



Núcleo de Meio Ambiente
Universidade Federal do Pará
Rua Augusto Corrêa, 01, Guamá
Belém, Pará, Brasil

<https://periodicos.ufpa.br/index.php/agroecossistemas>

Kerolayne Sousa de Castro

Universidade Federal do Oeste do Pará
kerolayne@gmail.com

Andria. G Sousa

Universidade Federal do Oeste do Pará
andriagama79@gmail.com

Mchelle, M. S Fugimura

Universidade Federal do Oeste do Pará
michellefugimura@yahoo.com.br

Luciano J. Vaz

Universidade Federal do Oeste do Pará
jensenlv@yahoo.com.br

Paulo F. Marcusso

Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri
paulomarcusso@gmail.com

Gustavo da Silva Claudiano

Universidade Federal do Oeste do Pará
gsclaudiano@gmail.com

Recebido em: 2019-10-22
Avaliado em: 2020-07-11
Aceito em: 2020-07-31

ESTABILIDADE DAS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS EM SANGUE DE *Colossoma macropomum* ARMazenado COM DIFERENTES ANTICOAGULANTES

RESUMO: Hemograma é uma ferramenta de diagnóstico imprescindível na medicina humana e veterinárias. O recomendável é que as análises hematológicas ocorram pouco tempo após coleta do sangue. No entanto, há situações nas quais as amostras são coletadas em locais distantes dos laboratórios, fazendo-se necessário o armazenamento. Assim, o presente trabalho avaliou a viabilidade das amostras de sangue coletado com ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico – EDTA K_3 10% ($1.3\text{mg mL}^{-1}/\text{EDTAa}$), EDTA K_3 10% ($2.0\text{ mg mL}^{-1}/\text{EDTAb}$), heparina de sódio (15 UI/ml) e citrato trissódico (3%) em tambaqui, *Colossoma macropomum*, comparando os valores do hematócrito e hemoglobina armazenada em temperatura de refrigeração (4°C). As amostras de sangue foram obtidas através da venopunção caudal e determinado o hematócrito (Ht) e a hemoglobina (Hb), durante 8 dias consecutivos com as análises realizadas em intervalo de 24 horas. Os resultados foram analisados através teste Tukey (5%). Não houve diferença estatística ($p>0.05$) entre os tempos nos parâmetros hematológicos. Entretanto, observou-se hemólise crescente ao longo do tempo em todas as amostras conservadas com citrato, iniciando horas pós coleta (HPC); no grupo EDTAa verificou-se hemólise em 100% das amostras em 192 HPC. Nas amostras com heparina verificou-se coágulo em 25%, 75%, 87,5% e 100% nos tempos de 2, 3, 4 e 6 dias de armazenagem respectivamente. Conclui-se que o anticoagulante citrato trissódico (3%) e heparina de sódio (15 UI/ml) não são recomendáveis para análises hematológicas em *C. macropomum*. O EDTA K_3 10% na quantidade de 2.0 mg mL^{-1} foi a melhor opção testada nesse estudo, por apresentar estabilidade das amostras sob refrigeração, evitando hemólise e coagulação.

PALAVRAS-CHAVE: Hematócrito, Tambaqui, Hemoglobina, Coagulação, Hemólise.

