

Comparação de metodologias utilizadas na análise dos parâmetros sanguíneos e da proteína total de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Comparison of methodologies used in the analysis of parameters of blood and total protein of Nile tilapia ("Oreochromis niloticus")

PEREIRA, Denise Soledade Peixoto^{1*}; GUERRA-SANTOS, Bartira²; MEDEIROS, Silene Duarte Costa de²; ALBINATI, Ricardo Castelo Branco²; AYRES, Maria Consuelo Caribé¹

¹Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Patologia e Clínicas, Salvador, Bahia, Brasil.

²Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, Departamento de Produção Animal, Salvador, Bahia, Brasil.

*Endereço para correspondência: deni.soledade@gmail.com

RESUMO

A hematologia em peixes contribui para a compreensão da fisiologia, relação filogenética, condições alimentares e outros parâmetros ecológicos. Este estudo comparou os efeitos dos anticoagulantes, ácido etilendiaminotetraacético - EDTA e heparina, sobre os constituintes sanguíneos de tilápia do Nilo. Foram utilizados 25 animais com peso médio de $28,6 \pm 13,0$ g para a colheita da amostra sanguínea e determinação do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume globular, proteínas totais, contagem total e diferencial de leucócitos e de trombócitos. Também foram comparadas algumas das técnicas utilizadas para a análise desses constituintes, como diluentes e corantes. Os dados foram submetidos à análise de variância, e comparados pelo teste de Wilcoxon ($P > 0,05\%$). Os anticoagulantes utilizados foram eficientes quanto à inibição da coagulação e da ocorrência de hemólise. Foram observadas diferenças no número total de eritrócitos, tanto na comparação dos anticoagulantes como na comparação entre os diluentes utilizados (solução salina e Natt-Herrick). Além disso, foi encontrada diferença entre as técnicas utilizadas para análise da concentração de hemoglobina e, entre os corantes utilizados para preparo das extensões sanguíneas (Panótico rápido e Rosenfeld). Os resultados dessa pesquisa permitiram concluir que ambos os anticoagulantes são eficientes na preservação

das características sanguíneas de tilápia do Nilo. Porém, a combinação do EDTA com o corante Rosenfeld apresentou melhores resultados na análise morfotintorial dos leucócitos, principalmente no que se refere à diferenciação celular.

Palavras-chave: EDTA, heparina, peixe, sangue

SUMMARY

Hematology fish contributes to the understanding of the physiology, phylogenetic relationship, feeding conditions and other environmental parameters. This study comparative the effects of anticoagulants, ethylenediaminetetraacetic acid - EDTA and heparin, on blood constituents of Nile tilapia. 25 animals were used with a mean weight of 28.6 ± 13.0 g for the collection of the blood sample and determining the number of erythrocytes, hemoglobin concentration, packed cell volume, total protein, total count and differential leukocytes and thrombocytes. Were also compared some of the techniques used for the analysis of these constituents, as diluents and stains. Data were subjected to analysis of variance, and compared using the Wilcoxon test ($P > 0,05\%$). The anticoagulants were as effective inhibition of coagulation and the occurrence of hemolysis. Differences were observed in erythrocyte count, in the comparison of

anticoagulants such as the comparison of diluents used (saline and Natt-Herrick). Furthermore, differences between techniques for analysis of hemoglobin concentration and between the stains used for preparation of blood extensions (rapid panoptic and Rosenfeld) was found. The results of this study allow us to conclude that both are effective anticoagulants in the preservation of blood characteristics of Nile tilapia. However, the combination of EDTA with Rosenfeld dye showed better results in morphotypes analysis of leukocytes, particularly with regard to cell differentiation.

Keywords: blood, EDTA, fish, heparin

INTRODUÇÃO

O tecido sanguíneo reflete as alterações físicas e químicas que ocorrem no organismo, gerando informações sobre o metabolismo geral e o estado fisiológico dos animais (ADEYEMO et al., 2009). Para garantir que os estudos sobre a normalidade dos parâmetros hematológicos e imunológicos não apresentem interferências, o sangue obtido não deve ser alterado pela ação de anticoagulantes (HATTINGH, 1975). Entre as alterações derivadas do uso de anticoagulantes está a ocorrência de hemólise (HARR et al., 2005) e a coagulação sanguínea (HATTINGH & SMITH, 1976; MAFUVADZE & ERLWANGER, 2007).

A heparina e o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) são os anticoagulantes mais empregados nas análises hematológicas de peixes. Dentre as funções desses compostos está a conservação da fluidez sanguínea e manutenção das características celulares. A comparação entre eles tem sido alvo de recentes estudos (ISHIKAWA et al., 2010; WITESKA & WARGOCKA, 2011). Alguns autores consideram a heparina como o anticoagulante mais adequado para as análises hematológicas de peixes

(HATTINGH & SMITH, 1976; MAINWARING & ROWLEY, 1985). Outros preferem o EDTA, por preservar os componentes sanguíneos por maior período de tempo, e se mostrar eficiente na inibição de coágulos (BLAXHALL, 1972; BLAXHALL & DAISLEY, 1973).

