

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Escola de Veterinária**

**Programa de Pós-graduação em Ciência Animal**

Gabriela Miccoli Alves

**Hematologia e bioquímicas em Araras Canindé (*Ara ararauna*), tigre d'água (*Trachemys scripta*) e pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) sob efeito de diferentes anticoagulantes**

Belo Horizonte  
2013

Gabriela Miccoli Alves

**Hematologia e bioquímicas em Araras Canindé (*Ara ararauna*), tigre d'água (*Trachemys scripta*) e pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) sob efeito de diferentes anticoagulantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora: Fabiola de Oliveira Paes Leme

Coorientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte  
2013

A474h            Alves, Gabriela Miccoli, 1985-  
                    Hematologia e bioquímicas em Araras Canindé (*Ara ararauna*), tigre  
                    d'água (*Trachemys scripta*) e pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) sob efeito de  
                    diferentes anticoagulantes / Gabriela Miccoli Alves.-2013.  
                    90 f. il.

                    Orientadora: Fabiola de Oliveira Paes Leme  
                    Coorientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

                    Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da  
                    UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.  
                    Bibliografia F. 75 – 90.

                    1. Veterinária - Teses - 2. Anticoagulantes - Teses - I. Paes Leme,  
                    Fabiola de Oliveira - II. Martins, Nelson Rodrigo da Silva –  
                    III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária –  
                    IV. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG  
COLEGIADO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO  
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 31270-901 - Belo Horizonte- MG  
FONES (31)-3409 2056 - 3409 2057 FAX (31) 3409 2059  
[http://www.vet.ufmg.br/ensino\\_posgraduacao/posgraduacao](http://www.vet.ufmg.br/ensino_posgraduacao/posgraduacao)  
E-mail cap@vet.ufmg.br

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **GABRIELA MICCOLI ALVES**

Às 9:00 horas do dia 27 de março de 2013, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado dos Cursos em 25/11/2012, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

Hematologia e bioquímica de Anaxas canindi (Anaxaxaxaxaxax) fígus d'agua (Trachemys Scripta) e pacarrãs (Lophocallurus Alexandri) sob efeito de diferentes anticoagulantes, como requisito final para a obtenção do Grau

de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina e Cirurgia Veterinárias**.

Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, Profª. Fabíola de Oliveira Paes Leme após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Dr. <u>Fabíola de Oliveira Paes Leme</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. <u>[Assinatura]</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. <u>[Assinatura]</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dr. _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a):  Aprovado  
 Reprovado

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 07 volumes encadernados da versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 27 de março de 2013.

Assinatura dos membros da banca:

[Assinatura]  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

[Assinatura]  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

(Normas Regulamentares da defesa de dissertação no verso)

**(Este documento não deverá conter rasuras)**

**(Este documento não terá validade sem assinatura e carimbo do Coordenador)**

À Luiza, minha querida e bela filha,  
obrigada, por deixar a vida mais leve,  
pela força e a vontade de sempre querer  
mais.

## AGRADECIMENTOS

À família, principalmente e indiscutivelmente. Hoje, já tendo formado a minha família com o André e a Luiza, percebo a importância e o valor que ela tem de forma clara e insubstituível. Vocês são um alicerce que me apoia e me sustenta. André, obrigada pela paciência, por tirar minhas dúvidas tecnológicas, pelo computador, e por estar ao meu lado em todos os momentos, especialmente nos mais desafiadores. Aos meus pais – Sérgio e José Álvaro, e a minha outra mãe Renata, pelo apoio e incentivo constante. Ao meu irmão Sandro, por me lembrar de que a vida sempre pode ser mais leve e divertida.

Ser filha de professores me moldou mais do que imaginava, a disciplina, o gosto por livros, leitura e estudos sempre presentes, nunca uma dificuldade, mas sempre algo natural. Um obrigada em mais que especial para minha mãe, Laura. Um exemplo desde sempre, uma mulher batalhadora, independente, forte, e que me ensinou o verdadeiro valor da resiliência e da determinação. Não há palavras para te agradecer, mama!

Um agradecimento especial para todos que me ajudaram nessa empreitada, todos do laboratório pelo companheirismo, pelo incentivo, pelos ensinamentos, e pelas risadas e lanches de sexta à tarde. Trabalhar com equipes como vocês nos mostra que podemos juntar, sim, o prazer e o trabalho. Daniel, prof. Nelson, Rogério, Ronald, Christiano, Leandro, Sheron, Lella, Pedro, e todos os outros que de forma direta ou indireta me ajudaram na obtenção dos animais, nas coletas, nos processamentos. Aos amigos da galeraBH e do Kdolimte que foram apoio nos momentos em que achei que nada ia dar certo, vocês fizeram toda a diferença.

Aos animais, as belas e coloridas araras (especial ao treze), os divertidos e inusitados tigres d'água e aos estranhos, porém simpáticos pacamãs. Vocês representaram uma conquista, trabalhar com animais silvestres é um sonho que eu cultivo desde antes de me tornar veterinária, e conseguir desenvolver esse trabalho com vocês me trouxe uma alegria e satisfação sem fim, além de me proporcionar aprendizados que levarei para sempre.

Fabiola, obrigada pelo e-mail há três anos, me convidando para juntar estas

duas paixões. Passamos por muito, obrigada pela companhia, pelo companheirismo, por ser amiga, mãe, orientadora. Você foi um guia essencial nesta jornada.

A todos vocês, sou eternamente grata. Sem vocês para instigarem, colaborarem e ajudarem, nada disto seria possível. A realização deste sonho é um reflexo do esforço e dedicação de cada um.

Muito obrigada, Gaby

## RESUMO

Estudos na área da hematologia de animais silvestres e exóticos são uma ferramenta importante para auxiliar o diagnóstico clínico e permitirem uma melhor compreensão das características e particularidades desses animais. O presente estudo como objetivo descrever valores e aspectos da hematologia e bioquímica de araras Canindé (*Ara ararauna*), tigres d'água (*Trachemys scripta spp.*) e pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*), sob o efeito de três anticoagulantes utilizados na rotina clínica veterinária: EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina. Foram coletadas amostras sanguíneas de 60 animais de cada espécie, 3 a 5mL de sangue de cada animal, o volume variou conforme a espécie. Após a coleta, o sangue foi distribuído em quatro micro tubos contendo: (1) EDTA-K<sub>3</sub> a 10%; (2) citrato de sódio a 3,8%; (3) heparina sódica. O restante da amostra foi acondicionado em um micro tubo, sem anticoagulante. Para todas as amostras foram realizadas a confecção de esfregaços sanguíneos, determinado o valor do hematócrito e concentração de proteínas. Foram aliqüotadas amostras para realização da contagem de hemácias, leucócitos e trombócitos na câmara de Neubauer e após a centrifugação para obtenção do plasma e soro para o processamento das avaliações bioquímicas. Foram dosados os seguintes analitos por técnica colorimétrica: albumina, proteínas totais, ureia, creatinina, glicose, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, ácido úrico, colesterol, triglicerídeos, lactato desidrogenase, e os demais, por método cinético: fósforo, cálcio e magnésio, em aparelho de bioquímica automático em cada anticoagulante pesquisado e no soro. Com base nos resultados, conclui-se que para araras EDTA é o melhor anticoagulante para a realização do hemograma; o citrato de sódio e a heparina são semelhantes na avaliação da hematimetria de araras, resultando em valores menores que os obtidos em amostras com EDTA; nas análises bioquímicas o EDTA se mostrou válido para um maior número de análises bioquímicas do que citrato de sódio e heparina e que o EDTA é o anticoagulante de escolha para realização de análises hematológicas e bioquímicas de araras Canindé. Os resultados de tigres d'água indicam que o citrato de sódio é o melhor anticoagulante para a realização do hemograma; dentre os anticoagulantes analisados, o citrato de sódio se mostrou válido para um maior número de análises

bioquímicas do que EDTA e heparina; o citrato de sódio é o anticoagulante de escolha para realização de análises hematológicas e bioquímicas de *Trachemys*. Para pacamãs os resultados apontam que para avaliação hematológica, a escolha do citrato de sódio como anticoagulante irá fornecer o melhor resultado; dentre os anticoagulantes analisados, o citrato de sódio se mostrou válido, para um maior número de análises (5 analitos) bioquímicas, do que citrato de sódio e heparina sódicas (3 analitos); O citrato de sódio é o anticoagulante de escolha para realização de análises hematológicas e bioquímicas de pacamãs.

Palavras-chave: hematologia; bioquímica; anticoagulantes; EDTA-K<sub>3</sub>; heparina de sódio; citrato de sódio; arara Canindé; *Ara ararauna*; Tigre d'água; *Trachemys scripta*; Pacamãs; *Lophiosilurus alexandri*.

## ABSTRACT

Studies in the field of haematology of wild and exotic animals are an important tool to assist clinical diagnosis and allow a better understanding of the characteristics and particularities of these animals. The present study aims to describe values and aspects of the haematology and biochemistry of Canindé macaws (*Ara ararauna*), water tigers (*Trachemys scripta spp*) and pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*), under the effect of three anticoagulants used in veterinary clinical routine: EDTA -K3, sodium citrate and heparin. Blood samples were collected from sixty animals of each species, 3 to 5mL of blood from each animal, the volume varied depending on the species. After collection, the blood was distributed into four microtubes containing: (1) 10% EDTA-K3; (2) 3.8% sodium citrate; (3) sodium heparin. The remainder of the sample was placed in a micro tube, without anticoagulant. Blood smears were prepared for all samples, determining the haematocrit value and protein concentration. Samples were aliquoted to count red blood cells, leukocytes, and thrombocytes in the Neubauer chamber and after centrifugation to obtain plasma and serum for processing biochemical evaluations. The following analytes were measured by colorimetric technique: albumin, total proteins, urea, creatinine, glucose, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, uric acid, cholesterol, triglycerides, lactate dehydrogenase, and the others, by kinetic method: phosphorus, calcium and magnesium, in an automatic biochemistry device in each anticoagulant studied and in the serum. Based on the results, it is concluded that for macaws EDTA is the best anticoagulant for performing the blood count; sodium citrate and heparin are similar in evaluating the hematimetry of macaws, resulting in values lower than those obtained in samples with EDTA; In biochemical analyses, EDTA proved to be valid for a greater number of biochemical analyses than sodium citrate and heparin and that EDTA is the anticoagulant of choice for carrying out haematological and biochemical analyses of Canindé macaws. The results from water tigers indicate that sodium citrate is the best anticoagulant for performing a blood count; Among the anticoagulants analysed, sodium citrate proved to be valid for a greater number of biochemical analyses than EDTA and heparin; sodium citrate is the anticoagulant of choice for carrying out haematological and biochemical analyses of *Trachemys*. For pacamãs, the results indicate that for haematological evaluation, the choice of sodium citrate as an anticoagulant will provide the best result; Among the anticoagulants

analysed, sodium citrate proved to be valid for a greater number of biochemical analyses (5 analytes) than sodium citrate and sodium heparin (3 analytes); Sodium citrate is the anticoagulant of choice for carrying out haematological and biochemical analyses of pacamãs.

Keywords: haematology; biochemistry; anticoagulants; EDTA-K<sub>3</sub>; sodium heparin; sodium citrate; Canindé macaw; *Ara ararauna*; Water tiger; *Trachemys scripta*; Pacamãs; *Lophiosilurus alexandri*.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores médios, seguidos do desvio padrão de volume globular (VG%); proteínas totais plasmáticas (PTP – mg/dL); contagem total de hemácias; contagem total e diferencial de leucócitos de *Ara ararauna* adultas, consideradas hípidas, amostras colhidas EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina sódicos. ....31
- Tabela 2. Valores médios, seguidos do desvio padrão de ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), alanina aminotransferase (ALT - UI/L), aspartato aminotransferase (AST - UI/L), cálcio (mEq/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL, lactato desidrogenase (LDH - UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicerídeos (mg/dL) e ureia (mg/dL) de amostras de soro e plasma de *Ara ararauna* colhidos em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina sódica ..... 33
- Tabela 3. Diferença percentual entre as amostras de soro e plasma colhido em EDTA-K<sup>3</sup>, citrato de sódio e heparina sódica para ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (UI/L), AST (UI/L), cálcio (mg/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL), LDH (UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicerídeos (mg/dL) e ureia (mg/dL) de *Ara ararauna*. .....34
- Tabela 4. Valores médios, seguidos do desvio padrão de volume globular (VG%); proteínas totais plasmáticas (PTP – mg/dL); contagem total de eritrócitos(x10<sup>5</sup>/μL); contagem total e diferencial de leucócitos; de *Trachemys spp* utilizando-se os em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina de sódio. ....48
- Tabela 5. Valores médios, seguidos do desvio padrão de ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (UI/L), AST (UI/L), cálcio (mEq/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL), LDH (UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicerídeos (mg/dl), ureia (mg/dL) de amostras de *Trachemys spp*. no soro e plasma colhidos em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina de sódio. ....50
- Tabela 6. Diferença percentual entre as amostras de plasma colhido em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina sódica para ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (UI/L), AST (UI/L), cálcio (mEq/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL), LDH (UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicerídeos (mg/dl), ureia (mg/dL) .....52
- Tabela 7. Valores médios seguidos do desvio padrão de volume globular (VG%); proteínas

totais plasmáticas (PTP –mg/dL); contagem total de eritrócitos; contagem total e diferencial de leucócitos; de *Lophiosilurus alexandri* colhidos em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina de sódio. ....63

Tabela 8. Valores médios, seguidos do desvio padrão de ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (UI/L), AST (UI/L), cálcio (mEq/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL), LDH (UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicerídeos (mg/dl), ureia (mg/dL) de amostras de *Lophiosilurus alexandri* soro e plasma colhidos em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina de sódio.....65

Tabela 9. Diferença percentual entre as amostras de plasma colhido em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina sódica para ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (UI/L), AST (UI/L), cálcio (mEq/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL), LDH (UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicerídeos (mg/dL), ureia (mg/dL).....66

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anestesia geral com isoflurano para coleta de sangue de arara Canindé em veia jugular direita externa. Parque Ecológico Vale Verde (Arquivo pessoal).....	27
Figura 2. Coleta de sangue através da venopunção jugular direita de arara Canindé. Parque Ecológico Vale Verde (Arquivo pessoal).....	27
Figura 3 - Estrutura montada no criatório para iniciar o processamento das amostras logo após a coleta. Parque Ecológico Vale Verde (Arquivo pessoal). ....	28
Figura 4. Recinto de répteis do Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA de Belo Horizonte - MG (Arquivo pessoal).....	44
Figura 5. Contenção e coleta de sangue através do plexo do seio cervical em <i>Trachemys</i> spp (Arquivo pessoal). ....	45
Figura 6. Coleta de sangue de pacamã: contenção manual com auxílio de um pano úmido (Arquivo pessoal). ....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EDTA-K3	Ácido etilenodiamino tetra-acético tássico
EDTA-Na2	Ácido etilenodiamino tetra-acético sódico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
VG	Volume globular
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais MG – Minas Gerais
CETAS	Centro de triagem de Animais Silvestres
EV	Escola de Veterinária
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ALP	Fosfatase alcalina
LDH	Lactato desidrogenase
ANOVA	Análise de variância
SNK	Student-Newman-Keuls
CK	Creatinaquinase
GGT	Gama glutamiltransferase
BUN	Nitrogênio ureico sanguíneo

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
CAPÍTULO 1: Avaliação hematológica e bioquímica de Araras Canindé, <i>Ara ararauna</i> , com o uso de EDTA-K <sub>3</sub> , citrato de sódio e heparina de sódio como anticoagulantes.....	21
REVISÃO DE LITERATURA.....	21
Avaliação clínica.....	21
Avaliação laboratorial.....	22
O uso de Anticoagulantes.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
Animais.....	26
Contenção e de coleta de amostras.....	26
Manipulação e processamento das amostras de sangue.....	28
Análises hematológicas.....	28
Análises bioquímicas.....	29
Delineamento experimental e análise estatística.....	30
RESULTADOS.....	30
Hematologia.....	30
Bioquímica.....	31
DISCUSSÃO.....	34
Hematologia.....	34
Bioquímica.....	36
CONCLUSÕES.....	40
CAPÍTULO 2: Avaliação hematológica e bioquímica de <i>Trachemys scripta spp</i> com o uso citrato de sódio, EDTA-K <sub>3</sub> e heparina sódica como anticoagulantes.....	41
REVISÃO DE LITERATURA.....	41
Avaliação laboratorial de Répteis.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
Animais.....	44
Contenção e coleta das amostras.....	45
Distribuição e transporte das amostras.....	45
Análises hematológicas.....	45

Análises bioquímicas.....	46
Delineamento experimental e análise estatística .....	46
RESULTADOS.....	47
Hematologia .....	47
Bioquímica .....	48
CONCLUSÕES.....	56
CAPÍTULO 3: .....	57
Avaliação hematológica e bioquímica de <i>Lophiluorus alexandriis</i> com o uso citrato de sódio, EDTA-K3 e heparina sódica como anticoagulantes .....	57
REVISÃO DE LITERATURA.....	57
Aquicultura no Brasil - Contexto atual.....	57
Avaliação laboratorial de peixes .....	58
Animais .....	60
Contenção e coleta .....	60
Acondicionamento e transporte das amostras .....	60
Análises hematológicas .....	61
Análises Bioquímicas.....	61
Delineamento experimental e análise estatística .....	62
RESULTADOS.....	62
Hematologia .....	62
Bioquímica .....	63
DISCUSSÃO.....	66
CONCLUSÃO.....	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## INTRODUÇÃO

Estudos na área da hematologia de animais silvestres e exóticos estão se tornando cada vez mais necessários, por serem uma importante ferramenta para auxiliar o diagnóstico clínico e permitir uma melhor compreensão das características e particularidades desses animais.

A compreensão do modo de resposta do tecido hematopoiético do animal permite a detecção de alterações fisiopatológicas agudas e crônicas atribuídas à nutrição, meio ambiente, agentes tóxicos, doenças e sua possível recuperação (Guerci, 1985; Miccoli et al., 2008; Adeyemo et al., 2009). Atualmente, muita atenção tem sido dada às questões ambientais, como preservação e sustentabilidade, em função do desmatamento, bem como da poluição e do risco de extinção de espécies animais e vegetais. Há ainda o crescente número de animais silvestres e exóticos que chegam aos médicos veterinários para atendimento, além de animais mantidos em instituições de conservação, como zoológicos ou reservas naturais, que se beneficiam dessas informações. O agronegócio é outro ramo de criação de animais silvestres e/ou exóticos, para o consumo ou mesmo expansão da indústria pesqueira, reforçando assim a necessidade de estudos dessa natureza, evidenciando a carência de pesquisas na área de medicina veterinária de animais selvagens (Goulart, 2006; Miccoli et al., 2008; Adeyemo et al., 2009).

O principal objetivo de um laboratório de patologia clínica é a realização correta de procedimentos analíticos que auxiliem no diagnóstico e tratamento do paciente (Mohri et al., 2009a). Exames laboratoriais são considerados uma ferramenta diagnóstica complementar, utilizada para monitorar a condição de saúde do animal (Karesh et al., 1997; Lanzarot et al., 2001; Allgayer et al., 2009). Entretanto, em algumas condições ou para espécies animais específicas, os exames laboratoriais podem representar a única ferramenta diagnóstica.

O hemograma é o principal exame para diagnóstico de alterações sanguíneas. O perfil bioquímico fornece informações quanto ao estado clínico e metabólico – energético, proteico e mineral, podendo ser utilizado na medicina veterinária para a avaliação individual ou de rebanhos (Almosny e Monteiro, 2007; González e Silva, 2008). Como ocorre na medicina de rebanho, em diversas espécies de animais de produção, esses exames são utilizados para monitorar a saúde e detectar doenças subclínicas, para se traçar um perfil de alterações metabólicas (Bowes et al., 1989). São exames complementares que devem ser comumente utilizados, para explorar a dinâmica da saúde de animais, mantidos em cativeiro, em centros biomédicos ou mesmo animais de vida livre destinados a centros de triagem (O'Neill et al. 1998).

As análises bioquímicas sanguíneas podem ser conduzidas com utilização de plasma ou de soro. O soro é a fração obtida após centrifugação da amostra, a partir de sangue coagulado, e representa o exemplar preferido para a análise de bioquímica clínica. Entretanto, o plasma, obtido pela centrifugação do sangue coletado em tubos, contendo um anticoagulante apropriado, pode ser um material igualmente útil e, em certas condições, preferível ao soro. O soro e o plasma são similares, mas o plasma contém fatores de coagulação e um anticoagulante que não estão presentes no soro. Os valores para a maioria dos analitos são similares no soro e no plasma de mamíferos, desde que o sangue seja manipulado de forma padronizada e a separação das células ocorra em período que não ultrapasse 2 horas (Young e Bermes, 2008).

É ideal que sejam coletadas amostras de sangue diferentes para análises bioquímicas e hematimétricas, porém, como isto não é possível em todos os pacientes, é indicada a coleta de uma única amostra que permita o maior número de análises (Mohri et al., 2009b). Independente do uso do plasma ou soro, a separação deve ocorrer o quanto antes, para minimizar o efeito da hemólise sobre os resultados. A hemólise pode causar inúmeras interferências nas dosagens de lactado desidrogenase (LDH), tendo em vista que a presença de 50 mg de hemoglobina por 100mL de soro pode resultar em um aumento de 15 – 20% da atividade do LDH no soro. Da mesma maneira, as transaminases alanina e aspartato transaminase (ALT e AST) podem sofrer influência da presença de hemólise, pois os eritrócitos possuem grande quantidade de isoenzimas (Titze 1983, apud Synermed<sup>®</sup>).

