

## Heparina e K<sub>3</sub>EDTA como anticoagulantes para tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816)

Santiago Benites de PÁDUA<sup>1</sup>, Fabiana PILARSKI<sup>2</sup>, Róberson SAKABE<sup>3</sup>, José DIAS-NETO<sup>4</sup>, Edsandra Campos CHAGAS<sup>5</sup>, Márcia Mayumi ISHIKAWA<sup>6</sup>

### RESUMO

Este estudo avaliou a eficácia da heparina sódica e do EDTA tripotássico como anticoagulantes e seus efeitos sobre os parâmetros hematológicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Foram utilizados dez indivíduos de tambaqui com médias de 384,9 ± 85,71 g de peso e 27,90 ± 2,10 cm de comprimento total para avaliação da heparina 5.000 UI e 100 UI, bem como do K<sub>3</sub>EDTA 10%. Foram analisados a inibição da coagulação por 10 h, eritrograma e teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05). Heparina 5000 UI, heparina 100 UI e K<sub>3</sub>EDTA 10% foram eficazes na prevenção da coagulação por mais de 10 h, no entanto o EDTA tripotássico causou hemólise desde os primeiros momentos. No eritrograma não foi observada diferença (P > 0,05) na contagem de eritrócitos, hematócrito, taxa de hemoglobina e CHCM, no entanto, houve aumento do VCM (P < 0,05) nas amostras acondicionadas com K<sub>3</sub>EDTA 10%. Este anticoagulante causou incremento (P < 0,01) na fragilidade osmótica dos eritrócitos quando comparado com a heparina pura, heparina diluída, e grupo controle. A utilização da heparina como anticoagulante é mais apropriada para tambaqui (*Colossoma macropomum*), visto que foi eficiente na prevenção da coagulação por mais de 10 h, sem ocasionar hemólise, ou alterações nos parâmetros hematológicos e na fragilidade osmótica dos eritrócitos.

**PALAVRAS-CHAVE:** coagulação sanguínea, hemólise, fragilidade osmótica dos eritrócitos, hematologia de peixes.

## Heparin and K<sub>3</sub>EDTA as anticoagulants for tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816)

### ABSTRACT

The efficacy of sodium heparin and tripotassium EDTA as anticoagulant and their effect on the hematological parameters of tambaqui (*Colossoma macropomum*) were evaluated in this study. Ten fish weighing 384.9 ± 85.71 g and measuring 27.90 ± 2.10 cm were used for heparin 5.000 IU, heparin 100 IU and K<sub>3</sub>EDTA 10% evaluation. Clotting inhibition after 10 h, erythrogram and osmotic fragility of erythrocytes were observed. The results were submitted to variance analysis and means compared by Tukey test (P < 0.05). Heparin 5.000 IU, heparin 100 IU and K<sub>3</sub>EDTA 10% were effective in preventing coagulation for more than 10 h. However, tripotassium EDTA caused hemolysis since first moments. In erythrogram there was no difference (P > 0.05) in erythrocyte count, hematocrit, hemoglobin and MCHC. On the other hand, an increase in MCV (P < 0.05) in samples kept with K<sub>3</sub>EDTA10% was observed. This anticoagulant provoked a significant increase (P < 0.01) in the osmotic fragility of erythrocytes when compared to pure heparin, diluted heparin and the control group. Heparin as an anticoagulant is more appropriate for tambaqui since it was effective in preventing coagulation for more than 10 h, without causing hemolysis, changes on hematological parameters or osmotic fragility of erythrocytes.