Apesar das recentes pesquisas sobre o tema, ainda não há unanimidade a respeito dos efeitos dos anticoagulantes sobre os parâmetros hematológicos de peixes (WALENICIK & WITESKA, 2007; ISHIKAWA et al., 2010).

As técnicas utilizadas na hematologia de peixes ainda são consideradas passíveis de erro, visto que elas seguem os protocolos adotados na hematologia de mamíferos (ISHIKAWA et al., 2008). Exemplo disso é a determinação do número de eritrócitos, devido à presença do núcleo nas células brancas e vermelhas. Diluentes como a solução salina (0,65%) (AZEVEDO et al., 2006), solução de Hayem (RANZANI-PAIVA et al., 2013) e a solução de Natt-Herrick (CAMPBELL, 2007) vêm sendo utilizados para essa análise. Quanto às extensões sanguíneas, as colorações utilizadas baseiam-se na mistura dos corantes eosina e azul de metileno (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

De modo a minimizar as possíveis variações nos parâmetros sanguíneos de teleósteos, objetivou-se avaliar o efeito do EDTA e da heparina, e comparar as técnicas utilizadas na contagem de eritrócitos, na dosagem de hemoglobina e na contagem das células de defesa de tilápia do Nilo, bem como verificar o efeito do tempo de estocagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 25 tilápias do Nilo, cedidas pela Estação de alevinagem

Aquavale, localizada no município de Ituberá-BA, foram aclimatadas em condições laboratoriais adequadas, por duas semanas, antes do início do experimento. Durante o período experimental de cinco semanas, os peixes foram mantidos em 05 tanques circulares de polietileno, com capacidade para 500L, contendo 05 animais cada. O experimento foi realizado no Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (LASOA-UFBA) e as análises sanguíneas no Laboratório de Pesquisa em Hematologia e Bioquímica da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia.

Os animais com peso médio de $28,6 \pm 13,0$ g e comprimento total médio de $11,1 \pm 1,7$ cm, foram alimentados três vezes ao dia, com ração comercial para onívoros (36% PB, 3-4mm). Durante todo o período, os parâmetros de qualidade de água como temperatura ($24,3 \pm 0,21$ °C), oxigênio ($6,81 \pm 0,54$ ppm/L) e pH ($7,79 \pm 0,27$) foram monitorados diariamente. A temperatura e o oxigênio dissolvido foram medidos através de um oximêtro digital (Alfakit, AT -160) e o pH com o auxílio do pHmetro portátil (Lutron, pH-206). Todos os tanques foram sifonados, uma vez ao dia, para remoção de matéria orgânica.

Os animais foram capturados, com auxílio de puçá e contidos mecanicamente por meio de um pano umedecido e submetidos à venopunção caudal, com auxílio de seringas estéreis e agulhas hipodérmicas 25x8mm. Todos os peixes foram submetidos à coleta de duas alíquotas sanguíneas de 0,5mL cada, sendo uma punção com seringa contendo 10 μ L de EDTA (10%) e outra com 10 μ L de heparina 5.000 UI. Após as coletas os animais não retornavam para o experimento. As amostras coletadas foram homogeneizadas

delicadamente e depositadas em microtubos de polietileno (1,5mL) acondicionadas em isopor com gelo e encaminhadas ao laboratório, as quais foram imediatamente submetidas às análises (Tempo 0 – T1). Após a realização dos exames essas amostras de sangue foram mantidas sob refrigeração (4°C) para realização das mesmas análises em um segundo momento, 24 horas após a colheita (Tempo 24h – T2).

A contagem total de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer ($\times 10^6/\mu\text{L}^{-1}$) após diluição de 1:200 em dois diferentes protocolos com relação aos diluentes. No protocolo 1 (He1) utilizou-se a solução salina à 0,65% (AZEVEDO et al., 2006) e no protocolo 2 (He2) a solução de Natt-Herrick (1952), segundo Ishikawa et al (2008). A concentração de hemoglobina foi determinada de acordo com o método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944), entretanto dois diferentes protocolos foram testados: o protocolo 1 (Hb1), onde 10 μ L de sangue foram homogeneizados a 2,0mL de Drabkin (LARSEN & SNIESZKO, 1961) e o protocolo 2 (Hb2), mais comumente empregada, onde 20 μ L de sangue foram homogeneizados a 5,0mL de Drabkin (COLLIER, 1944). As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Bioplus 2000) com comprimento de onda igual de 540nm. O volume globular foi determinado pela técnica do hematócrito preconizado por Goldenfarb et al. (1971), onde 2/3 de microcapilares foram preenchidos com as amostras sanguíneas e depois centrifugados (Spin1000) à 12.000rpm por 5 min, sendo o resultado expresso em porcentagem. Os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram calculados de acordo

com o preconizado por Wintrobe (1934). A proteína plasmática total foi determinada por refratômetro portátil.

