



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical

Mestrado e Doutorado

UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil

YURI IAN CARVALHO FURTADO

EFEITOS DOS ANTICOAGULANTES HEPARINA, Na_2EDTA E K_3EDTA
NAS ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DE
TRACAJÁ (*Podocnemis unifilis*)

MACAPÁ, AP

2021

YURI IAN CARVALHO FURTADO

EFEITOS DOS ANTICOAGULANTES HEPARINA, Na₂EDTA e K₃EDTA NAS
ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DE TRACAJÁ
(*Podocnemis unifilis*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientadora: Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka

MACAPÁ, AP
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Furtado, Yuri Ian Carvalho.

Efeitos dos anticoagulantes heparina, Na₂EDTA e K₃EDTA nas análises hematológicas e bioquímica plasmática de tracajá (*Podocnemis unifilis*). / Yuri Ian Carvalho Furtado; orientadora, Eliane Tie Oba Yoshioka. – Macapá, 2021.

45 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

1. Quelônios - Amazônia. 2. Hematologia comparada. 3. Sangue - Coagulação. 3. Sangue - Análise e química. I. Yoshioka, Eliane Tie Oba, orientadora. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

597.92 F992e
CDD. 22 ed.

YURI IAN CARVALHO FURTADO

EFEITOS DOS ANTICOAGULANTES HEPARINA, Na₂EDTA e K₃EDTA NAS
ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DE TRACAJÁ
(*Podocnemis unifilis*)



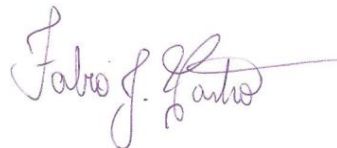
Dra. Eliane Tie Oba Yoshioka

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)



Dra. Marcela Nunes Videira

Universidade do Estado do Amapá (UEAP)



Dr. Fábio de Jesus Castro

Universidade Federal do Tocantins (UFT)

Aprovada em 28 de maio de 2021, Macapá, AP, Brasil

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde, dom da vida, fé e amor.

A toda a minha família, aos meus pais Renildo e Lidilza por todo amor incondicional e torcida, em especial ao meu avô Pedro Furtado (*in memoriam*) por todo suporte, incentivo e sabedoria que foram fundamentais para chegar até aqui.

A incrível orientadora e mãe-científica Dra. Eliane Yoshioka, pelo acolhimento, paciência, conhecimentos compartilhados, conselhos e imensurável apoio que possibilitou o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A Suellen Gomes, pelo apoio incondicional, conselhos e por ser um porto seguro nas horas certas. Aos amigos, pois sozinhos não vamos a lugar nenhum.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO/UNIFAP) pela oportunidade de concluir o mestrado e proporcionar mais uma conquista em minha vida.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amapá), Fundação de Amparo à Pesquisa do Amapá (FAPEAP), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte estrutural e de pessoal, financiamento de pesquisa e bolsa de estudos respectivamente.

Aos amigos de laboratório do Núcleo de Aquicultura e Pesca da Embrapa Amapá, Anaí Gonzales, Maria Ferreira, Cristiellem Cardoso, Alexandre Brasiliense, Taís Cantuária e Sheila Pereira, William Félix, Marcos Sidney, Lígia, por todos os momentos de descontração, risos e auxílio experimental.

Aos amigos do PPGBIO, Ezequiel, Fabi e Glauciele, que juntos fomos persistes nos momentos mais difíceis dessa jornada.

Muito Obrigado!

Porque dele, e por meio dele, e para ele
são todas as coisas. A ele seja a glória
para sempre. Amém. (Romanos 11:36)

PREFÁCIO

Esta dissertação está dividida em dois capítulos, de acordo com o formato alternativo proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBIO). As normas adotadas para padronização das referências da introdução geral seguem o formato do periódico *Ecology*. O segundo capítulo é o artigo intitulado “Anticoagulants and their effects on the hematological and biochemical parameters of Yellow-spotted amazon river turtle *Podocnemis unifilis* (Podocnemididae)” submetido ao periódico *Biota Neotropica*.

RESUMO

Furtado, Yuri Ian Carvalho. Efeitos dos anticoagulantes heparina, Na₂EDTA e K₃EDTA nas análises hematológicas e bioquímica plasmática de tracajá (*Podocnemis unifilis*). Macapá, 2021. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

Para o estabelecimento dos valores hematológicos de referência, para cada espécie, é fundamental o conhecimento sobre os reagentes mais apropriados durante estas avaliações. Este estudo avaliou a eficácia dos anticoagulantes heparina 5.000 U.I. mL⁻¹, Na₂EDTA (3% e 5%), e K₃EDTA (3 e 5%) em parâmetros sanguíneos de *Podocnemis unifilis*, bem como diferentes métodos para contagem de eritrócitos totais. A coagulação foi eficientemente inibida nas amostras de sangue de *P. unifilis* com o uso dos diferentes anticoagulantes avaliados após 10 horas de armazenamento. Houve aumento no número de eritrócitos com o uso de K₃EDTA 5% quando comparado a coleta de sangue com heparina. Foi constatada diferença estatisticamente significativa na contagem de eritrócitos entre as diferentes soluções de reagentes avaliadas. As soluções B e D, ambos com citrato de sódio e formol na composição, possibilitaram a contagem até 120 horas após a coleta, sem alteração em seus valores. Recomenda-se o uso dos anticoagulantes heparina 5000 U.I. mL⁻¹, Na₂EDTA 3%, Na₂EDTA 5%, K₃EDTA 3% nas análises hematológicas de *P. unifilis*. Ainda, o uso da solução de formol-citrato (1,9 g de citrato de sódio e 1,0 mL de formol em 50 mL de água destilada) para realização das contagens de eritrócitos totais em tracajá.

Palavras-chave: Chelonia; eritrócitos; hemoglobina; sangue; saúde.

ABSTRACT

Furtado, Yuri Ian Carvalho. Effects of anticoagulants heparin, Na₂EDTA and K₃EDTA on hematological and plasma biochemical analyzes of Yellow-spotted amazon river turtle (*Podocnemis unifilis*). Macapá, 2021. Dissertation (Master in Tropical Biodiversity) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

Knowledge of suitable methods and reagents for assessing the health condition of specimens of a given species is essential. The present study evaluated the efficacy of the heparin anticoagulants 5,000 I.U. mL⁻¹, Na₂EDTA (3% e 5%), and K₃EDTA (3% e 5%) on the blood parameters of *Podocnemis unifilis*, employing different methods for red blood cells count. The use of the various anticoagulants evaluated after 10 hours of storage efficiently inhibited coagulation in blood samples from *P. unifilis*. An increase in the number of erythrocytes was observed with the use of K₃EDTA 5% when compared with blood with heparin. Statistically significant changes in the erythrocyte number were observed with the use of the solutions. Solutions B and D for example, both of which featured sodium citrate and formaldehyde in their composition, allowed counting up to 120 hours after collection, without a change in values. The use of the heparin anticoagulants 5,000 I.U. mL⁻¹, Na₂EDTA 3%, Na₂EDTA 5%, K₃EDTA 3% was recommended in the hematological analysis of *P. unifilis*. Also recommended was the use of the formaldehyde-citrate solution containing 1.9 g of sodium citrate and 1.0 mL of formaldehyde (in 50 mL of distilled water) to perform red blood cells counts in yellow-spotted amazon river turtle.

Keywords: Chelonia; erythrocytes; hemoglobin; blood; health.

ABREVIATURAS E SIGLAS

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-cético.

Na₂EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-cético dissódico.

K₃EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-cético tripotássico.

Ht - Hematócrito.

Hb - Concentração de hemoglobina.

RBC - Contagem de eritrócitos.

VCM - Volume corpuscular médio.

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 Aspectos gerais de <i>Podocnemis unifilis</i>	13
1.2 Anticoagulantes	15
1.3 Contagem de Eritrócitos	18
2. HIPÓTESE.....	20
3. OBJETIVOS	21
3. 1. GERAL.....	21
3. 2. ESPECÍFICOS	21
4. REFERÊNCIAS	22
ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
INTRODUCTION	30
MATERIAL AND METHODS	31
<i>Anticoagulants effects on P. unifilis blood sample.....</i>	<i>31</i>
<i>Different solutions of P. unifilis for total erythrocyte count</i>	<i>32</i>
STATISTICAL ANALYSIS	32
RESULTS.....	33
DISCUSSION.....	33
<i>Anticoagulants effects on P. unifilis blood sample.....</i>	<i>33</i>
<i>Different solutions of P. unifilis for total erythrocytes count</i>	<i>35</i>
CONCLUSION	36
REFERENCES	36
5. CONCLUSÕES.....	43
6. ANEXO.....	44
Comprovante de submissão do artigo ao periódico Biota Neotropica	44

1. INTRODUÇÃO GERAL

A conservação e recuperação de recursos naturais deve ser a principal prioridade como forma de se manter a diversidade biológica que hoje está sob risco de extinção (Norris et al. 2019). Estudos foram realizados buscando identificar a perda da população de quelônios devido à caça e a modificação de habitats (Rebêlo and Pezzuti 2000, Fachín-Terán and Von Müllhen 2003, Norris and Michalski 2013, Ceballos et al. 2014, Quintana et al. 2019). A caça retrata uma antiga atividade de interação com a natureza, onde o homem busca itens alimentares em regiões muito remotas (Cajaiba et al. 2015). Nesse contexto a fauna silvestre apresenta-se como forma de sustento para muitas populações amazônicas, sendo muito valorizada pelas comunidades locais (Almeida and Abe 2009).

Para muitas gerações a captura de quelônios e seus ovos tem sido um hábito bastante difundido (Rebêlo and Pezzuti 2000), sua pele utilizada na confecção de apetrechos musicais (Almeida and Abe 2009), a gordura misturada a outros componentes era usada para vedação de embarcações e na indústria farmacêutica (Smith 1979). Os ovos por serem bastante apreciados acarretam grande preocupação devido à intensa exploração, todavia com baixo consumo no Estado do Amapá (Norris and Michalski 2013), além da carapaça ser usada como instrumento agrícola e com a queima, suas cinzas são misturadas para confecção de artefatos como tigelas e vasilhas, sendo a carne o principal item de aproveitamento alimentar (Almeida and Abe 2009).