**KEY WORDS:** blood clotting, hemolysis, osmotic fragility of erythrocytes, fish hematology.

<sup>1</sup> Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), E-mail: santiagopadua@live.com

<sup>2</sup> Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), E-mail: fabianap@caunesp.unesp.br

<sup>3</sup> Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), E-mail: rs\_zoovet@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), E-mail: san\_bob@hotmail.com

<sup>5</sup> Embrapa Amazônia Ocidental, E-mail: edsandra.chagas@cpaa.embrapa.br

<sup>6</sup> Embrapa Agropecuária Oeste, E-mail: marcia@cpao.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

A utilização de diferentes anticoagulantes na hematologia clínica de peixes tem sido alvo de recentes estudos (Walencik e Witeska 2007; Ishikawa *et al.* 2010a), visto que existem peculiaridades que tornam alguns fármacos mais apropriados de acordo com a espécie, assim como observados em outros vertebrados (Harr *et al.* 2005). Para que se estabeleçam os valores hematológicos de referência, torna-se fundamental o conhecimento do anticoagulante mais apropriado, uma vez que alterações *in vitro* relacionadas aos anticoagulantes têm sido reportadas em peixes (Hattingh 1975; Mainwaring e Rowley 1985; Walencik e Witeska 2007; Ishikawa *et al.* 2010a).

Entre os anticoagulantes empregados para realizar os procedimentos hematológicos em peixes, a heparina e o EDTA são os mais utilizados (Walencik e Witeska 2007). Entre as apresentações destes fármacos, tem-se principalmente a heparina de sódio, heparina de lítio, EDTA disódico ( $Na_2$ EDTA), EDTA dipotássico ( $K_2$ EDTA) e o EDTA tripotássico ( $K_3$ EDTA), que por sua vez atuam em diferentes etapas da cascata de coagulação inibindo-a (Harr *et al.* 2005), o que preserva a fluidez do sangue e viabiliza a realização do hemograma. A escolha do anticoagulante adequado é fundamental não somente para os exames hematológicos, mas alguns parâmetros imunológicos também sofrem interferência por estes fármacos (Mainwaring e Rowley 1985; Walencik e Witeska 2007).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma das principais espécies nativas produzidas no Brasil, com importância econômica relevante, especialmente na região Norte do Brasil. Estudos sobre a fisiologia e parâmetros hematológicos desta espécie já vem sendo realizados (Ranzani-Paiva *et al.* 1998; Tavares-Dias *et al.* 1999; Seibert *et al.* 2001; Tavares-Dias *et al.* 2001) e entre os anticoagulantes, a heparina e o EDTA são empregados por diferentes pesquisadores. Tavares-Dias e Sandrim (1998) investigaram o efeito destes dois anticoagulantes sobre o hematócrito, hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média de tambaqui. No entanto, parâmetros adicionais também devem ser avaliados.

Dessa forma, este estudo avaliou a eficácia da heparina de sódio e do EDTA tripotássico como anticoagulantes, bem como o efeito destes fármacos sobre os parâmetros hematológicos e fragilidade osmótica dos eritrócitos de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Unesp de Jaboticabal, São Paulo. Espécimes de tambaqui

foram mantidos em tanques circulares de fibra de vidro com capacidade de 300 L, abastecidos com fluxo contínuo de água ( $1.5 \text{ L min}^{-1}$ ), durante o período de um mês.

Os peixes foram alimentados com ração comercial para onívoros (28% de proteína bruta) fornecida duas vezes ao dia. Nesse período, os parâmetros de qualidade de água como temperatura e oxigênio foram monitorados três vezes por semana por meio de oxímetro digital (YSI 55') e quinzenalmente foram avaliados: alcalinidade por titulação, pH com potenciômetro digital (Quimis Q400M2') e amônia total pelo método do indofenol (Verdouw, 1978). Os valores médios  $\pm$  desvio padrão para estes parâmetros foram: oxigênio dissolvido  $5,9 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$ , pH  $8,1 \pm 0,1$ , temperatura  $29,6 \pm 0,4 \text{ }^\circ\text{C}$ , amônia total  $0,1 \pm 0,004 \text{ mg L}^{-1}$  e alcalinidade  $192,5 \pm 1,4 \text{ mg L}^{-1}$ .