A contagem total e diferencial das células sanguíneas de defesa, leucócitos e trombócitos foi realizada segundo metodologia indireta, proposta por Hrube & Smith (1998), por assegurar maior grau de confiabilidade quanto a diferenciação entre os linfócitos e os trombócitos. Para tanto, foram confeccionadas extensões sanguíneas,

em duplicatas, e estas por sua vez, foram coradas com duas diferentes técnicas: o panótico rápido e May-Grunwald-Giemsa (ROSENFELD, 1947). Em seguida, de cada extensão corada quantificou-se o número de leucócitos e trombócitos, e para obtenção do número total dessas células aplicou-se as fórmulas abaixo descritas considerando-se o número total de eritrócitos obtido na câmara de Neubauer:

$$\text{Leucócitos } (\mu\text{L}) = \frac{\text{Número de leucócitos} \times \text{Número de eritrócitos}}{2000 \text{ eritrócitos}}$$

$$\text{Trombócitos } (\mu\text{L}) = \frac{\text{Número de trombócitos} \times \text{Número de eritrócitos}}{2000 \text{ eritrócitos}}$$

Os dados obtidos foram submetidos ao programa Statistical Package for Social Sciences – SPSS. Inicialmente aplicou-se a análise de variância (ANOVA) e, em seguida o teste de Wilcoxon para análise de amostras pareadas não paramétricas. O limite de confiabilidade foi de 95% em todos os testes realizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os anticoagulantes utilizados demonstraram eficiência em relação à inibição da coagulação e na ocorrência de hemólise, visto que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) no percentual de coagulação e da hemólise entre eles, em nenhum dos momentos analisados, sendo ambos considerados adequados quanto a esses aspectos. Esses resultados corroboram com observado por Hesser (1960) que ao utilizar a heparina, nas concentrações de 0,4 a 0,6mg/mL, e o EDTA 10% não encontrou alterações nos valores dos parâmetros hematológicos estudados.

Semelhantes resultados foram obtidos por Pádua et al. (2012) ao compararem o K₃EDTA 10% e a heparina (nas concentrações de 5000UI e 100UI) observaram que todos eles agiram de maneira eficiente sob a inibição da coagulação sanguínea em tambaqui (*Colossoma macropomum*). Entretanto, a mesma eficiência não foi observada, visualmente, quanto à hemólise. O uso do K₃EDTA 10% causou hemólise, de discreta a moderada, desde os primeiros momentos, passando a observação de hemólise intensa após 10h de armazenamento, enquanto que as amostras acondicionadas com a heparina à 5.000UI e à 100UI apresentaram maior eficiência. Em estudos com carpa comum (*Cyprinus carpio*) as amostras tratadas com Na₂EDTA em diferentes concentrações (0,1; 0,5 e 1,0mg/mL) apresentaram hemólise parcial, enquanto que as amostras tratadas com heparina (10 UI) mostraram maior resistência (WALENCIK & WITESKA, 2007). Já Ishikawa et al. (2010) após avaliarem a eficácia da heparina e do Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum*

x *P. corruscans*) relataram que a heparina 100UI não foi eficiente para a preservação do sangue pois as amostras apresentaram-se parcialmente comprometidas 10 horas após a colheita, em razão da coagulação, enquanto as amostras acondicionadas com Na₂EDTA 10%, Na₂EDTA 5% e Na₂EDTA 3% tiveram o processo de coagulação inibido de forma eficiente. Mainwaring & Rowley (1985) observaram a formação de grumos de células quando utilizaram a heparina 50UI/mL em peixes *Labeo umbratus* e *Labeo capensis* observou-se que o uso de concentrações acima de 1,5mg/mL de heparina provocava hemólise em até 30 minutos após coleta, e o uso de baixas concentrações (0,3 a 1,0mg/mL) resultava em baixos valores de volume globular (HATTINGH, 1975).

Apesar do presente estudo ter demonstrado que tanto a heparina (5.000UI) quanto o EDTA 10% terem apresentado resultados satisfatórios em relação a inibição da coagulação e a preservação da hemólise, é possível observar, em outros estudos, que existem diferentes resultados em relação à esses parâmetros. Essas diferenças estão relacionadas a uma série de particularidades como por exemplo: as concentrações dos anticoagulantes utilizados, o método de colheita, o tempo de conservação das amostras e as inúmeras espécies de peixes pesquisadas. Os resultados dos parâmetros hematológicos da tilápia utilizando os anticoagulantes e diferentes técnicas laboratoriais de análise estão apresentadas na Tabela 1. Pode-se observar que alguns desses parâmetros sofreram influência desses fatores.