A criação de quelônios em cativeiro é uma alternativa sustentável e conservacionista visando minimizar a pressão sobre os estoques naturais (Araujo et al. 2013). O cultivo de organismos aquáticos é uma alternativa viável para suprir as necessidades do homem por produtos de origem animal (Cressey 2009) e a intervenção nos processos produtivos pode melhorar a produtividade, utilizando densidades de estocagem mais apropriadas, dietas melhor balanceadas para cada fase de desenvolvimento, além de promover a proteção contra predadores, sendo estas algumas das diversas vantagens da aquicultura (Gomiero et al. 1997). Visando a criação com finalidade comercial, algumas espécies de quelônios são autorizadas para cultivo no Brasil, dentre eles o muçua *Kinosternon scorpioides*, a tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa*, pitiú *Podocnemis sextuberculata* e o tracajá *Podocnemis unifilis*, por meio da Instrução Normativa nº 07/2015 (Ibama 2015).

Os animais quando em cativeiro estão sujeitos a condições que possibilitam a propagação de patologias (Morselli et al. 2016). E tais condições são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade ocasionando grandes prejuízos econômicos aos produtores (Leira et al. 2017). Durante o cultivo diversos fatores podem comprometer a saúde desses animais como altas densidades, má qualidade do ambiente, manejo inapropriado, entre outros. Contudo esses

empecilhos podem ser minimizados com diagnóstico precoce de doenças por meio de exames clínicos e avaliações hematológicas (Morselli et al. 2016), sendo este último método pouco invasivo (Bulté et al. 2006).

A hematologia é uma ferramenta importante para compreensão do estado de saúde de várias espécies de animais, pois o sangue reflete de modo eficaz os processos básicos que ocorrem nos organismos (Ranzani-Paiva et al. 2013). Os parâmetros sanguíneos são ferramentas importantes para o diagnóstico e prognóstico das condições de saúde, enfermidades e recuperação clínica em animais, os quais podem ser usados como índice sensível, porém bastante eficaz (Tavares-Dias et al. 2009, Satheeshkumar et al. 2012, Chandavar et al. 2013, Bloodgood et al. 2019), permitindo a compreensão das particularidades e características desses animais tornando estes estudos cada vez mais necessários. As variações nos resultados em exames clínicos podem estar associadas a distintas metodologias de análises (Santos et al. 2009) e para o estabelecimento dos valores hematológicos de referência, para cada espécie, é fundamental o conhecimento sobre os reagentes mais apropriados durante estas avaliações, visto que alterações relacionadas ao uso de determinados anticoagulantes têm sido relatadas (Hattingh 1975, Mainwaring and Rowley 1985, Walencik and Witeska 2007, Ishikawa et al. 2010), incluindo os utilizados para determinação de parâmetros eritrocitários.

1.1 Aspectos gerais de *Podocnemis unifilis*

A espécie *P. unifilis* é um réptil pertencente à ordem Chelonia, da família Podocnemididae. O gênero *Podocnemis* apresenta seis espécies: *Podocnemis vogli* Müller, 1935; *Podocnemis lewyana* Dumeril, 1852; *Podocnemis erithrocephala* Spix, 1824; *Podocnemis sextuberculata* Cornalia, 1849; *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 e *Podocnemis unifilis* Trochel, 1848. Destas espécies, *P. unifilis*, *P. sextuberculata*, *P. erithrocephala* e *P. expansa* estão categorizadas em situação vulnerável pela União Internacional para conservação da Natureza (IUCN); e, no Brasil, o tracajá *P. unifilis* encontra-se no *status* de conservação de Quase Ameaçada (Vogt et al. 2015).

A distribuição geográfica do tracajá (Figura 1) é bastante ampla, por toda a bacia Amazônica (Andrade 2008). No Brasil, ocorre nos estados do Amapá, Pará, Amazonas, Acre, Roraima, Rondônia, Tocantins, Goiás e Mato Grosso (Vogt et al. 2015), nas planícies tropicais da América do Sul, ocorre na Colômbia, Equador, Peru, Guiana Francesa, Suriname e Bolívia (Vogt et al. 2015).

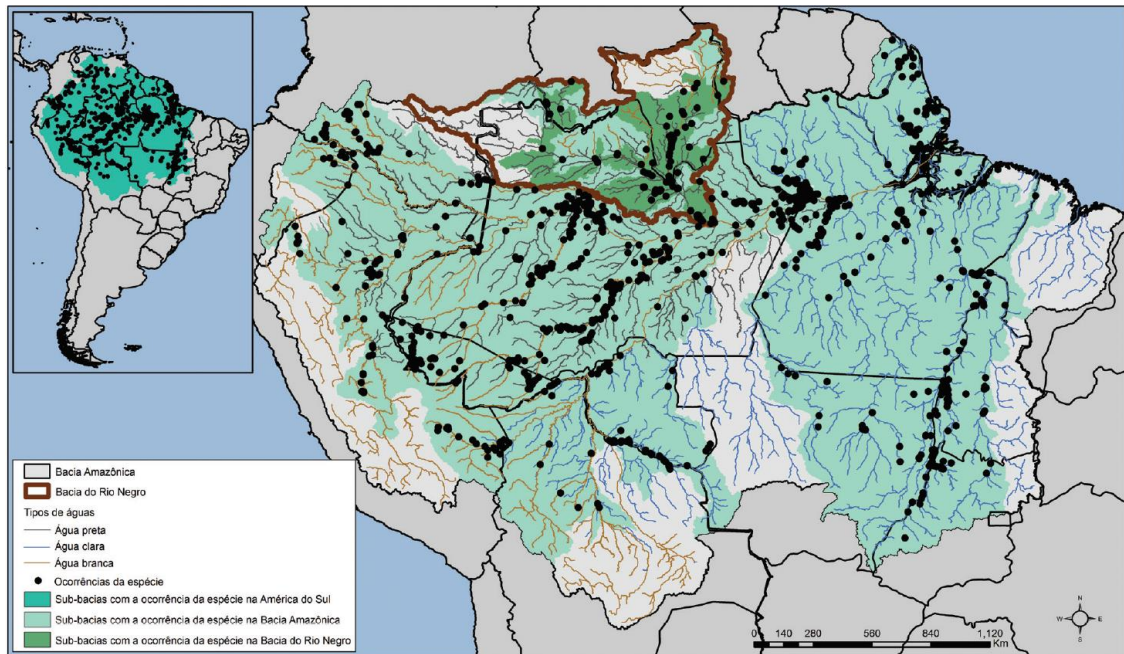


Figura 1. Locais de ocorrência de *Podocnemis unifilis* com destaque para a bacia Amazônica e bacia do rio Negro. Fonte: Ferrara et al. 2017.

A carapaça dos filhotes tem a tonalidade cinza escuro ou verde oliva (Balestra 2016) formato ovalar, apresentando patas curtas e rugosas e manchas amarelas na cabeça (Figura 2), região dorsal (Andrade 2008, Ibama 1989). Tais manchas são comuns nos indivíduos jovens, permanecendo somente em machos adultos. O dimorfismo sexual é evidente, o macho apresenta cauda mais comprida que da fêmea, no entanto, seu comprimento corporal é maior (Mascarenhas et al. 1992), atinge aproximadamente 50 cm de comprimento de carapaça e chegando a 12 kg (Soini and Cópula 1980).

O tracajá possui um hábito semiaquático com ampla variedade de ecossistemas, como igarapés, rios, lagos, pântanos, florestas inundadas, nas proximidades de praias arenosas onde ocorrem as nidificações (Fachín-Terán et al. 1995). É uma das espécies de quelônios menos seletiva para postura de seus ovos, escolhendo solos arenosos, barrancos, ambientes com arbustos, abrangendo praias arenosas altas e baixas (Balestra 2016). Os locais de desova mudam de acordo com as áreas, sucedendo nos meses de julho a novembro no rio Negro e afluentes, estado do Amazonas (Andrade 2008); de setembro a novembro no rio Araguari, estado do Amapá, porém com pico de nidificação em outubro (Arraes and Tavares-Dias 2014); no rio Curuá, estado do Pará, o período de postura é de outubro a novembro (Almeida et al. 2005) e, em dezembro e janeiro no baixo rio Branco, em Roraima (Nascimento 2002).

Os ovos apresentam cor esbranquiçada, formato elipsoidal, com as desovas ocorrendo em duas vezes por temporada, em intervalos de nove a dez dias, com diminuição do tamanho dos ovos até o fim do período de posturas (Andrade 2008).



Figura 2: Filhote de *Podocnemis unifilis* (tracajá). Fonte: Camila Ferrara.

Sua dieta é versátil, incluindo majoritariamente conteúdos vegetais (Fachín-Terán et al. 1995) como sementes, frutas, raízes, folhas e eventualmente crustáceos e insetos (Andrade 2008). Estudos realizados por Portal et al. (2002) no município de Pracuúba, estado do Amapá identificaram 35 espécies vegetais que compõem parte da dieta de *P. unifilis*.

1.2 Anticoagulantes

Diversas análises podem ser realizadas com a utilização do soro ou plasma sanguíneo (Alves 2013). Para obter o soro, o sangue é coletado em tubo sem anticoagulante e deixado coagular, entre 30 a 60 minutos, à temperatura ambiente, e após o período necessário o tubo é centrifugado e a parte líquida, é desassociada (Andriolo et al. 2010). O plasma por sua vez, é obtido após a centrifugação do sangue em tubos com anticoagulante adequado (Andriolo et al. 2010, Alves 2013).