Foram utilizados dez indivíduos de tambaqui com médias de  $384,9 \pm 85,71 \text{ g}$  de peso e  $27,90 \pm 2,10 \text{ cm}$  de comprimento total. Os peixes foram capturados com auxílio de puçá, contido mecanicamente por meio de pano úmido e submetidos à venopunção caudal (2 mL) utilizando seringas estéreis com volume útil de 3 mL e agulhas hipodérmicas  $25 \times 7 \text{ mm}$  isentas de anticoagulantes, conforme as preconizações de Ishikawa *et al.* (2010a,b). O sangue foi rapidamente distribuído em igual volume de 0,5 mL em quatro tubos de polietileno (1,5 mL). A primeira alíquota foi acondicionada em tubo isento de anticoagulante (controle) e nos demais tubos com as seguintes concentrações de anticoagulantes: 15  $\mu\text{L}$  de  $K_3$ EDTA 10% ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de sangue), 15  $\mu\text{L}$  de Heparina sódica 5.000 UI ( $150 \text{ UI mL}^{-1}$  de sangue) e 15  $\mu\text{L}$  de Heparina 100 UI ( $1,5 \text{ UI mL}^{-1}$  de sangue) após diluição realizada a partir da heparina sódica 5.000 UI em solução fisiológica a 0,65% (1:50).

Para determinação da fragilidade osmótica dos eritrócitos utilizou-se solução salina tamponada (pH 7,4) conforme descrito por Parpart *et al.* (1947). As diluições em série foram feitas a partir da solução estoque a 10,5%, sendo utilizadas as seguintes concentrações: 0,65%, 0,54%, 0,43%, 0,32%, 0,21% e 0,10% de  $NaCl-PO_4$ . Os procedimentos adotados para esta técnica em peixes foram conforme as modificações descritas por Ishikawa *et al.* (2010a).

A partir das amostras sanguíneas acondicionadas com os anticoagulantes, procedeu-se a dosagem do percentual do hematócrito pela técnica do microhematócrito (Goldenfarb *et al.* 1971), dosagem da taxa de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (Collier 1944) e contagem de eritrócitos utilizando a diluição de 1:200 em solução de formol-citrato, realizando a contagem em hemocítmetro. De posse desses dados, foram calculados os índices hematimétricos de Wintrobe (1934), compreendidos pelo Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). O sangue remanescente foi estocado em temperatura entre  $5-7 \text{ }^\circ\text{C}$ , por um período de 10 horas, sendo

avaliado após esse período visualmente quanto à ocorrência de coagulação e/ou hemólise (Hattingh e Smith 1976).

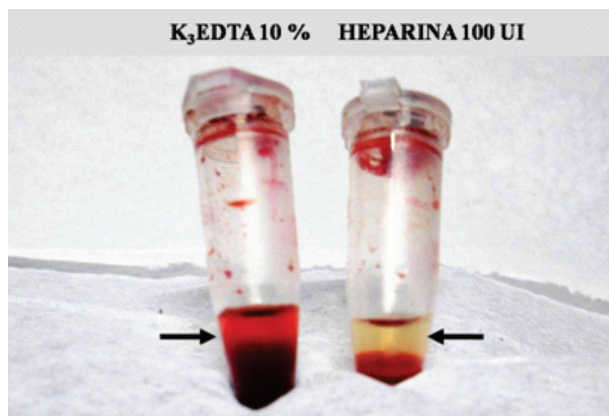
Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inibição da coagulação sanguínea em tambaqui foi promovida com a utilização do K<sub>3</sub>EDTA 10%, heparina 5.000 UI e heparina 100 UI de forma eficiente e por mais de 10 h sob refrigeração. No entanto, o K<sub>3</sub>EDTA 10% determinou a ocorrência de discreta a moderada hemólise desde os primeiros momentos, observado nos microtubos capilares durante a determinação do hematócrito. Além disso, foi observada intensa hemólise nas amostras acondicionadas com este anticoagulante após 10 h de armazenamento (Figura 1). Por outro lado, esta condição não foi verificada nas amostras acondicionadas com heparina 5.000 UI ou 100 UI.

Os resultados dos parâmetros hematológicos de tambaqui utilizando o K<sub>3</sub>EDTA e heparina como anticoagulantes estão relacionados na Tabela 1. Pode-se observar que o único parâmetro influenciado por estes fármacos foi o VCM, indicado pelo seu aumento (P < 0,05) nas amostras acondicionadas com K<sub>3</sub>EDTA 10%.

No teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos foi verificado que o K<sub>3</sub>EDTA 10% determina a ocorrência de hemólise em tambaqui, visto que esta condição foi observada desde a concentração de 0,65% de NaCl-PO<sub>4</sub>, que é a concentração fisiológica para peixes. Além disso, este anticoagulante aumentou a sensibilidade dos eritrócitos à hemólise nas concentrações 0,54% e 0,43% de NaCl-PO<sub>4</sub> (P < 0,01). Por outro lado, a heparina 5.000 UI e 100 UI não



**Figura 1** - Intensa hemólise observada em tambaqui (*Colossoma macropomum*) após 10 h de armazenamento do sangue sob refrigeração utilizando K<sub>3</sub>EDTA 10% como anticoagulante; ao lado amostra sanguínea isenta de hemólise, apresentando plasma de cor palha, em que foi utilizada Heparina 100 UI como anticoagulante.

influenciaram na sensibilidade dos eritrócitos de tambaqui frente ao estresse osmótico (Figura 2).

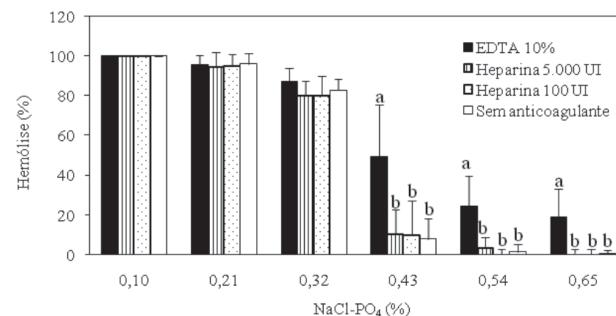
Neste estudo, o EDTA tripotássico 10% e as duas concentrações de heparina de sódio avaliadas foram eficazes na prevenção da coagulação sanguínea por mais de 10 h em tambaqui, sendo este tempo adequado para a realização do exame hematológico. Por outro lado, em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*) a heparina 100 UI não foi eficiente para preservação do sangue por mais de 10 h, ocorrendo coagulação das amostras (Ishikawa *et al.* 2010a). Heparina nas concentrações acima de 100 UI mL<sup>-1</sup> e Na<sub>2</sub>EDTA nas concentrações acima de 4 mg mL<sup>-1</sup> foram eficientes na inibição da coagulação em *Blennius pholis* (Mainwaring e Rowley 1985). Baixas concentrações de heparina e EDTA determinaram a ocorrência de coagulação parcial e/ou total em carpa comum, *Cyprinus carpio* (Smit *et al.* 1977), bem como em *B. pholis* (Mainwaring e Rowley 1985). Dessa forma, pode-se observar peculiaridades relacionadas à espécie, corroborando o fato de que os anticoagulantes devem ser avaliados para cada espécie em particular.

Hemólise em amostras acondicionadas com EDTA foi reportada nos peixes *Labeo umbratus*, *L. capensis*, *Barbus holubi*

**Tabela 1** - Parâmetros hematológicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) utilizando diferentes anticoagulantes.

Parâmetros	Heparina		K <sub>3</sub> EDTA
	5.000 UI	100 UI	10%
Hematócrito (%)	27,6 ± 2,87a	26,9 ± 1,72a	28,9 ± 2,55a
Eritrócitos (x 10 <sup>6</sup> μL <sup>-1</sup> )	1,78 ± 0,23a	1,67 ± 0,18a	1,73 ± 0,21a
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	8,12 ± 0,76a	8,08 ± 0,40a	8,23 ± 0,96a
VCM (fL)	155,66 ± 8,02a	158,61 ± 8,67a	167,60 ± 7,95b
CHCM (g dL <sup>-1</sup> )	29,63 ± 3,35a	30,11 ± 1,34a	28,59 ± 3,44 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Valores com letras diferentes em uma mesma linha são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05).