O uso do soro é a preferência dos laboratórios, uma vez que a ausência do anticoagulante reduz a interferência nos métodos analíticos e nas concentrações obtidas. Entretanto, o plasma é mais utilizado devido à dificuldade de obter amostras suficientes para preencher todos os tubos, quando há necessidade de novos testes, além daqueles previstos inicialmente ou, ainda, caso haja urgência para obter novos exames (Cerón et al., 2004). O uso do plasma é vantajoso por eliminar algumas limitações da utilização do soro, tais como: (a) permitir a separação do plasma e do soluto mais rapidamente devido à presença do anticoagulante, uma vez que a obtenção do soro exige entre 15 e 30 minutos para a completa coagulação sanguínea antes de poder ser centrifugado e, ao permitir a separação mais rápida de soluto e plasma, as interferências causadas pelo metabolismo celular, ocorridas durante o tempo em que as células estão em contato com o plasma, diminuem; (b) o plasma reduz a presença de coágulos de fibrina na amostra analisada, diminuindo as alterações nos valores e os possíveis danos a equipamentos por entupimento devido a coágulos; (c) o plasma aumenta o rendimento da amostra, que a partir de um dado volume de sangue total, torna-se maior quando comparado ao rendimento de soro,

com um ganho de 15 a 20% no volume de amostras (Fudge, 2000; Boyanton e Blick, 2002; Young e Bermes 2008).

A avaliação laboratorial em animais selvagens é difícil por, pelo menos, cinco motivos: (1) dificuldade de coleta de amostras; (2) ausência de técnica laboratorial eficiente para pequenos volumes de amostras; (3) falta de valores de referência para interpretação; (4) a escolha de tubos sem anticoagulantes para bioquímica de animais selvagens pode prejudicar a qualidade das amostras, pela possível ocorrência de hemólise durante o processo de coleta, que comprometeria as análises e, conseqüentemente, os resultados; (5) a maior ocorrência de fibrina no sangue desses animais, cuja presença pode prejudicar a qualidade das amostras para a análise bioquímica (Fudge, 2000; González e Silva, 2008).

Os anticoagulantes utilizados na hematologia humana e na de outros mamíferos são os sais de ácido etilenodiamino tetra-acético potássico (EDTA-K<sub>3</sub>) ou sódico (EDTA-Na<sub>2</sub>). A heparina é utilizada para bioquímica clínica e o citrato de sódio é necessário para estudos referentes aos tempos de coagulação e testes de agregação plaquetária (Cerón et al., 2004; Mohri et al., 2007a; Burtis et al., 2008).

O EDTA atua como um agente quelante, que se apresenta como sais - dissódico (Na<sup>2</sup>), dipotássico (K<sup>2</sup>) ou tripotássico (K<sup>3</sup>), sendo os dois últimos os mais solúveis. Atuam como quelantes de íons fortes, com elevada afinidade para formar complexos, como íons Ca<sup>2+</sup> e o Mg<sup>2+</sup>, essenciais para o processo de coagulação. Sendo assim, a utilização do plasma para a mensuração do de cálcio é inapropriada (Oviedo e Rodríguez, 2003; Burtis et al., 2008). O EDTA é o anticoagulante preferível para contagem total sanguínea e diferencial de leucócitos, principalmente devido à propriedade de preservação celular, sendo utilizado na concentração final de 1 a 2 g/L de sangue (Perrotta et al., 1998; Oviedo e Rodríguez, 2003; Burtis et al., 2008).

O citrato trissódico, assim como o EDTA, atua como quelante de Ca<sup>2+</sup>. Tem aplicação em estudos de coagulação, pois é possível reverter o seu efeito ao adicionar Ca<sup>2+</sup> à amostra. Entretanto, tem pouca aplicação para bioquímica clínica. Sua concentração de ação anticoagulante é de 24 a 28g/L de sangue, em uma razão de uma parte de citrato para nove partes de sangue (1:9) (Burtis et al., 2008).

Como os íons de cálcio são essenciais na cascata de coagulação, assim como para as interações intercelulares, a adição desses anticoagulantes mantém a amostra de sangue na fase líquida por um período relativamente longo, o que favorece a possibilidade da contagem celular

sanguínea. Devido à ação quelante de cálcio, a utilização do plasma para a mensuração deste elemento é inapropriada (Jain, 1993; Oviedo e Rodríguez, 2003; Harr et al., 2005; Burtis et al., 2008).

Dentre os anticoagulantes mais utilizados na rotina clínica, a heparina é o que possui maior aplicação hematológica e bioquímica. Essa substância é um glicosaminoglicano e encontra-se disponível como sais de sódio, potássio, lítio e amônio. Ao ligar-se à antitrombina III, acelera a sua atividade, o que inibe a ação da trombina e outras proteases necessárias para a coagulação. Possui a desvantagem de alterar as características de coloração de células sanguíneas, resultando na formação de um fundo azul, ao utilizar corantes de Wright. A heparina também pode ocasionar o aumento da agregação celular e, portanto, diminuir a precisão na contagem de leucócitos e plaquetas, quando da realização do hemograma (Harr et al., 2005; Burtis et al., 2008). As pesquisas desenvolvidas por Céron et al. (2004), Harr et al. (2005), Mohri et al. (2007a; 2007b), Mohri et al. (2009a), e Mohri et al. (2009b) foram realizadas com heparina de lítio. Entretanto, Bolten et al. (1992), Keller et al. (2005), Deem et al. (2006) e Padilla et al. (2009) não observaram diferenças estatísticas nas análises hematimétricas e bioquímicas quanto ao uso da heparina de lítio e da heparina sódica. A heparina sódica é de fácil acesso e custo inferior quando comparada com a heparina de lítio, sendo uma boa substituta (Padilla et al., 2009).

Diversos autores propuseram-se a identificar o melhor anticoagulante para aves, répteis e peixes, mas não há um consenso no estabelecimento dos índices hematimétricos aceitáveis que possam refletir a ação desses anticoagulantes sobre os parâmetros celulares, especialmente os eritrocitários (Blaxhall, 1972; Fourie, 1977; Smit et al., 1977; Harr et al., 2005; Walencik e Witeska, 2007; Guzman et al., 2008; Sabino et al., 2010).

A literatura documenta informações conflitantes e insuficientes para aves, répteis e peixes. Muito da informação disponível se baseia em número amostral pequeno, volumes de amostras reduzidos, parâmetros laboratoriais limitados e, muitas vezes, técnicas analíticas ultrapassadas. Uma vez que a hematologia e a bioquímica clínica são a base das ferramentas diagnósticas e essenciais para a qualidade do trabalho dos médicos veterinários que trabalham nesta área (Cândido, 2008), os laboratórios de patologia clínica e centros de pesquisas devem atender a essas expectativas e atuar no desenvolvimento de técnicas e serviços necessários para a análise e interpretação de exames laboratoriais de animais selvagens.

O presente estudo teve como objetivo descrever valores e aspectos da hematologia e bioquímica de três classes de animais: aves, répteis e peixes, representados pelas seguintes

espécies: Arara Canindé (*Ara ararauna*), tigre d'água (*Trachemys scripta*) e pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), sob o efeito de três anticoagulantes utilizados na rotina clínica veterinária: EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina sódica.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar hematologia de araras, tigres d'água e pacamãs com o uso de citrato de sódio, EDTA-K<sub>3</sub> e heparina sódica.
- Avaliar parâmetros bioquímicos de araras, tigres d'água e pacamãs com o uso de citrato de sódio, EDTA-K<sub>3</sub> e heparina.
- Indicar o anticoagulante que permita o maior número de exames hematimétricos e da bioquímica clínica para cada espécie em uma única amostra sanguínea.

Para tal, o presente trabalho será dividido em capítulos referentes às espécies analisadas para facilitar o acompanhamento dos resultados. No Capítulo 1 apresentamos os resultados das análises hematológicas e bioquímicas para araras Canindé. No Capítulo 2, encontram-se os resultados dessas análises para tigres d'água e no Capítulo 3, nosso olhar se volta para os resultados obtidos para pacamãs. Nas Considerações Finais, retomaremos os objetivos para apontar as implicações deste estudo para as espécies pesquisadas.

## **CAPÍTULO 1:**

### **Avaliação hematológica e bioquímica de Araras Canindé, *Ara ararauna*, com o uso de EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina de sódio como anticoagulantes.**

#### **REVISÃO DE LITERATURA**

Os psitacídeos pertencem à família Psittacidae e são representados pelas araras, papagaios e periquitos. Representam a ordem de aves mais frequentemente criadas em cativeiro. O papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) e a arara Canindé (*Ara ararauna*) correspondem aos psitacídeos mais desejados como animais de companhia, devido às cores atrativas e beleza, além da sua capacidade de interagir e reproduzir falas e sons humanos. Essas características também os colocam como alvo de tráfico de animais silvestres (Proença, 2010; Gomes et al., 2011). A arara Canindé pertence ao gênero *Ara* e representa um dos maiores psitacídeos da Ordem. Possui plumagem verde, amarela, azul, branca e preta, pesa em média 1 kg, atinge a maturidade sexual entre cinco e sete anos e pode viver até idades superiores a 75 anos (Cubas et al., 2007; Bahiense, 2010).

Após a regulamentação da criação comercial de animais silvestres pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, em 1997, por meio das portarias 117 e 118-N, houve aumento na procura por psitacídeos como animais de estimação, tornando frequente a procura de atendimento veterinário para esses animais.

A procedência desses animais é diversa. Há desde animais resgatados a animais de cativeiro, com as mais diversas origens – tráfico, criações comerciais legalizadas, centros de conservação de espécies silvestres (zoológicos e santuários). Há, ainda, a crescente conscientização sobre a relação entre meio ambiente e a conservação de espécies, como fatores para reforçar e evidenciar a importância do conhecimento de parâmetros fisiológicos desses animais, o que permitiria uma interpretação correta dos resultados obtidos após a realização de exames clínicos e laboratoriais com finalidade diagnóstica (Goulart, 2006; Valle et al., 2008; Bahiense, 2010).

#### **Avaliação clínica**

Na cadeia alimentar, as aves são, em geral, presas de animais predadores. A

manifestação física de doenças nesses animais pode favorecer ou servir de gatilho para a predação. Com isso, há uma tendência de a manifestação física de sinais clínicos de doenças ocorrer tardiamente (González e Silva, 2008; Bahiense, 2010). Isso reforça a importância de exames complementares que possibilitem a identificação de alterações no organismo, antes que o quadro de doença se torne grave e o animal se apresente cada vez mais debilitado.

Os sinais clínicos das doenças em aves são bastante inespecíficos, sendo que o exame clínico oferece informações limitadas, havendo necessidade do uso de métodos diagnósticos complementares para assegurar um tratamento eficaz (Cândido, 2008). O autor reforça a demanda no aprimoramento das técnicas diagnósticas não invasivas pelos profissionais que trabalham com aves não comerciais, tanto na clínica médica de animais de estimação ou de animais de vida livre.

As aves possuem inúmeras características fisiológicas e anatômicas diferenciadas, o que gera um grupo muito heterogêneo de animais (Bonello et al., 2002). A utilização de valores de referência não específicos para determinada espécie não se mostra adequada, pois o estado hematológico e bioquímico é um reflexo de inúmeros fatores, como: espécie, sexo, idade, dieta, manejo e nível de estresse (Bowes, 1989; Lumeij e Overduin, 1990; Harr et al., 2005).

Para uma correta interpretação dos resultados é necessário conhecer a especificidade e sensibilidade do método escolhido para a avaliação, os intervalos de referência para a espécie estudada e possuir uma lista de doenças que possam induzir às alterações em questão (Bowes et al., 1989).

### **Avaliação laboratorial**

A análise sanguínea é uma importante ferramenta para o conhecimento do modo de resposta do tecido hematopoiético do animal, permitindo o diagnóstico das doenças e o acompanhamento da sua recuperação. Essa avaliação proporciona dados sobre o grau de resposta do organismo à presença de microrganismos ou de deficiências nutricionais, pois permite a obtenção de grande número de informações sobre a condição do animal, a partir de um volume relativamente pequeno de amostra (Guerci, 1985).

O EDTA seja o anticoagulante preferível para contagem total sanguínea e diferencial de leucócitos, principalmente devido à propriedade de preservação celular (Perrotta et al., 1998; Patel, 2009). Trata-se de um agente quelante, que possui grande afinidade com íons fortes, essenciais para o processo de coagulação para formar complexos

(Oviedo e Rodríguez, 2003; Burtis et al., 2008; Patel, 2009).

### **O uso de Anticoagulantes**

O EDTA possui diversos efeitos sobre as células sanguíneas e permite esfregaços de ótima qualidade, desde que confeccionados entre duas e três horas após a coleta da amostra. O preenchimento do tubo no momento da coleta deve ser realizado com atenção, pois pode haver alteração na proporção entre sangue e anticoagulante. Níveis elevados de EDTA podem causar redução do tamanho dos eritrócitos, devido à hipertonicidade do plasma, com elevação da concentração iônica. Esse efeito pode levar ao aparecimento de artefatos no esfregaço sanguíneo, devido à lesão na membrana celular de eritrócitos e leucócitos, o que dificulta a identificação (Patel, 2009).

Campbell et al. (2007) citam o EDTA como um anticoagulante mais adequado para análise sanguínea de psitacídeos e de aves de rapina, pois a heparina pode causar aglutinação de leucócitos e alterar a afinidade das células com os corantes utilizados na rotina, como Wright's ou Wright-Giemsa. O mesmo autor relata ainda, que o EDTA pode ser associado à discreta hemólise em algumas espécies de aves.

O citrato de sódio é usado primariamente como anticoagulante para avaliação da coagulação devido a sua capacidade de reversão após a adição de cálcio (Burtis et al., 2008). Perrotta et al. (1998) relatam que esfregaços sanguíneos preparados a partir de sangue com citrato e com EDTA e corados com Wright's Giemsa são indistinguíveis, indicando que o sangue pode ser coletado em apenas um tubo para análises hematológicas e testes de coagulação.

A heparina é um glicosaminoglicano, com função anticoagulante e possui maior aplicação hematológica e bioquímica. Age através da ligação à antitrombina III, inibe a ação da trombina e outras proteases necessárias para a coagulação. Possui a desvantagem de alterar as características de coloração das células sanguíneas, resultando na formação de um fundo azul ao utilizar corantes de Wright. Além disso, pode ocasionar o aumento da agregação celular, diminuindo a precisão na contagem de leucócitos, causando aglutinação acentuada de heterofilos e plaquetas de aves quando da realização do hemograma (Campbell et al., 1994; Harr et al., 2005; Burtis et al., 2008).

Para a hematologia de aves, o EDTA e a heparina são considerados adequados, sendo a heparina o anticoagulante que apresenta os melhores resultados (Cohen, 1967; Hattingh e Smith, 1976; Smit et al., 1977). Harr et al. (2005), em um estudo comparativo de hematologia e bioquímica sérica de 10 araras (*Arara sp*), ao utilizarem EDTA, citrato e heparina, observaram

que as amostras em EDTA e heparina apresentaram resultados equivalentes; ao passo que as amostras em citrato apresentaram diminuição do volume globular (VG - %) e aumento na ocorrência de hemólise. Guzman et al. (2008), ao compararem os resultados do hemograma de 20 papagaios (*Amazona ventralis*) utilizando EDTA-K<sub>2</sub> e heparina de lítio, concluíram que a heparina pode ser utilizada como anticoagulante para essas aves. Os mesmos autores recomendaram ainda o uso do mesmo anticoagulante para acompanhar as variações em um mesmo paciente, principalmente quanto à concentração de proteína plasmática, VG (%) e a contagem de linfócitos. Mafuvadze e Erlwanger (2007) e Sabino et al. (2010), ao avaliarem o efeito do EDTA e da heparina sobre os eritrócitos de avestruzes (*Struthio camelus*), concluíram que a heparina é mais adequada que o EDTA para os parâmetros eritrocitários. Campbell et al. (1994) relatou que a heparina interfere na coloração celular e causa aglutinação acentuada de heterófilos de aves. Ao avaliar o efeito de anticoagulantes sobre a osmolaridade, o VG (%) e o pH do sangue de pombos, Fourie (1977) concluiu que a heparina é o anticoagulante mais adequado.

Lumeij e Bruijne (1985), utilizou o pombo como modelo experimental e estabeleceu o uso da bioquímica sanguínea como uma ferramenta importante na medicina de aves. Entretanto, transpor a espécie e utilizar valores não específicos para a espécie estudada não é adequado, pois o *status* hematológico e bioquímico são reflexos de inúmeros fatores como: sexo, idade, dieta, manejo e nível de estresse, além das variações fisiológicas como ciclo circadiano, ciclo anual e hábitos de migração, que são diferenças importantes entre as diversas espécies de aves (Bowes, 1989; Lumeij e Overduin, 1990; Harr et al., 2005). A bioquímica sérica se apresenta como ferramenta importante, pois fornece um grande volume de informações, sobre a condição animal a partir de um pequeno volume de amostra, auxiliando no diagnóstico de doenças metabólicas e possibilitando uma avaliação mais precisa do indivíduo (Bowes, 1989; Lumeij e Overduin, 1990; Valle, 2008).

Para uma correta interpretação dos resultados, é necessário conhecer a especificidade e sensibilidade do método escolhido para a avaliação, os intervalos de referência para a espécie estudada e possuir uma lista de doenças que possam induzir às alterações em questão (Bowes et al., 1989; Ritchie et al., 1994).

Como já mencionado, é ideal que sejam coletadas amostras de sangue diferentes para análises bioquímicas e hematimétricas. Porém, como isto não é possível em todos os pacientes, é indicada a coleta de uma única amostra que permita o maior número de análises (Mohri et al., 2009b). Independente do uso do plasma ou do soro, a separação deve ocorrer o quanto antes

para minimizar a hemólise, pois ela pode causar inúmeras interferências nas dosagens de LDH (Titze, 1983 apud Synermed®). A hemólise também pode interferir na dosagem das transaminases ALT e AST, pois os eritrócitos possuem grande quantidade de isoenzimas (Titze, 1983 apud Synermed®).

O uso do soro para análises bioquímicas, como é de conhecimento na área, é referência nos laboratórios, uma vez que os anticoagulantes podem aumentar a interferência com os métodos analíticos ou mesmo comprometer as concentrações de alguns analitos. Porém, o uso do plasma é indicado devido à dificuldade de obtenção de um volume de amostra suficiente para preencher vários tubos de coleta ou quando haja necessidade de novos testes além dos solicitados inicialmente (Cerón et al, 2004). O plasma é indicado também pois é obtido com maior velocidade com o uso de anticoagulantes e não há necessidade de esperar o tempo de retração do coágulo antes da centrifugação. Com a separação mais rápida entre soluto e plasma, as interferências causadas pelo metabolismo celular são menores. Além disso, o plasma pode reduzir a presença de coágulos de fibrina na amostra, diminuindo as possíveis alterações nos resultados e danos a equipamentos, por entupimento. Finalmente, o plasma tem maior rendimento, pois há um ganho de 15 a 20% no volume de amostras quando comparado ao soro (Fudge, 2000; Boyanton e Blick, 2002, Young e Bernes 2008).

Para cada analito há indicações para o uso de um anticoagulante específico. O plasma/EDTA é preferível para dosagens de triglicerídeos por ter efeito estabilizador sobre lipoproteínas, mas pode interferir com oxalatos e citrato nos níveis de colesterol, tornando-os discretamente menores (Titze, 1983 apud Synermed®).

Como já mencionado na introdução, a avaliação laboratorial em animais selvagens é difícil por, pelo menos, cinco motivos: (1) dificuldade de coleta de amostras; (2) escassez de técnicas laboratoriais eficientes para pequenos volumes de amostras; (3) escassez de valores de referência para interpretação; (4) o uso de tubos sem anticoagulantes, para bioquímica de animais selvagens, pode ser prejudicada pois a pode ocorrer hemólise, comprometendo as análises; e (5) a maior ocorrência de fibrina prejudicial à qualidade da amostra para a análise bioquímica (Fudge, 2000; González e Silva, 2008). Portanto, o uso do plasma na clínica de animais silvestres reduz as dificuldades que podem aparecer quando se utiliza o soro.

O efeito dos anticoagulantes sobre a bioquímica e a hematologia foi objeto de estudo no homem e em inúmeros animais, sendo que a maioria desses estudos é realizada com número amostral pequeno, com parâmetros limitados e técnicas analíticas ultrapassadas (Young e Bernes 1998; Harr et al., 2005; Mohri et al. 2007a; Mohri et al. 2007b; Valle, 2008; Mohri et

al., 2009a; Mohri e Rezapoor, 2009).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos dos anticoagulantes EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina sódicos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de araras Canindé.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os procedimentos realizados foram aprovados pelo IBAMA, através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO sob nº 32233, e pelas normas do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), sob protocolo 80/2012 da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### **Animais**

Foram avaliadas amostras sanguíneas de 60 araras Canindé (*Ara ararauna*) adultas de ambos os sexos, clinicamente híidas, provenientes do IBAMA de Minas Gerais (MG), localizado no Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS) de Lagoa Grande, em Nova Lima, e de criatórios mantenedores na região de Betim (ambas regiões metropolitanas de Belo Horizonte – MG).

As aves receberam água e dieta *ad libitum*, sendo a dieta composta de ração comercial e frutas variadas, seguindo o manejo estabelecido pelo CETAS do IBAMA-MG. Foram realizadas quatro coletas, entre agosto e setembro de 2012, sendo coletadas amostras de 15 animais por visita, sempre durante o período da manhã.

### **Contenção e de coleta de amostras**

Inicialmente, os animais foram submetidos à contenção física com a utilização de puçá. Posteriormente, com o auxílio de máscaras individuais, foi realizada a contenção química através da utilização de anestésico volátil, isoflurano, para realização do exame físico e da coleta de amostras (Fig. 1), conforme preconizado por Valle et al. (2008).



Figura 1. Anestesia geral com isoflurano para coleta de sangue de arara Canindé em veia jugular direita externa. Parque Ecológico Vale Verde (Arquivo pessoal).