Os anticoagulantes são fundamentais para preservação da vida útil das amostras sanguíneas (Klein et al. 2021), possibilitando que os parâmetros a serem analisados, apresentem o mínimo de alteração antes do processo analítico (Guder 2001). Na medicina veterinária os anticoagulantes comumente utilizados são: ácido etilenodiamino tetra-cético (EDTA) e heparinas (Walencik and Witeska 2007, Gilor and Gilor 2011, Ranzani-Paiva et al. 2013). Dentre essas substâncias tem-se a heparina de sódio e lítio, Na₂EDTA (dissódico), K₂EDTA

(dipotássico), K_3EDTA (tripotássico), que agem em distintas etapas de reação, denominada cascata de coagulação (Harr et al. 2005).

A formação do coágulo é um processo complexo sendo muito importante na homeostasia, em especial quando há prejuízos nos vasos sanguíneos (Tavares-Dias and Oliveira 2009). A coagulação começa com a formação de tampão de trombócitos, no local onde ocorreu a lesão (*in vivo*), realizando aderência dos trombócitos nas fibras de colágeno, em seguida, vários componentes do plasma são enviados a partir dos fatores de coagulação para o início de uma sequência de reações, resultando na formação da fibrina, com o objetivo de reforçar o tampão plaquetário (Tavares-Dias and Oliveira 2009). Este processo é denominado de homeostasia secundária, sendo dividido em três vias: a intrínseca, extrínseca e comum.

O ácido etilenodiamino tetra-cético (EDTA) atua unindo-se ao cálcio, capturando-o e interrompendo a sequência de reações enzimáticas da cascata de coagulação, sendo um quelante de cátions como Ca^{2+} e Mg^{2+} (Gilor and Gilor 2011, Harr et al. 2005). A heparina por sua vez, atua inibindo a coagulação, acelerando a atividade da antitrombina, neutralizando a trombina e demais fatores de coagulação (Gilor and Gilor 2011, Harr et al. 2005), conforme esquema demonstrado na Figura 3.

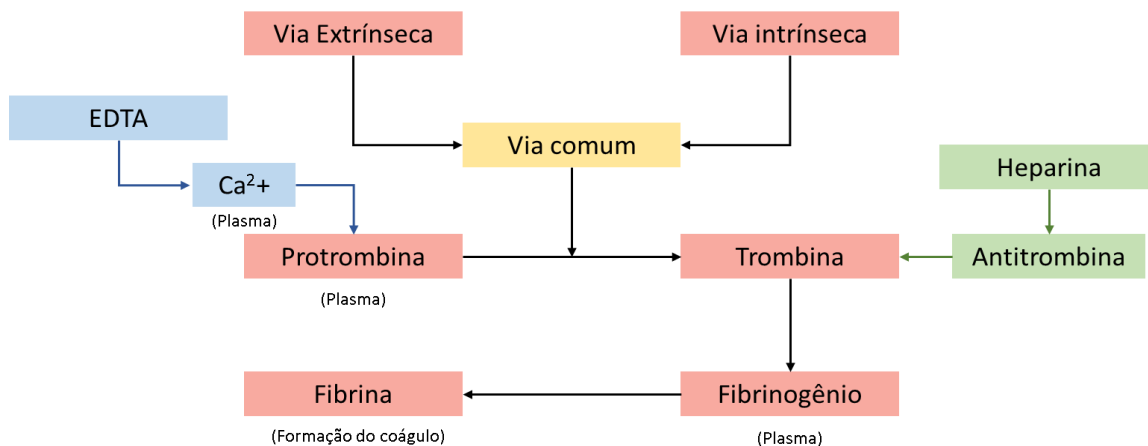


Figura 3 - Esquema simplificado da cascata de coagulação (Adaptado de Bagé 2017)

Diversos estudos buscam identificar os efeitos promovidos por estes anticoagulantes nos valores hematológicos de quelônios (Tabela 1), pois existem peculiaridades que tornam determinados fármacos mais apropriados, e os resultados tendem a variar de acordo com a espécie. A heparina de lítio é o anticoagulante de escolha para avaliações do sangue, pois o EDTA é reconhecido por propiciar a lise celular de algumas espécies de quelônios (Muro et al. 1998, Martinez-Jimenez et al. 2007, Perpiñán et al. 2010).

Tabela 1. Alterações hematológicas em quelônios causadas pela utilização de determinados anticoagulantes

Espécie	Anticoagulante	Alterações observadas	Referências
<i>Testudo hermanni</i>	Heparina de lítio	Menor agregação de trombócitos e leucócitos. Melhor coloração em extensões sanguíneas	Muro et al. 1998
	K ₃ EDTA	Hemólise após 6 horas	
<i>Terrapene carolina carolina</i>	Heparina de lítio	Maior hematócrito e garantiu contagem de leucócitos	Klein et al. 2021
	EDTA	Fragilidade osmótica e hemólise	
<i>Apalone spinifera</i>	Heparina de lítio	Permitiu obtenção do hemograma e bioquímica plasmática	Perpiñán et al. 2010
	EDTA	Todas as amostras lisadas	
<i>Emys marmorata</i>	Heparina de lítio	Utilizado para obtenção de valores bioquímicos	Keller et al. 2012
	K ₂ EDTA	Recomendado para análises hematológicas nesta espécie	
<i>Testudo radiata</i>	EDTA	Permitiu obtenção de valores hematológicos e bioquímicos	Marks and Citino 1990
<i>Gopherus polyphemus</i>	EDTA	Permitiu obtenção de valores hematológicos e bioquímicos	Taylor and Jacobson 1982
<i>Gratemys flavimaculata</i>	Heparina de lítio	Aumento do número de linfócitos	Martinez-Jimenez et al. 2007
	EDTA	Boa identificação leucocitária e recomendado para hematologia da espécie	

O rompimento da membrana das hemácias denominado hemólise, é uma das consequências decorrente do uso de anticoagulantes inadequados (Harr et al. 2005, Walencik and Witeska 2007), além da fragilidade osmótica, agregação de leucócitos e trombócitos, aumento do número de linfócitos e alterações no volume de eritrócitos (Muro et al. 1998, Martinez-Jimenez et al. 2007, Mafuvadze and Erlwanger 2007, Klein et al. 2021).

Contudo, para as espécies em que a hemólise não é identificada, a utilização do EDTA pode proporcionar extensões sanguíneas de boa qualidade, sem a mancha azulada e agregação de leucócitos (Muro et al. 1998, Campbell 2006, Martinez-Jimenez et al. 2007). Empregar o anticoagulante ideal pode aumentar a utilidade dos diagnósticos de patologias e na realização de hemogramas completos. A partir de estudos difundidos na literatura científica, a maior parte das pesquisas permanece conferindo ao EDTA como causador da hemólise, e a heparina permanece como o anticoagulante de escolha para maioria dos répteis, em especial os quelônios. Com o aumento dos estudos hematológicos em organismos aquáticos e o interesse pela aplicabilidade correta dos anticoagulantes, ainda existem divergências sobre os efeitos destes fármacos em testes de rotina, para espécies amazônicas como o tracajá *P. unifilis*.

1.3 Contagem de Eritrócitos

Os eritrócitos são células circundantes em maior proporção no sangue, com a principal função de transporte de oxigênio e gás carbônico por meio da ligação com a hemoglobina (Ranzani-Paiva et al. 2013). Em vertebrados mamíferos estas células são anucleadas e em não-mamíferos são nucleadas com funções semelhantes (Canfield 1998)

Os quelônios apresentam eritrócitos de maior tamanho entre os vertebrados, sendo que em comparação com mamíferos humanos são cerca de três vezes maiores, medindo aproximadamente 20 μm de comprimento; contrariamente, o número de eritrócitos destes animais está entre os mais baixos valores entre os animais (Perpiñán 2017). Estudos hematológicos em reptilianos ainda são considerados complexos, pois o núcleo dos eritrócitos não permite a contagem das células por dispositivos automáticos (Camargo 2018). Desse modo, pesquisas foram desenvolvidas visando realizar a contagem por mecanismos manuais possibilitando a obtenção de indicadores confiáveis.

Para quantificação de eritrócitos no sangue é essencial o uso de soluções devido à grande quantidade de elementos figurados constituintes presente no meio e, com isso, são utilizados diluentes específicos para não alterar a morfologia e o volume celular, como o formal-citrato com azul de toluidina, solução de Hayem ou solução de cloreto de sódio (Ranzani-Paiva et al. 2013). E a determinação dos elementos podem ser por métodos automáticos ou manuais.

Ainda sabe-se pouco sobre quais soluções e armazenamento adequado pra preservação de eritrócitos em quelônios (Radisic et al. 2020) e a contagem de eritrócitos totais em sangue de tracajá utiliza metodologias aplicadas a peixes, podendo tornar imprecisa a determinação deste parâmetro. Tais avaliações são necessárias com o intuito de investigar se o uso do reagente formol-citrato com corante azul de toluidina, é a causa da considerável redução observada destas células durante avaliações. Assim, buscou-se avaliar a separadamente alguns reagentes da solução completa, como forma de se identificar qual componente estava promovendo danos às células, dificultando sua contagem. É importante lembrar que a ausência de informações sobre a temática torna o estudo necessário, visando elucidar metodologias e soluções reagentes apropriadas para tracajá *P. unifilis*.

2. HIPÓTESE

O uso de anticoagulantes Heparina sódica, Na₂EDTA e K₃EDTA não promove alterações no hemograma e nos níveis plasmáticos de determinados metabólitos de tracajá (*Podocnemis unifilis*).

3. OBJETIVOS

3. 1. GERAL

Investigar a eficácia dos anticoagulantes Heparina sódica, Na₂EDTA e K₃EDTA e seus efeitos na hematologia de tracajá (*Podocnemis unifilis*).

3. 2. ESPECÍFICOS

- Avaliar o hemograma de tracajá com o uso de Heparina sódica, Na₂EDTA (3% e 5%) e K₃EDTA (3% e 5%).
- Avaliar possíveis alterações nos níveis plasmáticos de glicose, proteínas totais e albumina de tracajá com o uso de Heparina sódica, Na₂EDTA (3% e 5%) e K₃EDTA (3% e 5%).
- Recomendar reagentes mais adequados para serem utilizados em soluções para contagem de eritrócitos em tracajá.