**Figura 2** - Fragilidade osmótica dos eritrócitos em tambaqui (*Colossoma macropomum*) utilizando diferentes anticoagulantes. Letras diferentes em mesma concentração de NaCl-PO<sub>4</sub> (%) indicam diferença estatística entre os anticoagulantes, de acordo com o teste de Tukey (P < 0,01).

e *Clarias gariepinus* (Hattingh 1975), carpa comum (Hattingh 1975; Smit *et al.* 1977; Walencik e Witeska 2007), surubim híbrido (Ishikawa *et al.* 2010a) e tambaqui no presente estudo, além de outros vertebrados como répteis e aves (Hattingh e Smit 1976). Este anticoagulante promove a quelação dos íons Ca<sup>2+</sup> que determina distúrbios na permeabilidade e estabilidade da membrana dos eritrócitos (Walencik e Witeska 2007). Dessa forma, os eritrócitos tornam-se sensíveis a variações em seu volume, o que pode ser causado por falhas nas trocas iônicas realizadas em sua membrana, o que justifica o aumento do VCM em tambaqui neste estudo.

No teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos, os distúrbios na permeabilidade que acometeu os eritrócitos cujo sangue foi acondicionado com K<sub>3</sub>EDTA mostrou-se mais evidente, reproduzindo grande incremento no percentual de hemólise. Esta situação corrobora os resultados descritos em carpa comum (Walencik e Witeska 2007) e surubim híbrido (Ishikawa *et al.* 2010a), bem como observado também em humanos (Kafka e Yermiahu 1998). Além disso, essa condição possui efeito dose-dependente, onde altas concentrações de EDTA apresentam valores superiores no percentual de hemólise (Walencik e Witeska 2007; Mafuvadze e Erlwanger 2007; Ishikawa *et al.* 2010a). Por outro lado, a heparina pura e/ou diluída como anticoagulantes não influenciaram a fragilidade osmótica dos eritrócitos, apresentando resultados similares ao grupo sem anticoagulante. Efeito semelhante foi observado em surubim híbrido quando utilizado a heparina 100 UI, o que faz deste anticoagulante ideal para realização do teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos em peixes (Ishikawa *et al.* 2010a) e no homem (Kafka e Yermiahu 1998).

A utilização da heparina, citrato de sódio e Na<sub>2</sub>EDTA não ocasionaram alterações nos parâmetros hematológicos básicos de carpa comum (Walencik e Witeska 2007) e surubim híbrido (Ishikawa *et al.* 2010a). Nas aves *Struthio camelus* (Mafuvadze e Erlwanger 2007) e *Amazona ventralis* (Guzman *et al.* 2008) foram descritos valores superiores de hematócrito quando utilizado o EDTA tripotássico e dipotássico, respectivamente, em relação à heparina de lítio. Nestas condições, o aumento do percentual do hematócrito deve-se ao aumento concomitante do VCM, no entanto, neste estudo com o tambaqui foi observado o aumento do VCM sem alterações significativas no hematócrito (P > 0,05), o que pode ser justificado pela hemólise verificada desde os primeiros momentos.

Por outro lado, Tavares-Dias e Sandrim (1998) descreveram valores inferiores do percentual de hematócrito e taxa de hemoglobina em tambaqui quando utilizado EDTA, em comparação com a heparina, como anticoagulantes. Esta condição não foi confirmada por este estudo, o que possivelmente deve-se a diferenças metodológicas, especialmente nos procedimentos de colheita sanguínea e

aliquotagem, procedida em espécimes diferentes para cada anticoagulante (Tavares-Dias e Sandrim 1998). No presente estudo, o sangue do mesmo animal foi aliquotado em diferentes tubos que continham os anticoagulantes avaliados.