Após a antissepsia local com álcool a 70%, foram coletados 5 mL de sangue de cada arara através da punção da veia jugular direita (Fig. 2). Foram utilizadas seringas de 5 mL e agulhas 25x0,8 mm, lavadas internamente com heparina sódica apenas para prevenir a coagulação imediata, conforme recomendado por Thrall et al. (2007).



Figura 2. Coleta de sangue através da venopunção jugular direita de arara Canindé. Parque Ecológico Vale Verde (Arquivo pessoal).

### **Manipulação e processamento das amostras de sangue**

Após a coleta, o sangue foi acondicionado em quatro microtubos (1500 $\mu$ L), preparados previamente pela equipe, utilizando pipeta repetitiva HandyStep® (Brand GMBH + CO – MainGermany) contendo: (1) 100 $\mu$ l de EDTA-K<sub>3</sub> a 10%; (2) 120 $\mu$ l de citrato de sódio a 3,8%; (3) 200 $\mu$ l de heparina sódica, sendo colocado 1 mL por tubo. O restante da amostra foi acondicionado no quarto microtubo, sem anticoagulante (4) para obtenção do soro. Todas as amostras foram pré-processadas no local da coleta, sendo realizada a confecção dos esfregaços sanguíneos, a mensuração do microhematocrito (Jain, 1993), alíquotagem das amostras para contagem em hemocitoômetro e, a seguir, foi realizada separação do soro e do plasma para posterior processamento (Fig. 3). O material obtido foi transportado sob refrigeração ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG para o processamento das análises bioquímicas, contagem das hemácias e de leucócitos totais em hemocitoômetro e determinação do VG (%) e da concentração de proteína total plasmática por refratometria.



Figura 3 - Estrutura montada no criatório para iniciar o processamento das amostras logo após a coleta. Parque Ecológico Vale Verde (Arquivo pessoal).

### **Análises hematológicas**

Logo após a coleta, o sangue foi homogeneizado manualmente e, em seguida, foram confeccionados esfregaços sanguíneos em lâminas de vidro, sendo um para cada tipo de anticoagulante. Os esfregaços foram secos ao ar e guardados em caixas de madeira próprias para lâminas para posterior coloração e análise. Os microcapilares foram preenchidos para determinação do VG (%) pela técnica de microhematócrito e para determinação da proteína

plasmática total por meio da técnica de refratometria (Jain e Schalm, 1986). Além disso, 10 µl de sangue foram alíquotados em 1 mL de solução de diluição *Dacie* (Jain e Schalm, 1986) para contagem dos eritrócitos e leucócitos totais. A solução foi mantida sob refrigeração até a análise no laboratório de Patologia Clínica da EV-UFMG.

As contagens de eritrócitos e leucócitos totais foram realizadas em hemocitômetro, Câmara de Neubauer, utilizando-se microscópio óptico Olympus CX 40®, sob aumento de 400x, em até 24 horas após a coleta, possível devido à presença de formol na diluição de *Dacie*. A leitura foi realizada conforme a técnica descrita para mamíferos (Jain & Schalm 1986).

Os esfregaços foram corados com panótico rápido (Laborclin®- Paraná- Brasil). A observação da qualidade do esfregaço sanguíneo de hemoparasitas foi realizada sob a objetiva de 400x. Já a contagem diferencial de leucócitos foi realizada sob óleo de imersão (x1000), totalizando 100 células. Para a avaliação da celularidade, foram selecionadas lâminas de 10 animais, em triplicata. Foram feitas observações nas lâminas quanto a: apoptose, agregados celulares, artefato de coloração, presença de células pequenas e/ou células grandes e células com cauda.

### **Análises bioquímicas**

Uma vez realizado o processamento para hematologia, todas as amostras foram centrifugadas e separadas para obtenção da fração líquida (plasmas ou soro). A centrifugação foi realizada inicialmente a 1000 rpm durante 1 minuto e a 4000 rpm durante 4 minutos. Este protocolo de centrifugação foi adotado a fim de minimizar a ocorrência de hemólise. O plasma e o soro foram, então, refrigerados a 4 °C para posterior processamento do perfil bioquímico. Após cada coleta, o processamento bioquímico ocorreu em, no máximo, uma semana. Foram dosados os seguintes analitos por colorimetria: albumina (verde de bromocresol), proteínas totais (Biureto), ureia método (enzimático – UV), glicose (enzimático – N-sulfopropil), transaminases (enzimático - UV), ácido úrico (enzimático – UricaseAzure D2), colesterol (enzimático – N-sulfopropil), triglicerídeos (enzimático – N-sulfopropil) e lactato desidrogenase (LDH - enzimático - UV). Já o fósforo (fosfomolibdato/PVP), o magnésio (Azul Xilidil) e o cálcio (Arsenazo III) foram dosados por técnica cinética. Todas as análises foram realizadas no aparelho de bioquímica automático Cobas Mira Plus®, utilizando-se kits comerciais Synermed® (International Inc. São Paulo. Brasil. Registro 10438910025), já validados pelo laboratório de patologia clínica da EV-UFMG, para mamíferos domésticos.

Para melhor avaliar o efeito dos anticoagulantes, foi calculada a porcentagem de

variação entre as amostras de plasma e as de soro, esta última considerada como referência para os diferentes analitos bioquímicos.

### **Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental foi realizado em blocos, ao acaso. Como a comparação entre os anticoagulantes foi feita na mesma amostra do mesmo animal, o experimento foi considerado pareado. Os resultados considerados normais pelos testes de Komolgorov Smirnov e homocedásticos pelo teste de Shapiro-Wilk foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste Student-Newman-Keuls (SNK). Os resultados que não apresentaram distribuição normal ou homocedástica foram transformados pela multiplicação do log (10) e submetidos aos mesmos testes anteriormente descritos. Variáveis que mesmo após a transformação não apresentaram características normais foram submetidas ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Toda a análise estatística foi realizada considerando-se a margem de significância de 5%.

## **RESULTADOS**

### **Hematologia**

Segundo Cohen (1967), Hattingh e Smith (1976) e Smit et al. (1977), para a hematologia de aves, o EDTA e a heparina são considerados adequados, sendo a heparina mais confiável e, portanto, utilizada como comparativa no presente estudo.

A Tabela 1 dispõe os valores médios dos índices hematimétricos, proteínas totais, VG (%) e a contagem total de eritrócitos e leucócitos, além das porcentagens da contagem diferencial dos leucócitos. O valor de VG (%), no plasma/EDTA foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que no plasma/heparina, sendo estatisticamente igual aos valores encontrados no plasma/citrato de sódio e plasma/heparina ( $p > 0,05$ ). Nas dosagens das proteínas totais plasmáticas (PTP), houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do plasma/citrato de sódio em comparação os níveis de plasma/EDTA e plasma/heparina, que não tiveram diferenças entre si ( $p > 0,05$ ). Entre o plasma/citrato de sódio e plasma/heparina não houve diferenças na contagem de eritrócitos ( $p > 0,05$ ), mas houve uma diminuição significativa dos valores no plasma/EDTA ( $p < 0,05$ ). Já a contagem total de leucócitos foi significativamente menor no plasma/citrato de sódio ( $p < 0,05$ ), e entre plasma/EDTA e plasma heparina não houve diferença ( $p > 0,05$ ). Quanto ao diferencial dos leucócitos, não houve diferenças estatísticas entre os três anticoagulantes

avaliados.

Tabela 1. Valores médios, seguidos do desvio padrão de volume globular (VG%); proteínas totais plasmáticas (PTP – mg/dL); contagem total de hemácias; contagem total e diferencial de leucócitos de Ara ararauna adultas, consideradas hígdas, amostras colhidas EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina sódicos.

Variáveis	Sangue/EDTA-K <sub>3</sub> (n=60)	Sangue/Citrato de sódio (n=60)	Sangue/Heparina (n=60)
	43,20 ±		
<b>VG (%)</b>	4,55 <sup>A</sup>	30,69 ± 3,42 <sup>B</sup>	35,69 ± 3,41 <sup>B</sup>
<b>PTP (mg/dL)</b>	4,07 ± 0,78 <sup>B</sup>	5,34 ± 0,93 <sup>A</sup>	3,68 ± 0,76 <sup>B</sup>
<b>Contagem total de eritrócitos (x10<sup>6</sup>/μL)</b>	2,38 ± 0,68 <sup>A</sup>	2,41 ± 0,97 <sup>B</sup>	2,57 ± 0,68 <sup>B</sup>
<b>Contagem total de leucócitos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	9,32 ± 5,45 <sup>A</sup>	7,97 ± 3,60 <sup>B</sup>	8,41 ± 4,87 <sup>A</sup>
	(n=10)	(n=10)	(n=10)
<b>Heterófilos absolutos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	7,49 ± 0,28 <sup>A</sup>	6,20 ± 0,28 <sup>A</sup>	6,72 ± 0,32 <sup>A</sup>
<b>Monócitos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	0,03 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>A</sup>
<b>Linfócitos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	1,60 ± 0,30 <sup>A</sup>	1,63 ± 0,27 <sup>A</sup>	1,31 ± 0,16 <sup>A</sup>
<b>Eosinófilos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	0,21 ± 0,05 <sup>A</sup>	0,16 ± 0,04 <sup>A</sup>	0,21 ± 0,06 <sup>A</sup>
<b>Basófilos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	0,03 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>A</sup>	0,01 ± 0,01 <sup>A</sup>
<b>Pqt/RBC</b>	0,008 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,010 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,010 ± 0,004 <sup>a</sup>

EDTA-K<sub>3</sub>- Ácido etileno diaminotetracético (10%), Pqt- plaquetas; RBC- eritrócitos. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) entre os diferentes anticoagulantes pela ANOVA (SNK) e minúsculas pelo teste SNK – Kruskal.

### Bioquímica

Os resultados obtidos nas análises bioquímicas encontram-se descritos nas Tabelas 2 e 3. Quando comparadas as amostras de soro e diferentes plasmas, é possível observar algumas diferenças significativas (Tabela 2).

No plasma/EDTA-K<sub>3</sub>, a concentração de ácido úrico foi significativamente maior (p<0,05), enquanto as concentrações de albumina, ALT, AST, colesterol, fósforo, glicose, magnésio, proteína total, triglicerídeos e ureia foram significativamente inferiores (p<0,05) às concentrações séricas. A concentração do LDH não apresentou diferença estatística (p>0,05) entre soro e plasma/EDTA.

Os analitos testados no plasma/citrato de sódio, em sua maioria, apresentaram redução significativa (p<0,05) em relação ao soro. Foram eles ácido úrico, albumina, ALT, AST, cálcio,

colesterol, fósforo, glicose, proteína total, triglicerídeos e ureia. Os analitos LDH e magnésio não demonstraram diferenças estatísticas ( $p>0,05$ ) entre soro e plasma/citrato de sódio.

Já o plasma/heparina teve redução significativa ( $p<0,05$ ) os valores dos analitos: albumina, AST, cálcio, colesterol, fósforo, glicose, magnésio, proteína total, triglicerídeos e ureia. Os valores de ácido úrico, ALT, e LDH não apresentaram diferença estatística ( $p>0,05$ ).

Tabela 2. Valores médios, seguidos do desvio padrão de ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), alanina aminotransferase (ALT - UI/L), aspartato aminotransferase (AST - UI/L), cálcio (mEq/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL), lactato desidrogenase (LDH - UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicerídeos (mg/dL) e ureia (mg/dL) de amostras de soro e plasma de Ara ararauna colhidos em EDTA-K3, citrato de sódio e heparina sódica

ANALITOS	Soro (n=60)	EDTA-K <sub>3</sub> (n= 60)	Citrato de sódio (n=60)	Heparina (n=60)
Ácido úrico (mg/dL)	1,68±0,65 <sup>A</sup> (1.03 - 2,33)	2,30±0,53 <sup>B</sup> (1.77 – 2.83)	1,56±0,39 <sup>A</sup> (1.17 – 1.95)	1,67±0,69 <sup>A</sup> (0.98 – 2.36)
Albumina (g/dL)	1,40±0,16 <sup>A</sup> (1.24 – 1.56)	1,26±0,13 <sup>B</sup> (1.13 – 1,39)	1,04±0,10 <sup>C</sup> (0.94 – 1.14)	0,77±0,21 <sup>D</sup> (0.56 – 0.98)
ALT (UI/L)	106,28±28,52 <sup>A</sup> (77.76 – 134,8)	95,96±33,29 <sup>B</sup> (62.67 – 129.25)	75,76±22,37 <sup>C</sup> (53.39 – 98.13)	106,93±29,19 <sup>A</sup> (77.74 – 136.12)
AST (UI/L)	224,84±29,79 <sup>A</sup> (195,05 – 254.63)	212,02±33,71 <sup>B</sup> (178,31 – 245,73)	183,14±29,88 <sup>C</sup> (153,26 – 213,02)	182,43±31,48 <sup>C</sup> (151,05 – 213,91)
Cálcio (mEq/dL)	8,39±0,97 <sup>A</sup> (7.42 – 9.36)	-	3,39±0,52 <sup>B</sup> (2.87 – 3.91)	5,77±0,83 <sup>C</sup> (4,94 – 6.60)
Colesterol (mg/dL)	158,91±32,14 <sup>A</sup> (126.77 – 191,05)	152,51±27,67 <sup>B</sup> (124,84 – 180.18)	120,55±23,25 <sup>C</sup> (97,30 – 143,80)	122,54±25,17 <sup>C</sup> (97.37 – 147.71)
Fósforo (mg/dL)	4,75±1,68 <sup>A</sup> (3,07 – 6.43)	3,61±1,45 <sup>B</sup> (2.16 – 5.06)	2,41±1,05 <sup>C</sup> (1.36 – 3.46)	1,47±0,85 <sup>D</sup> (0.62 + 2.32)
Glicose (mg/dL)	266,59±68,22 <sup>A</sup> (198.37 – 334.81)	216,45±45,82 <sup>B</sup> (170,63 – 262.27)	200,49±30,72 <sup>C</sup> (169.77 – 231,21)	194,82±31,90 <sup>C</sup> (162.92 – 226.72)
LDH (UI/L)	83,78±59,49 <sup>AB</sup> (24.29 + 143.27)	95,87±63,35 <sup>A</sup> (32.52 – 159,22)	87,23±49,33 <sup>A</sup> (37.90 – 136.56)	68,29±40,03 <sup>B</sup> (28.26 – 108.32)
Magnésio (mg/dL)	3,44±0,89 <sup>A</sup> (2.55 – 4.33)	0,74±0,28 <sup>B</sup> (0.46 – 1.02)	3,30±0,72 <sup>A</sup> (2.58 – 4.02)	2,8±0,74 <sup>C</sup> (2.06 – 3.54)
Proteína total (g/dL)	3,65±0,46 <sup>A</sup> (3.19 – 4.11)	3,38±0,36 <sup>B</sup> (3.02 – 3.74)	2,74±0,30 <sup>C</sup> (2.44 – 3.04)	2,62±0,31 <sup>D</sup> (2.31 – 2.93)
Triglicerídeos (mg/dl)	252.14±299,67 <sup>A</sup>	162,88±146,83 <sup>B</sup> (16.05 – 309.71)	117,52±64,20 <sup>C</sup> (53.32 – 181.72)	116,34±67,82 <sup>C</sup> (48.52 – 184.16)
Ureia (mg/dL)	7,43±4,22 <sup>A</sup> (3.21 – 11.65)	6,29±4.60 <sup>B</sup> (2.23 – 10.89)	5,74±3,35 <sup>B</sup> (2.39 – 9.09)	5,29±2,95 <sup>B</sup> (2.34 – 8.24)

Análise de variância. Letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05) entre os diferentes anticoagulantes testados.

A Tabela 3 dispõe os dados das médias das porcentagens de variação entre amostras de soro e plasmas analisados considerando-se uma variação de 10% como aceitável (Jain & Schalm, 1986).

Tabela 3. Diferença percentual entre as amostras de soro e plasma colhido em EDTA-K<sup>3</sup>, citrato de sódio e heparina sódica para ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (UI/L), AST (UI/L), cálcio (mg/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL), LDH (UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicerídeos (mg/dL) e ureia (mg/dL) de *Ara ararauna*.

Analitos	Plasma/Citrato		
	Plasma/EDTA-K <sub>3</sub> (n=60)	de sódio (n=60)	Plasma/Heparina (n=60)
Ácido úrico (mg/dL)	58,97 <sup>A</sup>	0,19 <sup>B</sup>	9,79 <sup>B</sup>
Albumina (g/dL)	-9,64 <sup>A</sup>	-25,57 <sup>B</sup>	-44,87 <sup>C</sup>
ALT (UI/L)	-8,69 <sup>A</sup>	-24,64 <sup>B</sup>	4,59 <sup>A</sup>
AST (UI/L)	-5,80 <sup>A</sup>	-18,78 <sup>B</sup>	-18,89 <sup>B</sup>
Cálcio (mEq/dL)		-58,84 <sup>A</sup>	-30,55 <sup>B</sup>
Colesterol (mg/dL)	-3,26 <sup>A</sup>	-23,74 <sup>B</sup>	-22,23 <sup>B</sup>
Fósforo (mg/dL)	-24,04	-51,94 <sup>B</sup>	-70,12 <sup>A</sup>
Glicose (mg/dL)	-16,59 <sup>A</sup>	-21,56 <sup>AB</sup>	-24,08 <sup>B</sup>
LDH (UI/L)	48,79 <sup>A</sup>	37,78 <sup>A</sup>	11,99 <sup>A</sup>
Magnésio (mg/dL)	-80,78 <sup>A</sup>	-5,39 <sup>B</sup>	-19,64 <sup>B</sup>
Proteína total (g/dL)	-7,39 <sup>A</sup>	-24,87 <sup>B</sup>	-27,60 <sup>C</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	-11,18 <sup>A</sup>	-22,57 <sup>B</sup>	-23,67 <sup>B</sup>
Ureia (mg/dL)	21,01 <sup>A</sup>	-4,72 <sup>B</sup>	-4,58 <sup>B</sup>

Valores negativos representam a redução e positivos representam acréscimo nas concentrações dos analitos quando comparadas amostras de soro tidas como de referência para o teste em questão. Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes anticoagulantes testados.

## DISCUSSÃO

### Hematologia

O efeito entre anticoagulantes em aves foi pesquisado por Mafuvadze e Erlwanger (2007) em 8 avestruzes; por Sabino et al. (2010), utilizando 20 avestruzes; por Harr et al. (2005), em 10 araras e, por Guzman et al. (2008), em 20 papagaios. A escolha do anticoagulante é importante, porém não há um consenso entre os autores. A maioria deles fornece dados que são insuficientes, principalmente quanto à metodologia utilizada para coleta e análise das amostras em relação à proporção e concentração de anticoagulantes; ao método utilizado para contagem

de elementos figurados; à conservação da amostra e, ainda, à metodologia de análise. A falta de dados em estudos similares em araras Canindé dificulta a discussão dos resultados individuais. Além disso, as divergências dos valores descritos na literatura limitam ainda mais a discussão.

A elevação dos valores VG (%) observada no plasma/EDTA em comparação ao sangue total/heparina no presente estudo também foi observada por Mafuvadze e Erlwanger (2007) e por Sabino et al. (2010) em avestruzes e por Guzman et al. (2008) em papagaios-de-hispaniola. Assim como no presente estudo, eles verificaram que esse efeito pode ser associado à elevação do VCM, devido à tumefação celular. O EDTA quelata os íons cálcio, Jain (1993) explica que, por não haver ativação da bomba de sódio e potássio, há migração de água para o interior celular. Isso provoca o aumento do tamanho e lise celulares. A hemólise não pode ser incriminada nesta elevação, pois não foi observada nas amostras avaliadas.

No plasma/citrato de sódio, os níveis de PTP foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em comparação ao plasma/heparina e o plasma/EDTA. O nível proteico entre plasma/EDTA e plasma/heparina observado por Guzman et al. (2008) em papagaios-de-hispaniola tiveram aumento significativo dos valores em comparação ao plasma/heparina. Lumeij e Bruijne (1985) relatam que a acurácia do método de refratometria em aves é considerada reduzida. Como quanto maior a concentração de glicose, menor a de proteínas plasmáticas em aves, correlações entre o refratômetro e o método de biureto podem não ser possíveis em algumas espécies (Lumeij e Maclean, 1996). Entretanto, a refratometria deve ser sempre considerada, já que se trata de uma metodologia rápida para a determinação de uma estimativa da proteína em fluidos (Lumeij e Bruijne, 1985). Segundo Guzman et al. (2008), as concentrações de proteínas totais devem ser determinadas por eletroforese. Nenhum dos autores consultados menciona a influência do citrato sobre a refratometria de proteínas e as justificativas apresentadas, tais como a influência da glicemia, não foram observadas neste estudo. Pelo contrário, valores de glicemia em amostras em citrato foram inferiores a amostras séricas e coletadas em EDTA (Ver Tabela 3).

Quanto à contagem de eritrócitos, houve diminuição significativa dos valores no sangue total/EDTA, quando comparado aos resultados do plasma/citrato de sódio e plasma/heparina. Harr et al. (2005) não observaram resultados semelhantes, não havendo diferença entre os três anticoagulantes testados.

A contagem total de leucócitos foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparada com o plasma/heparina. Nenhum dos autores consultados menciona a influência do citrato sobre a refratometria de proteínas e as justificativas apresentadas, tais como a influência da glicemia, não foram observadas neste estudo. Pelo contrário, valores de glicemia em

amostras em citrato foram inferiores a amostras séricas e coletadas em EDTA (Ver Tabela 3).