4. REFERÊNCIAS

- Almeida, C. G. de, and A. S. Abe. 2009. Aproveitamento de alimentos de origem animal pela tartaruga-da-amazônia: *Podocnemis expansa* criada em cativeiro. *Acta Amazonica* 39:215–220.
- Almeida, S. S. de, J. C. B. Pezzuti, and D. F. da Silva. 2005. Notes on nesting of *Podocnemis unifilis* (Chelonia: Pelomedusidae) in small agricultural clearings in Eastern Amazonia, Caxiuanã, Pará, Brazil. *Bol. Mus. Paraense Emílio Goeldi* 1:243–245.
- Alves, G. M. 2013. Efeitos dos anticoagulantes – citrato de sódio, EDTA-K₃e heparina sódica nas análises hematimétricas e bioquímicas em Araras Canindé (*Ara ararauna*), Tigre d'água (*Trachemys scripta*) e Pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*). (Dissertation master).
- Andriolo, A., A. R. Martins, C. A. F. Ballarati, I. V. Barbosa, M. E. Mendes, M. R. Melo, N. M. Sumita, P. Romano, and P. de A. Trindade. 2010. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso. Second edition. Barueri, SP.
- Araújo, J. da C., M. das D. C. Palha, and P. V. e Rosa. 2013. Nutrição na quelonicultura - revisão. *Revista Eletrônica Nutritime* 10:2828–2871.
- Arraes, D. R. dos S., and M. Tavares-Dias. 2014. Nesting and neonates of the yellow-spotted river turtle (*Podocnemis unifilis*, Podocnemididae) in the Araguari River basin, eastern Amazon, Brazil. *Acta Amazonica* 44:387–391.
- Balestra, R. A. M. 2016. Manejo conservacionista e monitoramento populacional de quelônios amazônicos. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), Brasília, DF.
- Bloodgood, J. C. G., T. M. Norton, L. A. Hoopes, N. I. Stacy, and S. M. Hernandez. 2019. Comparison of hematological, plasma biochemical, and nutritional analytes of rehabilitating and apparently healthy free-ranging atlantic green turtles (*chelonia mydas*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 50:69–81.
- Bulté, G., C. Verly, and G. Blouin-Demers. 2006. An improved blood sampling technique for hatchling emydid turtles. *Herpetological Review* 37:318–319.
- Cajaiba, R. L., W. B. Da Silva, and P. R. R. Piovesan. 2015. Animais silvestres utilizados como recurso alimentar em assentamentos rurais no município de Uruará, Pará, Brasil. *Desenvolvimento e Meio Ambiente* 34:157–168.

- Camargo, F. R. C. de. 2018. Particularidades das técnicas de hematologia e bioquímica sérica de tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*, Schweigger, 1812) em cativeiro. (Dissertation master).
- Campbell, T. W. 2006. Clinical Pathology of Reptiles. *Reptile Medicine and Surgery*:453–470.
- Canfield, P. J. 1998. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Australian veterinary journal* 76:793–800.
- Ceballos, C. P., I. Romero, C. Gómez Saldarriaga, and K. Miranda. 2014. Reproducción y conservación de la tortuga del Río Magdalena (*Podocnemis lewyana*) em el Río Claro Cocorná Sur, Colômbia. *Acta Biológica Colombiana* 19:393.
- Andrade, P. C. M. 2008. Criação e Manejo de Quelônios no Amazonas. Brasil: IBAMA, Pró-Várzea, Manaus, AM.
- Chandavar, V. R., N. Raghu, R. Lalitha, and P. R. Naik. 2013. Biochemical indices to monitor health status with respect to reproductive cycle of *Melanochelys trijuga*. *Journal of Applied and Natural Science* 5:118–124.
- Cressey, D. 2009. Aquaculture: Future fish. *Nature* 458:398–400.
- Fachín-Terán, A., and E. M. Von-Mülhen. 2003. Reproducción de la taricaya *Podocnemis unifilis* troschel 1848 (testudines: podocnemididae) en la várzea del medio solimões, Amazonas, Brasil. *Ecologia Aplicada* 2:125.
- Fachín-Terán, A., R. C. Vogt, and M. F. S. Gomez. 1995. Food Habits of an Assemblage of Five Species of Turtles in the Rio Guapore, Rondonia, Brazil. *Journal of Herpetology* 29:536.
- Ferrara, C. R., C. K. Fagundes, T. Q. Morcatty, and R. C. Vogt. 2017. Quelônios Amazônicos: Guia de identificação e distribuição. *Wildlife C. Manaus, AM*.
- Gilor, S., and C. Gilor. 2011. Common laboratory artifacts caused by inappropriate sample collection and transport: How to get the most out of a sample. *Topics in Companion Animal Medicine* 26:109–118.
- Gomiero, T., M. Giampietro, S. G. F. Bukkens, and M. G. Paoletti. 1997. Biodiversity use and technical performance of freshwater fish aquaculture in different socioeconomic contexts: China and Italy. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 63:169–185.
- Guder, W. G. 2001. The quality of diagnostic samples. *Medizinische Welt* 63:293–299.
- Harr, K. E., R. E. Raskin, and D. J. Heard. 2005. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. *Veterinary Clinical Pathology* 34:383–388.

- Hattingh, J. 1975. Heparin and ethylenediamine tetra-acetate as anticoagulants for fish blood. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 355:347–352.
- Ibama. 1989. Projeto Quelônios da Amazônia: Manual Técnico. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis:125.
- Ibama. 2015. Instrução Normativa nº 07, de 30 de Abril de 2015. Brasília. https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Instrucao_normativa/2015/in_ibama_07_2015_institui_categorias_uso_manejo_fauna_silvestre_cativeiro.pdf.
- Ishikawa, M. M., S. B. de Pádua, F. Satake, H. Hisano, G. T. Jerônimo, and M. L. Martins. 2010. Heparina e Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. *Ciência Rural* 40:1557–1561.
- Klein, K., B. Gartlan, G. Doden, K. Fredrickson, L. Adamovicz, and M. C. Allender. 2021. Comparing the effects of lithium heparin and dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid on hematologic values in eastern box turtles (*Terrapene Carolina Carolina*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 51:999–1006.
- Leira, M. H., A. de A. Lago, J. A. Viana, L. T. da Cunha, F. G. Mendonça, and R. T. F. de Freitas. 2017. As principais doenças na criação de tilápias no Brasil: revisão de literatura. *Nutri Time* 14:15.
- Mafuvadze, B., and K. H. Erlwanger. 2007. The effect of EDTA, heparin and storage on the erythrocyte osmotic fragility, plasma osmolality and haematocrit of adult ostriches (*Struthio camelus*). *Veterinarski Arhiv* 77:427–434.
- Mainwaring, G., and A. F. Rowley. 1985. The effect of anticoagulants on *Blennius pholis* L. leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology* 80:85–91.
- Martinez-Jimenez, D., S. J. Hernandez-Divers, T. M. Floyd, H. Wilson, and K. S. Latimer. 2007. 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* 35:328–332.
- Mascarenhas, B. M., M. de F. C. Lima, and W. L. Overal. 1992. Animais da Amazônia: Guia zoológico do Museu Paraense Emílio Goeldi. Supercores, Belém, PA, Brasil.
- Morselli, M. E. P., F. S. E. D. V. Faria, V. M. F. Ribeiro, M. N. S. Viana, A. F. Parente, L. J. Baginski, C. Jardim, and D. B. V. Reis. 2016. Biometria e parâmetros hematológicos em tartarugas da Amazônia de um criatório comercial de Rio Branco/AC. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 68:1548–1556.

- Muro, J., R. Cuenca, J. Pastor, L. Vinas, and S. Lavin. 1998. Effects of Lithium Heparin and Tripotassium EDTA on Hematologic Values of Hermann's Tortoises (*Testudo hermanni*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 29:40–44.
- Nascimento, S. P. do. 2002. Observações sobre o comportamento de nidificação de três espécies de Podocnemis Wagler (Testudinata, Pelomedusidae) no Baixo Rio Branco, Roraima, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 19:201–204.
- Norris, D., and F. Michalski. 2013. Socio-economic and spatial determinants of anthropogenic predation on Yellow-spotted River Turtle, *Podocnemis unifilis* (Testudines: Pelomedusidae), nests in the Brazilian Amazon: Implications for sustainable conservation and management. *Zoologia* 30:482–490.
- Norris, D., F. Michalski, and J. P. Gibbs. 2019. Community based actions save Yellow-spotted river turtle (*Podocnemis unifilis*) eggs and hatchlings flooded by rapid river level rises. *PeerJ* 8:1–17.
- Perpiñán, D. 2017. Chelonian haematology 1. Collection and handling of samples. In *Practice* 39:194–202.
- Perpiñán, D., D. L. Armstrong, and F. Dórea. 2010. Effect of Anticoagulant and Venipuncture Site on Hematology and Serum Chemistries of the Spiny Softshell Turtle (*Apalone spinifera*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 20:74.
- Portal, R. da R., M. A. S. Lima, V. L. F. Luz, Y. S. de L. Bataus, and I. J. dos Reis. 2002. Espécies vegetais utilizadas na alimentação de *Podocnemis unifilis*, Troschel 1948 (Reptilia, Testudinae, Pelomedusidae) na região do Pracuúba-Amapá-Brasil. *Ciência Animal Brasileira* 3:11–19.
- Quintana, I., D. Norris, A. Valerio, F. G. Becker, J. P. Gibbs, and F. Michalski. 2019. Nest removal by humans creates an evolutionary trap for Amazonian freshwater turtles. *Journal of Zoology* 309:94–105.
- Radisic, R., S. D. Owens, C. A. Manire, N. Montgomery, D. Mader, B. Zirkelbach, and N. I. Stacy. 2020. Red blood cell osmotic fragility in healthy loggerhead and green sea turtles. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 32:908–911.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., S. B. de Pádua, M. Tavares-Dias, and M. I. Egami. 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá, PR, Brasil.
- Rebêlo, G., and J. Pezzuti. 2000. Percepções sobre o consumo de quelônios na Amazônia: sustentabilidade e alternativas ao manejo atual. *Ambiente & Sociedade*:85–104.
- Santos, M. R. de D., L. S. Ferreira, C. Batistote, A. Grossman, and C. Bellini. 2009. Valores hematológicos de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) juvenis

