



6. HEPARINA E EDTA COMO ANTICOAGULANTES PARA MATRINXÃ (*Brycon amazonicus*)

Franciele Cristina de SOUZA¹; Edsandra Campos CHAGAS²; Jony DAI RIKI²; Fernanda Ferréira Louréira de ALMEIDA²; Chéila de Lina BOJINK².

¹Centro Universitário do Norte; ²Embrapa Amazônia Ocidental

1. Introdução

A utilização de diferentes anticoagulantes na hematologia clínica e peixes tem sido alvo de estudos recentes (Walenciak & Wteska 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 inúmeras alterações in vitro relacionadas aos anticoagulantes têm sido reportadas em peixes (Hattinigh 1975; Mai nwarin g & Row ley 1985; Walenciak & Wteska 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 (Walenciak & Wteska 2007). Entre as apresentações destes fármacos, tem-se principalmente a heparina de sódio, heparina de lítio, EDTA di sódico (Na₂EDTA), EDTA dipotássico (K₂EDTA) e o EDTA tripotássico (K₃EDTA), que por sua vez atuam em diferentes etapas da cascata de coagulação in vivo (Harr et al., 2005), dessa forma, preserva-se a fluidez do sangue que viabiliza a realização do hemograma.

O matrinxã (*Brycon amazonicus*) 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 (Tavares-Das et al., 2008) e entre os anticoagulantes, a heparina e o EDTA são empregados por diferentes pesquisadores.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da heparina de sódio e do EDTA como anticoagulantes e o efeito destes fármacos sobre os parâmetros hematológicos de matrinxã (*Brycon amazonicus*).

2. Material e Métodos

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental. Para isso, juvenis de matrinxã foram mantidos em tanques circulares de fibra de vidro com capacidade de 2000 L, abastecidos com fluxo contínuo de água (1.5 L min⁻¹), durante o período de um mês.

Nesse período, os parâmetros de qualidade de água como temperatura (29,6 ± 0,4 °C) e oxigênio (5,9 ± 0,4 mg L⁻¹) foram monitorados três vezes por semana por meio de oxímetro digital (YSI 55) e quimicamente e foram avaliados.

Foram utilizados dez indivíduos de matrinxã pesando 200 g. Os peixes foram capturados com auxílio de puçá, contido mecanicamente por meio de pano úmido e submetidos à venopunção caudal (2,5 mL) utilizando seringas estéreis com volume útil de 3 mL e agulhas hipodérmicas 25 x 7 mm isentas de anticoagulantes, conforme as recomendações 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 µL de K₃EDTA 10% (1 mg mL⁻¹ de sangue), 15 µL de Heparina 5.000 UI (150 UI mL⁻¹ de sangue) e 15 µL de Heparina 100 UI (1,5 UI mL⁻¹ de sangue), após diluição a partir da heparina 5.000 UI e em solução fisiológica a 0,65% (1:50). Para determinação da fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE) 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-PO₄. Os procedimentos adotados para esta técnica em peixes foram os modificados por Ishikawa et al. (2010a).

A partir das amostras sanguíneas acondicionadas com os anticoagulantes, foi realizada a dosagem do percentual do hematócrito pela técnica do microhematócrito (Goldfarb et al., 1971), dosagem da taxa de hemoglobina pelo método da diânometahemoglobina (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°C, por um período de 10 horas, sendo avaliado após esse período visualmente quanto à ocorrência de coagulação e/ou hemólise (Hattigh & Smith 1976).

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

3. Resultados e Discussão

A inibição da coagulação sanguínea em matrinxã foi promovida com a utilização do K₃EDTA 10%, heparina 5000 UI e heparina 100 UI de forma eficiente e por mais de 10 h sob refrigeração. No entanto, o K₃EDTA 10% determinou a ocorrência de discreta a moderada hemólise desde os primeiros momentos, observado nos microtubos capilares durante a determinação do hematócrito. Adicionalmente, foi observada intensa hemólise nas amostras acondicionadas com este anticoagulante após 10h de armazenamento.

Os resultados dos parâmetros hematológicos de matrinxã utilizando o K₃EDTA e heparina como anticoagulantes estão relacionados na tabela 1. Pode-se observar que o único parâmetro que foi influenciado por estes fármacos foi o VCM, indicado pelo seu aumento ($P < 0,05$) nas amostras acondicionadas com K₃EDTA 10%.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos de matrinxã (*Brycon amazonicus*) utilizando diferentes anticoagulantes.

Parâmetros	Heparina		K ₃ EDTA
	5.000 UI	100 UI	10%
Hematócrito (%)	27,6 ± 2,87a	26,9 ± 1,72a	28,9 ± 2,55a
Eritrócitos (x 10 ⁶ µL ⁻¹)	1,78 ± 0,23a	1,67 ± 0,18a	1,73 ± 0,21a
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	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 ⁻¹)	29,63 ± 3,35a	30,11 ± 1,34a	28,59 ± 3,44a

Valores com letras diferentes e em uma mesma linha são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

No teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE) foi verificado que o K₃EDTA 10% determinou a ocorrência de hemólise em matrinxã, visto que esta condição foi observada desde a concentração de 0,65% de NaCl-PO₄, 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-PO₄ ($P < 0,01$). Por outro lado, a heparina 5.000 UI e 100 UI não influenciaram na sensibilidade dos eritrócitos de matrinxã frente ao estresse osmótico (Figura 2).