Tabela 1. Valores da mediana (Máx- Mín) dos parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo tratadas com EDTA e Heparina, analisadas imediatamente e 24h após a colheita. He 1 = solução salina como diluente; He 2 = Natt-Herrick como diluente; Hb 1 = protocolo 1; Hb 2 = protocolo 2 (n = 25), onde: He (número de eritrócitos), VG (volume globular), Hb (concentração de hemoglobina), VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), PPT (proteína total)

Parâmetros	EDTA		HEPARINA	
	Imediatamente Mediana (Máx – Min)	24 h Mediana (Máx – Min)	Imediatamente Mediana (Máx – Min)	24 h Mediana (Máx – Min)
He 1 (x10 ⁶ /μL)	1,2 (14,7 - 4,5) ^{aA}	1,3 (13,7 - 3,0) ^a	1,5 (14,6 - 4,8) ^{bA}	1,5 (12,4 - 3,5) ^b
He 2 (x10 ⁶ /μL)	1,5 (10,8 - 3,9) ^{aB}	1,4 (6,5 - 2,9) ^a	1,5 (10,4 - 4,6) ^{aA}	1,5 (7,9 - 2,9) ^a
VG (%)	34,0 (53,0 - 18,0) ^a	36,0 (63,0 - 20,0) ^a	31,5 (44,0 - 22,0) ^a	34,5 (48,0 - 19,0) ^a
Hb 1 (g/ dL)	7,9 (15,7 - 4,5) ^{aA}	6,9 (13,7 - 3,0) ^a	7,5 (14,6 - 4,8) ^{aA}	8,3 (12,4 - 3,5) ^a
Hb 2 (g/ dL)	6,0 (10,8 - 3,9) ^{aB}	5,9 (6,5 - 2,9) ^a	5,9 (10,4 - 4,6) ^{aB}	5,5 (7,9 - 2,9) ^a
VCM (fL/μL)	2,6 (12,6 - 3,2) ^a	2,7 (13,5 - 4,1) ^a	2,1 (3,1 - 1,3) ^a	1,9 (2,9 - 1,4) ^a
HCM (pg/μL)	0,7 (1,7 - 0,3) ^a	0,7 (2,7 - 0,2) ^a	0,5 (0,8 - 0,3) ^a	0,4 (0,7 - 0,2) ^a
CHCM (g/dL)	23,9 (63,0 - 10,3) ^a	22,2 (33,2 - 8,0) ^a	25,6 (36,2 - 14,5) ^a	22,7 (31,5 - 12,4) ^a
PPT (mg/dL)	5,6 (9,1 - 4,8) ^a	6,0 (10,0 - 5,4) ^a	5,4 (8,0 - 4,5) ^a	5,5 (8,6 - 4,8) ^a

Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre os anticoagulantes e letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as técnicas utilizadas segundo o teste de Wilcoxon (P<0,05).

Na contagem de eritrócitos mostrou-se que o uso do EDTA junto com a solução de cloreto de sódio (0,65%) como diluente, provocou uma redução significativa no número de eritrócitos em relação a heparina com o mesmo diluente. Essa redução foi observada tanto nas análises feitas imediatamente após a coleta como nas amostras conservadas por 24h. No entanto, esse resultado foi observado apenas nas contagens diluídas em solução de cloreto de sódio à 0,65%, não ocorrendo diferenças entre os anticoagulantes quando a contagem era feita em diluição com Natt & Herrick (1952). Isso demonstra que a solução salina teve um efeito negativo sobre a quantidade de células eritrocitárias.

Adeyemo et al. (2009) ao compararem a ação do EDTA e da heparina, utilizando solução de Hayem como diluente na contagem de eritrócitos no sangue de Catfish (*Clarias gariepinus*) não encontraram diferença significativa entre

eles. Entretanto, Paduá et al. (2012) ao realizar estudos com heparina e K_3EDTA , em tambaqui (*C. macropomum*), verificaram uma maior fragilidade osmótica dos eritrócitos provocada pela ação do K_3EDTA , ocasionando distúrbios na permeabilidade dessas células. Resultado semelhante foi observado em sangue de carpa comum, onde o uso do Na_2EDTA provocou destruição gradual nas células eritrocitárias (WITESKA & WARGOCKA, 2011).

O anticoagulante EDTA promove quelação dos íons de Ca^{2+} provocando uma série de distúrbios na permeabilidade e, conseqüentemente, na estabilidade da membrana dos eritrócitos, levando a destruição celular, em conseqüência da sua expansão e posterior o rompimento das membranas.