- selvagens do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 46:491.
- Satheeshkumar, P., G. Ananthan, D. S. Kumar, and L. Jagadeesan. 2012. Haematology and biochemical parameters of different feeding behaviour of teleost fishes from Vellar estuary, India. *Comparative Clinical Pathology* 21:1187–1191.
- Smith, N. J. H. 1979. Aquatic turtles of Amazonia: An endangered resource. *Biological Conservation* 16:165–176.
- Soini, P., and M. Cópula. 1980. Estudio, reproducción y manejo de los quelonios del género *Podocnemis* (charapa, cupiso y taricaya) en la cuenca del río Pacaya, Loreto-Perú.
- Tavares-Dias, M., A. A. Oliveira, M. G. Silva, J. L. Marcon, and J. F. M. Barcellos. 2009. Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Veterinarski Arhiv* 79:601–610.
- Tavares-Dias, M., and S. R. Oliveira. 2009. A review of the blood coagulation system of fish. *Revista Brasileira de Biociências* 4849:205–224.
- Vogt, R. C., C. K. Fagundes, Y. S. de L. Bataus, R. A. M. Balestra, F. R. de Q. Batista, V. M. Uhlig, A. L. Silveira, A. Bager, A. M. Batistella, F. L. de Souza, G. M. Drummond, I. J. dos Reis, R. Bernhard, S. H. Santesso, T. de Mendonça, and V. L. F. Luz. 2015. Avaliação do Risco de Extinção de *Podocnemis unifilis* Troschel, 1848 no Brasil. <https://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/7426-repteis-podocnemis-unifilis-tracaja>.
- Walencik, J., and M. Witeska. 2007. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 146:331–335.

ARTIGO CIENTÍFICO

Anticoagulantes and their effects on the hematological and biochemical parameters of yellow-spotted amazon river turtle *Podocnemis unifilis* (Podocnemididae)

Artigo submetido ao periódico "Biota Neotropica"

Anticoagulants and their effects on the hematological and biochemical parameters of Yellow-spotted amazon river turtle *Podocnemis unifilis* (Podocnemididae)

Yuri Ian Carvalho Furtado¹ <https://orcid.org/0000-0002-8658-657X>

Cristiellem Cardoso Monteiro² <https://orcid.org/0000-0003-3798-7921>

Anai Paola Prissilla Flores Gonzales³ <https://orcid.org/0000-0002-9282-3500>

Maria de Nazaré Ferreira Costa⁴ <https://orcid.org/0000-0002-9821-7050>

Alexandre Renato Pinto Brasiliense⁵ <https://orcid.org/0000-0002-5962-1333>

Eliane Tie Oba Yoshioka^{6*} <https://orcid.org/0000-0003-0167-6355>

¹ Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 02, Bairro Jardim Marco Zero, CEP: 68.903-419, Macapá, Amapá, Brasil.

² Universidade do Estado do Amapá, Avenida Presidente Vargas, 650, Bairro Centro, CEP: 68.900-070, Macapá, Amapá, Brasil.

³ Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Jr. Ica 1662, Puerto Maldonado, CEP 17001, Madre de Dios, Peru.

⁴ Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 02, Bairro Jardim Marco Zero, CEP: 68.903-419, Macapá, Amapá, Brasil.

⁵ Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 02, Bairro Jardim Marco Zero, CEP: 68.903-419, Macapá, Amapá, Brasil.

⁶ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Laboratório de Aqüicultura e Pesca, Rodovia Juscelino Kubitschek, Km 5, 2600, Bairro Universidade, CEP: 68.903-419, Macapá, Amapá, Brasil. +55 (96) 3203-0244 *eliane.yoshioka@embrapa.br (correspondent author).

Anticoagulants and their effects on the hematological and biochemical parameters of Yellow-spotted amazon river turtle *Podocnemis unifilis* (Podocnemididae)

ABSTRACT

Knowledge of suitable methods and reagents for assessing the health condition of specimens of a given species is essential. This is the first study that evaluated the effectiveness of anticoagulants heparin 5,000 I.U. mL⁻¹, Na₂EDTA, and K₃EDTA in blood parameters of *Podocnemis unifilis*, as well as different methods for counting total erythrocytes. The use of the various anticoagulants evaluated after 10 hours of storage efficiently inhibited coagulation in blood samples from *P. unifilis*. An increase in the number of erythrocytes was observed with the use of K₃EDTA 5% when compared with blood with heparin. Statistically significant changes in the erythrocyte number were observed with the use of the solutions. Solutions B and D for example, both of which featured sodium citrate and formaldehyde in their composition, allowed counting up to 120 hours after collection, without a change in values. The use of the heparin anticoagulants 5,000 I.U. mL⁻¹, Na₂EDTA 3%, Na₂EDTA 5%, K₃EDTA 3% was recommended in the hematological analysis of *P. unifilis*. Also recommended was the use of the formaldehyde-citrate solution containing 1.9 g of sodium citrate and 1.0 mL of formaldehyde (in 50 mL of distilled water) to perform red blood cells counts in yellow-spotted amazon river turtle.

Keywords: blood, Chelonia, erythrocytes, health, hemoglobin.

Anticoagulantes e seus efeitos em parâmetros hematológicos e bioquímicos de tracajá *Podocnemis unifilis* (Podocnemididae)

RESUMO

O conhecimento sobre métodos e reagentes apropriados para as avaliações da condição de saúde de exemplares de determinada espécie é fundamental. Este é o primeiro estudo que avaliou a eficácia dos anticoagulantes heparina 5.000 U.I. mL⁻¹, Na₂EDTA, e K₃EDTA em parâmetros sanguíneos de *Podocnemis unifilis*, bem como diferentes métodos para contagem de eritrócitos totais. A coagulação nas amostras de sangue de *P. unifilis* foi eficientemente inibida com o uso dos diferentes anticoagulantes avaliados após 10 horas de armazenamento. Aumento no número de eritrócitos foi observado com o uso de K₃EDTA 5% em comparação à coleta de sangue com heparina. Alterações estatisticamente significativas nas contagens de eritrócitos com uso das soluções foram observadas, a exemplo das soluções B e D, ambos com citrato de sódio e formol na composição, possibilitaram a contagem até 120 horas após a coleta, sem alteração em seus valores. Recomenda-se o uso dos anticoagulantes heparina 5000 U.I.mL⁻¹, Na₂EDTA 3%, Na₂EDTA 5%, K₃EDTA 3% nas análises hematológicas de *P. unifilis*. Assim como o uso da solução de formol-citrato contendo 1,9 g de citrato de sódio e 1,0 mL de formol (em 50 mL de água destilada) para realização das contagens de eritrócitos totais em tracajá.

Palavras-chave: sangue, Chelonia, eritrócitos, saúde, hemoglobina.

INTRODUCTION

Turtles are reptiles of the Chelonia order, with both sea and freshwater representatives. They are ectothermic, maintaining the balance of their body temperature by exchanging thermal energy with the environment (Pough et al. 2008). They are of great medicinal, economic, and subsistence-related importance for the human populations of the Amazon. Among the most notable genres are *Podocnemis* and *Kinosternon* (Alho 1985). *Podocnemis* is the most representative genus, with six living species: *Podocnemis erythrocephala* Spix, 1824; *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812; *Podocnemis lewyana* Duméril, 1852; *Podocnemis sextuberculata* Cornalia, 1849; *Podocnemis unifilis* Tröschel, 1848, and *Podocnemis vogli* Muller, 1935. Of these, yellow-spotted amazon river turtle, *P. unifilis*, is one of the most frequently caught species for human consumption, according to the International Union for the Conservation of Nature (IUCN). Additionally, the species adapts well to management conditions in cultivation (Pezzuti et al. 2008). *Podocnemis unifilis* is of great economic importance in the Brazilian Amazon, and its breeding is authorized through Normative Instruction No. 07/2015 (Ibama 2015), as it is widely consumed by the populations of the region.

To establish the hematological reference values of each species, it is essential that the most suitable reagents used in evaluations are known, as changes caused by the use of certain anticoagulants have been reported (Hattingh 1975, Mainwaring & Rowley 1985, Walencik & Witeska 2007, Ishikawa et al. 2010), including those used to determine erythrocyte parameters. Among the anticoagulants used in clinical hematology are potassium (K_3EDTA) and sodium (Na_2EDTA) ethylenediaminetetraacetic acids (EDTA), in addition to sodium heparin (Harr et al. 2005). Heparin, however, a glycosaminoglycan, can be found in the form of sodium, potassium, lithium, and ammonium salts; and is the anticoagulant most used in the clinical routines of fish, reptiles, and birds (Alves 2013). Its anticoagulant activity is caused by the acceleration of antithrombin III activity, which in turn inhibits the action of thrombin and other proteases responsible for the coagulation cascade (Harr et al. 2005). Heparin has been used as an anticoagulant of choice for turtles, due to allowing the observation of hemolysis caused by EDTA (Jacobson 1987, Muro et al. 1998).

The anticoagulant effect of EDTA is due to its action in the chelation of factor IV (Ca^{2+}) in the coagulation cascade, acting as a mediator, as well as in the cell-to-cell relationship during coagulation reactions (Harr et al. 2005, Tavares-Dias & Oliveira 2009). However, EDTA is recommended as an anticoagulant, preferably for the total and differential counting of chelonian leukocytes, due to the preservation properties of leukocyte blood cells (NCCLS 1990, Oviedo & Rodríguez 2003, Burtis & Burns 2016). Nevertheless, these anticoagulants have not been evaluated for blood collection specifically in *P. unifilis*. The present study therefore aimed to compare the most

suitable methods and reagents for assessing the qualitative and quantitative characteristics of the blood cells of yellow-spotted amazon river turtle, using sodium heparin, sodium ethylenediaminetetraacetic acid (Na_2EDTA 3 and 5%) and potassium ethylenediaminetetraacetic acid (K_3EDTA 3 and 5%) as anticoagulants, in addition to different solutions counting total erythrocyte number.