A contagem total de leucócitos foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) em amostras coletadas em citrato de sódio do que em EDTA ou heparina. Harr et al. (2005), descreveram alterações no eritrograma, com incidência de hemólise, em amostras de araras coletadas em citrato de sódio. Guzman et al. (2008), recomendaram a heparina de lítio como anticoagulante para essas aves, sugerindo que os demais possam alterar concentração de proteína plasmática, VG (%) e a contagem de linfócitos, entretanto nada foi relatado a respeito da contagem total de leucócitos. Na avaliação da contagem diferencial, não foram observadas diferenças estatísticas, nem a ocorrência de agregados celulares em lâminas oriundas de amostras com citratos. Pelo contrário, 65% das amostras que apresentaram agregados celulares eram provenientes de coletas com heparina, o que pode ter comprometido a contagem total de leucócitos. Já amostras coletadas em EDTA apresentaram intensas alterações morfológicas em trombócitos. Dessa forma, a diferença observada pode ter sido resultado de alterações morfológicas e/ou agregação celulares que comprometeram a diluição ou a identificação dos leucócitos na câmara de Neubauer.

### **Bioquímica**

A comparação entre plasma e soro para a análise bioquímica vem sendo pesquisada para inúmeras espécies (Laborde et al., 1995, Young e Bernes 1998; Morris et al., 2002; Cerón et al., 2004; Mohri et al., 2007a; Mohri et al., 2007b; Mohri et al., 2009a; Mohri et al., 2009b; Mohri e Rezapoor, 2009; Padilla et al., 2009) porém os estudos ainda demonstram ser controversos e inconclusivos.

A dosagem de ácido úrico no plasma/EDTA foi significativamente maior em comparação ao soro, enquanto no plasma/citrato de sódio, o resultado foi significativamente menor e no plasma/heparina não houve diferença estatística. O aumento do valor do ácido úrico encontrado no plasma/EDTA de araras não possui um mecanismo claro e não foi encontrado trabalho que dosasse o analito em plasma/EDTA para poder discutir mais profundamente nossos resultados.

Os valores de albumina nos três anticoagulantes pesquisados foram significativamente menores. Apesar do presente estudo demonstrar diminuição significativa da concentração valor de albumina, ele não foi observado em cães, cavalos, vacas, camelos ou ovelhas espécies (Laborde et al., 1995, Young e Bernes 1998; Morris et al., 2002; Cerón et al., 2004; Mohri et

al., 2007a; Mohri et al., 2007b; Mohri et al., 2009b; Mohri e Rezapoor, 2009; Padilla et al., 2009). Essa diferença deve ser associada a particularidades da espécie. Segundo Lumeij e Overduin, (1990), o método do verde de bromocresol ainda não é validado para aves, sendo a disparidade associada, principalmente pelo controle e padrão usados serem de humanos. Além disso, a albumina aviária possui uma afinidade diferente ao corante verde de bromocresol, sendo assim recomendado o uso do gel de eletroforese para determinação de albumina (Guzmanet al., 2008).

As atividades das transaminases AST e ALT no plasma/EDTA de araras apresentaram diminuição significativa quando comparadas ao soro, enquanto no plasma/citrato de sódio houve diminuição somente na AST. O mesmo resultado foi encontrado em cavalos (Mohri et al., 2007a). Em vacas e ovelhas, somente a atividade da AST foi analisada e foi observada a diminuição significativa quando comparada ao soro (Mohri et al., 2007b; Mohri e Rezapoor, 2009). Segundo Mohri et al. (2007a), o EDTA quelata não somente o cálcio, mas também os íons magnésio, zinco e ferro, necessários como cofatores para a atividade das enzimas mencionadas, o que poderia justificar a diferença observada neste estudo ao se comparar amostras de plasma/EDTA e soro.

Dentre os minerais, o magnésio foi testado no plasma/EDTA de cavalo, camelo e ovelha e, em todas as espécies (Mohri et al., 2007a; Mohri et al., 2009b; Mohri e Rezapoor, 2009), os valores de magnésio tiveram redução dos valores quando comparados ao soro no plasma/EDTA e no plasma/citrato de sódio, corroborando os resultados encontrados no presente estudo. Esse achado provavelmente foi ocasionado pelo efeito quelante do EDTA de íons fortes, como já discutido anteriormente.

O fósforo teve diminuição na dosagem nos três anticoagulantes, assim como observado por Céron et al. (2004) e Mohri et al. (2009b), em amostras de sangue de cães e camelos. A diminuição do fósforo pode também ser associada ao efeito quelante do EDTA (Mohri et al., 2009b). Entretanto, Mohri et al. (2007a), em pesquisa de anticoagulantes em cavalos, não observaram diferença estatística entre soro e plasma/EDTA.

A diminuição significativa vista nos níveis de colesterol no plasma/EDTA, plasma/citrato de sódio e plasma/heparina quando comparados ao soro de araras, também foi observada no plasma/EDTA de ovelhas Morris et al. (2002) e cavalos Mohri et al. (2007a). Entretanto, ele não foi observado em amostras de plasma/EDTA de cães (Céron, 2004), camelos (Mohri et al., 2009b) e ovelhas (Mohri e Rezapoor, 2009). Dessa forma, parece haver diferença entre as espécies animais com relação aos efeitos do EDTA, citrato de sódio e heparina sobre as análises bioquímicas de colesterol.

Segundo Burtis et al. (2008), o anticoagulante padrão para dosagem de glicose é o fluoreto de sódio, pois inibe a glicólise anaeróbica pelos eritrócitos. Entretanto, Jain e Schalm (1986) relata que, desde que a separação da fração líquida ocorra imediatamente após a coleta, não haverá redução da concentração de glicose, pois não haverá consumo pelas células sanguíneas, especialmente pelos eritrócitos. As concentrações de glicose no plasma/EDTA, plasma/citrato de sódio e plasma/heparina apresentaram diminuição significativa em relação ao soro. Mohri et al. (2007a), ao testarem os níveis de glicose de cavalos, obtiveram resultados semelhantes quanto à redução nos níveis de glicose plasmática em comparação ao soro. Já Morris et al. (2002) relataram aumento no nível de glicose no plasma/EDTA de ovinos, sendo esses resultados associados à ocorrência de hemólise. Dentre os plasmas avaliados, o coletado em heparina apresentou a maior diferença observada, com uma diminuição de 24% em comparação a amostras de soro (Tabela 4).

Resultados semelhantes à redução dos valores do plasma/EDTA em comparação ao soro de proteínas totais das araras foram encontrados em cavalos (Mohri et al., 2007a), vacas (Mohri et al., 2007b) e ovelhas (Mohri e Rezapoor, 2009), sendo essa diminuição de 6,93%, 7,60% e 1,93%. Já em cães (Cerón et al., 2004), camelos (Mohri et al., 2009b) e ovelhas (Mohri e Rezapoor, 2009) não houve diferença estatística. As diferenças entre espécies podem ser fatores que contribuíram para isso.

A avaliação do plasma/EDTA em ovelhas obteve resultado semelhante aos encontrados no plasma de araras, com diminuição significativa dos valores de triglicerídeos, quando comparados às amostras de soro (Laborde et al., 1995; Morris et al., 2002). Estudos sobre o efeito de plasma/EDTA nos níveis de triglicerídeos de cães, cavalos e camelos não relatam haver diferença significativa entre soro e plasma (Céron et al., 2004; Mohri et al., 2007a; Mohri et al., 2009b). Os resultados de triglicerídeos em araras demonstraram uma variável bastante instável para a espécie, com coeficientes de variação acima de 90%, inclusive em amostras de soro.

Os valores de ureia no presente estudo apresentaram uma redução significativa em plasma/EDTA. Resultados similares foram observados em estudos utilizando-se amostras de sangue de vacas e ovelhas (Mohri, 2007b; Mohri e Rezapoor, 2009). Em cães, Cerón et al. (2004) e, em ovelhas, Laborde et al. (1995), esses autores relataram não haver diferença entre plasma/EDTA e soro. No presente estudo, o mecanismo exato que possa explicar essa diferença estatística nos analitos glicose, proteínas totais, ureia e colesterol não é claro, mas pode estar associado à diferença entre espécies, contribuindo para as variações encontradas.

A comparação estatística do plasma/citrato de sódio com o soro demonstrou que 10

analitos testados tiveram uma diminuição estatística de valores quando comparados ao soro. Esses resultados corroboram aos encontrados por Céron et al. (2004); Mohri et al. (2007a); Mohri et al. (2007b); Mohri et al. (2009a); Mohri et al. (2009b) e Mohri e Rezapoor, (2009), que observaram redução significativa de valores para os seguintes analitos: cálcio, fósforo, magnésio, ferro, cloreto, glicose, ácido úrico, proteínas totais, albumina, acetilcolinesterase, lipase, amilase, ALP, ALT, AST, creatina quinase (CK), gama glutamiltransferase (GGT), colesterol, triglicerídeos, bilirrubina totais e creatinina, associando este achado à hemodiluição, devido à alta concentração de anticoagulante utilizada necessária (1:9). Se considerarmos, no entanto, os volumes de anticoagulantes utilizados, veremos que a mesma hemodiluição, que possivelmente tenha ocorrido com o uso de citrato de sódio (1:8,3), ocorreu com o uso de EDTA (1:10) e heparina (1:5), já que foram adicionados 1mL de amostra de sangue em 120 uL, 100 uL e 200uL de anticoagulante, respectivamente.

Os valores bioquímicos de albumina, AST, cálcio, colesterol, fósforo, glicose, magnésio, proteínas totais, triglicerídeos e ureia no plasma/heparina de araras, quando comparados ao soro, demonstraram diminuição significativa. Céron et al. (2004) encontrou resultados divergentes em cães, em que a heparina e o soro apresentaram diferenças estatísticas apenas nos valores de albumina, potássio, cálcio e acetilcolinesterase. Em cavalos, Mohri et al. (2007a), ao compararem plasma/heparina ao soro, encontraram que para a maioria dos analitos testados não houve diferenças estatísticas. Entretanto, os valores de BUN, bilirrubina totais, ALT e CK apresentaram uma diminuição significativa. A semelhança entre plasma/heparina e soro também foi observada em plasma de avestruzes, como descrito por Mohri et al. (2009a), exceto pela diminuição nos níveis de glicose, proteínas totais, albumina e fósforo. A diminuição significativa de ureia, creatinina e proteínas totais e o aumento de bilirrubina foram descritos por Mohri et al. (2007b) em vacas. Já em camelos, Mohri et al. (2009b) observaram um aumento significativo nas atividades da CK e diminuição da atividade da GGT, além de diminuição das concentrações de colesterol, creatinina e cloreto. Na avaliação de ovelhas, o plasma/heparina, como na maioria das espécies estudadas por Mohri e Rezapoor (2009) apresentou o melhor resultado tendo somente aumento significativo nos valores de albumina.

Ao comparar os resultados apresentados pelo EDTA, pelo citrato de sódio e pela heparina ao soro, a redução significativa dos valores obtidos é visível em praticamente todos os analitos pesquisados (Ver Tabela 4). Jain e Schalm (1986) considera que, para que a diferença seja clinicamente significativa, ela deve ser superior a 10% do valor do soro; sendo assim, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o EDTA seja o melhor substituto ao soro na bioquímica de araras, pois apresentaram em cinco analitos resultados dentro da variação

proposta por Jain (1993). Finalmente, mesmo com a redução desses valores é possível utilizar esses resultados para aplicações práticas, flexibilizando ou aumentando sua margem de utilização.

## **CONCLUSÕES**

Tendo em vista os parâmetros que delimitam a condução deste estudo, é possível concluir que:

1. EDTA é o melhor anticoagulante para a realização do hemograma de araras;
2. Citrato de sódio e heparina são semelhantes na avaliação da hematimetria de araras, resultando em valores menores que os obtidos em amostras com EDTA;
3. Dentre os anticoagulantes analisados, o EDTA se mostrou válido para um maior número de análises bioquímicas do que citrato de sódio e heparina sódicas;
4. O EDTA é o anticoagulante de escolha para realização de análises hematológicas e bioquímicas de araras Canindé.

## CAPÍTULO 2:

### **Avaliação hematológica e bioquímica de *Trachemys scripta spp* com o uso citrato de sódio, EDTA-K<sub>3</sub> e heparina sódica como anticoagulantes.**

#### **REVISÃO DE LITERATURA**

O Brasil possui a quinta maior diversidade de répteis do mundo, registrando 468 das 6400 espécies descritas para esta classe. Esse número tende a ser maior, pois existem outras espécies a serem descobertas em todos os biomas brasileiros, sobretudo na Amazônia. Um levantamento realizado em 2002 relata 34 espécies de quelônios no Brasil, sendo cinco marinhas, duas terrestres e vinte e sete límnicas (Pinto, 2002; Valle et al., 2008).

Os quelônios estão expostos a inúmeros impactos, diretos e indiretos, que podem ter efeito sobre os animais e suas áreas de alimentação, desova, hibernação, entre outros. Esses impactos podem influenciar as espécies em todos os seus estágios de vida, de forma cumulativa, amplificando o efeito sobre as populações. A fragmentação e a degradação dos habitats, a alteração da qualidade da água, a ocupação desordenada dos pontos de desova, o consumo de carne e derivados, o tráfico destinado a animais de estimação e a mortalidade por atropelamento são apenas alguns dos fatores aos quais os quelônios estão expostos (Bager, 2003).

O gênero *Trachemys* foi descrito por Agassiz em 1857, sendo representado por seis espécies de cágados. É um gênero de ampla distribuição, ocorrendo em todas as Américas. As *Trachemys spp* são animais límnicos; possuem porte de médio a grande, sendo identificadas principalmente pelas faixas de ambos os lados da cabeça, em tons de vermelho, laranja ou amarelos. As fêmeas são maiores que os machos, que têm cauda longa e garras proeminentes nos membros anteriores, características para facilitar a cópula (Ernst e Barbour, 1989 *apud* Souza, 2006). A *Trachemys scripta elegans* é originária do sul dos Estados Unidos da América e do norte do México. Entretanto, devido ao tráfico internacional de animais, chegou ao Brasil, onde se adaptou muito bem e representa risco às espécies nativas - *Trachemys scripta dorbignyi* por competição interespecífica (Souza, 2006).

#### **Avaliação laboratorial de Répteis**

A utilização parâmetros hematológicos e bioquímicos para avaliação da saúde e estado

clínico de répteis, especialmente tartarugas, é essencial por representar uma ferramenta diagnóstica importante devido às características e particularidades da espécie (López-Olvera et al., 2003). O estabelecimento de valores de referência e a padronização da coleta de amostras podem ser úteis em inúmeros campos, desde a prática clínica para animais em centros de reabilitação até a avaliação de animais de produção, representando um importante indicador ambiental, uma vez que estas espécies são sensíveis às mudanças de habitat (Dickinson et al., 2002).

Entretanto, inúmeros fatores, intrínsecos e extrínsecos, dificultam o estabelecimento de valores de referências para essas espécies. Para minimizar os efeitos como idade, sexo, espécie, estação do ano, habitat, dieta e temperatura, a padronização do local da coleta e as técnicas irão aprimorar a acurácia (Gottdenker e Jacobson, 1995) desses valores.

Quanto à análise hematológica de répteis, os anticoagulantes utilizados com mais frequência são heparina de sódio, lítio e amônia; EDTA dissódico, dipotássico ou tripotássico; citrato de sódio ou oxalato (Horne e Findisen, 1977). Segundo Harr et al. (2005), o EDTA ou a heparina de lítio podem ser utilizados para a análise hematológica de tartarugas e tigres d'água. Entretanto, o EDTA pode induzir hemólise *in vitro*, e a heparina pode causar aglutinação de trombócitos e leucócitos e alterar a coloração dos esfregaços. Hanley et al. (2004) ao compararem o efeito do EDTA ou heparina de lítio sobre os valores de hematologia de iguanas, constataram que o EDTA apresentou resultados compatíveis aos vistos no esfregaço, sendo melhor que a heparina. Em quelônios, a heparina de lítio tem sido utilizada como anticoagulante de escolha devido à hemólise causada pelo EDTA (Jacobson, 1987; Muro et al., 1998). A heparina de lítio deve ser usada como anticoagulante quando a mesma amostra de sangue será usada para análises bioquímicas, pois as heparinas de potássio ou sódio podem interferir na determinação de eletrólitos (Rovira, 2010).

A avaliação da bioquímica sanguínea pode ser realizada com a utilização de plasma ou de soro. O soro representa a fração obtida após centrifugação de uma amostra de sangue coagulado, sendo a amostra preferida para as análises bioquímicas. Entretanto, o plasma, pode ser um material igualmente útil e, em certas condições, até preferível ao soro. Ambos são similares, porém o plasma contém fatores de coagulação e um anticoagulante que não estão presentes no soro. A maioria dos analitos, tanto no soro quanto no plasma de mamíferos, é similar, desde que o sangue seja manipulado de forma padronizada e a separação das células ocorra em até 2 horas (Young e Bermes, 2008).

É ideal que as amostras de sangue para realização de análises hematimétricas e bioquímicas sejam coletadas separadamente, entretanto, como isso nem sempre é possível,

indica-se a coleta de uma única amostra que permita o maior número de análises (Mohri et al., 2009a). Independentemente de a amostra utilizada ser de plasma ou de soro, a separação deve ocorrer o quanto antes para minimizar a hemólise, uma vez que ela pode causar inúmeras interferências nas dosagens de analitos como LDH, AST e ALT sejam por aumento na atividade ou por isoenzimas.

Grande parte dos laboratórios prefere o uso do soro, pois a presença do anticoagulante pode causar interferências nos métodos analíticos. Entretanto, o plasma acaba sendo mais utilizado devido à dificuldade na obtenção de amostras suficientes para preenchimento dos tubos de coleta ou, ainda, pela possibilidade de serem necessários novos testes além daqueles previstos inicialmente (Cerón et al, 2004). O uso do plasma também é vantajoso por eliminar algumas limitações associadas à utilização do soro, tais como: (a) a separação do plasma e do soluto é mais rápida, devido à presença do anticoagulante, reduzindo as interferências causadas pelo metabolismo celular (b) a presença de coágulos de fibrina na amostra analisada é reduzida e (c) o rendimento da fração líquida é elevado. Há um ganho de 15 a 20% no volume de amostras de plasma, quando comparadas ao volume de soro (Fudge, 2000; Boyanton e Blick, 2002, Young e Bermes, 2008).

Os mesmos fatores relacionados no capítulo 1 como motivos que dificultam a coleta e a interpretação de exames laboratoriais são evidenciados em relação aos quelônios. Estes incluem: a dificuldade de coleta de amostras; a ausência de técnica laboratorial eficiente para pequenos volumes de amostras; a falta de valores de referência para interpretação; e a ocorrência de hemólise e de fibrina devido ao processo de coleta e/ou separação da fração líquida (Fudge, 2000; González e Silva, 2008).

Para procedimentos hematológicos, o sangue deve ser coletado em tubos contendo anticoagulantes. As células sanguíneas de alguns animais reagem a anticoagulantes, mas o uso de tubos sem anticoagulantes para bioquímica de animais selvagens pode ser prejudicado pela possibilidade de hemólise durante o processo, comprometendo as análises (González e Silva, 2008). Além disso, a ocorrência de uma fibrina gelificante do soro pode comprometer a qualidade da amostra para o teste de bioquímica (Fudge, 2000).

Os anticoagulantes utilizados em hematologia humana e de outros mamíferos são os sais de ácido etilenodiamino tetra-acético potássico (EDTA-K<sup>3</sup>) ou sódico (EDTA-Na<sup>2</sup>). A heparina é utilizada para bioquímica clínica. O citrato de sódio é necessário para estudos referentes aos tempos de coagulação e testes de agregação plaquetários (Cerón et al., 2004; Mohri et al., 2007a; Burtis et al., 2008).

Tendo em vista essas considerações, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos dos anticoagulantes EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina sódicos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de tigras d'água.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram aprovados pelo IBAMA através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO, sob nº 32233, e pelas normas da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG pelo CEU 80/2012.

### Animais

Foram utilizados setenta tigras d'água (*Trachemys scripta spp*) adultos, hípidos, de ambos os sexos, provenientes do CETAS do IBAMA-MG em Belo Horizonte – MG (Figura 5). Os animais tinham peso médio de 1,1 kg e estavam acondicionados em recinto próprio. Foram realizadas quatro coletas, de 15 animais cada, durante os meses de junho e julho de 2012. As coletas foram realizadas durante o período da manhã a fim de minimizar o efeito da temperatura ambiente sobre os animais.



Figura 4. Recinto de répteis do Centro de Triagem de Animais Silvestres do IBAMA de Belo Horizonte - MG (Arquivo pessoal).

### Contenção e coleta das amostras

Os animais foram retirados do tanque com auxílio de uma rede e colocados em uma caixa plástica para serem identificados de forma a evitar que o mesmo animal fosse puncionando duas vezes. Para a coleta de amostras, a contenção foi manual (Figura 6). Foram coletados cerca de 3 mL de sangue, não excedendo os 10% do peso vivo do animal (Thrall et al., 2007), através do plexo do seio cervical, tomando-se cuidado para que a contaminação de linfa fosse mínima. Foi utilizado seringa de 3 mL e agulha 25x8, lavada internamente com heparina sódica para prevenir a coagulação imediata.



Figura 5. Contenção e coleta de sangue através do plexo do seio cervical em *Trachemys* spp (Arquivo pessoal).

### Distribuição e transporte das amostras

Após a coleta, o sangue foi distribuído em quatro frascos de 0,5 mL contendo: (1) 50 $\mu$ L de EDTA-K<sub>3</sub> a 10%; (2) 60 $\mu$ L de citrato de sódio a 3,8%; (3) 100 $\mu$ L de heparina sódica; (4) frasco sem coagulante para obtenção do soro. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração em caixas térmicas durante o transporte até o laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG para posterior processamento.

### Análises hematológicas

O sangue, após atingir a temperatura ambiente, foi homogeneizado e em seguida foram confeccionados esfregaços sanguíneos, um para cada anticoagulante. Também foram preenchidos micro capilares para determinação do VG (%) pela técnica de micro hematócrito e determinação da proteína plasmática total por refratometria. Então, 20 $\mu$ L de sangue foram aliqüotados em 1mL de solução de diluição *Dacie* (Jain e Schalm, 1986) para contagem dos

eritrócitos e leucócitos totais em hemocítômetro. Os procedimentos hematológicos foram realizados em prazo máximo de 6 horas após a coleta.