Já na comparação das diferentes técnicas laboratoriais utilizadas para avaliar a concentração de hemoglobina foram encontradas diferenças significativas entre os protocolos testados (Figura 1).

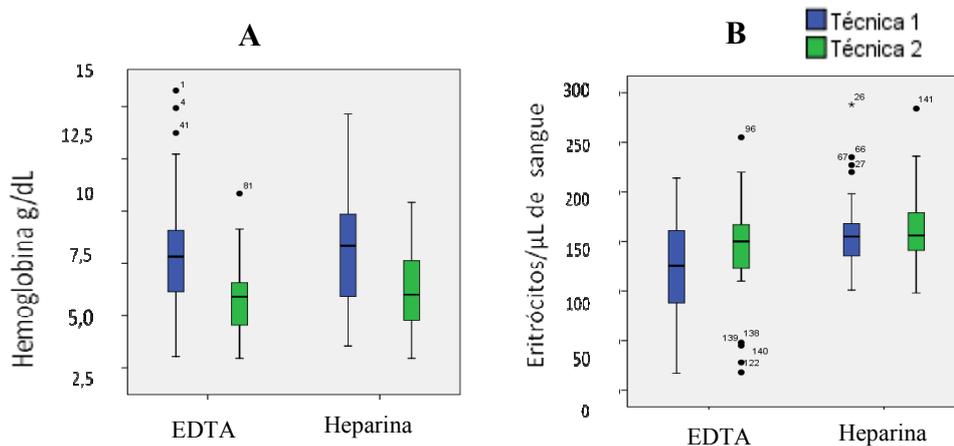


Figura 1A e B. Valores da taxa da hemoglobina pela micro (1) e macrotécnica (2) e da contagem de eritrócitos, com solução salina (técnica 1) e Natt Herrick (técnica 2), de tilápias do Nilo utilizando EDTA e Heparina analisados imediatamente e 24h após a coleta (n = 25)

A concentração de hemoglobina vem sendo estudado em diferentes espécies de peixes, porém existe uma variedade nos métodos adotados dificultado a correlação entre eles. Adeyemo et al (2009) avaliaram a concentração de hemoglobina de Catfish, diluindo 20 μ L de sangue em 1,0mL de solução de Drabkin encontrou valores entre 1-20g/dL. Enquanto Larsen & Sniesko (1961) diluíram 10 μ L de sangue de truta comum (*Salmo trutta*) e truta arco-iris (*Salmo gairdneri*) em 2,0mL de Drabkin e encontraram valores médios entre 8,8g/dL e 9,6g/dL, respectivamente. Já Ekanem et al (2012) ao avaliarem amostras de sangue de tilápia encontraram valores entre 9,8-10,5g/dL. Considerando a importância de que os testes escolhidos utilizem uma quantidade mínima de amostra sanguínea, para que não seja necessário sacrificar os peixes, o protocolo 1 apresentou resultados satisfatórios. O volume globular é considerado um teste importante para seleção entre os

anticoagulantes utilizados nas análises hematológicas de peixes (Figura 2). Um aumento significativo do volume globular foi relatado em sangue de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com EDTA 10% (0,5mg/mL) quando comparado com a heparina (4mg/mL) (EKANEM & UDOH, 2012). Witeska & Wargocka (2011) também verificaram valores aumentados do percentual do volume globular, de carpa comum (*Cyprinus carpio*), usando Na₂EDTA, nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0mg/mL, em comparação com a heparina 50 UI. Hattingh (1975) testando o uso do EDTA e da heparina registrou o mesmo aumento em relação ao volume globular em outras espécies de peixes (*Labeo umbratus*, *L. capensis*, *Barbus holubi*, *Clarias gariepinus* e *Cyprinus carpio*). Esse mesmo aumento também foi relatado em répteis e aves (HATTINGH & SMITH, 1976; MAFUVADZE & ERLWANGER, 2007).