STABILITY OF HEMATOLOGICAL VARIABLES IN *Colossoma macropomum* BLOOD STORED WITH DIFFERENT ANTICOAGULANTS

ABSTRACT: The blood count is an essential diagnostic tool for human and veterinary medicine. The most recommended is that hematological analyzes should take place shortly after blood collection. However, there are situations in which samples are collected in places far from the laboratories, making storage necessary. Thus, the present work evaluated the viability of blood samples collected with tripotassic ethylenediamine tetraacetic acid - EDTA k3 10% (1.3mg mL⁻¹ / EDTAa), EDTA k3 10% (2.0 mg mL⁻¹ / EDTAb), heparin sodium (15 IU / ml) and trisodium citrate (3%) of tambaquis, *Colossoma macropomum*, comparing the values of hematocrit and hemoglobin stored at refrigerated temperature (4°C). Blood samples were obtained through caudal venipuncture and hematocrit (Ht) and hemoglobin (Hb) were determined for 8 consecutive days with analyzes performed at 24-hour intervals. The results were analyzed using the Tukey test (5%). There was no statistical difference ($p > 0.05$) between times in hematological parameters. However, increasing hemolysis was observed over time in all samples preserved with citrate, starting hours post collection (HPC); in the EDTAa group, hemolysis was found in 100% of the samples at 192 HPC. In the samples with heparin there was a clot in 25%, 75%, 87.5% and 100% in the periods of 2, 3, 4 and 6 days of storage respectively. It is concluded that the anticoagulant trisodium citrate (3%) and sodium heparin (15 IU / ml) are not recommended for hematological analysis in *C. macropomum*, since EDTA K3 10% in the amount of 2.0 mg mL⁻¹, the best option tested in this study, for presenting samples stability under refrigeration, avoiding hemolysis and coagulation.

KEYWORDS: Hematocrit, Tambaqui, Hemoglobin, Coagulation, Hemolysis.

ESTABILIDAD DE LAS VARIABLES HEMATOLÓGICAS EN LA SANGRE *Colossoma macropomum* ALMACENADA CON DIFERENTES ANTICOAGULANTES

RESUMEN: El recuento sanguíneo es una herramienta de diagnóstico esencial para la medicina humana y veterinaria. Lo más recomendado es que los análisis hematológicos se realicen poco después de la extracción de sangre. Sin embargo, hay situaciones en las que las muestras se recolectan en lugares alejados de los laboratorios, lo que hace necesario el almacenamiento. Por lo tanto, el presente estudio evaluó la viabilidad de las muestras de sangre recolectadas con ácido tripotásico de etilendiamina tetraacético - EDTA k3 10% (1.3mg mL⁻¹ / EDTAa), EDTA k3 10% (2.0 mg mL⁻¹ / EDTAb), heparina sodio (15 UI / ml) y citrato trisódico (3%) de tambaquis, *Colossoma macropomum*, comparando los valores de hematocrito y hemoglobina almacenados a temperatura refrigerada (4°C). Se obtuvieron muestras de sangre mediante venopunción caudal y se determinaron hematocrito (Ht) y

hemoglobina (Hb) durante 8 días consecutivos con análisis realizados a intervalos de 24 horas. Los resultados se analizaron utilizando la prueba de Tukey (5%). No hubo diferencia estadística ($p > 0.05$) entre los tiempos en los parámetros hematológicos. Sin embargo, se observó un aumento de la hemólisis con el tiempo en todas las muestras conservadas con citrato, horas de inicio después de la recolección (HPC); En el grupo EDTAa, se encontró hemólisis en el 100% de las muestras a 192 HPC. En las muestras con heparina hubo un coágulo en 25%, 75%, 87.5% y 100% en los períodos de 2, 3, 4 y 6 días de almacenamiento, respectivamente. Se concluye que el citrato trisódico anticoagulante (3%) y la heparina de sodio (15 UI / ml) no se recomiendan para el análisis hematológico en *C. macropomum*, ya que EDTA K3 10% en la cantidad de 2.0 mg mL⁻¹, el mejor opción probada en este estudio, por presentar muestras de estabilidad bajo refrigeración, evitando la hemólisis y la coagulación.

PALABRAS CLAVES: Hematocrito, Tambaqui, Hemoglobina, Coagulación, Hemólisis.

A intensificação dos sistemas de produção aumenta a predisposição a várias doenças, principalmente infecciosas e parasitárias. A

análise sanguínea é boa ferramenta de diagnóstico e de monitoramento da saúde dos peixes sendo possível identificar doenças, disfunções nutricionais e condições de estresse, bem como alterações ambientais (RANZINI-PAIVA; SILVA-SOUZZA, 2004; OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2006; CASTRO et al., 2014; CLAUDIANO et al., 2019). Recomenda-se que as análises hematológicas devam ocorrer logo após coleta do sangue, todavia em situações nas quais as amostras são

coletadas em locais distantes, o armazenamento antes do processamento torna-se inevitável (LEE et al, 2016).

