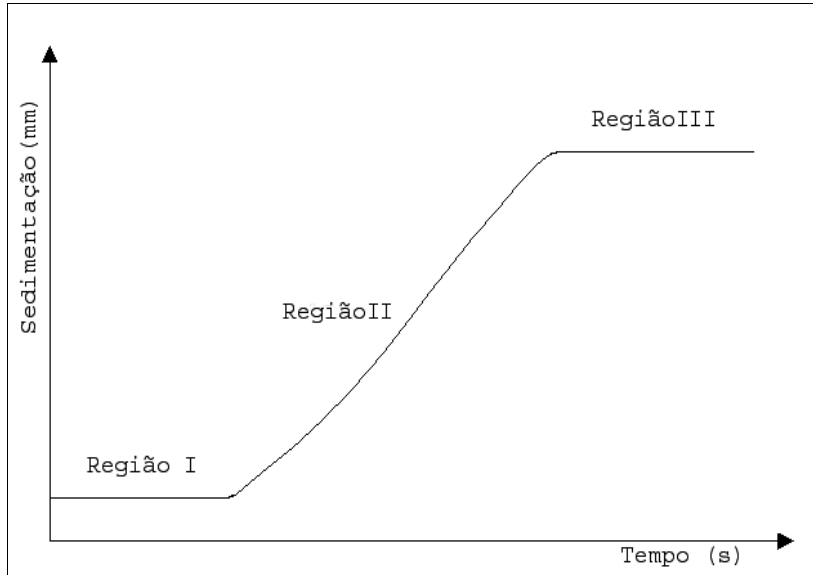


Figura 2: Esboço da *curva característica* (ou padrão) para o processo de sedimentação do sangue no ensaio de VHS (Velocidade de Hemossedimentação). As regiões representadas na figura são: i-Região I=início do processo de agregação; ii-Região II= sedimentação; iii-Região III=fim do processo de sedimentação.

A taxa de sedimentação foi determinada a partir da inclinação das curvas e desconsiderando-se as regiões onde as curvas assumem valores constantes (Fig.3). Os valores da taxa de sedimentação em função do hematócrito obedecem a seguinte seqüência: 20%(0,042mm/s) > 25%(0,037mm/s) >30%(0,030mm/s) >35%(0,027mm/s).

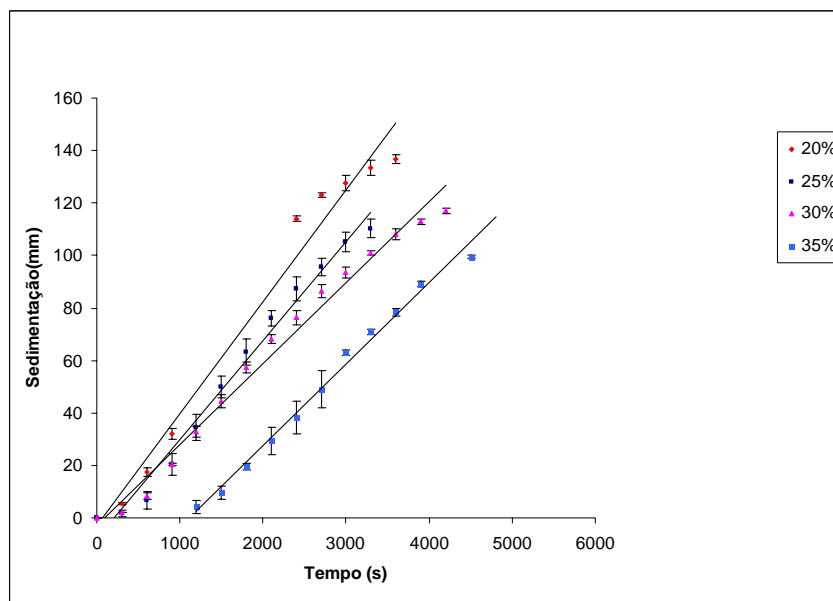


Figura 3: Regressão linear da seção reta (Região II) das curvas de Velocidade de Hemossedimentação realizado com amostras de sangue suíno (hematócritos 20%, 25%, 30% e 35%). A taxa de sedimentação, em função do hematócrito, obedece a seguinte seqüência: 20%(0,042mm/s) > 25%(0,037mm/s) >30%(0,030mm/s) >35%(0,027mm/s).