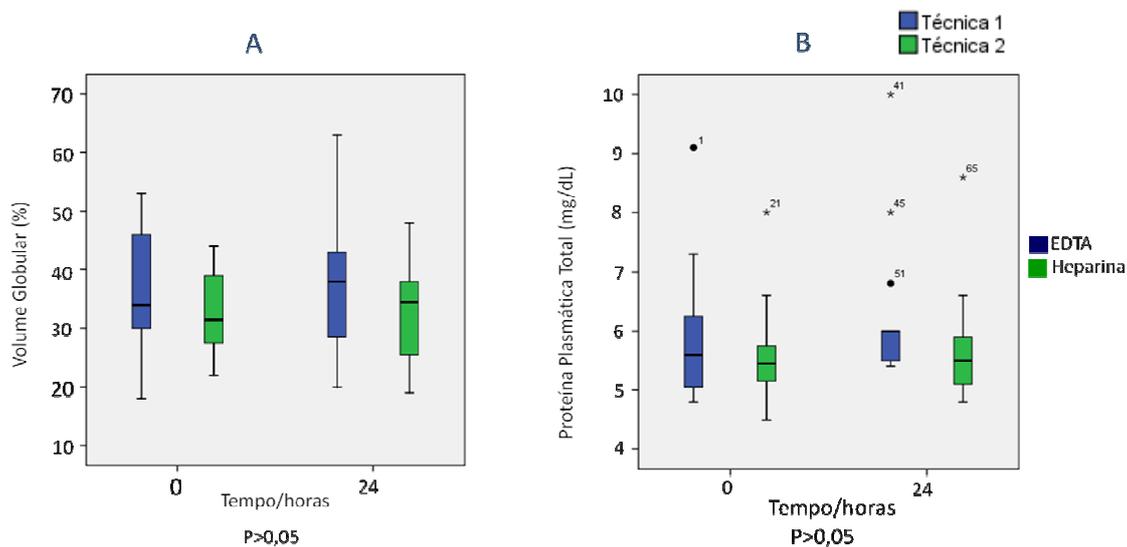


Figura 2A e B. Valores do volume globular (VG) e das proteínas plasmáticas totais (PPT) de tilápia do Nilo tratado com EDTA e Heparina, e analisados imediatamente e 24h após a colheita (n = 25)

Tavares-Dias & Sandrim (1998) verificaram uma diminuição significativa tanto no volume globular quanto na concentração de hemoglobina das amostras sanguíneas de tambaqui quando utilizado EDTA, em comparação com a heparina, como anticoagulantes. Achados semelhantes foram descritos por Bazolli et al. (1996) que ao utilizar a heparina 5000UI encontraram valores aumentados do volume globular e da concentração de hemoglobina em sangue de *Brycon orbignyianus*. Contrariamente, Allen (1993) verificou que o percentual do volume globular, na espécie *Oreochromis aureus*, diminuiu nas amostras de sangue contendo diferentes concentrações de heparina (20, 250 e 5000UI) em relação às amostras sem anticoagulante. Entretanto, o presente estudo não

demonstrou diferença entre os anticoagulantes na avaliação do volume globular, bem como na análise das proteínas totais.

Não foi observada diferença entre os anticoagulantes na contagem dos leucócitos totais e diferenciais (Tabela 2). Já a contagem de trombócitos demonstrou diferença significativa entre os anticoagulantes quando as amostras foram coradas pelo método de Rosenfeld. Além disso, a contagem de trombócitos também apresentou diferença significativa entre os métodos de coloração das extensões sanguíneas nas amostras colhidas com EDTA (Figuras 3A e B). As extensões sanguíneas coradas panótico apresentaram um maior número de trombócitos em relação às extensões sanguíneas coradas com Rosenfeld.

Tabela 2. Valores da mediana (Máx. – Min.) dos trombócitos e leucócitos de tilápia do Nilo tratadas com EDTA e Heparina, analisadas imediatamente e 24 após a colheita e coradas com duas técnicas. 1 = panótico, 2 = Rosenfeld (n = 25)

Parâmetros	EDTA		HEPARINA	
	Imediatamente Mediana (Máx – Min)	24 h Mediana (Máx – Min)	Imediatamente Mediana (Máx – Min)	24 h Mediana (Máx – Min)
Tromb.1 (µL)	8082 (41334 – 1779) ^{aa}	6783 (25406 – 463) ^{aa}	9952 (26871 – 10) ^a	10281 (94480 – 1638) ^a
Tromb. 2 (µL)	1622 (7323 – 779) ^{ab}	4898 (12350 – 1) ^{ab}	9203 (2977 - 1670) ^b	9407 (34134 - 1382) ^b
Leuc. T. 1 (µL)	9413 (28182 – 1668) ^a	4392 (15883 – 1854) ^a	10497 (37011 – 2139) ^a	14444 (24009 – 2315) ^a
Leuc. T. 2 (µL)	13377 (19352 – 2680) ^a	13070 (17409 – 7647) ^a	14483 (19440 – 3516) ^a	12059 (35821 – 4661) ^a
Linf. 1 (µL)	8055 (26266 – 1174) ^a	3438 (9090 – 1023) ^a	9320 (32273 – 1765) ^a	10885 (19255 – 1795) ^a
Linf. 2 (µL)	11322 (16662 – 2182) ^a	11713 (13405 – 6263) ^a	11848 (16705 – 3228) ^a	10214 (33564 – 3991) ^a
Neut. 1(µL)	1207 (3085 – 47) ^a	578 (5972 – 221) ^a	784 (2739 – 175) ^a	730 (5839 – 44) ^a
Neut. 2(µL)	1279 (3988 – 281) ^a	935 (3064 – 8) ^a	1216 (2103 – 102) ^a	681 (3848 – 364) ^a
Monoc. 1(µL)	474 (1338 – 37) ^a	381 (3240 – 163) ^a	324 (1998 – 48) ^a	597 (2937 – 44) ^a
Monoc. 2(µL)	1279 (3988 – 281) ^a	935 (3064 – 8) ^a	662 (2054 – 108) ^a	571 (1576 – 228) ^a
Eosin. 1(µL)	0	0	0	0
Eosin. 2(µL)	0	0	0	0
Basof. 1(µL)	0	0	0	0
Basof. 2(µL)	0	0	0	0

Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativa entre os anticoagulantes e letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre as técnicas utilizadas segundo o teste de Wilcoxon (P<0,005).