Dentre os anticoagulantes mais utilizados para realização de procedimentos laboratoriais em peixes, destacam-se a heparina e o EDTA (WALENCIK; WITESKA 2007; FARIAS et al., 2016).

Contudo, não há uma padronização universal de qual anticoagulante utilizar em peixes devido à grande variedade de espécies existentes. Alguns anticoagulantes usados nos teleósteos podem ter limitações durante o processamento de amostras de

sangue, causando alterações como hemólise, coagulação, aumento do número de eritrócitos e mudanças na morfologia das células sanguíneas, podendo gerar dados não confiáveis (RANZINI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004; MAFUVADZE; ERLWANGER, 2007; WALENCIK; WITESKA, 2007).

Com base nas informações acima, este trabalho visa analisar a viabilidade de amostras de sangue coletado com EDTA k_3 , heparina de sódio e citrato trissódico em *Colossoma macropomum* comparando os valores de hemoglobina e do hematócrito armazenada em temperatura de refrigeração durante 8 dias consecutivos.

Foram utilizados oito (8) tambaquis, *Colossoma macropomum* ($636,6 \pm 53,2g / 32,4 \pm 0,84 cm$), sem alterações clínicas e com hemocultura negativa, adquiridos de piscicultura comercial da mesma desova. Os peixes foram acondicionados em tanque (3000 L), para quarentena, seguida, distribuídos aleatoriamente em 2 caixas de fibra (250 L / $n=4$), abastecidas com água

corrente de poço artesiano, com vazão de 1L/min. e com aeração suplementar no Laboratório Múltiplos de Produção de Organismos Aquáticos (LAMPOA / ICTA / UFOPA) (Comissão de Ética no Uso Animal, UFOPA, nº 0720180034).

Os peixes receberam ração comercial durante aclimatação 15 dias antes do início do ensaio, sendo alimentados pela manhã e tarde, correspondendo a 3% da biomassa. As caixas foram sifonadas diariamente para a retirada de fezes e restos de ração, e verificado os parâmetros de qualidade da água ($od=5,3 mg/L$; $to=8,87 ^\circ C$; $pH=7,53$ e a condutividade elétrica= $118,26 \mu S/cm$), que permaneceu na faixa de conforto para os peixes durante todo o ensaio (BOYD, 1990).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente (DIC), cada animal representou uma unidade experimental (CLAUDIANO et al., 2020). Os peixes foram capturados individualmente ao acaso com auxílio de puçá, contidos mecanicamente por meio de pano úmido e submetidos à

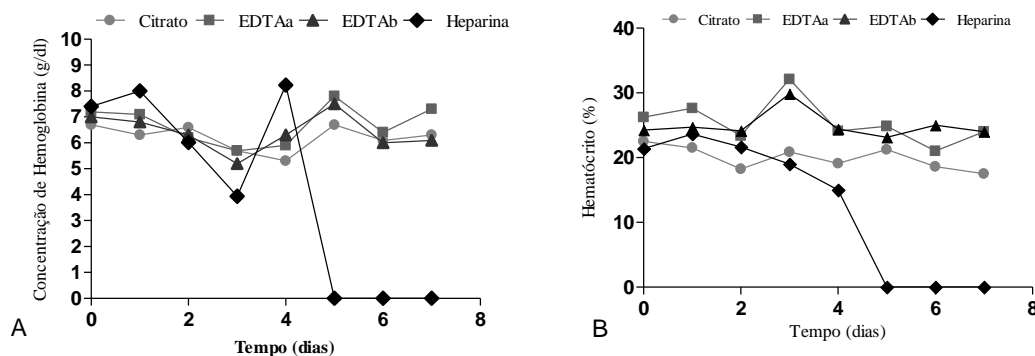
venopunção caudal, utilizando seringas estéreis com volume útil de 5 mL e agulhas hipodérmicas 25 x 7 mm isentas de anticoagulantes, conforme as preconizações de Ishikawa et al. (2010).