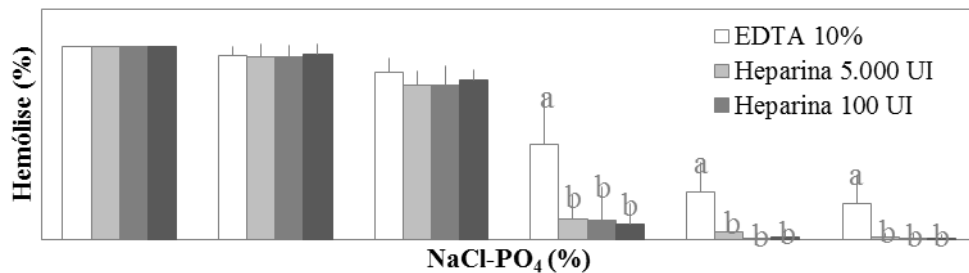


Figura 1. Fragilidade osmótica dos eritrócitos e matrizã (*Brycon amazonicus*) utilizando diferentes anticoagulantes. Letras diferentes e mesma concentração de NaCl-PO₄ (%) indicam diferença estatística entre os anticoagulantes, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,01$).

Neste estudo, o EDTA tri potássico 10% e as duas concentrações de heparina de sódio foram eficazes na prevenção da coagulação sanguínea por mais de 10 h em matrizã, 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. 2010). Heparina nas concentrações acima de 100 UI mL⁻¹ e Na₂ EDTA nas concentrações acima de 4 mg mL⁻¹ foram eficientes na inibição da coagulação em *Blenius pholis* (Mairwaing 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* (Mairwaing 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 e em particular.

He mólise em amostras acondicionadas com EDTA foi reportada nos peixes *Labeo umbratus*, *L. capensis*, *Barbus hodubi* e *Oarias gariepinus* (Hattin gh 1975), carpa comum (Hattin gh 1975; Smit et al. 1977; Wal encik e Wteska 2007), surubim híbrido (Ishikawa et al. 2010a) e matrizã no presente estudo, além de outros vertebrados como répteis e aves (Hattin gh e Smit 1976). Este anticoagulante promove a quelção dos íons Ca²⁺ que determina distúrbios na permeabilidade e estabilidade da membrana dos eritrócitos (Wal encik e Wteska 2007), dessa forma, os eritrócitos tornam-se sensíveis a variações em seu volume por falhas nas trocas iônicas realizadas em sua membrana, o que justifica o aumento do VCM em matrizã deste estudo.

No teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos, os distúrbios na permeabilidade que acometeu os eritrócitos cujo sangue foi acondicionado com K₃ EDTA mostrou-se mais evidente, reproduzindo grande incremento no percentual de hemólise. Esta situação corrobora os resultados descritos em carpa comum (Wal encik e Wteska 2007) e surubim híbrido (Ishikawa et al. 2010a), bem como observado também em humanos (Kafka e Yermahahu 1998). Além disso, essa condição possui efeito dose-dependente, onde altas concentrações de EDTA apresentam valores superiores no percentual de hemólise (Wal encik e Wteska 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 Yermahahu 1998).

A utilização da heparina, citrato de sódio e Na₂ EDTA não ocasiona alterações nos parâmetros hematológicos básicos de carpa comum (Wal encik e Wteska 2007) e surubim híbrido (Ishikawa et al. 2010a). Nas aves *Struthio camelus* (Mafuvadze e Erlwanger 2007) e *Amazona ventralis* (Guzman et al. 2008) foi descrito valores superiores de hematócrito quando utilizado o EDTA tri potássico e di potássico, 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 matrizã 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.

Com base nos resultados do estudo é possível concluir que a utilização da heparina como anticoagulante é mais apropriada para matrizã (*Brycon amazonicus*), 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 matrizã.

4. Referências

Ishikawa, M M; Pádua, S. B.; Satake, F.; Pietro, P. S.; Hsano, H. 2010. Procedimentos básicos para coleta de sangue em peixes. *Circular Técnica*, 17. Empresa Agropecuária Oeste, 8.

Tavares-Das, M; Oliveira, S. R. 2009. A review of the blood coagulation system of fish. *Revista Brasileira de Biociências*. 7(2): 205-224.

Tavares-Das, M et al. 2008. Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. *Acta Amazônica*, 38: 799-806.

Tavares-Das, M; SANDRIM, E. F. S. 1998. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum* *Acta Scientiarum biológica science*, 20(2): 151-155.

Walenciak, J.; Wteska, 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.