Alguns fatores podem explicar este resultado tais como densidade das partículas e densidade do plasma sanguíneo, número de partículas presentes em suspensão e número de colisões entre as partículas. Algumas hipóteses são sugeridas para se compreender o comportamento das curvas no ensaio de VHS.

A primeira parte do pressuposto de que quanto menor o hematócrito, menor é número de colisões entre as hemácias, com significativo aumento do livre caminho médio entre elas. Conseqüentemente o processo de sedimentação é facilitado pela ausência de obstáculos entre as partículas (neste caso eritrócitos). Por outro lado, nos hematócritos maiores, apesar do grande número de partículas facilitarem o processo de agregação, o processo de sedimentação é dificultado pelas colisões entre as partículas que tendem a retardar a sedimentação.

A segunda hipótese considera que todas as suspensões no ensaio de VHS estão inicialmente em repouso, nessa situação a formação de agregados prevalece, ocorrendo com maior freqüência nas suspensões sanguíneas onde hematócritos maiores. Como um maior número de *roleaux* (agregados de hemácias) demanda mais energia para se locomoverem através de um fluido, nas suspensões onde os hematócritos possuem valores mais elevados, este fator juntamente com as colisões do sistema dificulta o processo de sedimentação. Essa análise considera que a probabilidade de ocorrer à formação de agregados de dimensões maiores (maior número de hemácias por agregado) ocorre quando o hematócrito possui valor mais elevado.

Uma outra hipótese supõe que a geometria do tubo utilizado para ensaio (pipeta de 20 cm de extensão e diâmetro de aproximadamente 2,5mm) interfere no processo de sedimentação. Assim, o diâmetro do tubo interfere na sedimentação devido às colisões dos eritrócitos entre si e com as paredes do tubo (efeito de parede); portanto nos hematócritos maiores, a sedimentação é mais lenta.

3.2 Agregação e Sedimentação do Sangue Utilizando Espectrofotometria UV-Vis

A Figura 4 apresenta resultados típicos para o ensaio de espectrofotometria UV-Vis (absorbância (A) em função do tempo (em segundos)) em amostras de sangue suíno.