Resultados similares foram vistos em sangue de catfish africano (*Clarias gariepinus*) onde a contagem total de leucócitos não apresentou diferença significativa. No entanto, o experimento apresentou valores significativamente maiores na contagem diferencial de linfócitos e neutrófilos com o uso do EDTA (TAVARES & MORAES, 2007). O mesmo foi observado por Walencik &

Witeska (2007) comparando os anticoagulantes heparina, EDTA e citrato, na contagem total de leucócitos e trombócitos de carpa comum, não encontraram diferença significativa entre eles, exceto na contagem diferencial. O número de linfócitos foi significativamente menor nas amostras de sangue contendo 0,1mg/mL de Na₂EDTA.

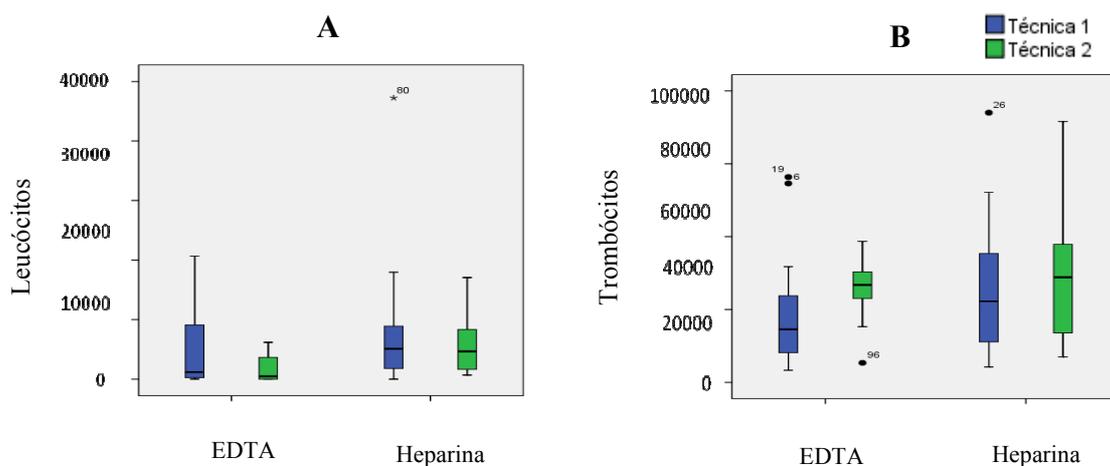


Figura 3A e B. Número total de leucócitos e trombócitos do sangue de tilápia do Nilo utilizando com os anticoagulantes EDTA e Heparina, e dois corantes: Técnica 1 = Panótico, Técnica 2 = Rosenfeld (n = 25).

É preciso ressaltar que, no presente estudo, a utilização da técnica de coloração de Rosenfeld (1947) para as extensões sanguíneas foi mais eficiente na identificação das células. As características morfotintoriais, tanto dos leucócitos quanto dos eritrócitos, foram melhores evidenciadas com a utilização do método de Rosenfeld do que pelo método panótico rápido (Instat-Prov). O uso do Rosenfeld apresentou melhores resultados também na avaliação morfológica dos eritrócitos nas extensões analisadas no período de 24h, sendo observada maior preservação da membrana dessas células. Fato semelhante foi destacado por Gomes et al. (2011), quando relatou maior facilidade para identificação dos

leucócitos e trombócitos de psitacídeos e da sua integridade morfológica. Ambos anticoagulantes, EDTA à 10% e Heparina 5000UI, mostraram-se eficientes no que diz respeito à inibição da hemólise e prevenção na coagulação do sangue de tilápia. Em relação aos valores do eritograma, o anticoagulante EDTA à 10%, junto à solução salina, interferiu na contagem de eritrócitos demonstrando que a combinação desses reagentes provocam maior lise dessas células. Para realização do leucograma, principalmente para a diferenciação celular, sugere-se a combinação do EDTA com o Rosenfeld para coloração das extensões sanguíneas, ambos apresentam melhor preservação das

características morfotintoriais dos leucócitos.