As amostras de sangue (n=8) foram divididas quatro alíquotas de 1,0 ml em microtubo côncavo, tipo eppendorf (1,5 ml), acrescidas dos respectivos anticoagulantes, constituindo os tratamentos: ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico – EDTA k_3 10% (1.3 mg mL⁻¹/ EDTAa), EDTA k_3 10% (2.0 mg mL⁻¹/ EDTAb), heparina de sódio (15 UI/ml) e citrato trissódico (3%) e armazenadas em temperatura de refrigeração (4 °C). Nestas foram determinados: o hematócrito (Ht) através da técnica de microhematócrito e a hemoglobina (Hb) utilizou-se o método de Drabkin (1984), com leitura em espectrofotômetro (CLAUDIANO et al., 2019). As análises foram realizadas por 8 dias consecutivos em intervalo de 24 horas e as amostras conservadas em refrigeração (4 °C), sendo o tempo zero imediatamente após a coleta.

Os resultados foram submetidos às análises de variância em delineamento inteiramente casualizado (DIC), teste de normalidade alfa 5% (Kolmogorov – Smirnov; Anderson-Darling; Shapiro-Wilk e Watson). Estabelecida a normalidade foi realizada comparação das médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (CLAUDIANO et al., 2020).

O tempo de armazenamento e o tipo anticoagulante influenciam os parâmetros hematológicos em *C. macropomum* (Figura 1 A e B). Neste estudo, observou-se que a heparina (15 UI/ml) e o citrato trissódico (3%) não são indicados para análises hematológicas 48 horas após a coleta (HPC), pois não há estabilidade nas amostras que coagulam com o uso de heparina e sofrem hemólise quando se utiliza citrato. Após 4 dias de armazenamento com ambos anticoagulantes não é recomendado realizar nenhum exame hematológico devido à intensa coagulação (87,5%) e hemólise (100%) das amostras.

Figura 1. Efeito dos anticoagulantes na preservação das amostras de sangue de *Colossoma macropomum* ao longo do tempo sobre a concentração de hemoglobina (A) e hematócrito (B).



O tipo de anticoagulante empregado na preservação de sangue em tambaqui influencia nos valores da hemoglobina (Hb) 24 HPC ($p < 0,05$; Tabela 1). Verificou-se que as amostras conservadas com citrato (3%) apresentaram os menores valores de hemoglobina ($p < 0,05$) na comparação com heparina (15 UI/ml) sem diferença ($p > 0,05$) de ambas em relação aos grupos EDTAa e EDTAb (Tabela 1).

Essa diferença pode ser explicada pela grande quantidade de hemólise observada no grupo citrato logo nas primeiras 48 HPC, chegando a 100 % a

de hemólise 4 DPC. No grupo que utilizou heparina verificou-se formação de coágulos em 50%, 75%, 87,5% e 100% nos tempos de 2, 3, 4 e 6 DPC, respectivamente, impossibilitando a análise estatística após o segundo dia de armazenamento (24 HPC). A utilização de heparina 100 UI em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*), também, não demonstrou-se eficiente na preservação do sangue por mais de 10 h, ocorrendo coagulação das amostras (ISHIKAWA et al. 2010).

Tabela 1. Valores médios (respectivos desvios padrão) e análise da variância para os valores de hemoglobina de tambaqui (*Colossoma macropomum*) com diferentes anticoagulantes.

Tempo (dias)	Hemoglobina (g dL ⁻¹)			
	Citrato	EDTA a	EDTA b	Heparina
0 DPC	6.7 ± 0,68 ^{Aa}	7.2 ± 0,49 ^{Aa}	7,1± 0,56 ^{Aa}	7,4± 0,82 ^{Aa}
1 DPC	6.3 ± 0,69 ^{Ba}	7.1 ± 0,58 ^{Ba}	6,8 ± 0,75 ^{ABa}	8,1 ± 0,39 ^{Aa}
2 DPC	6.6 ± 0,86 ^{Aa}	6.2 ± 1,14 ^{Aa}	6.3 ± 0,51 ^{Aa}	-
3 DPC	5.7 ± 0,8 ^{Aa}	5.7 ± 1,67 ^{Aa}	5.2 ± 0,85 ^{Aa}	-
4 DPC	5.3 ± 0,84 ^{Aa}	5.9 ± 0,99 ^{Aa}	6.3 ± 0,79 ^{Aa}	-
5 DPC	6.7 ± 0,65 ^{Aa}	7.8 ± 0,95 ^{Aa}	7.5 ± 0,86 ^{Aa}	-
6 DPC	6.4 ± 0,83 ^{Aa}	6.4 ± 1,35 ^{Aa}	6.1 ± 1,02 ^{Aa}	-
7 DPC	6.3 ± 1,08 ^{Aa}	7.3 ± 0,67 ^{Aa}	6.1 ± 0,82 ^{Aa}	-

