

Valores de parâmetros hematológicos de amostras sanguíneas de bovinos analisadas em diferentes intervalos de tempo

Values of hematological parameters of bovine blood samples analyzed at different time intervals

Kaori Shibuya¹, Fábio Silva de Souza^{2*}, Raquel Silva Lisbôa³

Artigo

Resumo: Alterações nos valores dos constituintes celulares e bioquímicos sanguíneos, podem indicar precocemente a presença de uma patologia. A exatidão de um teste laboratorial, além de outros fatores, depende da qualidade da amostra fornecida para análise. O objetivo do presente estudo foi verificar a viabilidade de amostras sanguíneas coletadas de bovinos analisadas em diferentes intervalos de tempo e relatar as variações observadas nos valores dos parâmetros hematológicos. Foram utilizadas 10 amostras de sangue total de bovinos mestiços, refrigeradas (0-2°C), para a realização de quatro hemogramas em cada unidade amostral em espaços de tempo diferentes 2, 26, 52 e 74 horas após a coleta. Houve alterações nos valores de VG a partir de 26h, a contagem global dos eritrócitos foi o parâmetro que mais variou entre os diferentes tempos avaliados. A dosagem de hemoglobina teve um aumento na maioria das amostras nas análises após 2h, provavelmente, devido à ocorrência de hemólise. Também ocorreu aumento nos valores de VGM nos diferentes intervalos de tempo. Os resultados dos valores de PPT também se apresentaram alterados em 26h após a coleta. Já o fibrinogênio foi o parâmetro que permaneceu com valores mais estáveis nos diferentes tempos avaliados. Apenas nos períodos de 52h e 74h foram visualizadas alterações morfológicas nos leucócitos. Concluiu-se que não houve grande variação nos valores dos parâmetros avaliados entre os períodos de 2h e 26h, se as amostras forem conservadas adequadamente podem ser examinadas em até 24h.

Palavras chave: hemocomponentes, hemograma, ruminantes

Abstract. Changes in the values of biochemical and cellular blood constituents can indicate the presence of early pathology. The accuracy of a laboratory test depends, among other factors, on the quality of the sample provided for analysis. The aim of this study was to

verify the feasibility of collected blood samples from cattle analyzed at different time intervals and report the variations observed at the values of haematological parameters. Ten whole blood samples of crossbred cattle, refrigerated (0-2°C), to achieve four blood counts in each sample unit, in different time 2, 26, 52 and 74 hours after collection were used. There have been changes in the values of VG from 26h, the total count of erythrocytes was the parameter that most ranged between the different times evaluated. Hemoglobin was increased in most samples in the analysis after 2h, probably due to the occurrence of hemolysis. Also there was an increase in the values of MCV in different time intervals. The results of the values of TPP also demonstrated abnormal in 26h after collection. However, the fibrinogen was the parameter that remained with more stable values in the different times evaluated. Only in periods of 52h and 74h morphological changes were visualized in leukocytes. It was concluded that there was wide variation in the values of the parameters evaluated between periods of 2h and 26h, if samples are preserved properly can be examined within 24h.

Keywords: hemocomponents, hemogram, ruminants

*Autor para correspondência: E-mail: * mvfabiosouza@gmail.com

Recebido em 25.8.2018. Aceito em 30.12.2018

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20180046>

¹Médica Veterinária autônoma. Manaus, Amazonas - E-mail: kaorishibuya1@gmail.com

²Doutor. Docente do Curso de Medicina Veterinária. Centro Universitário Estácio da Amazônia. Boa Vista, Roraima –

³Fiscal Agropecuária. Agência de Defesa Agropecuária do Estado. Boa Vista, Roraima –
E-mail: raquel.silvalisboa@gmail.com

Introdução

O exame laboratorial do sangue é de grande valor na complementação do exame clínico da circulação, sendo muitas vezes até de importância diagnóstica decisiva. As alterações, acima ou abaixo do intervalo de normalidade da espécie, dos valores dos constituintes celulares e bioquímicos podem indicar precocemente a presença de uma patologia (DIRKSEN et al., 1993).

Para a correta interpretação do eritrograma, vários pesquisadores chegaram à conclusão de que os valores hematológicos devem ser regionais e de cada laboratório, pois são influenciados pela espécie animal, raça, sexo, idade, temperatura ambiente, altitude, nutrição, excitação do animal, gestação, puerpério, lactação e balanço hídrico (GOMES et al., 2010).

Para bovinos, as variações normais

na composição quantitativa e qualitativa do sangue podem ser determinadas por fatores intrínsecos, como raça, idade e sexo de cada animal e nas fêmeas, o estado gestacional, desmame e lactação (DIRKSEN et al., 1993).

Já, os fatores extrínsecos que influenciam, em menor ou maior grau, os parâmetros sanguíneos seriam: alimentação e manejo, assim como as condições de coleta (data, local e técnica) (DIRKSEN et al., 1993). Portanto, são vários os fatores que contribuem para a má qualidade das amostras hematológicas, dentre eles a pouca quantidade de sangue nos tubos de coleta, levando as amostras a serem obtidas com excesso de anticoagulante (OLIVEIRA et al., 2010). A necessidade de processar a amostra em menor tempo possível, desde a sua coleta, é um fator limitante, particularmente para o profissional do campo (LISBÔA et al., 2001).

O objetivo do presente estudo foi verificar a viabilidade de amostras sanguíneas coletadas de bovinos analisadas em diferentes intervalos de tempo e relatar as variações observadas nos valores dos parâmetros hematológicos.