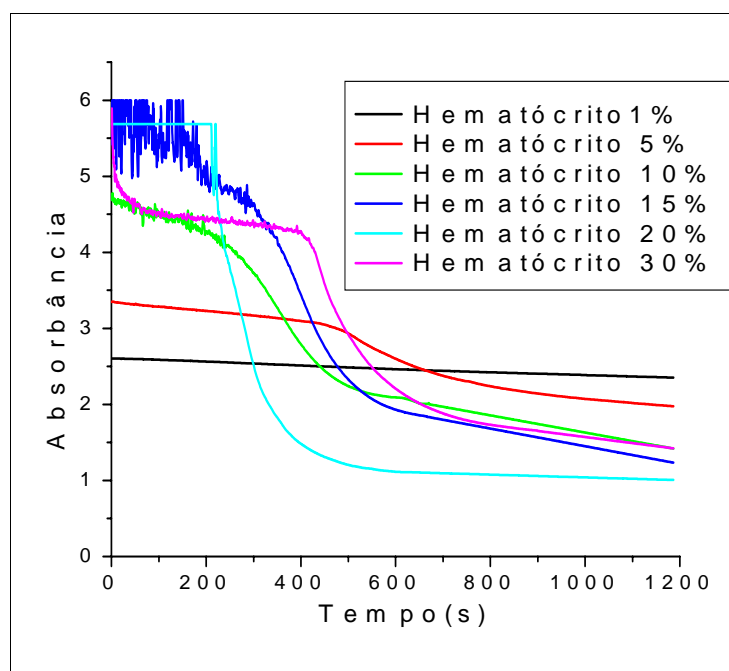


Figura 4: Absorbância no comprimento de onda $\lambda=655\text{nm}$ (A_{655}), modo cinético (t em segundos), utilizando amostras de sangue suíno (hematócrito de 1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 30%). A *descrição qualitativa* das etapas do processo de agregação e sedimentação pode ser obtida pelo formato das curvas de absorbância

Apesar dos valores de absorbância ser demasiadamente alto (transmitância extremamente baixa), a *descrição qualitativa* das etapas do processo pode ser obtida pelo *formato das curvas* de absorbância, que permite uma análise das diferentes regiões que compõem o processo de agregação e sedimentação. Supôs-se, através do estudo da Figura 4, que o processo de agregação eritrocitária ocorre em duas etapas, uma acelerada, expressa pela presença da queda inicial acentuada da absorbância (Região I, Figura 5) e uma menos acentuada descrita pela região seguinte (Região II, Figura 5). Assim, a Região I apresenta somente o processo de agregação eritrocitária. Na Região II o fenômeno de sedimentação está presente, entretanto o

fenômeno de agregação é dominante com a formação da maior parte dos agregados restantes e a posterior ocorrência do “efeito avalanche”, caracterizado por uma queda acentuada da absorvância (Região III). A pequena queda na absorvância da Região II poderá ser relacionada com o crescimento volumétrico dos *roleaux*.

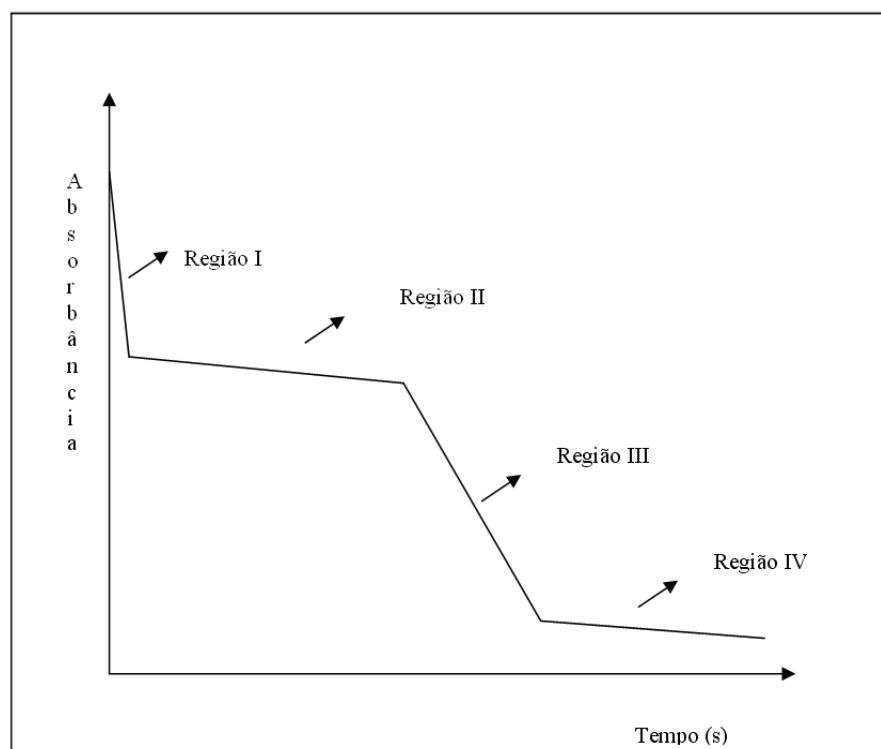


Figura 5: Esboço da *curva característica* (ou *padrão*) do processo de agregação e sedimentação eritrocitária, produzido a partir das curvas experimentais obtidas nos ensaios espectrofotométricos com amostras de sangue suíno. As regiões representadas na figura são: i-Região I = agregação eritrocitária; ii-Região II = crescimento dos agregados; iii-Região III = sedimentação; iv-Região IV = final do processo de sedimentação.