MATERIAL AND METHODS

This experiment is authorized by Ethics Committee for Animal Use (CEUA) of Embrapa Amapá, under procedural nr 010/2017-CEUA/CPAFAP, and is registered in National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen), under identification number A237945.

Anticoagulants effects on *P. unifilis* blood sample

Podocnemis unifilis (n=10), belonging to the vivarium of Embrapa Amapá, captured with the aid of a dip net and transported to the Laboratory of Nutrition of Aquatic Organisms, Embrapa Amapá, Macapá, AP, were individually weighed (2.1 ± 0.3 kg), measured (carapace length, 25.2 ± 1.2 cm) and identified. The animals were manually restrained with the aid of a damp cloth and the use of rubber gloves for safe handling, and blood samples were collected by puncturing the caudal vessel. Disposable syringes (capacity of 3.0 mL) and hypodermic needles (25 x 7 mm), without anticoagulants, were used to collect blood samples for the evaluation of anticoagulants.

The blood sample of each animal was quickly distributed into five polyethylene microtubes (capacity of 1.5 mL), 500 μL in each, to which 12.5 μL of anticoagulant was added as follows: in microtube 1, sodium heparin 5,000 I.U. mL^{-1} ; in microtube 2, Na_2EDTA 3%; in microtube 3, Na_2EDTA 5%; in microtube 4, K_3EDTA 3%; and, in microtube 5, K_3EDTA 5%; all homogenized by inversion. After aliquoting the blood in polyethylene tubes, 10 μL of each aliquot was incubated in polyethylene microtubes (capacity of 1.5 mL), kept under refrigeration for a period of 10 hours, and visually evaluated every 30 minutes for the occurrence of coagulation and/or hemolysis (Hattingh & Smith 1976).

The hematocrit (Ht) was determined using the microhematocrit technique (Goldenfarb et al. 1971), with a reading of the red cell percentage on standardized cards. The hemoglobin concentration (Hb) was determined by the cyanmethemoglobin method (Collier 1944), with the absorbance reading taken in a spectrophotometer (Biospectro modelo SP-220) at 540 nm. The red blood cells count (RBC) was performed using formaldehyde-citrate solution and a Neubauer chamber, under a light microscope (Boeco trend, model BOE-01). These data (Ht, Hb and RBC) were used to determine the hematimetric indices (Wintrobe 1934): mean corpuscular volume (MCV) and mean

corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). The remaining blood was centrifuged at 75 G (Centrifuge model MCD-2000), during 10 min to obtain plasma and to determine levels of glucose, total protein and albumin using specific colorimetric kits (Ebram[®], São Paulo, SP, Brazil), for each metabolite, with absorbance readings from a spectrophotometer (Biospectro, SP-220, Curitiba, PR, Brazil).

Different solutions of *P. unifilis* for total erythrocyte count

Podocnemis unifilis (n=6) were captured with the aid of a dip net and transported to the Laboratory of Nutrition of Aquatic Organisms, Embrapa Amapá, Macapá, AP, manually restrained with the aid of a damp cloth and the use of rubber gloves for safe handling. Blood samples were collected by puncturing the caudal vessel with disposable syringes (capacity of 3.0 mL) and hypodermic needles (25 x 7 mm), with heparin as anticoagulant. Blood samples were kept in polyethylene tubes under refrigeration. After these, for erythrocytes number determination 10 µL of blood was added to a glass tube with 2.0 mL of one solution tested.

The following six (6) solutions were evaluated for the total erythrocyte count (RBC), for which a total volume of 50 mL of each solution was prepared, made up with distilled water: Solution A: Sodium chloride solution 0.9 %; Solution B: 1.45 g sodium citrate and 1.5 ml formaldehyde; Solution C: 1.9 g sodium citrate, 1.0 ml formalin and 0.01 g toluidine blue; Solution D: 1.9 g sodium citrate and 1.0 mL formaldehyde; Solution E: 1.9 g sodium citrate and 0.01 g toluidine blue; Solution F: 1.0 mL formaldehyde and 0.01 g toluidine blue. Blood samples in a sodium chloride solution were kept in the refrigerator, as this solution does not include any preservative-containing reagents.

Six counts of each blood sample were performed: the first, at the time of blood collection; the second, 24 hours (1 day) after blood collection; the third, 48 hours (2 days) after collection; the fourth, 72 hours (3 days) after collection; the fifth, 96 hours (4 days) after collection and the sixth, 120 hours (5 days) after collection.

STATISTICAL ANALYSIS

After tests of normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity (Levene), the data were subjected to one-way analysis (ANOVA) of variance with the use of parametric and nonparametric multiple comparison tests (Zar 2010). The analyses were performed using the GraphPad Instat[®] Statistical Program, version 3.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

In the blood samples, blood clotting inhibition was efficient in all the tests with the anticoagulants evaluated. The hematological and biochemical values of apparently healthy *P. unifilis* using different anticoagulants are shown in Table 1. In the samples collected with heparin, the mean RBC was lower ($p < 0,05$) than with the use of K_3EDTA 5%. A significantly lower MCV was observed with the use of the Na_2EDTA 3% anticoagulant than with the use of sodium heparin, Na_2EDTA 5% and K_3EDTA 5%. Differences were not observed ($p > 0,05$) in glucose, total protein and albumin plasma levels, or in Ht, Hb, and MCHC, with the use of the different anticoagulants.

Differences in the total erythrocyte counts of solution E, with sodium citrate and toluidine blue dye, and solution F, with formaldehyde and the addition of toluidine blue dye, were observed at the time of collection, meaning that the blood cell preservation potential of the use of these solutions was not observed (Table 2). All the reagent solutions evaluated exhibited statistically significant differences in the total erythrocyte count.

Hemolysis was detected with the use of the reagent containing only 0.9% sodium chloride solution, 72 hours after collection. Solutions B and D, both composed of sodium citrate and formaldehyde, but in different concentrations, demonstrated less variation in the erythrocyte count, which could be performed up to 120 hours after the collection of the blood samples. Solution C, with sodium citrate and toluidine blue dye, revealed a lower number of erythrocytes, demonstrating problems with carrying out the count, and allowing cell visualization up to 72 hours after the collection of blood samples.

DISCUSSION

Anticoagulants effects on P. unifilis blood sample

This is the first study on the effects of heparin sodium and EDTA (sodium and potassium) on the hematological parameters of *P. unifilis* as anticoagulants. The use of sodium heparin in the hematological evaluation of turtles and other reptiles has been widely described in several studies (Aguirre et al. 1995, Mafuvadze & Erlwanger 2007, De Deus Santos et al. 2009, Sabino et al. 2010, Ishikawa et al. 2010, Costa et al. 2019), and has been found to be an effective anticoagulant. However, some studies have reported that heparin, despite being considered a natural coagulant, can interfere with the staining of leukocyte blood cells, in addition to being expensive in comparison with other anticoagulants (Gilor & Gilor 2011). However, EDTA is a more widely used anticoagulant than heparin, as it reduces the agglutination processes, preserving blood cell morphology and staining (Gilor & Gilor 2011). However, several studies have reported that EDTA, when used as an anticoagulant

in chelonian, can cause hemolysis (Muro et al. 1998, Perpiñán et al. 2008, Oliveira-Junior et al. 2009, Tavares-Dias et al. 2009, Perpiñán et al. 2010).

The hematological and biochemical parameters of *P. unifilis* revealed few variations, with mainly minimal differences observed in the blood count. The samples collected with K₃EDTA 5% exhibited higher numbers of RBC, while the MCV differed between the samples with the anticoagulants evaluated. The use of EDTA, in the concentrations assessed in the present study, allowed hematological and biochemical values to be obtained, corroborating the results of studies carried out in yellow-blotched map turtles (*Graptemys flavimaculata*) (Martinez-Jimenez et al. 2007). Other studies have reinforced the applicability of the use of EDTA for several species, in particular reptiles (Hattingh 1975, Marks & Citino 1990, Salakij et al. 2002, Bogan et al. 2020).

There was a trend towards higher hematocrit values with the use of EDTA in relation to heparin, indicating good cell preservation. It was therefore found that the use of different anticoagulants did not alter most blood parameters. The hematocrit values of *P. unifilis* in the present study using sodium and potassium EDTA were similar to those reported by Bogan et al. (2020) for the eastern indigo snake *Drymarchon couperi*, using tripotassic EDTA. However, it was lower than that reported by Andrade (2008) for *P. unifilis* in captivity, and by Tavares-Dias et al. (2012) for *P. unifilis* from the Abufari biological reserve (Amazon State, Brazil). In addition, both studies used heparin as an anticoagulant.

The hemoglobin concentration of *P. unifilis* in the present study did not differ with the use of different anticoagulants, corroborating previous studies with animals of the same species kept in captivity and under good cultivation conditions (Tavares-Dias et al. 2009). However, the number of total erythrocytes was lower with the use of heparin than with the use of K₃EDTA 5%. Alves (2013) also reported an increase in the number of total erythrocytes in *Trachemys scripta* with the use of K₃EDTA as an anticoagulant. However, Muro et al. (1998) observed a reduction in the number of erythrocytes in *Testudo hermanni*, also with the use of K₃EDTA 5%, in comparison with the use of lithium heparin. In contrast, such differences were not observed in studies with macaws and pythons (Harr et al. 2005). Ishikawa et al. (2010) showed the efficiency of the anticoagulant Na₂EDTA 3% in hybrid catfish, known as surubim (*P. reticulatum* x *P. corruscans*). Thus, such results demonstrate the importance of knowledge about the most suitable anticoagulant for use in each species, due to their peculiarities and specificities.

In *P. unifilis*, MCV was lower with the use of Na₂EDTA 3% than with the use of heparin, Na₂EDTA 5% and K₃EDTA 3%. However, MCV from the present study, when using these different anticoagulants, showed reduced value than those reported for wild yellow-spotted amazon river turtle obtained with heparin (Oliveira-Júnior et al.

2009, Tavares-Dias et al. 2012). This reduction in MCV may be due to osmotic crenation in erythrocytes when blood is collected with high concentrations (7.2 mg mL^{-1} e 14.4 mg mL^{-1}) of EDTA (Oliveira et al. 2010).