¹Médias (n=8) seguidas pelo menos uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05). DPC - dias após coleta. ²Letras maiúscula comparam as linhas os diferentes anticoagulantes, enquanto as minúsculas comparam as colunas nos diferentes dias. (-) indica coagulação das amostras.

No grupo armazenado com EDTAa (1.3 mg mL⁻¹), na avaliação quantitativa, verificou-se hemólise em todas as amostras a partir do terceiro dia, semelhante ao observado em carpa, *Cyprinus carpio L.*, onde o EDTA a 0.1, 0.5, e 1.0 mg/mL de sangue, induz a destruição gradual dos eritrócitos começando por danos à membrana celular externa e, em seguida danos à membrana nuclear resultando em hemólise.

Entretanto, em *C. macropomum*, não se pode afirmar que o EDTA induz a destruição gradual dos eritrócitos, haja vista que no grupo EDTAb (2.0 mg mL⁻¹ de sangue), não foi observado hemólise até o final do período de observação e a coagulação ocorreu em apenas 25% das amostras 7 DPC. A ocorrência de hemólise compromete as análises hematológicas e conseqüente o diagnóstico e o prognóstico (KERR, 2003), como foi verificado na comparação entre os anticoagulantes (Figura 1).

Em amostras de sangue coletadas com EDTA de homens e mulheres armazenadas em temperatura ambiente e em geladeira verificou-se aumento do VCM e diminuição da CHCM conseqüente dos valores do hematócrito (Ht) (DALANHOL et al., 2009). Em contraste, no presente estudo não se verificou diferença ao longo do tempo no hematócrito ($p < 0,05$; Tabela 2).

Na análise do hematócrito, observou-se menor valor no grupo conservado com heparina e citrato em relação ao grupo EDTAa, mantém-se

até 4 DPC ($p > 0,05$). Essa redução pode ser explicada pela hemólise crescente verificadas nos grupos conservados com heparina e citrato (Tabela 2). O excesso de EDTA k_3 pode ocasionar diminuição do hematócrito por hemodiluição (DOYLE et al., 1967). Todavia não foi observado diferença estatística no grupo EDTAb ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de sangue) entre todos os grupos, ou seja, pode ser considerado uma quantidade segura para ser utilizada na espécie sem comprometer os resultados dos exames avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios (respectivos desvios padrão) e análise da variância para os valores de hematócrito de tambaqui (*Colossoma macropomum*) com diferentes anticoagulantes.

Tempo (dias)	Hematócrito (%)			
	Citrato	EDTA a	EDTA b	Heparina
0 DPC	22,51 ± 1,22 ^{Ba}	26,25 ± 0,66 ^{Aa}	24,25 ± 1,08 ^{ABa}	23,6 ± 0,82 ^{Ba}
1 DPC	21,51 ± 4,12 ^{BCa}	27,62 ± 3,38 ^{Aa}	24,71 ± 1,57 ^{ABa}	22,4 ±
2 DPC	18,25 ± 3,66 ^{Ba}	23,37 ± 1,93 ^{Aa}	24,14 ± 1,64 ^{Aa}	0,82 ^{Ca}
3 DPC	20,87 ± 6,06 ^{Ba}	32,12 ± 2,42 ^{Aa}	29,85 ± 4,35 ^{Aa}	-
4 DPC	19,12 ± 5,62 ^{Ba}	24,12 ± 6,64 ^{Aa}	24,42 ± 1,91 ^{Aa}	-
5 DPC	21,25 ± 5,33 ^{Aa}	24,85 ± 6,64 ^{Aa}	23,14 ± 2,47 ^{Aa}	-
6 DPC	18,62 ± 5,14 ^{Aa}	21,11 ± 5,72 ^{Aa}	25,14 ± 1,06 ^{Aa}	-
7 DPC	17,51 ± 6,22 ^{Aa}	24,11 ± 8,04 ^{Aa}	24,21 ± 2,16 ^{Aa}	-