A Região III é descrita pela predominância do fenômeno de sedimentação com um pequeno grau de agregação devido aos agregados que, ao sedimentarem, colidem entre si. A Região IV é caracterizada por uma sedimentação lenta causada pelas partículas de menores dimensões (pequenos agregados). A inclinação da Região III é, até certo valor, função do hematócrito. Este efeito é fácil de ser observado na curva de hematócrito igual a 1%: o número de eritrócitos é pequeno e a probabilidade de se formar um grande agregado também é muito pequena gerando uma queda lenta na absorvância. Os patamares correspondentes às Regiões II, III e IV estão presentes no hematócrito 1%, no entanto apresentam-se muito menos acentuados.

A extensão do platô presente na Região II também está ligada ao valor do hematócrito através de uma relação inversa, ou seja, quanto maior for o valor do hematócrito menor será a extensão do platô. O efeito “avalanche” ocorre de forma mais acelerada nos hematócritos maiores, devido ao maior número de colisões existente entre os eritrócitos e maior tamanho dos agregados.

Parece também existir uma relação entre o hematócrito e a taxa de agregação inicial, determinada pela inclinação das curvas referentes à Região I. Os dados nesta região são, entretanto, os mais difíceis de serem coletados porque o fenômeno de agregação inicia-se ainda quando o sangue encontra-se em movimento (a agregação eritrocitária ainda ocorre em taxas de cisalhamento da ordem de 50 s^{-1}). Nos hematócritos maiores, a taxa de agregação inicial é maior porque as hemácias colidem mais. À medida que ocorre a redução no hematócrito, ocorre uma redução na inclinação da reta tangente à Região I (inclinação em relação ao eixo da absorvância, eixo y).

Utilizando-se o software Excel, foram calculados os coeficientes das linhas de tendência (retas com equação $ax + b$, onde a é a inclinação da reta) das Regiões I, II, III e IV da Figura 4, obtendo-se a Figura 6. Quanto maior a inclinação da curva de absorvância, maiores são as taxas de agregação e sedimentação. As linhas pontilhadas que ligam os pontos na Figura 6 são utilizadas apenas para evidenciar o comportamento dos dados e não possuem significado físico.