## CONCLUSÕES

A utilização da heparina como anticoagulante é mais apropriada para tambaqui (*Colossoma macropomum*), visto que foi eficiente na prevenção da coagulação por mais de 10 h, sem ocasionar hemólise, ou alterações nos parâmetros hematológicos e na fragilidade osmótica dos eritrócitos. A heparina 100 UI torna-se mais econômica e não apresenta diferença prática em relação à heparina 5.000 UI, sendo então o anticoagulante de eleição para o tambaqui.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Aquabrazil/Embrapa e ao Ministério da Pesca e Aquicultura pelo apoio financeiro.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Collier, H.B. 1944. The standardizations of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, 50(6): 550 - 552.
- Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P.; Hall, E.; Brosious, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal of Clinical Pathology*, 56(1): 35 - 39.
- Guzman, D.S.; Mitchell, M.A.; Gaunt, S.D.; Beaufrère, H.; Tully Jr, T.N. 2008. Comparison of Hematologic Values in Blood Samples With Lithium Heparin or Dipotassium Ethylenediaminetetraacetic Acid Anticoagulants in Hispaniolan Amazon Parrots (*Amazona ventralis*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 22(2):108 - 113.
- Harr, K.E. Raskin, R.E.; Heard, D.J. 2005. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(4): 383 - 388.
- Hattingh, J. 1975. Heparin and ethylenediamine tetra-acetate as anticoagulants for fish blood. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 355(4): 347 - 352.
- Hattingh, J.; Smith, E.M. 1976. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 363(3): 267 - 269.
- Ishikawa M.M., Pádua S.B., Satake F., Hisano H., Jerônimo G.T., Martins M.L. 2010a. Heparina e Na<sub>2</sub>EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. *Ciência Rural*, 40(7): 1557 - 1561.
- Ishikawa, M.M.; Pádua, S.B.; Satake, F.; Pietro, P.S.; Hisano, H. 2010b. *Procedimentos básicos para colheita de sangue em peixes*. Circular Técnica, 17. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, 8 p.

- Kafka, M.; Yermiahu, T. 1998. The effect of EDTA as an anticoagulant on the osmotic fragility of erythrocytes. *Clinical & Laboratory Haematology*, 20: 213 - 216.
- Mafuvadze, B.; Erlwanger, K.H. 2007. The effect of EDTA, heparin and storage on the erythrocyte osmotic fragility, plasma osmolality and haematocrit of adult ostriches (*Struthiocamelus*). *Veterinarski Arhiv*, 77(5): 427 - 434.
- Mainwaring, G.; Rowley, A.F. 1985. The effect of anticoagulants on *Blennius pholis* L. leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology: part A: physiology*, 80(1): 85 - 91.
- Parpart, A.K.; Lorenz, P.B.; Parpart, E.R.; Gregg, J.R.; Chase, A.M. 1947. The osmotic resistance (fragility) of human red cells. *Journal of Clinical Investigation*, 26(4): 636 - 640.
- Ranzani-Paiva, M.J.T.; Salles, F.A.; Eiras, J.C.; Eiras, A.C.; Ishikawa, C.M.; Alexandrine, A.C. 1998. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, estado de São Paulo. *Boletim do Instituto de Pesca*, 25: 77 - 83.
- Seibert, C.S.; Guerra-Shinohara, E.M.; Carvalho, E.G.; Marques, E.E. 2001. Red blood cell parameters and osmotic fragility curve of *Colossoma macropomum* (Pisces, Osteichthyes, Mileinae) in captivity. *Acta Scientiarum*, 23(2): 515 - 520.
- Smit, G.L.; Hattingh, J.; Schoonbee, H.B. 1977. Observations on some effects of disodium ethylenediamine tetra-acetate and heparin on fish blood. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 57 C, 35 - 38.
- Tavares-Dias, M.; Sandrim, E.F.S. 1998. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Acta Scientiarum: biological science*, 20(2): 151 - 155.
- Tavares-Dias, M.; Sandrim, E.F.; Campos-Filho, E. 1999. Características hematológicas do Tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(1): 175 - 184.
- Tavares-Dias, M.; Sandrim, E.F.; Moraes, F.R.; Carneiro, P.C. 2001. Physiological responses of "tambaqui" *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. *Boletim do Instituto de Pesca*, 27(1): 43 - 48.
- Verdouw, H.; Van Eched, C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Research*, 12(6): 397-402.
- Walencik, J.; Witeska, M. 2007. 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*, 146(3): 331 - 335.
- Wintrobe, M.M. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51: 32 - 49.

Recebido em 23/12/2010

Aceito em 17/02/2011