A contagem de eritrócitos e leucócitos foi realizada em microscópio óptico sob aumento de 40x em hemocítômetro em prazo máximo de 24 horas após a coleta, o que foi possível devido à presença de formol na solução de *Dacie*. A leitura foi feita conforme a técnica descrita para mamíferos.

### **Análises bioquímicas**

Uma vez ocorrido o processamento para hematologia, as amostras foram centrifugadas e preparadas para as análises bioquímicas. A centrifugação foi realizada inicialmente a 1000 rpm, durante 1 minuto, e a 4000rpm durante 4 minutos, para a obtenção do plasma nas amostras com anticoagulantes e para obtenção do soro na amostra sem anticoagulante, respectivamente. O protocolo de centrifugação foi adotado a fim de minimizar a ocorrência de hemólise. O plasma e o soro foram então refrigerados a 4°C para posterior processamento do perfil bioquímico.

Após a separação, o processamento bioquímico ocorreu em prazo máximo de uma semana. Foram dosados os seguintes analitos por técnica de colorimétrica: albumina, proteínas totais, ureia, creatinina, glicose, ALT, AST, ácido úrico, colesterol, triglicerídeos e LDH. Os demais analitos, fósforo, cálcio e magnésio, foram dosados por método cinético em aparelho de bioquímica automático Cobas Mira Plus<sup>®</sup>, utilizando kits comerciais Synermed<sup>®</sup>, já validados pelo laboratório de patologia clínica da EV-UFMG.

Para comparação entre as amostras e possivelmente sua validação, foram calculados os valores de porcentagem de variação. Dessa forma, o soro foi tido como referência para a bioquímica, para mensurar o percentual de variações entre soro e os anticoagulantes pesquisados. Os valores resultantes foram apresentados como negativos e positivos, quando havia decréscimo ou acréscimo nesses valores, comparados às amostras-padrão.

### **Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental foi em blocos, ao acaso, utilizando-se animais adultos de ambos os sexos. Como a comparação foi feita entre amostras de um mesmo animal, o experimento foi considerado pareado. Os resultados considerados normais pelos testes de Komolgorov Smirnov e homocedásticos pelo teste de Shapiro-Wilk na hematologia e na

bioquímica foram, então, submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste Student-Newman-Keuls. Os resultados que não apresentaram distribuição normal ou homocedástica foram transformados pela multiplicação do log (10) e submetidos aos mesmos testes anteriormente descritos. Toda a análise estatística foi realizada considerando-se a margem de significância de 5%.

## **RESULTADOS**

### **Hematologia**

A tabela 4 dispõe os valores médios dos índices hematimétricos, proteínas totais, VG (%) e contagem total de eritrócitos e leucócitos, além das porcentagens da contagem diferencial dos leucócitos.

O valor de VG no plasma/EDTA foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que no plasma/citrato de sódio e plasma/heparina, sendo estes estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ). Nas dosagens das PTP, não houve diferenças entre os três anticoagulantes avaliados ( $p > 0,05$ ). Entre o plasma/EDTA e os plasmas/heparina e citrato de sódio houve diferenças significativas na contagem de eritrócitos ( $p < 0,05$ ). A contagem total de leucócitos foi significativamente maior no plasma/citrato de sódio ( $p < 0,05$ ), quando comparado às amostras coletadas no citrato de sódio e na heparina, que se mostraram equivalentes ( $p > 0,05$ ). Na análise diferencial de leucócitos, houve similaridade estatística para os três anticoagulantes avaliados ( $p > 0,05$ ).

Tabela 4. Valores médios, seguidos do desvio padrão de volume globular (VG%); proteínas totais plasmáticas (PTP – mg/dL); contagem total de eritrócitos( $\times 10^5/\mu\text{L}$ ); contagem total e diferencial de leucócitos; de Trachemys spp utilizando-se os em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina de sódio.

Variáveis	Plasma/Citrato de		
	Plasma/EDTA-K <sub>3</sub> (n=60)	sódio (n=60)	Plasma/Heparina (n=60)
<b>VG (%)</b>	17,77 ± 5,35 <sup>A</sup>	14,47±4,02 <sup>C</sup>	15,38±4,64 <sup>BC</sup>
<b>PTP (mg/dL)</b>	4,00 ± 1,80 <sup>A</sup>	4,76±1,23 <sup>A</sup>	4,44±2,16 <sup>A</sup>
<b>Contagem total de eritrócitos (<math>\times 10^5/\mu\text{L}</math>)</b>	3,95 ± 1,66 <sup>A</sup>	3,39±1,50 <sup>B</sup>	3,37±1,09 <sup>B</sup>
<b>Contagem total de Leucócitos (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	7,45 ± 5,02 <sup>A</sup>	13,79±6,56 <sup>B</sup>	7,29±3,43 <sup>A</sup>
	<b>(n=10)</b>	<b>(n=10)</b>	<b>(n=10)</b>
<b>Heterofilos absolutos (<math>\times 10^5/\mu\text{L}</math>)</b>	4,33 ± 0,45 <sup>A</sup>	3,99 ± 0,88 <sup>A</sup>	4,80 ± 1,39 <sup>A</sup>
<b>Monócitos (<math>\times 10^5/\mu\text{L}</math>)</b>	0,06 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,09± 0,11 <sup>A</sup>
<b>Linfócitos (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	1,87± 0,74 <sup>A</sup>	2,19±1,22 <sup>A</sup>	2,15± 0,78 <sup>A</sup>
<b>Eosinófilos (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	3,72± 0,76 <sup>a</sup>	3,70± 0,87 <sup>a</sup>	2,87± 0,90 <sup>a</sup>
<b>Basófilos (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	0,03± 0,04 <sup>a</sup>	0,04± 0,06 <sup>a</sup>	0,09± 0,11 <sup>a</sup>

Análise de variância. Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes anticoagulantes testados.

### Bioquímica

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 5 e 6. Quando comparadas as amostras de soro e de diferentes plasmas, podem-se observar diferenças significativas.

No plasma/EDTA-K<sub>3</sub>, a concentração de ALT, AST e LDH foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que o valor dessa concentração obtida no soro, enquanto para glicose e magnésio, os valores foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) em relação ao soro. Em relação a ácido úrico, albumina, fósforo e proteína total não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre amostras de soro e plasma.

No plasma/citrato de sódio, a concentração de cálcio, fósforo, magnésio e proteína total foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) em comparação ao soro. Somente albumina apresentou valor significativamente maior ( $p < 0,05$ ) e os valores das transaminases ALT e AST não demonstram diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ).

No plasma/heparina, a concentração de albumina, glicose, LDH, magnésio e proteína total foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ), em relação ao soro. Já o valor da albumina foi

significativamente maior.

Tabela 5. Valores médios, seguidos do desvio padrão de ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (UI/L), AST (UI/L), cálcio (mEq/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL), LDH (UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicérides (mg/dl), ureia (mg/dL) de amostras de *Trachemys spp.* no soro e plasma colhidos em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina de sódio.

Analitos	Soro (n=60)	Plasma/EDTA-K <sub>3</sub> (n=60)	Plasma/Citrato de sódio (n=60)	Plasma/Heparina (n=60)
Ácido úrico (mg/dL)	1.12±0.52 <sup>A</sup> (0,6 – 1,64)	1,15±0.43 <sup>A</sup> (0,72 – 1,58)	1.18±0.38 <sup>A</sup> (0,8 – 1,56)	1.24±0.42 <sup>A</sup> (0,82 – 1,66)
Albumina (g/dL)	1.19±0.34 <sup>A</sup> (0,85 – 1,53)	1.25±0.41 <sup>A</sup> (0,84 – 1,66)	1.54±0,89 <sup>B</sup> (0,65 – 2,43)	1,90±0.75 <sup>C</sup> (1,15 – 2,65)
ALT (UI/L)	57.39±31,25 <sup>A</sup> (26,14 – 88,64)	68.85±35,50 <sup>B</sup> (33,35 – 104,35)	57.18±25.63 <sup>A</sup> (31,55 – 189,96)	55,85±24,85 <sup>A</sup> (31,0 – 80,7)
AST (UI/L)	119,03±54.71 <sup>A</sup> (64,32 – 173,74)	133,49±56.47 <sup>B</sup> (77,02 – 189,96)	120,01±51,09 <sup>A</sup> (68,92 – 171,1)	105,16±44.16 <sup>A</sup> (61 – 149,32)
Cálcio (mEq/L)	11.28±2.57 <sup>A</sup> (8,71 – 13,85)	-	7.53±1.57 <sup>B</sup> (5,96 – 9,1)	9.73±2.02 <sup>C</sup> (7,71 – 11,75)
Colesterol (mg/dL)	128.55±76.92 <sup>A</sup> (51,63 – 205,47)	128,02±78,88 <sup>A</sup> (49,14 – 206,9)	125.14±73,58 <sup>A</sup> (51,56 – 198,72)	114,39±76,40 <sup>B</sup> (37,99 – 190,79)
Fósforo (mEq/L)	2,77±1,07 <sup>AB</sup> (1,7 – 3,84)	3.69±2.39 <sup>A</sup> (1,3 – 6,08)	2.47±1.70 <sup>B</sup> (0,77 – 4,17)	2,50±2,69 <sup>C</sup> (-0,19 – 5,19)
Glicose (mg/dL)	41,11±19,08 <sup>A</sup> (22,03 – 60,19)	34,66±15,25 <sup>B</sup> (19,41 – 49,91)	34.17±16,16 <sup>B</sup> (18,01 – 50,33)	30,89±14,44 <sup>C</sup> (16,45 – 45,33)
LDH (UI/L)	592,68±282,20 <sup>A</sup> (313,48 – 874,88)	684,95±352,30 <sup>B</sup> (332,65 – 1037,25)	588,53±268,55 <sup>A</sup> (319,98 – 857,08)	499,85±264,20 <sup>C</sup> (235,65 – 764,05)
Magnésio (mEq/L)	4,01±0.87 <sup>A</sup>	0.31±0.37 <sup>B</sup>	3.73±0,98 <sup>C</sup>	2.96±0.99 <sup>D</sup>

	(3,14 – 4,88)	(-0,06 – 0,68)	(2,75 – 4,71)	(1,97 + 3,95)
Proteína total (g/dL)	3.37±0,83 <sup>A</sup>	3.32±0,93 <sup>A</sup>	2.94±1.11 <sup>B</sup>	3.00±0.76 <sup>B</sup>
	(2,54 – 4,2)	(2,39 – 4,25)	(1,83 – 4,05)	(2,24 – 3,76)
Triglicerídeos (mg/dL)	214.01±190,40 <sup>B</sup>	215,22±187,61 <sup>A</sup>	226.32±212.80 <sup>C</sup>	209,64±196,50 <sup>C</sup>
	(23,61 – 402,83)	(27,61+402,83)	(13,52 – 439,12)	(13,14 – 406,14)
Ureia (mg/dL)	21,20±14.65 <sup>A</sup>	22,84±14,84 <sup>A</sup>	22,34±13,90 <sup>A</sup>	19,74±12,21 <sup>A</sup>
	(6,55 – 35,85)	(8 – 37,68)	(8,44 – 36,24)	(7,53 – 31,95)

Análise de variância. Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes anticoagulantes testados. Os valores de ALT, fósforo e triglicerídeos - análise por Kruskal Wallis (não paramétrico).

A Tabela 6 dispõe os dados após a obtenção dos resultados entre as médias das porcentagens de variação, entre amostras de soro e plasmas analisados. Considerando-se uma variação de 10% como aceitável (Jain e Schalm, 1986), amostras de plasma/EDTA apresentaram resultados semelhantes aos do soro para: albumina, colesterol, glicose, proteína total e triglicerídeos (5/13 analitos). No plasma/citrato de sódio, para ALT, AST, colesterol, glicose, LDH, magnésio, triglicerídeos e ureia o resultado foi também semelhante (8/13 analitos). No plasma/heparina, o mesmo padrão se repetiu (7/13 analitos) em relação à ALT, AST, colesterol, fósforo, proteína total, triglicerídeos e ureia. O analito cálcio não apresenta estabilidade em amostras de plasma.

Tabela 6. Diferença percentual entre as amostras de plasma colhido em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina sódica para ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (UI/L), AST (UI/L), cálcio (mEq/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL), LDH (UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicerídeos (mg/dl), ureia (mg/dL)

Analitos	Plasma/Citrato		
	Plasma/EDTA-K <sub>3</sub> (n=60)	de sódio (n=60)	Plasma/Heparina (n=60)
Ácido úrico (mg/dL)	10,79	24,63	28,75
Albumina (g/dL)	5,67	33,77	63,26
ALT (UI/L)	36,73	5,65	9,50
AST (UI/L)	12,63	-0,36	-8,71
Cálcio (mEq/L)	0	-32,54	-12,94
Colesterol (mg/dL)	-0,38	-3,86	-8,21
Fósforo (mEq/L)	42,64	-12,08	10,21
Glicose (mg/dL)	-8,63	-7,79	-19,72
LDH (UI/L)	26,21	6,11	-12,16
Magnésio (mEq/L)	-92,86	-9,32	-26,68
Proteína total (g/dL)	0,53	-10,68	-6,49
Triglicerídeos (mg/dL)	4,61	1,43	-5,79
Ureia (mg/dL)	20,79	5,46	2,16

Valores negativos representam a redução e positivos representam acréscimo nas concentrações dos analitos quando comparadas amostras de referência (-) para o teste em questão.

## DISCUSSÃO

### Hematologia

O efeito entre anticoagulantes em reptéis foi pesquisado em iguanas por Hanley et al. (2004), porém, estudos similares com tigrés d'água não foram realizados. A maioria dos autores fornece dados que são insuficientes, principalmente, quanto à metodologia utilizada para coleta e análises. Em *Trachemys spp* a falta de estudos limita a discussão dos resultados.

O aumento observado nos valores de VG (%), encontrados no plasma/EDTA, quando comparados ao plasma/citrato de sódio e plasma/heparina foi corroborado por Mafuvadze e Erlwanger (2007), Guzman et al. (2008) e Sabino et al. (2010) em papagaios-de-hispaniola e avestruzes e, assim como no presente estudo, este efeito está associado à tumefação celular. Jain (1993) explica que como não há a ativação da bomba de sódio e potássio, devido ao efeito quelante do cálcio do EDTA, há migração de água para o interior celular, que aumenta o tamanho e lise celulares. A hemólise não pode estar vinculada a essa elevação, pois não foi observada em nenhuma das amostras avaliadas. Entretanto, em um estudo realizado por Muro et al. (1998), com jabutis, a mensuração do VG (%) foi impossibilitada devido a intensa hemólise.

Entre o plasma/heparina e plasma/citrato de sódio não houve diferenças na contagem de eritrócitos. Foi observado, no plasma/EDTA-K<sub>3</sub>, um aumento significativo nessa contagem, enquanto Muro et al. (1998), trabalhando com jabutis, observaram redução significativa de eritrócitos ao comparem a contagem de eritrócitos aos valores encontrados em amostras coletadas em heparina. Harr et al. (2005), com araras e pítons, não observaram essas diferenças, evidenciando não haver distinção entre os três anticoagulantes testados.

A contagem total de leucócitos foi significativamente maior no plasma/citrato de sódio ( $p < 0,05$ ). Entre plasma/EDTA e plasma/heparina não houve diferença ( $p > 0,05$ ). Na avaliação da contagem diferencial, não foram observadas diferenças estatísticas.

As qualidades das lâminas de esfregaços sanguíneos de *Trachemys spp* foram superiores às aquelas confeccionadas com sangue de araras e pacamãs, apresentando melhor qualidade quanto a coloração e artefatos.

## Bioquímica

A comparação entre plasma e soro para a análise bioquímica vem sendo pesquisada em inúmeras espécies (Laborde et al., 1995, Young e Bernes 1998; Morris et al., 2002; Cerón et al. Mohri et al., 2007a; Mohri et al., 2007b; Mohri et al., 2009b; Mohri e Rezapoor, 2009; Padilla et al., 2009). Porém, esses estudos ainda demonstram ser controversos e inconclusivos.

No presente estudo, nas amostras de plasma/EDTA, a concentração de ALT, AST e LDH foi significativamente maior que os valores obtidos nas amostras de soro. Apesar de não ter sido observado hemólise nessas amostras, algum grau de lise celular pode ter ocorrido. Em vista disso, como os eritrócitos possuem grande quantidade das isoenzimas ALT e AST, pôde ser observada uma elevação nas atividades das transaminases, corroborando o resultado de Tietz (1983), citado por Synermed<sup>®</sup>.

O anticoagulante padrão para dosagem de glicose é o fluoreto de sódio, que inibe a glicólise anaeróbica pelos eritrócitos (Burtis et al., 2008). Porém, desde que a separação entre solutos e a fração líquida ocorram imediatamente após a coleta, não haverá redução da concentração de glicose, como relata Jain e Schalm (1986). As concentrações de glicose no plasma/EDTA, plasma/citrato de sódio e plasma/heparina apresentaram diminuição significativa em relação ao soro. Morris et al. (2002) associaram o aumento no nível de glicose no plasma/EDTA de ovinos à ocorrência de hemólise. Mohri et al. (2007a), ao dosarem os níveis de glicose de cavalos, obtiveram resultados semelhantes quanto à redução nos níveis de glicose plasmática em comparação ao soro.

O magnésio foi testado no plasma/EDTA de cavalo (Mohri et al., 2007a), camelo (Mohri et al., 2009b) e ovelha (Mohri e Rezapoor 2009) e, nessas espécies, os valores de magnésio tiveram redução quando comparados ao soro, corroborando os resultados encontrados no nosso estudo. Esse achado pode ser associado ao efeito quelante de íons fortes do anticoagulante, como já discutido anteriormente.

No plasma/citrato de sódio, as concentrações de cálcio, fósforo, magnésio e proteína total foram significativamente menores em comparação ao soro, corroborando os resultados da maioria dos trabalhos pesquisados. A albumina e os triglicérides apresentaram valores significativamente maiores e os valores de ácido úrico, das transaminaes ALT e AST, do colesterol, do fósforo e do LDH não evidenciaram diferenças estatísticas. Esses resultados diferem um pouco daqueles encontrados por Céron et al. (2004); Mohri et al. (2007a); Mohri et al. (2007b); Mohri et al. (2009a); Mohri et al. (2009b) e Mohri Rezapoor, (2009) observaram

redução significativa para os seguintes analitos: cálcio, fósforo, magnésio, ferro, cloreto, glicose, ácido úrico, proteínas totais, albumina, acetilcolinesterase, lipase, amilase, ALP, ALT, AST, creatina quinase (CK), gama glutamiltransferase (GGT), colesterol, triglicerídeos, bilirrubina totais e creatinina, associando esse achado à hemodiluição, devido à alta concentração de anticoagulante (1:9) utilizada.

Se considerarmos, no entanto, os volumes de anticoagulantes utilizados, veremos que a mesma hemodiluição que possivelmente ocorreu com o uso de citrato de sódio (1:8,3) ocorreu com o uso de EDTA (1:10) e heparina (1:5), já que foi adicionado 1 mL de amostra de sangue em 50, 60 e 100uL de anticoagulantes, respectivamente.

No plasma/heparina, a concentração de ácido úrico, ALT, AST, e ureia não apresentaram diferenças estatísticas.

Os valores de albumina foram significativamente maiores para o plasma/heparina em comparação ao soro. Essa elevação difere do resultado encontrado por Cerón et al. (2004), que observaram redução nos níveis de albumina, contrariamente a Mohri et al. (2009a) que, em avestruzes, documentaram a elevação da albumina e relatam a elevação dos níveis de glicose, proteínas totais e fósforo. Mohri e Rezapoor (2009) também observaram a elevação dos valores de albumina no plasma/heparina de ovelhas. Stolol et al. (2001) *apud* Mohri e Rezapoor (2009), associam a elevação da albumina à combinação da heparina e o fibrinogênio.

Quanto à dosagem de proteínas totais no plasma/heparina, os resultados conhecidos em vacas (Mohri et al. 2007b) que evidenciaram redução significativa corrobora os valores encontrados neste estudo com *Trachemys spp.* No entanto, o mecanismo que explica essa redução não está claro.

Os valores de cálcio, magnésio, fósforo, glicose, colesterol, glicose e LDH no plasma/heparina de *Trachemys* foram significativamente menores. Entretanto, os resultados diferem daqueles encontrados por Morris et al. (2002) e Mohri e Rezapoor (2009), em ovelhas; por Céron et al. (2004) em cães; em avestruzes, por Mohri et al. (2009a); em camelos, por Mohri et al. (2009b); e em cavalos por Mohri et al. (2007a), sendo que o mecanismo para a redução observada no plasma/heparina continua não elucidado.

A Tabela 6 dispõe os valores após a obtenção dos resultados entre as médias das porcentagens de variação, entre amostras de soro e plasmas analisados. Considerando-se uma variação de 10% como aceitável (Jain e Schalm, 1986), amostras de plasma/EDTA apresentaram resultados semelhantes aos do soro para albumina, colesterol, glicose, proteína total e triglicerídeos. No plasma/citrato de sódio, os valores para ALT, AST, colesterol, glicose, LDH, magnésio, triglicerídeos e ureia encontram-se de acordo à variação aceitável de 10%. No

plasma/ heparina, os analitos ALT, AST, colesterol, fósforo, proteína total, triglicerídeos e ureia também se encontram dentro desse parâmetro. O analito cálcio não apresenta estabilidade em amostras de plasma.

Apesar de o soro ser a escolha para análise bioquímica, a partir dos resultados obtidos na tabela 5, é possível fazer uma avaliação clínica por meio da porcentagem de diferença entre soro e os plasmas. Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o citrato de sódio seja o melhor substituto ao soro na bioquímica de *Trachemys spp*, pois o uso desse anticoagulante apresentou resultados dentro da variação proposta por Jain (1993) em oito analitos dos treze pesquisados.