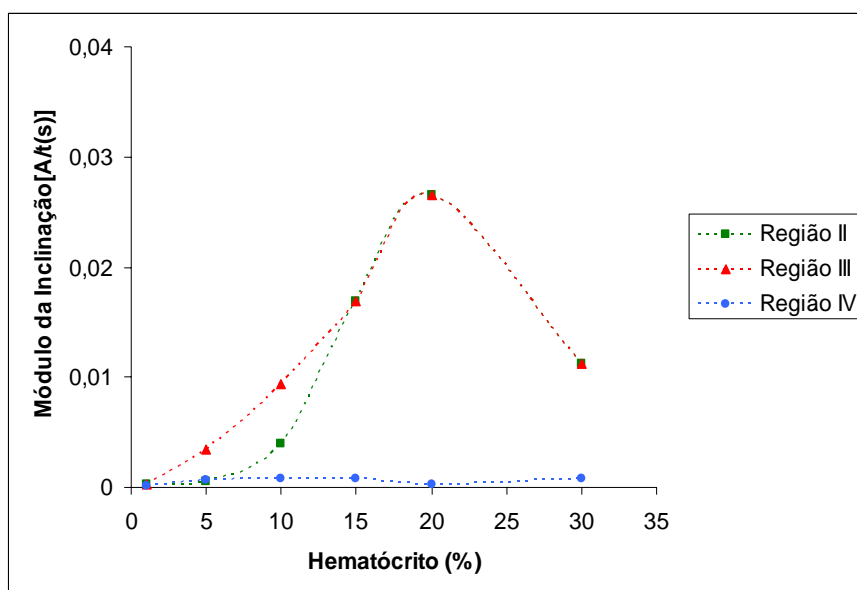


Figura 6: Valores dos módulos das inclinações das retas (obtidas por regressão linear) das Regiões II, III e IV em função de hematócrito (H). Dados do ensaio de espectrofotometria UV-Vis, modo cinético ($\lambda=655\text{nm}$), utilizando amostras de sangue suíno (hematócritos 1%, 5%, 10%, 15%, 20% e 30%).

Para a Região II e III, a inclinação aumenta (em módulo) até um hematócrito de 20% sofrendo em seguida um decréscimo em seu valor.

Ensaio com sangue humano foram realizados para se verificar se o comportamento apresentado pelas amostras de sangue suíno, ocorre em outros tipos de sangue. A Figura 7 apresenta os resultados obtidos nestes ensaios com sangue humano.

O comportamento em relação ao valor do hematócrito é semelhante para os dois tipos de sangue (humano e suíno); hematócritos menores assumem um comportamento quase linear; quando o hematócrito aumenta, a formação das quatro regiões se torna mais acentuada. As semelhanças entre os resultados são atribuídas à semelhança entre os dois tipos de amostras de sangue, pois tanto o sangue humano como o sangue de porco agrega-se naturalmente.

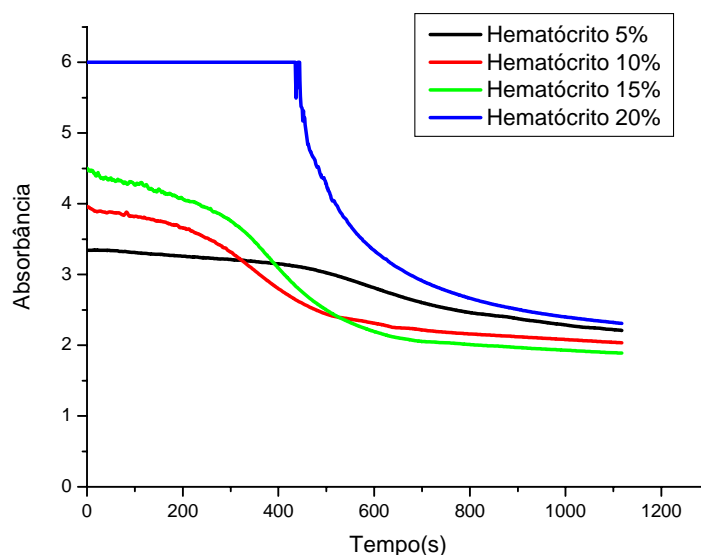


Figura 7: Absorbância no comprimento de onda $\lambda=655\text{nm}$ (A_{655}), modo cinético (t em segundos), utilizando amostras de sangue humano (hematócrito de 5%, 10%, 15% e 20%). O comportamento apresentado pelas amostras de sangue suíno (Veja Figura 4) e humano apresenta-se semelhante.

A Figura 8 apresenta os coeficientes a das linhas de tendência (retas) obtidas com o software Excel para o sangue humano. Quanto maior a inclinação da curva de absorvância, maiores são as taxas de agregação e sedimentação. As linhas pontilhadas que ligam os pontos na Figura 8 são utilizadas apenas para evidenciar o comportamento dos dados e não possuem significado físico.