Total plasma protein concentrations were not influenced by the use of different anticoagulants in *P. unifilis*. Similarly, the levels of total plasma proteins of hybrid surubim were not influenced by the use of heparin or Na_2EDTA in different concentrations of 3, 5 and 10% (Ishikawa et al. 2010). However, Oliveira et al. (2015) reported that EDTA 5 and 10% were not efficient, and caused a reduction in total plasma proteins, as the coagulation process includes protein retention, reducing its amount in plasma.

Different solutions of P. unifilis for total erythrocytes count

The total erythrocyte count in *P. unifilis*, using methodologies applied to fish (Tavares-Dias et al. 2002, Walencik & Witeska 2007, Ranzani-Paiva et al. 2013), makes the determination imprecise of this parameter for this species of chelonian. However, such evaluations are necessary to investigate whether the use of the formaldehyde-citrate reagent with toluidine blue dye could be the cause of the considerable reduction in these cells number during counting. We therefore sought to evaluate the disassociation of some reagents from the complete solution, as a means of identifying which component was causing damage to the cells and making them difficult to determine. The lack of information on this theme makes the present study necessary, as it aims to elucidate which methodology and reactive solutions are suitable for the yellow-spotted amazon river turtle.

With solutions E and F it was only possible to visualize the erythrocytes at the time of blood collection, and they could not be seen 24 hours after blood collection due to the large number of lysed cells. Of these two solutions, solution F exhibited an extremely low erythrocyte count number, the lowest among all the solutions evaluated. The possible cause of the hemolysis that occurred in a short period of time with the use of solution F is presumed to be due to the absence of sodium citrate in the composition, even considering that citrate is widely used in blood clotting time tests.

The use of solution A (sodium chloride), with samples preserved under refrigeration, revealed that the *P. unifilis* erythrocytes can be counted up to a maximum of 48 hours without significant changes in numbers, and after this period there is a considerable reduction, with secure determination not guaranteed. Radisic et al. (2020) observed greater osmotic fragility in sodium chloride concentrates of under 0.38%, causing hemolysis in 50% of samples from sea turtles, *Caretta caretta* e *Chelonia mydas*. The use of the crystal violet method for counting erythrocytes with dilution in 0.45% sodium chloride solution enabled the erythrocyte nuclei of slider turtles *Trachemys scripta*

to be stained, allowing the differentiation and proper distinguishing of erythrocytes from other cells, such as lymphocytes, thrombocytes and granulocytes (Tsai et al. 2014).

Solution C revealed problems in the counts performed after 96 hours of collection, although with less damage than was observed with the use of solutions E and F. Thus, solutions B and D proved more suitable for counting the erythrocytes of *P. unifilis*. It is notable that both solutions B and D were prepared without the use of toluidine blue dye. When observing the counts obtained in the present study, mean values and standard deviation, and comparing the counts between these two reagents, it was found that the counts performed with solution D had a lower coefficient of variation and can be recommended as the first choice in hematological studies of this species of chelonian, *P. unifilis*. This solution was prepared with 1.9 g sodium citrate and 1.0 ml formaldehyde, for a total volume of 50 ml, completed with distilled water.

CONCLUSION

Blood samples from *P. unifilis* using EDTA (Na₂EDTA 3%, Na₂EDTA 5%, K₃EDTA 3%, K₃EDTA 5%) and sodium heparin (5000 I.U. mL⁻¹) prevented clotting within 10 hours of storage. However, an increased number of erythrocytes was observed with the use of K₃EDTA 5%. Therefore, we recommend that the heparin anticoagulants 5,000 I.U. mL⁻¹, Na₂EDTA 3%, Na₂EDTA 5%, K₃EDTA 3% are used in these hematological analyzes. We also recommend the use of a formaldehyde-citrate solution composed of 1.9 g of sodium citrate and 1.0 mL of formaldehyde in 50 mL of distilled water, when performing total erythrocyte counts in *P. unifilis*.

REFERENCES

- AGUIRRE, A.A., BALAZS, G.H., SPRAKER, T.R., GROSS, T.S. 1995. Adrenal and Hematological Responses to Stress in Juvenile Green Turtles (*Chelonia mydas*) with and without Fibropapillomas. *Physiol. Zool.*, 68(5): 831–854.
- ALHO, C.J.R. 1985. Conservation and management strategies for commonly exploited Amazonian turtles. *Biol. Conserv.*, 32(4): 291-298.
- ALVES, G.M. 2013. Efeitos dos anticoagulantes – citrato de sódio, EDTA-K₃ e heparina sódica nas análises hematimétricas e bioquímicas em Araras Canindé (*Ara ararauna*), Tigre d'água (*Trachemys scripta*) e Pacamãs (*Lophosilurus alexandri*). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

- ANDRADE, P.C.M. 2008. Criação e manejo de quelônios no Amazonas. Manaus, AM, Brasil: IBAMA, Pró-Várzea, v. 522.
- BOGAN-JR, J.E., ANTONIO F.B., ZACHARIAH T.T., STACY, N.I. 2020. Comparison of the Effects of Three Anticoagulants on Hematological Analytes in the Eastern Indigo Snake (*Drymarchon couperi*). J. Herpetol. Med. Surg, 30(2): 96-100.
- BURTIS, B. & BURNS, T. 2016. Tietz fundamentos de química clínica e diagnóstico molecular, 7 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, p.1726.
- COLLIER, H.B. 1944. Standardization of blood haemoglobin determinations. Can. Med. Assoc. J, 50(6): 550-552.
- COSTA, B.F., COSTA, R.M., BOLDRIN, M.A., NETO, E.P., FERREIRA JÚNIOR, P.D., DE DEUS SANTOS, M.R., LENZ, D. 2019. Plasma proteins and leukocyte kinetics of turtles (*Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848)) inoculated with inactivated *Escherichia coli*. Comp. Clin. Pathol, 29: 305–310.
- DE DEUS SANTOS, M.R., FERREIRA, L.S., BATISTOTE, C., GROSSMAN, A., BELLINI, C. 2009. Valores hematológicos de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) juvenis selvagens do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci, 46(6): 491-499.
- GILOR, S. & GILOR, C. 2011. Common laboratory artifacts caused by inappropriate sample collection and transport: how to get the most out of a sample. Top. Companion Anim. M, 26(2):109-118.
- GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., BROSIOUS, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. Am. J. Clin. Pathol, 56(1): 35-39.
- 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. Vet. Clin. Path, 34(4): 383-388.
- HATTINGH, J. & SMITH, E.M. 1976. Anticoagulants for avian and reptilian blood: heparin and EDTA. Pf. Arch. Eur. J. Phy, 363(3): 267-269.
- HATTINGH, J. 1975. Heparin and ethylenediamine tetra-acetate as anticoagulants for fish blood. Pf. Arch. Eur. J. Phy, v.355(4): 347-352.

- IBAMA. 2015. Instrução Normativa nº 07 de 30 de abril de 2015. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Instrucao_normativa/2015/in_ibama_07_2015_institui_categorias_uso_manejo_fauna_silvestre_cativeiro.pdf>. Acesso em 29 nov. 2020.
- ISHIKAWA, M.M., PADUA, S.B., SATAKE, F., HISANO, H., JERÔNIMO, G.T., MARTINS, M.L. 2010. Heparina e Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. Ciênc. Rural, 40(7): 1557-1561.
- JACOBSON, E.R. 1987. Reptiles. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, v.17, n.5, p. 1203-1225.
- 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 (*Struthio camelus*). Vet. Archiv, 77(5): 427-434.
- MAINWARING, G. & ROWLEY, A.F. 1985. The effect of anticoagulants on *Blennius pholis* L. leukocytes. Comp. Biochem. Phys, 80(1): 85-91.
- MARKS, S.K. & CITINO, S.B. 1990. Hematology and serum chemistry of the radiated tortoise (*Testudo radiata*). J. Zoo Wildlife Med, 21(3): 342-344.
- MARTINEZ-JIMENEZ, D., HERNANDEZ-DIVERS, S.J., FLOYD, T.M., BUSH, S., WILSON, H., LATIMER, K.S. 2007. Comparison of the effects of dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid and lithium heparin on hematologic values in yellow-blotched map turtles, *Graptemys flavimaculata*. J. Herpetol. Med. Surg, 17(2): 36-41.
- MURO, J., CUENCA, R., PASTOR, J., Vinas L, Lavin S. 1998. Effects of lithium heparin and tripotassium EDTA on hematologic values of Hermann's Tortoises (*Testudo hermanni*). J. Zoo. Wildlife Med, 29(1): 40-44.
- NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. Villanova, PA: NCCLS, vol. 24 n. 38, p.52.
- OLIVEIRA, A.C.D., RIBEIRO FILHO, J.D., GUIMARÃES, J.D., SILVA, A.R., DANTAS, W.D.M.F., BONFÁ, L.D.P., FARIAS, S.K.D. 2010. Concentração de anticoagulante, tempo e temperatura de armazenagem sobre os parâmetros hematológicos no hemograma automatizado. Ciênc. Rural, 40(12): 2521-2526.
- OLIVEIRA, A.T., SANTOS, M.Q.C., LEMOS J.R.G., PANTOJA-LIMA, J., ARIDE, P.H.R., TAVARES-DIAS M., MARCON, J.L. 2015. Comparison of the Effects of Anticoagulants Used in Blood Collection to Determine