## CONCLUSÕES

Nas condições em que este estudo foi conduzido, é possível concluir que:

1. Citrato de sódio é o melhor anticoagulante para a realização do hemograma de tigras d'água;
2. Dentre os anticoagulantes analisados, o citrato de sódio se mostrou válido para um maior número de análises bioquímicas do que EDTA e heparina sódicas;
3. O citrato de sódio é o anticoagulante de escolha para realização de análises hematológicas e bioquímicas de *Trachemys sp*.

### **CAPÍTULO 3:**

## **Avaliação hematológica e bioquímica de *Lophiluorus alexandriis* com o uso citrato de sódio, EDTA-K3 e heparina sódica como anticoagulantes**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

#### **Aquacultura no Brasil - Contexto atual**

Conforme o estudo de Projeções do Agronegócio (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA 2010/11-2020/2021), a demanda por alimento está em expansão nos mercados interno e externo e os preços dos produtos agrícolas estão em ascensão, o que estimula sua produção, permitindo que o Brasil se consolide como uma potência agrícola. O Ministério avalia que o país manterá a dianteira na produção da carne de frango e carne bovina, e incrementará a produção de carne suína (Brasil, 2010). O aumento da produção de pescado vai depender do avanço de pesquisas envolvendo a aquacultura, uma vez que a produtividade da pesca extrativa está condicionada à preservação e reprodução dos recursos naturais existentes. Esses recursos estão ameaçados pela sobrepesca, avanço do turismo e da expansão imobiliária no litoral brasileiro, bem como a construção de grandes complexos industriais. Isso tem levado à poluição das águas, aterro dos mangues e destruição de muitos locais de pesca, prejudicando a atuação dos pescadores artesanais, em um primeiro momento, e depois a própria pesca industrial (Brasil, 2010).

Entretanto, uma grande preocupação está na produtividade dos recursos e na manutenção dos estoques das espécies, que se encontram no limite da sustentabilidade, para que possa haver competição do pescado em relação aos concorrentes como a carne bovina, suína e de aves (Giulietti e Assumpção, 1995). Embora a aquacultura tenha avançado na última década (López e Sampaio, 2000; Tenório et al., 2006; Luz e Dos Santos, 2008; Pedreira et al., 2008; Dos Santos e Luz, 2009; Pedreira et al., 2009), informações sobre características clínicas, bioquímicas, hematológicas e de desenvolvimento ainda são escassas. Dificuldades são enfrentadas devido à falta de informações sobre a fisiologia dos animais e as oscilações nos parâmetros laboratoriais que auxiliem na compreensão dos aspectos biológicos, durante as diferentes fases de crescimento e desenvolvimento dos animais, desde a larvicultura, até a alevinagem e, especialmente, no período de engorda (Azzaydi et al., 1998; Lee et al., 2000).

Com base nesse levantamento, para o Brasil atingir a condição de potência também na área da aquicultura, aspectos como a preservação das espécies, o conhecimento sobre sua fisiologia e sua interação com o meio ambiente devem ser avaliados e considerados, por serem importantes para garantir o sucesso da produção. Das inúmeras espécies de peixes de água doce existentes no país, quantas possuem potencial zootécnico para ingressar em uma forma intensiva e sustentável de produção? Pouco se sabe sobre a fisiologia animal sob um ponto de vista produtivo. O conhecimento dos animais, sua fisiologia e comportamento no meio ambiente nos permitem extrapolar para o ambiente intensivo e, assim, começar a produção em uma escala maior. As análises laboratoriais nos permitem uma visão sobre condições gerais do animal, sua resposta a tratamentos e formas de manejo que podem inferir sobre a qualidade da carne.

O pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) é um peixe teleósteo pertencente à família Pimelodidae (Ordem Siluriformes) e tem como habitat natural a bacia do rio São Francisco (Travassos 1959). É uma espécie sedentária, de hábito noturno, que vive em geral em regiões de fundo de areia ou de pedras e tem preferência por ambientes lênticos (Travassos, 1959). É um peixe carnívoro por excelência e apresenta desova parcelada e natural em lagoas (Travassos, 1959; Cardoso et al., 1996). Os adultos podem atingir até 8 kg de peso vivo e são considerados uma espécie com grande potencial para cultivo e repovoamento de reservatórios hidrelétricos (Cardoso et al., 1996).

### **Avaliação laboratorial de peixes**

O sangue nos peixes pode representar um indicador fisiopatológico do funcionamento corpóreo, conseqüentemente, os parâmetros sanguíneos são importantes no diagnóstico do estado estrutural e funcional dos peixes (Mohammadzadeh et al, 2012).

A interpretação eficaz dos dados hematológicos pode tornar-se algo difícil, pois há fatores intrínsecos e extrínsecos que podem afetá-los, como forma e local de coleta, técnica laboratorial, variação sazonal, características genéticas, sexo, densidade populacional, deficiências alimentares, estresse, pH, qualidade da água, bem como estresse e transporte (Harding e Höglung, 1983; Wilhelm Filho et al., 1992; Rehulka e Adamec, 2004; Fund, 2007). Entretanto, apenas alguns valores normais para um reduzido número de parâmetros hematológicos foram estabelecidos para alguns peixes teleósteos, e esses valores variam amplamente devido à ausência de técnicas padronizadas de coletas e de mensuração (Blaxhall,

1972).

Para o sangue de peixes, é possível utilizar EDTA ou heparina (Campbell, 1988; Adeyemo et al., 2009; Hrubec e Smith, 2010). Ocasionalmente, ocorre coagulação mesmo na presença de anticoagulantes; nestes casos, coágulos podem ser observados na amostra antes da contagem celular ou micro agregados de trombócitos serão vistos no esfregaço sanguíneo corado. O uso de um anticoagulante diferente e a redução do estresse pré-captura pode prevenir a aglomeração dos trombócitos (Hrubec e Smith, 2010). Hesser (1960) relatou que a heparina é um anticoagulante de ação satisfatória com ocorrência mínima de lise ou crenação celular. Na falta da heparina, o EDTA deve ser preferido ao oxalato, pois também demonstrou baixa ocorrência de crenação. Klontz e Smith (1968), citados por Hattingh (1975), relatam que o EDTA é superior a heparina para procedimentos hematológicos de rotina de peixes, entretanto os resultados encontrados por Hattingh (1975), Barham et al. (1979), Korcock et al. (1988), Walencik e Witeska (2007), Ishikawa et al. (2010) e Witeska e Wargocka (2011) sugerem que a heparina seja melhor. Os mesmos estudos ressaltaram que, além da escolha do anticoagulante, deve-se avaliar também a concentração em que estes são usados.

A bioquímica clínica é comumente utilizada para explorar a dinâmica da saúde de animais mantidos em cativeiro, em centros biomédicos ou mesmo de animais de vida livre destinados em centros de triagem. Entretanto, estudos sobre bioquímica sérica em peixes teleósteos são escassos. Estes dados são benéficos para a determinação da fisiologia dos animais em cativeiro e vida livre. Ensaios fisiológicos permitem uma pré-triagem dos indivíduos experimentais e diminuir a perda de tempo, esforço e animais, indicando quais peixes são os mais adequados para sobreviver aos rigores da cirurgia, experimentação e manutenção em longo prazo, além de servir como base comparativa para avaliar os procedimentos adotados ou a resposta do organismo a diferentes estresses (O'Neill et. al, 1998).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos dos anticoagulantes EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina sódicos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos de tigrês d'água.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os procedimentos foram aprovados pelo IBAMA através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO, sob nº32233, e pelas normas da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG pelo CEU 80/2012.

## Animais

Foram utilizados 60 pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) adultos, hípidos, provenientes do Laboratório de Aquacultura da Escola de Veterinária da UFMG em Belo Horizonte – MG. Os animais tinham peso médio de 0,5 kg e estavam acondicionados em tanques circulares brancos de 3000L de capacidade, úteis e apropriados para o cultivo de peixes, num sistema de recirculação de água, dotados de sistema complementar de aeração. A alimentação, feita conforme o manejo estabelecido pelo laboratório, se constituiu de carcaça de tilápias.

## Contenção e coleta

Foram realizadas três coletas durante o mês de março de 2012, coletando-se o sangue de 20 animais por coleta, durante o período da manhã. Os animais foram retirados do tanque com auxílio de uma rede e contidos manualmente com auxílio de um pano úmido (Fig. 8). Foram coletados cerca de 3 mL, através da veia ou artéria caudal, utilizando seringa de 3mL e agulha 25x8, lavadas internamente com heparina sódica para prevenir a coagulação imediata.



Figura 6. Coleta de sangue de pacamã: contenção manual com auxílio de um pano úmido (Arquivo pessoal).

## Acondicionamento e transporte das amostras

Após a coleta, o sangue foi distribuído em 4 frascos, cada um com 0,5 mL, contendo: (1) 50µl de EDTA-K<sub>3</sub> a 10%; (2) 60µl de citrato de sódio a 3,8%; (3) 100µl de heparina sódica; (4) sangue sem anticoagulante para obtenção do soro. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG.

### **Análises hematológicas**

Após atingir a temperatura ambiente, o sangue foi homogeneizado e, em seguida, foram confeccionados esfregaços sanguíneos, um para cada anticoagulante. Também foram preenchidos micro capilares para determinação do VG (%), pela técnica de micro hematócrito e da proteína plasmática, por refratometria. Então, 20µl de sangue foram aliqüotados em 1 ml de solução de diluição Dacie na proporção 1:50 (Jain e Schalm, 1986), para contagem dos eritrócitos e leucócitos totais, em hemocítômetro. Os procedimentos hematológicos foram realizados no prazo máximo de até 6 horas após a coleta.

A contagem de eritrócitos e leucócitos foi realizada em microscópio óptico sob aumento de 40x, em hemocítômetro, até 24 horas após a coleta, o que foi possível devido à presença de formol na solução de Dacie. A leitura foi feita conforme procedimentos para mamíferos.

### **Análises Bioquímicas**

Logo após o processamento para as análises hematológicas, as amostras foram centrifugadas e preparadas para as análises bioquímicas, com a soro/separação do plasma e dos elementos figurados. A centrifugação foi realizada inicialmente a 1000 rpm durante 1 minuto e a 4000 rpm durante 4 minutos, respectivamente, para a obtenção do plasma nas amostras nos anticoagulantes e para obtenção do soro na amostra sem anticoagulante. O protocolo de centrifugação foi adotado a fim de minimizar a ocorrência de hemólise.

O plasma e o soro foram, então, refrigerados a 4°C para posterior análise do perfil bioquímico. Após cada coleta, o processamento bioquímico ocorreu no prazo máximo de uma semana. Foram dosados os seguintes analitos por colorimetria: albumina (verde de bromocresol), proteínas totais (Biureto), ureia (enzimático – UV), glicose (enzimático – N-sulfopropil), transaminases (enzimático - UV ALT e AST), ácido úrico (enzimático – Uricase Azure D2), colesterol (enzimático – N-sulfopropil), fósforo (fosfomolibdato/PVP), triglicérides (enzimático – N-sulfopropil), lactato desidrogenase (LDH - enzimático - UV) e magnésio (Azul Xilidil) o cálcio foi dosado por cinética (Arsenazo III). Todas as análises foram realizadas em aparelho de bioquímica automático Cobas Mira Plus<sup>®</sup>, utilizando kits comerciais Synermed<sup>®</sup> (Internacional Inc. São Paulo. Brasil. Registro 10438910025), já validados pelo laboratório de patologia clínica da EV-UFMG, para mamíferos domésticos.

## **Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental foi em blocos e ao acaso, utilizando-se animais adultos de ambos os sexos. Como a comparação foi feita entre amostras de um mesmo animal, o experimento foi considerado pareado. Os resultados considerados normais pelos testes de Komolgorov Smirnov e homocedásticos pelo teste de Shapiro Wilk, na hematologia e na bioquímica, foram, então, submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente ao teste Student-Newman-Keuls (SNK). Os resultados que não apresentaram distribuição normal ou homocedástica foram transformados pela multiplicação do log (10) e submetidos aos mesmos testes anteriormente descritos. Toda a análise estatística foi realizada considerando-se a significância de 5%.

## **RESULTADOS**

### **Hematologia**

Os valores encontrados para as variáveis hematológicas estão descritos na Tabela 7. Quando comparadas, os valores das amostras de plasma, de heparina, do citrato de sódio e do EDTA, podem-se observar algumas diferenças significativas quanto à contagem total de leucócitos.

Para os índices VG (%), contagem total de leucócitos e os diferenciais, não houve diferenças estatísticas entre os três anticoagulantes avaliados. O valor de proteínas totais plasmáticas no plasma/citrato de sódio foi significativamente maior em comparação ao plasma/citrato de sódio e plasma/heparina, que não revelaram diferenças entre si. Já a contagem total de leucócitos foi significativamente menor no plasma/citrato de sódio. Entre plasma/EDTA e plasma/heparina não houve diferença estatística.

Tabela 7. Valores médios seguidos do desvio padrão de volume globular (VG%); proteínas totais plasmáticas (PTP –mg/dL); contagem total de eritrócitos; contagem total e diferencial de leucócitos; de *Lophiosilurus alexandri* colhidos em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina de sódio.

Variáveis	Plasma/Citrato		
	Plasma/EDTA-K <sub>3</sub> (n=60)	de sódio (n=60)	Plasma/Heparina (n=60)
<b>VG (%)</b>	20,46±3,29 <sup>A</sup>	19,37 ±3,30 <sup>A</sup>	20,86 ±3,27 <sup>A</sup>
<b>PTP (mg/dL)</b>	4,68 ± 0,97 <sup>A</sup>	5,54±,66 <sup>B</sup>	4,17±0,65 <sup>C</sup>
<b>Contagem total de eritrócitos (x10<sup>5</sup>/μL)</b>	3,76 ±3,32 <sup>A</sup>	3,31±2,58 <sup>A</sup>	28,5 ±18,4 <sup>A</sup>
<b>Contagem total de leucócitos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	5,13 ±4,1 <sup>A</sup>	2,8±2,2 <sup>B</sup>	5,0±3,0 <sup>A</sup>
	<b>(n=10)</b>	<b>(n=10)</b>	<b>(n=10)</b>
<b>Heterofilos absolutos (x10<sup>5</sup>/μL)</b>	7,36 ± 0,55 <sup>A</sup>	699000±115031 <sup>A</sup>	696000±80994
<b>Monócitos(x10<sup>5</sup>/μL)</b>	0,24 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,36 ± 018 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,13 <sup>a</sup>
<b>Linfócitos(x10<sup>5</sup>/μL)</b>	0,12 ± 0,26 <sup>a</sup>	1,35 ± 5,97 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,53 <sup>a</sup>
<b>Eosinófilos(x10<sup>5</sup>/μL)</b>	1,21 ± 0,47 <sup>A</sup>	1,3 ± 6,55 <sup>A</sup>	1,5 ± 0,62 <sup>A</sup>
<b>Basófilos(x10<sup>5</sup>/μL)</b>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>Pqt/RBC</b>	0,00352±0,0141 <sup>A</sup>	0,029±0,0187 <sup>A</sup>	0,0321±0,0160 <sup>A</sup>

Análise de variância (ANOVA). Letras diferentes representam diferença significativa (p<0,05) entre os diferentes anticoagulantes testados.

### Bioquímica

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 8 e 9. Quando comparadas amostras de soro e de diferentes plasmas, é possível observar diferenças significativas entre algumas amostras avaliadas.

No plasma/EDTA-K<sub>3</sub>, a concentração de ácido úrico foi significativamente maior que o valor conseguido no soro. Enquanto para albumina, ALT, AST, colesterol, fósforo, magnésio, proteínas totais, triglicerídeos e ureia foram significativamente menores em relação ao soro. Já os valores de glicose e LDH não relevaram diferença estatística (p>0,05) entre amostras de soro e plasma.

No plasma/citrato de sódio, a concentração de ALT, AST, colesterol, magnésio, proteínas totais, triglicerídeos e ureia foram significativamente menores em relação ao soro. Os demais analitos ácido úrico, albumina, fósforo, glicose e não demonstram diferenças

estatísticas.

No plasma/heparina, a concentração albumina, ALT, AST, cálcio, colesterol, fósforo, LDH, magnésio, proteína total, triglicerídeos e ureia foram significativamente menores em relação ao soro, enquanto os valores de ácido úrico e glicose demonstram diferenças estatísticas.

Tabela 8. Valores médios, seguidos do desvio padrão de ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (UI/L), AST (UI/L), cálcio (mEq/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL), LDH (UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicerídeos (mg/dl), ureia (mg/dL) de amostras de *Lophiosilurus alexandri* soro e plasma colhidos em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina de sódio.

<b>Analitos</b>	<b>Soro (n=60)</b>	<b>Plasma/EDTA-K<sub>3</sub> (n=60)</b>	<b>Plasma/Citrato sódio (n=60)</b>	<b>de Plasma/ Heparina (n=60)</b>
Ácido úrico (mg/dL)	0,33±0,20 <sup>A</sup>	0,80±0,39 <sup>B</sup>	0,45±0,29 <sup>A</sup>	0,35±0,21 <sup>A</sup>
Albumina (g/dL)	0,85±0,15 <sup>A</sup>	0,75±0,13 <sup>B</sup>	0,86±0,15 <sup>A</sup>	0,61±0,18 <sup>C</sup>
ALT (UI/L)	34,54±24,53 <sup>A</sup>	11,90±6,83 <sup>B</sup>	20,85±11,98 <sup>C</sup>	27,36±21,07 <sup>C</sup>
AST (UI/L)	81,37±30,49 <sup>A</sup>	71,82±26,72 <sup>B</sup>	81,46±26,11 <sup>A</sup>	63,64±19,42 <sup>B</sup>
Cálcio (mEq/dL)	8,65±2,58 <sup>A</sup>	-	-	7,64±1,92 <sup>B</sup>
Colesterol (mg/dL)	230,42±46,48 <sup>A</sup>	213,12±31,48 <sup>B</sup>	197,41±28,21 <sup>C</sup>	189,25±36,82 <sup>C</sup>
Fósforo (mg/dL)	9,79±5,01 <sup>A</sup>	4,24±1,91 <sup>C</sup>	8,91±5,41 <sup>AB</sup>	8,48±6,07 <sup>B</sup>
Glicose (mg/dL)	11,41±9,10 <sup>A</sup>	12,20±8,75 <sup>A</sup>	8,09±4,64 <sup>A</sup>	7,62±5,65 <sup>A</sup>
LDH (UI/L)	357,70±206,49 <sup>A</sup>	329,24±204,30 <sup>A</sup>	354,33±211,18 <sup>A</sup>	286,47±150,82 <sup>B</sup>
Magnésio (mg/dL)	2,79±0,39 <sup>A</sup>	0,05±0,03 <sup>B</sup>	2,52±0,39 <sup>C</sup>	2,26±0,28 <sup>D</sup>
Proteína total (g/dL)	3,25±0,57 <sup>A</sup>	2,88±0,39 <sup>B</sup>	2,97±0,37 <sup>C</sup>	2,71±0,35 <sup>D</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	616,42±212,36 <sup>A</sup>	486,42±146,74 <sup>B</sup>	506,89±185,15 <sup>BC</sup>	537,65±166,04 <sup>C</sup>
Ureia (mg/dL)	15,19±10,00 <sup>A</sup>	4,68±2,88 <sup>B</sup>	7,19±3,80 <sup>C</sup>	12,01±10,28 <sup>D</sup>

Análise de variância. Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes anticoagulantes testados.

A Tabela 9 dispõe os dados após a obtenção dos resultados entre as médias das porcentagens de variação entre amostras de soro e plasmas analisadas. Considerando-se uma variação de 10% como aceitável (Jain e Schalm, 1986), amostras de plasma/EDTA apresentaram resultados semelhantes aos do soro para: AST, colesterol e LDH; no plasma/citrato de sódio: albumina, AST, glicose, magnésio, proteínas totais e ureia e no plasma/heparina: cálcio e fósforo. Os analitos ácido úrico, ALT e triglicerídeos não apresentam estabilidade em amostras de plasma.

Tabela 9. Diferença percentual entre as amostras de plasma colhido em EDTA-K<sub>3</sub>, citrato de sódio e heparina sódica para ácido úrico (mg/dL), albumina (g/dL), ALT (UI/L), AST (UI/L), cálcio (mEq/dL), colesterol (mg/dL), fósforo (mg/dL), glicose (mg/dL), LDH (UI/L), magnésio (mg/dL), proteína total (g/dL), triglicerídeos (mg/dL), ureia (mg/dL)

Analitos	Plasma/ citrato de		
	Plasma/ EDTA-K <sub>3</sub>	sódio	Plasma/ Heparina
Ácido úrico (mg/dl)	328,86	20,36	41,06
Albumina (g/dL)	-11,63	2,88	-27,70
ALT (UI/L)	-54,94	-21,59	27,79
AST (UI/L)	-7,20	8,19	-17,36
Cálcio (mEq/L)	-	-	-6,93
Colesterol (mg/dl)	-7,91	-25,20	-22,24
Fósforo (mEq/L)	-45,73	65,22	-3,64
Glicose (mg/dL)	459,98	4,14	673,58
LDH (UI/L)	-5,18	15,49	-12,81
Magnésio (mEq/L)	-98,05	-8,75	-18,28
Proteína total (g/dL)	-12,68	-9,60	-17,63
Triglicerídeos (mg/dl)	-19,50	-13,81	-10,99
Ureia (mg/dL)	-42,30	-0,55	99,50

Valores negativos representam a redução e positivos, acréscimo nas concentrações dos analitos quando comparadas amostras de referência (-) para o teste em questão.