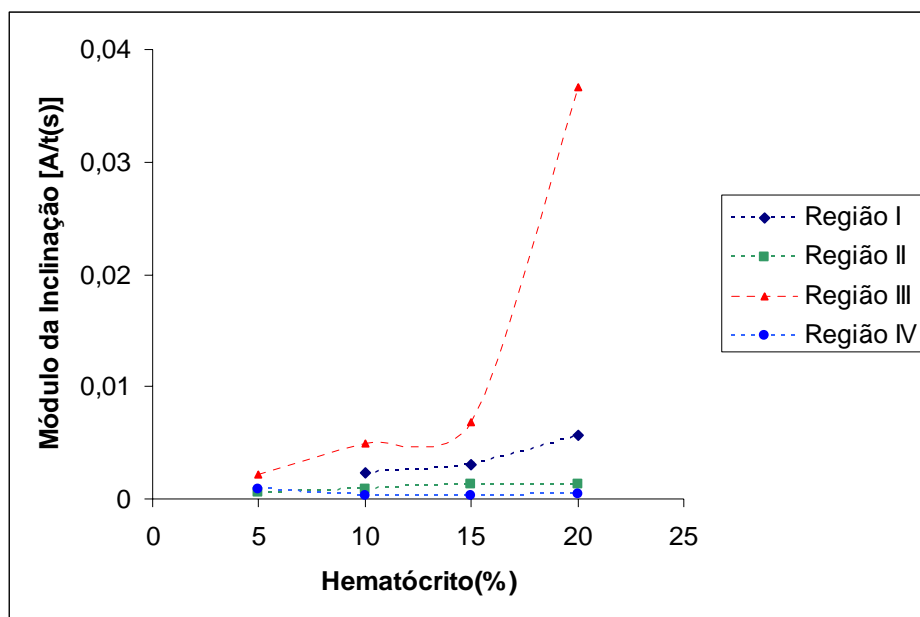


Figura 8: Valores dos módulos das inclinações das retas (obtidas por regressão linear) das Regiões I, II, III e IV em função de hematócrito (H). Dados do ensaio de espectrofotometria UV-Vis no modo cinético ($\lambda=655\text{nm}$) utilizando amostras de sangue humano (hematócritos 5%, 10%, 15% e 20%).

Cotejando as Figuras 6 (sangue suíno) e Figura 8 (sangue humano) pode-se observar que a Região II do sangue humano não apresenta crescimento em função do hematócrito como ocorre com o sangue suíno. A Região III (sedimentação) acompanha o mesmo padrão para os dois tipos de sangue com um máximo em torno de $H=20\%$. Em relação à Região IV o comportamento das amostras indica que os valores de absorvância caminham lentamente para um valor fixo (absorvância do plasma).

4 CONCLUSÕES

A partir das curvas obtidas nos ensaios de VHS e espectrofotometria UV-Vis é possível descrever as *modificações da microestrutura do sangue* que controlam o fenômeno microscópico da agregação eritrocitária e, em seqüência, o fenômeno macroscópico da sedimentação.

As curvas obtidas nos ensaios de VHS possuem o inconveniente de tornar difícil a leitura e determinação de pontos experimentais para hematócritos inferiores a 20%.