REFERÊNCIAS

ADEYEMO, O.K.; OKWILAGWE, O.O.; AJANI, F. Comparative assessment of sodium EDTA and Heparina 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.

ALLEN, P. Determination of haematological parameters of *Oreochromis aureus* Streindachner and the effects of heparin on these. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.106A, p.355-358, 1993.

AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M.M.; FRANCISCO, C.J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: Comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no Vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil, **Boletim Instituto de Pesca**, v.32, n.1, p.41-49, 2006.

BAZOLLI, R.S.; LEÃO-SOUZA, V.; FERRAZ, G.V.; BRUM, C.D.; URBINATI, E.C. Efeito de ciclo reprodutivo e da metodologia em parâmetros hematológicos da piracanjuba, *Brycon orbignyanus*. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 45, 1996, Sete Lagoas. **Anais...** Minas Gerais, 1996.

BLAXHALL, P.C. The haematological assessment of health of freshwater fish: A review of selected literature. **Journal Fish Biology**, v.4, p.593-604, 1972.

BLAXHALL, P.C. ; DAISLEY, K.W. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, v. 5, n. 6, p.771-781, 1973.

CAMPBELL, T.W. Hematologia de peixes. In. BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G (Orgs.). **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap.19, p. 265-276.

COLLIER, H.B. The standardizations of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v.50, n.6, p.550-552, 1944.

EKANEM, A.P.; UDOH, A.J. Effect of different anticoagulants on hematological parameters of *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Science and Advanced Technology**, v.2, n.6, p.17-20, 2012.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, n.1, p.35-39, 1971.

GOMES, D.M.; SILVA, M.N.; SILVA, R.M.M.; DÓREA, R.D.; BASTOS, B.L.; AYRES, M.C.C. Hemogram and clinical blood biochemistry of Macaws (*Ara sp.*) in ecological farms maintained by the state of Bahia, Brazil. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.4, p.699-711, 2011

HATTINGH, J. Heparin and ethylenediamine tetra-acetate as anticoagulants for fish blood. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v.355, n.4, p.347-352, 1975.

- HATTINGH, J.; SMITH, E.M. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v.363, n.3, p.267-269, 1976.
- HARR, K.E.; RASKIN, R.E.; HEARD, D.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. 383-388, 2005.
- HESSER, E. F. Methods for routine on fish haematology. **The Progressive Fish Culturist**, v.22, p.164-171, 1960.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. HEMATOLOGY OF FISHES. In: HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. HEMATOLOGY OF FISHES. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Blackburg: Wiley-Blackwell, 1998. p. 1120-1125.
- ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixes, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.1, p.54-63, 2008.
- ISHIKAWA, M.M.; PÁDUA, S.B.; SATAKE, F.; HISANO, H.; JERÔNIMO, G.T.; MARTINS, M.L. Heparina e Na₂ EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscan*): eficácia e alterações hematológicas. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1557-1561, 2010.
- LARSEN, H.N.; SNIESZKO, S.F. Comparison of various methods of determination of haemoglobin in trout blood. **The Progressive Fish-Culturist**, v.23, n.1, 1961.
- MAFUVADZE, B.; ERLWANGER, K.H. The effect of EDTA, heparin and storage on the erythrocyte osmotic fragility, plasma osmolality and haematocrit of adult ostriches (*Struthio camelus*). **Veterinarski Archiv**, v.77, n.5, p.427-434, 2007.
- MAINWARING, G.; ROWLEY, A.F. The effect of anticoagulants on *Blennius pholis* L. leucocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology: part A: physiology**, v.80, n.1, p.85-91, 1985.
- NATT, M.P.; HERRICK, C.A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of chickens. **Poultry Science**, v.31, p.182-8, 1952.
- PÁDUA, S.B. de.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; DIAS-NETO, J.; CHAGAS, E. C.; ISHIKAWA, M. M. Heparina e K₃EDTA como anticoagulantes para tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816). **Acta Amazonica**, v.42, n.2, p.293-298, 2012.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B. De.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1ª Ed., Maringá: Edum, 2013.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrônicos e estudos de diversos fatores. **Memórias de Instituto Butantã**, v.20, p. 315-328, 1947.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*ictalurus punctatus* raf.), with an assessment of morphological, cytochemical, and ultrastructural features. **Veterinary Clinica Pathology**, v.36, p.49-54, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Acta Scientiarum: biological science**, v.20, n.2, p.151-155, 1998.

WALENICIK, 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 and pharmacology**, v. 146, n.3, p.331-335, 2007.

WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v.51, p.32-49, 1934.

WITESKA, M.; WARGOCKA, W. Disodium EDTA used as anticoagulant causes hemolysis in common carp blood. **Turkish Journal of Veterinary Animal Science**, v.35, n.2, p.99-104, 2011.

Data de recebimento: 28/11/2014

Data de aprovação: 10/10/2015