## DISCUSSÃO

### Hematologia

Ao se avaliar o sangue de peixes, Campbell (1988), Adeyemo et al. (2009) e Hrubec e Smith (2010) relatam a possibilidade de utilização como anticoagulante do EDTA ou a heparina. Hattingh (1975) cita Klontz e Smith (1968), que relatam que o EDTA é superior a heparina para procedimentos hematológicos de rotina de peixes. Entretanto, os resultados encontrados por Hattingh (1975), Barham et al. (1979), Korcock et al. (1988), Walencik e Witeska (2007),

Ishikawa et al. (2010) e Witeska e Wargocka (2011) sugerem que a heparina seja melhor. Com base nos resultados desses autores, a heparina foi considerada padrão para comparação entre os anticoagulantes pesquisados.

Não há na literatura estudos sobre o efeito dos anticoagulantes na hematologia de pacamãs. A falta de dados dificulta e limita a discussão dos resultados encontrados. Nas pesquisas hematológicas em peixes grandes, parte dos autores fornece dados que são insuficientes, principalmente quanto à metodologia utilizada para coleta e análise das amostras e especialmente em relação à proporção e concentração de anticoagulantes, ao método utilizado para contagem de elementos figurados e à conservação da amostra.

Em relação à elevação da dosagem de proteínas plasmáticas no plasma/citrato de sódio, em comparação ao plasma/heparina e plasma/EDTA, Walencik e Witeska (2007), ao pesquisarem o efeito dos anticoagulantes EDTA, citrato de sódio e heparina em alguns índices hematológicos de carpas, não observaram diferença entre esses anticoagulantes. No plasma/citrato de sódio, os níveis de PTP foram significativamente maiores em comparação ao plasma/heparina. A contagem total de leucócitos também foi significativamente maior quando comparadas com o plasma/heparina.

### **Bioquímica**

No presente estudo, o plasma/EDTA demonstrou aumento no nível de ácido úrico e diminuição nos valores de albumina, ALT, AST, colesterol, fósforo, magnésio, proteína total, triglicerídeos e ureia, os quais foram significativos quando comparados aos valores obtidos na amostra de soro. Os níveis de glicose e LSH não demonstraram diferenças estatísticas. Diversos estudos avaliaram a bioquímica plasmática em diferentes espécies como vacas, ovelhas, cavalos, cães, avestruz, camelos, crocodilos e seres humanos (Laborde et al., 1995, Young e Bernes 1998; Morris et al., 2002; Cerón et al., 2004; Mohri et al., 2007a; Mohri et al., 2007b; Mohri et al., 2009a; Mohri et al., 2009b; Mohri e Rezapoor, 2009; Padilla et al., 2009). O EDTA atua como agente quelante, apresentando-se como sais dissódico ( $\text{Na}^2$ ), dipotássico ( $\text{K}^2$ ) ou tripotássico ( $\text{K}^3$ ), sendo os dois últimos os mais solúveis. Eles atuam como quelantes de íons fortes, com elevada afinidade para formar complexos, como íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , essenciais para o processo, com a formação de complexos (Oviedo e Rodríguez, 2003; Burtis et al., 2008).

Os níveis de ácido úrico no plasma/EDTA, comparados aos níveis encontrados no soro, demonstraram aumento significativo, como também foi observado em araras. Não há um mecanismo claro de ação entre o analito e o plasma/EDTA e não foi possível determinar se há interferência entre anticoagulantes. Mais ainda, não foi encontrado trabalho que dosasse o

analitos em plasma/EDTA para subsidiar a discussão.

A diminuição significativa do valor de albumina no plasma/EDTA, presentes neste estudo, não foi observada pelos autores: em ovelhas, cães, cavalos, vacas e camelos (Laborde et al., 1995; Mohri e Rezapoor, 2009; Cerón et al., 2004; Mohri et al., 2007a; Mohri et al., 2007b; Mohri et al., 2009b). Cerón et al (2004) relata diminuição nos níveis de albumina de cães no plasma, quando comparados ao soro, mas esta diminuição não foi significativa. Houve diminuição significativa do valor albumina no plasma/EDTA de pacamãs no presente estudo. O mecanismo exato ainda não foi esclarecido.

A comparação dos resultados das análises bioquímicas entre plasma/EDTA e soro para a atividade das enzimas transaminases AST e ALT de pacamãs revelou uma diminuição significativa. O mesmo resultado foi encontrado por Mohri et al. (2007a) em cavalos para ambos os analitos; já em vacas (Mohri et al., 2007b) e ovelhas (Mohri e Rezapoor, 2009), somente a atividade da AST foi analisada, e observada a diminuição significativa, quando comparados esses valores aos do soro. Esses autores associaram as atividades enzimáticas a uma dependência de minerais como zinco, magnésio e ferro. Então, a diminuição da atividade dessas enzimas pode estar associada ao efeito quelante promovido pelo EDTA.

O nível de colesterol plasmático de pacamãs em comparação ao de soro revela uma diminuição significativa. Essa diminuição foi relatada também em cavalos (Morris et al., 2002) e ovelhas (Mohri e Rezapoor, 2009). Entretanto, mecanismo e causa dessa diminuição não estão claros nessas espécies, assim como no pacamã. Já em cães (Cerón et al., 2004), camelos (Mohri et al., 2009b) e ovelhas (Mohri e Rezapoor, 2009) não foram observadas diferenças estatísticas entre os níveis plasmáticos de colesterol no EDTA em comparação ao soro.

No plasma/EDTA, os minerais magnésio e fósforo tiveram diminuições significativas quando comparados ao soro. Para o magnésio, Mohri et al. (2007a), Mohri et al. (2009b), Mohri e Rezapoor (2009) obtiveram resultados semelhantes para cavalos, camelos e ovelhas. A diminuição significativa dos níveis de fósforo também foi observada no plasma de cães (Céron et al., 2004) e camelos (Mohri et al. (2009b)). Já em cavalos (Mohri et al., 2007a) e ovelhas (Mohri e Rezapoor, 2009), não foram relatadas diferenças estatísticas entre plasma e soro. Mohri et al. (2007a), Mohri et al. (2009b) e Mohri e Rezapoor (2009) acreditam que estes resultados podem ser associados ao efeito quelante de íons fortes, pelo anticoagulante.

Na avaliação das proteínas totais, observou-se uma redução significativa nos níveis do plasma/EDTA em comparação ao soro em pacamãs. Isso foi observado por Mohri et al. (2007a), Mohri et al. (2007b) e Mohri e Rezapoor (2009) em cavalos, vacas, ovelhas, respectivamente. Já em camelos, cães e ovelhas, os autores Laborde et al. (1995), Cerón et al. (2004) e Mohri et

al. (2009b) não observaram diferenças estatísticas entre os níveis do plasma/EDTA e soro. Mohri et al. (2007a) associaram as diferenças entre espécies como fatores que contribuem para a divergência nos resultados observados.

A diminuição estatística dos níveis de triglicerídeos no plasma/EDTA em comparação ao soro encontrado neste estudo também foi observada em ovelhas (Laborde et al., 1995); Morris et al., 2002), mas não em cães (Céron et al., 2004), cavalos (Mohri et al., 2007a) e ovelhas (Mohri e Rezapoor, 2009).

A diferença estatística nos níveis de ureia plasmática em comparação ao soro de pacamãs corrobora o resultado encontrado por Mohri et al. (2007b) em vacas e Mohri e Rezapoor (2009) em ovelhas. Em cães, Céron et al. (2004) e ovelhas (Laborde et al., 1995), não foram observadas diferenças significativas entre plasma/EDTA e soro. Os mecanismos exatos que os possam explicar não são descritos, mas a diferença entre espécies pode ser um fator que contribui para os diferentes resultados.

O citrato trissódico, assim como o EDTA, irá atuar como um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como esses íons são essenciais para uma coagulação, a adição desses anticoagulantes mantém a amostra de sangue na fase líquida, por um período relativamente longo (Burtis et al., 2008). Os níveis de ácido úrico, albumina, AST, fósforo, glicose e LDH não mostraram diferenças estatísticas entre o plasma/citrato de sódio e soro, em amostras de pacamã. Já os analitos ALT, colesterol, magnésio, proteínas totais, triglicerídeos e ureia, ao se comparar soro e plasma/citrato de sódio, revelaram reduções significativas. A diminuição de inúmeros analitos foi observada em estudos realizados com cavalos, vacas, cães, avestruzes e, camelos, por (Mohri et al., (2007a), Mohri et al., (2007b);, Cerón et al., (2004;), Mohri et al., (2009a); Mohri et al., (2009b), quando comparados os níveis de plasma/citrato de sódio com o soro. Em vacas, houve diminuições significativas para glicose, bilirrubina total, ureia, creatinina, proteínas totais, albumina, AST e CK. Em cavalos, a diminuição ocorreu para glicose, colesterol, triglicerídeos, bilirrubina totais, nitrogênio urêmico sanguíneo (BUN), creatinina, proteínas totais, albumina, cálcio e ferro. Já em cães, foram encontradas reduções significativas nos níveis de albumina, ácidos biliares, bilirrubina, colesterol, frutossamina, glicose, proteínas totais e ureia. Em avestruzes houve redução dos valores de glicose, ácido úrico, proteínas totais e cálcio (Mohri et al., 2009a). Na avaliação em camelos, a redução observada afetou os seguintes analitos: glicose, colesterol, triglicerídeos, ureia, creatinina, proteína total, albumina, cálcio e magnésio. As reduções foram associadas à hemodiluição, provocada pelo citrato na concentração utilizada de 1:9 (Cerón et al., 2004; Mohri et al., 2007a; Mohri et al., 2007b; Mohri et al., 2009a; Mohri et al., 2009b; Mohri e Rezapoor, 2009;).

Dentre os anticoagulantes mais utilizados na rotina clínica, a heparina é o que possui mais aplicação hematológica e bioquímica (Burtis et al., 2008). No plasma/heparina, as concentrações de albumina, ALT, AST, cálcio, colesterol, fósforo, LDH, magnésio, proteína total, triglicerídeos e ureia foram significativamente menores em relação ao soro. A igualdade entre as maiores das análises no plasma/heparina em comparação ao soro, predominou em cães. Cerón et al. (2004) relataram que no plasma/heparina as diferenças estatísticas ocorreram no aumento da albumina e na diminuição dos valores de potássio, cálcio e acetilcolinesterase. Em cavalos, a maioria dos resultados não apresentaram diferenças estatísticas; houve diminuição significativa nos níveis de BUN, bilirrubinas totais, ALT e CK (Mohri et al., 2007a). Mohri et al. (2009a), pesquisando avestruzes, observou a mesma predominância de igualdade no plasma/heparina em comparação ao soro, exceto nos níveis de glicose, proteínas totais, albumina e fósforo. A diminuição significativa no plasma/heparina nos valores de ureia, creatinina, proteínas totais e aumento de bilirrubina foi descrita por Mohri et al. (2007b) em vacas. Já em camelos, Mohri et al. (2009b) observaram um aumento significativo de CK e diminuição significativa da atividade da GGT, colesterol, creatinina e cloreto. Na avaliação de ovelhas, assim como na maioria das espécies estudadas por Mohri e Rezapoor (2009), o plasma/heparina apresentou o melhor resultado, tendo aumento significativo somente nos valores de albumina.

## CONCLUSÃO

Nas condições em que este estudo foi conduzido, é possível concluir que:

1. Dentre os anticoagulantes analisados, o citrato de sódio se mostrou válido para um maior número de análises (5 analitos) bioquímicas do que citrato de sódio e heparina sódicas (3 analitos).
2. O citrato de sódio é o anticoagulante de escolha para realização de análises hematológicas e bioquímicas de pacamãs

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos para araras, tigres d'água e pacamãs são de extrema importância na vasta área que é a patologia clínica e a clínica de animais silvestres. Avaliar parâmetros hematológicos e bioquímicos de araras, tigres d'água e pacamãs e indicar o anticoagulante que permita o maior número de exames hematimétricos e da bioquímicos para cada espécie em uma única amostra sanguínea representa uma maneira de simplificar o processo e otimizar o rendimento das amostras coletadas, uma vez que reduzimos o tempo de coleta, o estresse de contenção no animal e gasto com material. Desta forma, caminhamos para a determinação de uma opção de metodologia para animais silvestres.

Os resultados podem ser vistos como valores diretos e com aplicações práticas imediatas, entretanto, eles também geraram inúmeros questionamentos que podem ser fontes para pesquisas futuras como: a concentração utilizada foi adequada para os analitos pesquisados? O uso do corante panótico é válido para as observações de lâminas ou o protocolo de tempo para corar as lâminas foi o melhor para as espécies pesquisadas?

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYEMO, O.K.; OKWILAGWE, O.O.; AJANI, F. Comparative assessment of sodium EDTA and heparin as anticoagulants for the evaluation of haematological parameters in cultured and feral african catfish (*Clarias gariepinus*). **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v.13, n.1, p.19-24, 2009. DOI: 10.14210/bjast.v13n1.p19-24. Disponível em: <https://periodicos.univali.br/index.php/bjast/article/view/1332> Acesso em: 13/02/2012.

ALLGAYER, M. C.; GUEDES, N. M. R.; CHIMINAZZO, C.; CZIULIK, M.; WEIMER, T. A. Clinical pathology and parasitologic evaluation of free-living nestlings of the Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*). **Journal of wildlife diseases**, v. 45, n. 4, p. 972-81, 2009. DOI: 10.7589/0090-3558-45.4.972 Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jwd/article/45/4/972/123335/CLINICAL-PATHOLOGY-AND-PARASITOLOGIC-EVALUATION-OF> Acesso em: 14/12/2012.

ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, A.O. Patologia Clínica. *In*: CUBAS, Zalmir Silvino; SILVA, Jean Carlos Ramos; CATÃO-DIAS, Jose Luiz. **Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2007, p.939-966.

AZZAYDI, M.; MADRID, J.A.; ZAMORA, S., SANCHEZ-VASQUEZ; MARTINEZ, F.J. Effect of three feeding strategies automatic, ad libitum demand-feeding and time-restricted demand-feeding on feeding rhythms and growth in European sea bass. **Aquaculture**, v.163, p.285-296, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00238-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848698002385> Acesso em: 14/12/2012.

BAGER, Alex. **Aspectos da Biologia e Ecologia da Tartaruga Tigre D'Água, Trachemys dorbignii, (Testudines – Emydidae) no Extremo Sul do Estado do Rio Grande do Sul**. Universidade Feral do Rio Grande do Sul – Departamento de Biociências, 2003. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/3441/000400598.pdf> Acesso em: 14/12/2012.

BAHIENSE, Carla Rodrigues. **Determinação de Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de Arara Canindé (Ara Ararauna), no Estado Do Rio De Janeiro.** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO - INSTITUTO DE VETERINÁRIA, 2010. Disponível em: <https://tede.ufrj.br/jspui/bitstream/jspui/1794/2/2010%20-%20Carla%20Rodrigues%20Bahiense.pdf> Acesso em: 26/12/2012

BARHAM, W.T.; SMIT, G.L.; SCHOONBEE, H.J. The effect of heparin concentration on certain blood parameters of the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **Comparative Biochemistry and Physiology - C: Comparative Pharmacology**, n.63, v.2, p.369-71, 1979. DOI: 10.1016/0306-4492(79)90088-1. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0306449279900881> Acesso em: 22/01/2013.

BLAXHALL, P.C., The hematological assessment of the health of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v.4, n.4, p.593-604, 1972. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1095-8649.1972.tb05704.x> Acesso em: 20/01/2013.

BOLTEN, Alan. B., JACOBSON, Elliot R, BJORNDAL, Karen A. Effects of anticoagulant and auto analyzer on blood biochemical values of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). **Am J Vet Res**; 53: 2224–2227. 1992. DOI: 10.2460/ajvr.1992.53.12.2224. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/ajvr/53/12/ajvr.1992.53.12.2224.xml> Acesso em: 14/02/2013.

BONELLO, Fabio Luis, CIARLINI, Paulo Cesar, AZEVEDO, Eustaquio Zacour Eritrograma e proteína plasmática total (Ppt) em Araras-Canindé (Ara Ararauna) mantidas em cativeiro. **Ciências Agraria**, v.2, n.2, p.20-24, 2002. Disponível em: [https://www.fea.br/wp-content/uploads/2020/09/Vol2\\_N2\\_2002.pdf](https://www.fea.br/wp-content/uploads/2020/09/Vol2_N2_2002.pdf) Acesso em: 23/07/2012.

BOWES, Victoria A., JULIAN, Richard J., STIRTZINGER Tania. Comparison of serum biochemical profiles of male broilers with female broilers and White Leghorn chickens. **Canadian journal of veterinary research**, v.53 n.1 p. 7 -11, 1989. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1255504/> Acesso em: 15/01/2013.

BOYANTON Jr, Bobby L; BLICK, Kenneth. E. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. **Clinical chemistry**, v.48 n.12 p.2242-2247. DOI: 10.1093/clinchem/48.12.2242 Disponível em: <https://academic.oup.com/clinchem/article/48/12/2242/5642419> Acesso em: 15/01/2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL E COMBATE À FOME. **O Brasil sem miséria**. Organizadores: Campello, Tereza; Falcão, Tiago; Vieira da Costa, Patricia. 2010.

BURTIS C.A.; ASHWOOD E.R.; BURNS D.E. Tietz **Fundamentos de Química Clínica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008, p.992.

CAMPBELL, Terry. W. Fish Cytology and Hematology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.18, n.2, p.349-364, 1988. DOI: 10.1016/S0195-5616(88)50036-0 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561688500360> Acesso em: 15/06/2012.

CAMPBELL, Terry W. Hematologia de Aves. *In*: THRALL, M. A.; BAKER, D. C. DENICOLA, D.; et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 1 ed. São Paulo: Roca. 2007 p. 215-247.

CAMPBELL, Terry W. Hematology. *In*: RITCHIE, Brason W.; HARRISON, Greg J.; HARRISON, Linda R. **Avian Medicine: Principles and Applications**. Florida: Wingers Publishing, p. 176- 198, 1994.

CAMPBELL, Terry W.; SMITH S.A.; ZIMMERMAN K.L. Hematology of Waterfowl and Raptors. *In*: Weiss, Douglas J.; Wardrop, Jane, K.; Schalm, O.W., **Schalm's Veterinary Hematology**, 6 ed. Iowa: Wiley-Blackwell 2010, p. 977-986.

CÂNDIDO, Marcus Vinicius. **Hematologia, bioquímica sérica e nutrição em aves: cracidae**. Universidade Federal do Paraná, 2008. Disponível em:

[https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/bitstream/handle/1884/16089/MARCUS\\_VINICIUS\\_CANDIDO.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/bitstream/handle/1884/16089/MARCUS_VINICIUS_CANDIDO.pdf?sequence=1&isAllowed=y) Acesso em: 23/07/2012

CARDOSO, E. L.; CHIARINI-GARCIA, H.; FERREIRA, R. M. A. et al.  
Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. **Journal of Fish Biology**, v. 49, n. 5, p. 778-787, nov. 1996. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1996.tb00078.x Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1095-8649.1996.tb00078.x> Acesso em: 17/06/2012

CERÓN, Jose J.; MARTÍNEZ-SUBIELA, Silvia; HENNEMANN, Carla; TECLES, Fernando. The effects of different anticoagulants on routine canine plasma biochemistry. **The Veterinary Journal**, v.167, n.3, p.294-301, 2004. DOI: 10.1016/j.tvjl.2003.09.009 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023303001734?via%3Dihub> Acesso em: 17/08/2012

COHEN, Robert R. Anticoagulation, centrifugation time, and sample replicate number of the microhaematocrit method for avian blood. **Poultry Science**, v.46, n.1, p214-218, 1967. DOI: 10.3382/ps.0460214. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119381763?via%3Dihub> Acesso em: 23/06/2012

CUBAS, Zalmir Silvino; SILVA, Jean Carlos Ramos; CATÃO-DIAS, Jose Luiz. **Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária**. 1ªed. São Paulo: Roca. 2007.

DEEM, Sharon L, DIERENFELD, Ellen S, SOUNGUET, Guy Phillipe, ALLEMAN A. Rick, CRAY, Carolyn, POPPENGA, Robert H., NORTON, Terry M., KARESH, William B. Blood Values in Free Ranging Nesting Leatherback Sea Turtles (*Dermochelys coriacea*) on the Coast of the Republic of Gabon. **J. of Zoo and Wildlife Medicine** 37: 464-471, 2006. DOI: 10.1638/05-102.1 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17315430/> Acesso em: 15/06/2012

DICKINSON, Vanessa M, JARCHOW, James L, TRUEBLOOD, Mark H. Hematology

and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. **J Wildl Dis**, v.38, n. 11, p. 143-153, 2002. DOI 10.7589/0090-3558-38.1.143. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jwd/article/38/1/143/122594/HEMATOLOGY-AND-PLASMA-BIOCHEMISTRY-REFERENCE-RANGE> Acesso em: 21/05/2012

DOS SANTOS, Jose Claudio; LUZ, Ronald K. Effect of salinity and prey concentrations on *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larvicultura. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.10.014. **Aquaculture**, v. 287, n. 3-4, p. 324-328, fev. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848608007618> Acesso em: 14/06/2012

FOURIE F. I. R. Effects of Anticoagulants on the Haematocrit, Osmolality and pH of Avian Blood. **Poultry Science**, v.56, n.6, p1842-1846, 1977. DOI: 10.3382/ps.0561842. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119549203> Acesso em: 18/06/2012

FUDGE, Alan M. **Laboratory medicine avian and exotic pets**. WB Saunders, Philadelphia, pp 378–394, 2000

FUND, Turtle Conservation. **A Global Action Plan for Conservation of Tortoises and Freshwater Turtles. Strategy and Funding Prospectus 2002–2007**. Washington, DC: Conservation International and Chelonian Research Foundation, 30 pp., 2007. Disponível em: [https://turtleconservationfund.org/wp-content/uploads/2008/02/tcf\\_action\\_plan.pdf](https://turtleconservationfund.org/wp-content/uploads/2008/02/tcf_action_plan.pdf) Acesso em: 18/06/2013

GIULIETTI, Nelson, ASSUMPÇÃO, Roberto. INDÚSTRIA PESQUEIRA NO BRASIL. **Agricultura em São Paulo**, SP, 42(2): 95-127, 1995. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/ftpiea/ASP6-0295.pdf> Acesso em: 14/06/2013

GOMES, Debora Malta; SILVA, Margarete Neres; SILVA, Renata M. Moncao; BASTOS, Bruno Lopes; DOREA, Rafaela Duplat; AYRES, Maria C. Caribe. Hemograma E Bioquímica Clínica Sanguínea De Araras (Ara Sp.). Mantidas Em Sítios Ecológicos No

Estado Da Bahia. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 699-711, 2011. DOI: 10.5216/cab.v12i4.6230 Disponível em: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/6230> Acesso em: 21/05/2013.