- Blood Parameters of Free-Living Stingrays from the *Potamotrygon* genus (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). *Biota Amaz*, 5(3): 55-58.
- OLIVEIRA-JUNIOR, A.A., TAVARES-DIAS, M., MARCON, J.L. 2009. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Res. Vet. Sci*, 86(1): 146-151.
- OVIDO, C. & RODRÍGUEZ, J. 2003. EDTA: the chelating agent under environmental scrutiny. *Quim. Nova*, 26(6): 901-905.
- PERPIÑÁN, D., ARMSTRONG, D.L., DÓREA, F. 2010. Effect of anticoagulant and venipuncture site on hematology and serum chemistries of the spiny softshell turtle (*Apalone spinifera*). *J. Herpetol. Med. Surg*, 20(2-3): 74-78.
- PERPIÑÁN, D., HERNANDEZ-DIVERS, S.M., LATIMER, K.S., AKRE, T., HAGEN, C., BUHLMANN, K.A., HERNANDEZ-DIVERS, S.J. 2008. Hematology of the Pascagoula map turtle (*Graptemys gibbonsi*) and the southeast Asian box turtle (*Cuora amboinensis*). *J. Zoo Wildlife Med*, 39(3): 460-463.
- PEZZUTI, J.C.B., SILVA, D.F., KEMENES, A., GARCIA, M., PARALUPPI, N.D., MONJELÓ, L.A.S. 2008. Ecologia de Quelônios pelomedusídeos na Reserva Biológica do Abufari. In: ANDRADE PCM. (Ed.). Criação e Manejo de Quelônios no Amazonas. 2. ed. Ibama-ProVárzea, p. 127-173.
- POUGH, F.H., HEISER, J.B., JANIS, C.M. 2008. A vida dos vertebrados. 4.ed. São Paulo: Atheneu Editora. 684p.
- RADISIC, R., OWENS, S.D., MANIRE, C.A., MONTGOMERY, N., MADER, D., ZIRKELBACH, B., STACY, N.I. 2020. Red blood cell osmotic fragility in healthy loggerhead and green sea turtles. *J. Vet. Diagn. Invest*, 32(6): 908-911.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T., PÁDUA, S.B., TAVARES-DIAS, M., EGAMIM M.I. 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Eduem - UEM, Maringá, PR., Brasil.
- SABINO, A.J., TREVELIN, S.C., CIARLINI, P.C. 2010. Comparação do efeito do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e da heparina sobre os eritrócitos de avestruzes (*Struthio camelus* L.). *Rev. Ceres*, 57(3): 338-342.

- SALAKIJ, C., SALAKIJ, J., APIBAL, S., NARKKONG, N.A., CHANHOM, L., ROCHANAPAT, N. 2002. Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*). *Vet. Clin. Path*, 31(3): 116-126.
- TAVARES-DIAS, M., MELO, J.F.B., MORAES, G., MORAES, F.R.D. 2002. Características hematológicas de teleosteos brasileiros: IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciênc. Rural*, 32(4): 693-698.
- TAVARES-DIAS, M. & OLIVEIRA, S.R. 2009. A review of the blood coagulation system of fish. *Rev. Bras. Biociênc*, 7(2): 205-224.
- TAVARES-DIAS, M., OLIVEIRA-JUNIOR, A.A., SILVA, M.G., MARCON, J.L., BARCELLOS, J.F. 2009. Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the Amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Vet. Arhiv*, 79(6): 601-610.
- TAVARES-DIAS, M., SILVA, M.G., OLIVEIRA, A.T., OLIVEIRA-JUNIOR, A.A., MARCON, J.L. 2012. Propriedades do sangue de três espécies de quelônios do gênero *Podocnemis* de vida livre da Reserva Biológica do Abufari, baixo rio Purus, estado do Amazonas, Brasil. *Patologia e sanidade de organismos aquáticos*. 1ed. Maringá, Paraná: Massoni, v. 1, p. 195-220.
- TSAI, C.Y., YU, J.F., WANG, Y.W., FAN, P.C., CHENG, T.Y., WANG, L.C. 2014. An alternative staining method for counting red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*) blood cells using crystal violet in cells diluted with 0.45% sodium chloride. *J.Vet. Diagn. Invest*, 26(5): 610-615.
- WALENCIK, J. & WITESKA, M. 2007. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. Phys. C*, 146(3): 331-335.
- WINTROBE, M.M. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematol*, 51(32): 32-49.
- ZAR, J. H. 2010. *Biostatistical Analysis*. 5ed. Ed Hall P. New Jersey: Upper Saddle river, p. 944.

Table 1. Hematological variables and plasma concentrations (glucose, total proteins and albumin) of *Podocnemis unifilis* by the use of different anticoagulants: sodium heparin (5000 I.U. mL⁻¹), Na₂EDTA (3 e 5%) and K₃EDTA (3 e 5%).

Parameters	Sodium heparin	Na ₂ EDTA	Na ₂ EDTA	K ₃ EDTA	K ₃ EDTA
		3%	5%	3%	5%
Ht (%)	22.69±2.07 ^a	24.25±4.43 ^a	25.06±3.17 ^a	25.50±4.21 ^a	26.00±3.53 ^a
Hb (g dL ⁻¹)	7.13±0.73 ^a	7.19±1.47 ^a	7.53±0.79 ^a	7.35±1.38 ^a	7.23±1.19 ^a
RBC (x 10 ⁶ μL ⁻¹)	0.35±0.07 ^b	0.43±0.11 ^{ab}	0.38±0.04 ^{ab}	0.44±0.09 ^{ab}	0.49±0.09 ^a
VCM (fL)	632.87±84.70 ^a	424.21±111.15 ^b	631.84±78.20 ^a	633.60±106.55 ^a	495.45±114.07 ^{ab}
CHCM (g dL ⁻¹)	32.23±2.69 ^a	32.47±7.45 ^a	31.16±5.81 ^a	32.01±6.30 ^a	31.52±3.51 ^a
Glucose (mg dL ⁻¹)	37.95±7.31 ^a	42.76±9.42 ^a	35.59±7.94 ^a	36.00±7.69 ^a	39.70±8.80 ^a
Total protein (g dL ⁻¹)	3.54±0.35 ^a	3.69±0.55 ^a	3.57±0.44 ^a	3.85±0.29 ^a	3.69±0.34 ^a
Albumin (g dL ⁻¹)	1.31±0.26 ^a	1.33±0.20 ^a	1.48±0.13 ^a	1.46±0.12 ^a	1.49±0.19 ^a

Ht. Hematocrit; Hb. Hemoglobin concentration; RBC. Red blood cells count; MCV. Mean corpuscular volume; MCHC. Mean corpuscular hemoglobin concentration. Different lowercase letters in the same line mean statistical differences between treatments (p<0.05). ANOVA. test de Tukey.

Table 2. Different solutions evaluation for red blood cells count ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) in *Podocnemis unifilis* blood samples, performed at the time of blood collection (0h) and after 24, 48, 72, 96 and 120 hours.

	Solution A	Solution B	Solution C	Solution D	Solution E	Solution F
0h	100.00±48.99 ^{aAB}	112.00±64.19 ^{aAB}	62.00±16.43 ^{aAB}	130.00±23.45 ^{aAB}	138.00±73.96 ^{aA}	38.00±40.25 ^{aB}
24h	136.00±31.30 ^{aA}	128.00±58.05 ^{aA}	74.00±81.42 ^{aA}	120.00±43.01 ^{aA}	0.00±0.00 ^{bB}	0.00±0.00 ^{bB}
48h	158.00±57.62 ^{aA}	132.00±60.99 ^{aAB}	54.00±58.99 ^{aBC}	138.00±32.71 ^{aAB}	0.00±0.00 ^{bC}	0.00±0.00 ^{bC}
72h	82.00±45.50 ^{abAB}	92.00±32.71 ^{aAB}	38.00±41.47 ^{aBC}	112.00±31.14 ^{aA}	0.00±0.00 ^{bC}	0.00±0.00 ^{bC}
96h	16.00±35.78 ^{bB}	126.00±11.40 ^{aA}	0.00±0.00 ^{aB}	132.00±34.20 ^{aA}	0.00±0.00 ^{bB}	0.00±0.00 ^{bB}
120h	0.00±0.00 ^{bB}	140.00±14.14 ^{aA}	0.00±0.00 ^{aB}	120.00±42.43 ^{aA}	0.00±0.00 ^{bB}	0.00±0.00 ^{bB}


Different lowercase letters in the same column mean statistical differences between time of counts ($p < 0.05$). ANOVA, teste de Tukey. Different capital letters in the same line mean statistical differences between solutions ($p < 0.05$). ANOVA, teste de Tukey.

5. CONCLUSÕES

- Todas as cinco concentrações de anticoagulantes testadas *in vitro* apresentaram eficácia e preveniram a coagulação do sangue de tracajá em até 10 horas de armazenamento.
- Nenhuma das cinco concentrações de anticoagulantes testadas alteraram os níveis plasmáticos de glicose, proteínas totais e albumina de *P. unifilis*.
- Identificou-se o aumento do número de eritrócitos de tracajá com o uso do anticoagulante K₃EDTA 5%.
- O uso da heparina sódica 5000 U.I. mL⁻¹, Na₂EDTA 3%, Na₂EDTA 5%, K₃EDTA 3% são seguros e eficazes como anticoagulantes para testes hematológicos em *P. unifilis*.
- Recomenda-se o uso da solução de formol-citrato (1,9 g de citrato de sódio e 1,0 mL de formol para 50 mL de água destilada) na realização das contagens de eritrócitos totais em sangue de *P. unifilis*.

6. ANEXO

Comprovante de submissão do artigo ao periódico *Biota Neotropica*

 **Biota Neotropica**

[# Home](#)

[/ Author](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
Biota Neotropica

Manuscript ID
BN-2021-1235

Title
Anticoagulants and their effects on the hematological and biochemical parameters of Yellow-spotted amazon river turtle *Podocnemis unifilis* (Podocnemididae)

Authors
Furtado, Yuri
Monteiro, Crisziellem
Gonzales, Anai
Costa, Maria
Brasiliense, Alexandre
Yoshioka, Eliane

Date Submitted
03-May-2021

[Author Dashboard](#)

Biota Neotropica

03-May-2021

Dear Dr. Yoshioka:

Your manuscript entitled "Anticoagulants and their effects on the hematological and biochemical parameters of Yellow-spotted amazon river turtle *Podocnemis unifilis* (Podocnemididae)" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the *Biota Neotropica*.

Your manuscript ID is BN-2021-1235.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/bn-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/bn-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the *Biota Neotropica*.

Sincerely,
Biota Neotropica Editorial Office