¹Médias (n=8) seguidas pelo menos uma letra em comum não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). DPC - dias após coleta. ²Letras maiúscula comparam as linhas os diferentes anticoagulantes, enquanto as minúsculas comparam as colunas nos diferentes dias. (-) indica coagulação das amostras.

Concluiu-se que a heparina de sódio (15 UI/ml) e o citrato trissódico (3%) não são recomendáveis para armazenagem do sangue de tambaqui, *Colossoma macropomum*. Sendo o EDTA k_3 10% na quantidade de 2.0 mg mL⁻¹ o anticoagulante mais recomendável na conservação do sangue dessa espécie sob refrigeração, por ter sido eficiente na prevenção da coagulação e da hemólise, não provocando alterações nos parâmetros hematológicos analisados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Científica (K.S. de Castro).

REFERÊNCIAS

BOYD, C. E. **Water Quality in Ponds for Aquaculture**. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn, 1990, Alabama.

DRABKIN, D. The standardization of hemoglobin measurement. **The**

American Journal of the Medical Sciences, v. 215, 110-111, 1948.

CASTRO M.P., CLAUDIANO G.S., PETRILLO T.R. et al. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelatate and *Saccharomyces cerevisiae*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 36, p. 284-290, 2014. 10.1016/j.fsi.2013.11.012

CLAUDIANO G.S., YUNIS-AGUINAGA J., MARINHO-NETO F.A., et al. Hematological and immune changes in *Piaractus mesopotamicus* in the sepsis induced by *Aeromonas hydrophila*. **Fish Shellfish Immunology**. 88:259-265, 2019. 10.1016/j.fsi.2019.01.044

CLAUDIANO G.S, ANDRADE S.C.S., SOUZA E.C., et al. Role of neuroendocrine modulation and biochemistry in the sepsis in *Piaractus mesopotamicus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 288, p. 113338, 2020.

DALANHOL, M. et al. Efeitos quantitativos da estocagem de sangue periférico nas determinações do hemograma automatizado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** [online]. 2010, v.32, n.1, p.16-22. Epub Mar 19, 2010.

DOYLE, C.T. et al. The effect of blood volume and choice of anticoagulant on the PCV, MCHC and total white cell

count. *Irish Journal of Medical Science.*, v.42, n.9, p.429-435, 1967. doi: 10.1007/BF02954088.

FAO. 2018. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018** - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

FARIAS, T.H.V.; PEREIRA, N.L.; PÁDUA, S.B. et al. Na₂EDTA anticoagulant impaired blood samples from the teleost *Piaractus mesopotamicus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, p. 431-435, 2016.

ISHIKAWA, M.M.; PADUA, S.B.; SATAKE, F.; et al. Heparina e Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. *Ciência Rural*, v. 40, n. 7, p. 1557 – 1561, 2010.

KERR, M.G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária-bioquímica clínica e hematologia**. 2a ed. Roca: São Paulo, 2003. 436p.

LEE, J.M.; KANG, J.S. Changes of hematological references depends on

storage period and temperature conditions in rats and dogs. *Laboratory Animal Research*, v. 32, n. 4, p. 241-248, 2016.

MAFUVADZE, B.; ERLWANGER, K.H. The Effect of EDTA, Heparin and Storage on the Erythrocyte Osmotic Fragility, Plasma Osmolality and Haematocrit of Adult Ostriches (*Struthiocamelus*). *Veterinary Archives*, v. 77, p. 427-434. 2007.

RANZINI-PAIVA, M.J.T.; SILVA SOUZA, A.T. *Hematologia de peixes brasileiros*. In: RANZINI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p.89-120.

WALENCIK J.; WITESKA M. 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, p. 331- 335, 2007.