GONZÁLEZ, Felix H. Diaz; SILVA, Sergio Céroni da. **Patologia clínica veterinária: texto introdutório**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 342 p.

GOTTDENKER, Nicole L., JACOBSON, Elliott R. Effect of venipuncture sites on hematologic and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). **American Journal of Veterinary Research**, v.56, n.1, p 19-21. 1995. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/236935349\\_Effect\\_of\\_Venipuncture\\_Sites\\_on\\_Hematological\\_and\\_Clinical\\_Chemistry\\_Values\\_in\\_the\\_Desert\\_Tortoise\\_Gopherus\\_agassizii](https://www.researchgate.net/publication/236935349_Effect_of_Venipuncture_Sites_on_Hematological_and_Clinical_Chemistry_Values_in_the_Desert_Tortoise_Gopherus_agassizii) Acesso em: 17/04/2012

GOULART, Carlos Eduardo Silveira. **Valores hematológicos de referência para papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva* – Psittacidae) mantidos em cativeiro**. Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Medicina Preventiva. 2006. Disponível em: [https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/HESA-6ZWPQV/1/disserta\\_\\_o\\_carlos\\_goulart.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/HESA-6ZWPQV/1/disserta__o_carlos_goulart.pdf) Acesso em: 21/05/2013.

GUERCI, Aldo. **Métodos de análisis clínicos y suinterpretación**. 3º ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1985.

GUZMAN, David Sanchez-Migallon; MITCHELL, Mark A.; GAUNT, Stephen D, BEAUFRERE, Hugues, THOMAS N Tully Jr. Comparison of hematologic values in blood samples with lithium heparin or dipotassiumethylenediaminetetraacetic acid anticoagulants in Hispaniola Amazon parrots (*Amazona ventralis*). **Journal of avian medicine and surgery**, v. 22, n. 2, p. 108- 13, jun. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18689071/> Acesso em: 17/07/2012

HANLEY, Christopher S.; HERNANDEZ-DIVERS, Stephen J.; BUSH, Shay; LATIMER, Kenneth S. Comparison of the effect of dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid and lithium heparin on hematologic values in the green iguana (*Iguana iguana*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n.3, p. 328-332, 2004. DOI: 10.1638/03-057. Disponível

em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15526887/> Acesso em: 19/06/2012

HARR, Kendal E.; RASKIN, Rose E.; HEARD, Darryl J. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 4, p. 383-8, dez. 2005. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2005.tb00065.x Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00065.x> Acesso em: 19/06/2012

HATTINGH J. Heparin and Ethylenediamine Tetra-Acetate as Anticoagulants for Fish Blood. **PlügersArchiv: European Journal of Physiology**, v.355, n.4, p347-352, 1975. DOI: 10.1007/BF00579855 Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00579855> Acesso em: 19/05/2012

HATTINGH, J.; SMITH, E.M. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. **PflügersArchiv: European Journal of Physiology**, v.363, n.3, p.267-269, 1976. DOI: 10.1007/BF00594613. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00594613> Acesso em: 14/06/2012

HESSER E. F. Methods for routine fish heamatology. **The Progressive Fish-Culturist**, v.22, n.4, p.164-171, 1960. DOI: 10.1577/1548-8659(1960)22[164:MFRFH]2.0.CO;2 Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-8659%281960%2922%5B164%3AMFRFH%5D2.0.CO%3B2> Acesso em: 14/06/2012

HORNE, Francis; FINDEISEN, Charles. Aspects of fasting metabolism in the desert tortoise *Gopherusberlandieri*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, n.58, v.1, p.21-26, 1977. DOI:10.1016/0305-0491(77)90120-1. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0305049177901201> Acesso em: 15/06/2012

HRUBEC T.C.; SMITH S.A. Hematology of Fishes. *In*: Weiss, Douglas J.; Wardrop, Jane, K.; Schalm, O.W., **Schalm's Veterinary Hematology**, 6 ed. Iowa: Wiley-Blackwell 2010

ISHIKAWA, Marcia Mayumi; PÁDUA, Santiago Benites; SATAKE, Fabiana, HISANO, Hamilton, JERONIMO, Gabriela Tomas, MARTINS, Maurício Laterça. Heparina e Na<sub>2</sub>EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1557-1561, 2010. DOI: 10.1590/S0103-84782010005000113. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/cLwvQNxs4mCcZDtffWGCKxk/> Acesso em: 15/06/2012

JACOBSON, E. R. Reptiles. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.17, n.5, p. 1203-1225, 1987. DOI: 10.1016/s0195-5616(87)50111-5 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195561687501115?via%3Dihub> Acesso em: 15/06/2012

JAIN, Neime C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

JAIN, Nemi C, SCHALM, O. W. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.1221, 1986.

HARDING, J, HOGLUND, L. B. On accuracy in estimating fish blood variables. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 75, n. 1, 1983. DOI: 10.1016/0300-9629(83)90040-3 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0300962983900403> Acesso em: 15/06/2012

KARESH, William B., DEL CAMPO, Alvaro, BRASELTON, Emmett W., PUCHE, Helena, COOK, Robert C. Health evaluation of free- ranging and hand-reared macaws (*Ara spp.*) in Peru. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** v.28, p.368–377. 1997. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/20095677> Acesso em: 18/06/2012

KELLER, Jennifer M, MCCLELLAN-GREEN, Patricia D, LEE, A. Michelle, ARENDT, Mike D., MAIER, Philip P., SEGARS, Al L., WHITAKER, J. David, KEIL, Deborah E., PEDEN-ADAMS, Margie M. Mitogen- induced lymphocyte proliferation in loggerhead sea turtles: comparison of methods and effects of gender, plasma testosterone concentrations and body condition on immunity. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 103, n.

3-4, 2005. DOI: 10.1016/j.vetimm.2004.09.029 Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165242704002892?via%3Dihub>  
Acesso em: 18/06/2012

KORCOCK, D. E.; HOUSTON, A. H.; GRAY, J. D. Effects of sampling conditions on selected blood variables of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, v.33, n.2, p.319-330, 1988. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1988.tb05474.x Céron em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1095-8649.1988.tb05474.x> Acesso em:  
25/07/2012

LABORDE, C.J., CHAPA, A.M., BURLEIGH, D.W., SALGADO, D. J., FERNANDEZ, J. M. Effects of processing and storage on the measurement of nitrogenous compounds in ovine blood. **Small Ruminant Research** v.17, n. 2, p159–166 1995. DOI: 10.1016/0921-4488(95)00665-8 Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0921448895006658> Acesso em:  
25/06/2012

LANZAROT, M. P., MONTESINOS, A., SAN ANDRES, M. I. RODRIGUEZ, C., BARAHONA, M. V. Hematologic, protein electrophoresis and cholinesterase values of free-living nestling peregrine falcons in Spain. **Journal of Wildlife Diseases** 37: 172–177, 2001. DOI: 10.7589/0090-3558-37.1.172 Disponível em:  
<https://meridian.allenpress.com/jwd/article/37/1/172/122925/HEMATOLOGICAL-PROTEIN-ELECTROPHORESIS-AND> Acesso em: 19/06/2012

LEE, Sang-Min; HWANG, Un-Gi; CHO, Sung Hwoan. Effects of feeding frequency and dietary moisture content on growth, body composition and gastric evacuation of juvenile Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). **Aquaculture**, v.187, n. 3-4 p.399-409, 2000. DOI: 10.1016/S0044-8486(00)00318-5 Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848600003185> Acesso em:  
19/06/2012

LÓPEZ-OLVERA, J. R., MONTANE, J., MARCO, I., MARTINZES-SILVESTRE, A., SOLER, J., LAVIN, S. Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*) **J. Wildl Dis**, v. 39, n. 4, p. 830 836,

2003. DOI: 10.7589/0090-3558-39.4.830. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jwd/article/39/4/830/121530/EFFECT-OF-VENIPUNCTURE-SITE-ON-HEMATOLOGIC-AND> Acesso em: 21/06/2012

LÓPEZ, Cristiane Machado; SAMAPAI, Edson Vieira. Sobrevivência e crescimento larval do pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes, Pimelodidae), em função de três densidades de estocagem em laboratório. **Acta Scientiarum**, v.22, n. 2, p.491-494, 2000. DOI: 10.4025/actascibiolsci.v22i0.2934 Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/2934> Acesso em: 23/06/2012.

LUMEIJ, J. T.; BRUIJNE, J. J. Evaluation of the refractometric method for the determination of total protein in avian plasma or serum. **Avian pathology**, v.13, n.4 p. 441-444, 1985 DOI: 10.1080/03079458508436245 Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03079458508436245> Acesso em: 16/06/2012

LUMEIJ, J. T.; OVERDUIN, L.M. PLASMA CHEMISTRY REFERENCES VALUES IN PSITTACIFORMES. **Avian Pathology**. v19, p. 235 - 244, 1990. DOI: 10.1080/03079459008418676 Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03079458508436245> Acesso em: 16/06/2012

LUZ, Ronald Kennedy; DOS SANTOS Jose Claudio Epaminondas. Avaliação da tolerância de larvas do pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877 (Pisces: Siluriformes) a diferentes salinidades. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, n. 4, p. 345-350, 2008. DOI: 10.4025/actascibiolsci.v30i4.791 Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/791/791> Acesso em: 16/06/2012

MAFUVADZE, Benford; ERLWANGER Kennedy. The effect of EDTA, heparin and storage on the erythrocyte osmotic fragility, plasma osmolality and haematocrit of adult ostriches (*Struthio camellus*). **Veterinary Archives**, n.77, v.5, p.427-434, 2007. Disponível em: <https://vetarhiv.vef.unizg.hr/papers/2007-77-5-5.pdf> Acesso em: 16/07/2012

MICCOLI, Gabriela; STASIENIUK, Erika Von Zeidler; DONATTI, Rogério Venancio; MACHADO, André Luiz Costa; COELHO, Camila Campos Gondim Martins; PEREZ Jr, Afonso Alvarez; RISTOW, Luiz Eduardo; VILELA, Daniel A. R.; XAVIER, Marcos Silva; FERREIRA, Walter Mota. Determinação do perfil bioquímico de sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*) em cativeiro. In: **XI Congresso e XVII Encontro da Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens**, 2008.

MOHAMMADIZADEH, Maria, AFKHAMI, Majid, BASTAMI, Kazem Darvish, EHSANPOUR, Maryam, KHAZAALI, Aida, SOLTANI, Farzane. Determination of some biochemical values in the blood of *Liza klunzingeri* from the coastal water of the Persian Gulf. *African Journal of Biotechnology* v.11, n. 12, p. 3022-3025. 2012. DOI: 10.5897/AJB11.3476 Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/230750777\\_Determination\\_of\\_some\\_biochemical\\_values\\_in\\_the\\_blood\\_of\\_Liza\\_klunzingeri\\_from\\_the\\_coastal\\_water\\_of\\_the\\_Persian\\_Gulf](https://www.researchgate.net/publication/230750777_Determination_of_some_biochemical_values_in_the_blood_of_Liza_klunzingeri_from_the_coastal_water_of_the_Persian_Gulf)

MOHRI M.; ALLAHYARI, L.; SHAKERI H. Effects of Common Anticoagulants on Routine Plasma Biochemistry of Horse and Comparison with Serum. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.27, n.7, p 313–316, 2007a. DOI: 10.1016/j.jevs.2007.05.004 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080607001955> Acesso em: 16/07/2012

MOHRI M.; SHAKERI H.; ZADEH S. Lotfollah. Effects of common anticoagulants (heparin, citrate and EDTA) on routine plasma biochemistry of cattle. **Comparative Clinical Pathology**, v.16, n.3, p.207-209, 2007b. DOI: 10.1007/s00580-006-0664-9 Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00580-006-0664-9> Acesso em: 16/07/2012

MOHRI M.; NARENJI SANI, R.; MASOODI, R. Plasma biochemistry of ostrich (*Struthio camelus*): effects of anticoagulants and comparison with serum. **Trop Anim Health Prod** n. 41, p. 845–849, 2009a. DOI:10.1007/s11250-008-9261-z Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-008-9261-z> Acesso em: 15/07/2012

MOHRI M.; MOOSAVIAN, H. R.; HADIAN, M.J. Plasma biochemistry of one-humped camel (*Camelus dromedarius*): Effects of anticoagulants and comparison with serum. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 3, p. 554–558, 2009b. DOI: 10.1016/j.rvsc.2008.02.009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528808000234?via%3Dihub> Acesso em: 15/07/2012

MOHRI M.; REZAPOOR, H. Effects of heparin, citrate, and EDTA on plasma biochemistry of sheep: Comparison with serum. **Research in Veterinary Science**, v.86, p 111–114, 2009. DOI: 10.1016/j.rvsc.2008.05.010 Disponível em: [https://labs.dgsom.ucla.edu/dlam/files/view/docs/diagnostic-lab-services/private/effects\\_of\\_anticoagulants\\_in\\_biochemistry.pdf](https://labs.dgsom.ucla.edu/dlam/files/view/docs/diagnostic-lab-services/private/effects_of_anticoagulants_in_biochemistry.pdf) Acesso em: 27/06/2012

MORRIS, J. D., FERNANDEZ, J.M., CHAPA, A.M., GENTRY, L.R., THORN, K.E., WEICK, T.M. Effects of sample handling, processing, storage, and hemolysis on measurements of key energy metabolites in ovine blood. *Small Ruminant Research*, v. 43, n. 2, p. 157-166. 2002. DOI: 10.1016/S0921-4488(01)00266-8 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921448801002668?via%3Dihub> Acesso em: 27/06/2012

MURO, Jesus; CUENCA, Rafaela; PASTOR, Juan Angel Franco; VINAS, Luís, LAVIN, Santiago. Effects of lithium heparin and tripotassium EDTA on hematologic values of Hermann's Tortoises (*Testudo hermanni*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.29, n.1, p.40-44, 1998.

O'NEILL, M.D., WESO, H.M., MENSINGER, A.F., HANLON, R. T. Initial baseline blood chemistry of the oyster toadfish, *Opsanus tau*. **Biol. Bull.** v.195, p.228-229, 1998. DOI: 10.2307/1542853 Disponível em: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.2307/1542853> Acesso 16/06/2012

PADILLA, Sergio E., WEBER, Manuel, JACOBSON, Elliott. Comparación de anticoagulantes de heparina de litio y sodio en la bioquímica plasmática del cocodrilo de pantano (*Crocodylus moreletii*), en Campeche, México. **Vet. Méx.** V.40 n.2, p.203-2011, 2009 Disponível em:

[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922009000200010](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922009000200010) Acesso em: 15/06/2012

PATEL, N. **Tech talk**. V.7, n. 1, 2009. Disponível em: [http://www.bd.com/vacutainer/pdfs/techtalk/TechTalk\\_Jan2009\\_VS8014.pdf](http://www.bd.com/vacutainer/pdfs/techtalk/TechTalk_Jan2009_VS8014.pdf). Acesso em 02/03/2012

PEDREIRA, Marcelo Matos; DOS SANTOS, José Cláudio Epaminondas; SAMPAIO, Edson Vieira; FERREIRA, Felipe Nilvan; SILVA Janaina de Lima. Efeito do tamanho da presa e do acréscimo de ração na larvicultura de pacamã. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 7, p. 1144-1150, 2008. DOI: 10.1590/S1516-35982008000700002 Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/7XmPNGrBMwQyzpQFfqhWhrG/abstract/?lang=pt> Acesso em: 02/03/2012

PEDREIRA, Marcelo Matos; LUZ, Ronald Kennedy; DOS SANTOS, José Cláudio Epaminondas; SAMPAIO, Edson Vieira; SILVA, Rafael Sá Fortes. Biofiltração da água e tipos de substrato na larvicultura do pacamã. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n.5, p. 511-518, 2009. DOI: 10.1590/S0100-204X2009000500011 Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/mSnpBBfnTKhF3xz9vBQxtGB/> Acesso em: 14/03/2012

PERROTTA, G., ROBERTS, L., GLAZIER, J., SHUMACHER, H. R. Use of sodium citrate anticoagulant for routine hematology analysis on the CELL-DYN® 4000: An opportunity to enhance efficiency in the clinical laboratory. **Laboratory Hematology** v.4, p. 156 – 162, 1998 Disponível em: <https://fliphtml5.com/fdsu/yjth/basic> Acesso em: 14/03/2012

PINTO, M. G. M. Quelônios e jacarés do Brasil., PNUD/RAN/IBAMA 2002. Disponível em: [http://www.ibama.gov.br/projetos\\_centros/centros/ran/quelonios\\_Jacares.htm](http://www.ibama.gov.br/projetos_centros/centros/ran/quelonios_Jacares.htm) Acesso em: 30 nov. 2012.

PROENÇA, Laila Maftoum. **Proteinograma Sérico e Parâmetros Hematológicos de Papagaios- Verdadeiro (Amazona Aestiva) e Araras-Canindé (Ara ararauna) de Cativoiro**. 2010. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e

Veterinárias Campus Jaboticabal. 2010. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/67b1a431-3d9a-4750-bacb-3f044af20799/content> Acesso em: 12/11/2012

REHULKA, Jiri; ADAMEC, Vaclav. Red Blood Cell Indices for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Reared in Cage and Raceway Culture. **ACTA VET. BRNO**, v. 73, n. 1, p. 105-114, 2004. Disponível em: [https://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb\\_2004073010105.pdf](https://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb_2004073010105.pdf) Acesso em: 16/06/2012

RITCHIE, Brason W.; HARRISON, Greg J.; HARRISON, Linda R. **Avian Medicine: Principles and Applications**. Florida: Wingers Publishing, p. 176- 198, 1994.

ROVIRA, A.R.I. Hematology of Reptiles. *In*: Weiss, Douglas J.; Wardrop, Jane, K.; Schalm, O.W., **Schalm's Veterinary Hematology**, 6 ed. Iowa: Wiley-Blackwell 2010.

SABINO, Antônio José; TREVILIN, Silvia Cellone; CIARLINI, Paulo César. Comparação do efeito do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e da heparina sobre os eritrócitos de avestruzes (*Struthio camelus* L.). **Revista Ceres**, n.57, v.3, p.338-342, 2010. DOI: 10.1590/S0034-737X2010000300008 Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rceres/a/Qz6X9xqBph4KqRs59XTVhVf/> Acesso em 02/12/2012

SOUZA, Rodrigo Antônio Martins de. Comparação de diferentes protocolos terapêuticos na cicatrização de carapaça de tigras-d'água (*Trachemys* sp.) Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, 2006. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/4807> Acesso em: 14/05/2012

SMIT G.L.; HATTINGH J.; SCHOONBEE H.J. Observations on some effects of disodium ethylenediamine tetra-acetate and heparin on fish blood. **Comparative Biochemistry and Physiology - C: Comparative pharmacology**, v.57, n.1, p35-38, 1977. DOI: 10.1016/0306-4492(77)90074-0 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0306449277900740> Acesso em: 11/011/2012

TENÓRIO, Ruy Albuquerque; SANTOS, Athiê Jorge Guerra; LOPES, José Patrocínio;

NOGUEIRA, Eliane Maria de Souza. Crescimento do niquim (*Lophiosilurus alexandri* Steindachner 1876), em diferentes condições de luminosidade e tipos de alimentos. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 28, n. 4, p. 305-309, 2006. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/160/230> Acesso em: 12/11/2012

THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; DENICOLA, D.; et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 1 ed. São Paulo: Roca. 2007 p. 215-247.

TRAVASSOS, H. Nótula sobre o pacamã, *Lophiosilurus alexandri* Seindacher, 1876. **Altas da Sociedade de Biologia**. Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 1-2, 1959.

VALLE, Stella de Faria.; ALLGAYER, Mariângela da Costa; PEREIRA, Rosecler Alves, BARCELLOS, Leonardo José Gil, HLAVAC, Nicole Regina Capacchi, FRANCA, Raqueli Teresinha, LOCATELLI, Marcelo Lauxen. Parâmetros de bioquímica sérica de machos, fêmeas e filhotes de Araras canindé (*Ara ararauna*) saudáveis mantidas em cativeiro comercial. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 711 - 716, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/8QYZZStngF9Gf7RcbgRTJLn/> Acesso em: 12/11/2012

WALENCIK, Jacek; WITESKA, Malgorzata. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus Carpio* L.). **Comparative biochemistry and physiology – Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.146, n.3, p331- 335, 2007. DOI: 10.1016/j.cbpc.2007.04.004 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1532045607001081> Acesso em: 11/11/2012

WILHELM FILHO, Danilo; EBLB, Gunther Jensen; KASSNER, Gilson, CAPRARIO, Francisco Xavier; DAFRE, Alcir Luiz; OHIRA, Masanao. Comparative hematology in marine fish. *Comparative biochemistry and physiology*. **Comparative biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 102, n. 2, p. 311-21, jun. 1992. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/030096299290141C> Acesso em: 11/11/2012

WITESKA, Malgorzata; WARGOCKA, Wioleta. Dissodium EDTA used as anticoagulant

causes hemolysis in common carp blood. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.35, n.2, p.99-104, 2011. Disponível em: <https://journals.tubitak.gov.tr/cgi/viewcontent.cgi?article=2241&context=veterinary>

Acesso em: 17/11/2012

YOUNG, D.S.; BERMES, E.W. Colheita e Processamento de Amostras: Fontes de variação biológica. *In*: BURTIS C.A.; ASHWOOD E.R.; BURNS D.E. **Tietz Fundamentos de Química Clínica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008, p.992.