As curvas obtidas nos ensaios com o espectrofotômetro UV-Vis conseguem captar as diferentes etapas do processo de agregação e sedimentação; entretanto, em hematócritos maiores as leituras se tornam indeterminadas ou apresentam valores muito altos de absorvância devido ao tamanho do *caminho óptico* (cubetas de 10 mm de largura). Absorvâncias muito altas (transmitâncias muito pequenas) indicam a ocorrência concomitante de outros fenômenos ópticos (reflexão) na amostra. A redução do caminho óptico em equipamentos de UV-Vis possibilitará a utilização de hematócrito iguais aos existentes *in vivo*.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Bolsa de Mestrado para GSM na REDEMAT, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais UFOP-CETEC-UEMG) e à FAPEMIG (Bolsa de Iniciação Científica para GAM) pelo apoio financeiro concedido.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] BEDELL, S.E., BUSH, B.T., “Erythrocyte Sedimentation Rate. From Folklore to Facts”, *American Journal of Medicine*, v. 78, pp. 1001-1009, 1985.
- [2] SWANK, R.L., “The Influence of Ecological Factors on Blood Viscosity and Sedimentation and on Serum Cholesterol”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 19, pp. 418-432, 1962.
- [3] BULL, B., BRAILSFORD, J.D., “The Zeta Sedimentation Ratio”, *Blood*, n. 40, pp. 550-559, 1972.
- [4] ICSH, “International Council for Standardization in Hematology”, Recommendation of Measurement of Erythrocyte Sedimentation Rate, *Journal of Clinical Pathology*, v. 46, pp. 198-203, 1993.
- [5] SOX, H.C., LIANG, M.H., “Erythrocyte Sedimentation Rate”, *Ann International of Medicine*, n. 104, pp. 512-523, 1986.
- [6] BORRE, M., NERSTROM, B., OVERGAARD, J., “Erythrocyte Sedimentation Rate: a Predictor of Malignant Potential in Early Prostate Cancer”, *Acta of Oncology*, n. 36, pp. 689-694, 1997.
- [7] WOLF, F., “Comparative Usefulness of C-Reactive Protein and Erythrocyte Sedimentation Rate in Patients with Rheumatoid Arthritis”, *Journal of Rheumatology*, n. 102, pp. 21-28, 1997.
- [8] BALLAS, S.K., “The Erythrocyte Sedimentation Rate, Rouleaux Formation and Syndrome of Hiperviscosity: Theory and Fact”, *American Journal of Clinical Pathology*, n. 63, pp. 45-48, 1975.
- [9] MALLYA, R.K., BERRY, H., MACE, B., BEER, F.C., *et al.*, “Diurnal Variation of Erythrocyte Sedimentation Rate Related to Feeding”, *Lancet*, v. 1, pp. 389-390, 1982.
- [10] BIRCHAL, G., VIDIGAL, P.G., “Recomendações para o Uso da Velocidade de Hemossedimentação”, *Rev. Med. de Minas Gerais*, v. 14, pp. 52-57, 2004.
- [11] EASTHAM, R.D., “The Erythrocyte Sedimentation Rate and The Plasma Viscosity”, *Journal of Clinical Pathology*, n. 7, pp. 164-167, 1954.
- [12] OLSHAKER, J.S., SQUIRE, J.R., “Diurnal Variation of Erythrocyte Sedimentation Rate Related to Feeding”, *Lancet*, n. 1, pp. 389-390, 1997.
- [13] LANZARA, G.A., PROVENZA, J.R., BONFIGLIOLI, R. “Velocidade de Hemossedimentação (VHS) de Segunda Hora: Qual o Seu Valor?”, *Revista Brasileira de Reumatologia*, n. 41, pp. 237-241, 2001.
- [14] SANTOS, V.M., CUNHA, S.F.C., CUNHA, D.F., “Velocidade de Sedimentação das Hemácias: Utilidades e Limitações”, *Revista da Associação Médica Brasileira*, n. 46, pp. 232-236, 2000.
- [15] CHA, K, BROWN, E. F., WILMORE, D.W, “A New Bioelectrical Impedance Method for Measurement of the Erythrocyte Sedimentation Rate”, *Physiological Measurement*, n. 15, pp. 449-508, 1994.
- [16] BOTTIGER, L.E., CARLSON, L.A., EKELUND, L.G., OLSON, A.G., “Raised Erythrocyte Sedimentation Rate in Asymptomatic Hyperlipidimia”, *British Medical Journal*, n. 2, pp. 681-684, 1973.
- [17] PLEBANI, M., PIVA, E., “Erythrocyte Sedimentation Rate: Use of Fresh Blood for Quality Control”, *American Journal of Clinical Pathology*, n. 117, pp. 621-626, 2002.
- [18] ANVISA, PORTARIA N. 121 DE 24 DE NOVEMBRO DE 1995, pp. 69.
- [19] COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS (COEP-UFMG), PARECER: ETIC 0345/06, CAAE-0345.0.203.000-06.