Material e Métodos

Obtenção das Amostras de Sangue de Bovinos

As amostras de sangue de bovinos mestiços foram obtidas por meio de venopunção jugular e acondicionadas em tubos contendo anticoagulante EDTA. As amostras foram transportadas sob refrigeração e encaminhadas a um laboratório Veterinário de Análises Clínicas na cidade de Manaus, AM, para a realização de hemogramas.

Realização dos Hemogramas

Foram utilizadas dez amostras de sangue total de dez bovinos mestiços sendo identificados como animal 1 a 10 e então refrigeradas entre 0-2°C para a realização de quatro hemogramas por amostra em intervalos de tempo distintos padronizados em horas: 2h, 26h, 52h e 74h após a coleta. Cada amostra coletada foi dividida em duas alíquotas, sendo realizados dois hemogramas para cada alíquota, sendo uma utilizada para realização dos hemogramas referentes ao intervalo de 2h e 26h e a segunda alíquota para as análises de 52h e 74h.

Foram analisados os seguintes parâmetros hematológicos: determinação do volume globular (VG) e do fibrinogênio plasmático, efetuadas por meio do método do micro-hematócrito segundo metodologia descrita por Jain (1986); concentração de proteínas plasmáticas

totais (PPT), determinada por meio do método de refratometria (COLES, 1984); concentração de hemoglobina, dosada em analisador bioquímico semiautomático T-3000 VET (Tekna®); contagens de hemácias e leucócitos totais realizadas em hemocitômetro, com solução fisiológica e líquido de Turck, respectivamente.

A contagem de leucócitos foi realizada na diluição de 1/20 e a de eritrócitos na diluição de 1/200, utilizando a câmara de Neubauer. Foram contados os leucócitos dos quatro quadrantes dos cantos e os eritrócitos foram contados no quadrante central em $1/5$ de mm^3 (cinco subdivisões do retículo melhorado central da câmara de Neubauer). Os respectivos fatores de correção para as contagens totais de leucócitos e de eritrócitos foram o número de células contadas vezes 50 e 10.000, respectivamente, considerando-se a área contada, altura da câmara e diluição utilizada.

Por meio de fórmulas padronizadas foram calculados os seguintes índices de Wintrobe (1933): volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM).

Para acompanhar as alterações morfológicas das células foram realizados esfregaços sanguíneos de cada amostra em cada tempo pré-determinado e realizada a

verificação da morfologia celular. Os eritrócitos e leucócitos foram fotografados com câmera digital (Lumix Panasonic® DMC-FH5).

Resultados e Discussão

Os parâmetros avaliados nas dez amostras sanguíneas de bovinos foram VG, contagem global de eritrócitos, hemoglobina, VGM, CHGM, PPT, fibrinogênio e contagem global dos leucócitos. Sendo estas amostras avaliadas em intervalos de 2h, 26h, 52h e 74h após a coleta. Os valores dos resultados nas horas subsequentes sofreram alterações quando comparados com o primeiro exame.

Na inspeção visual as amostras de sangue não apresentaram alterações quanto ao aspecto quando armazenadas e analisadas no tempo pré-determinado. Todos os animais apresentaram valores dentro da normalidade para a espécie, com exceção do animal 5, cuja contagem global de leucócitos em 2h e 52h indicaram uma leucopenia discreta; e, ocorreu um aumento do número de leucócitos na contagem global do animal 10 em 74h.

Os valores dos parâmetros hematológicos obtidos nos hemogramas podem ser verificados nas Tabelas 1 a 5.

Os valores de VG, 26h após a coleta aumentaram em seis amostras, diminuíram em uma e mantiveram-se em

três; em 52h esses valores aumentaram em três amostras e mantiveram-se em sete; já em 74h após a coleta os valores aumentaram em sete e foram mantidos em três amostras.

Na avaliação da contagem global de eritrócitos, 2h após a coleta os valores diferiram entre as amostras, porém ainda dentro da normalidade para a espécie em questão. Após 26h os valores diminuíram, neste parâmetro, em quatro amostras e aumentaram nas outras seis amostras. Já no período de 52h a contagem aumentou em cinco amostras e diminuiu nas outras cinco; e, em 74h aumentou em duas, diminuiu em sete e manteve-se igual em

uma amostra. Este parâmetro foi o que mais variou entre os diferentes tempos.

Nas dosagens de hemoglobina realizadas após 26h, quando comparadas com a análise de 2h, ocorreu um aumento em oito amostras e uma diminuição em duas; na análise de 52h após a coleta aumentaram em três e mantiveram-se em sete; e, em 74h aumentaram em quatro, manteve-se em uma e diminuíram em cinco. Este parâmetro teve aumento na maioria das amostras, quando analisadas nos diferentes tempos, isto deve ter acontecido, provavelmente, devido à ocorrência de hemólise.

Tabela 1. Resultados dos parâmetros hematológicos de amostras sanguíneas dos animais 1 e 2 analisadas em diferentes intervalos de tempo (2h, 26h, 52h e 74h).

Parâmetros	ANIMAL 1				ANIMAL 2				Valores Padrão
	2h	26h	52h	74h	2h	26h	52h	74h	
VG	35	35	36	36	35	37	36	36	24 – 46%
Eritrócitos	9,1	9,7	5,8	9,0	5,2	4,7	6,7	5,5	5,0 - 10,0x10 ⁶ /µL
Hemoglobina	11,5	12,3	12,5	11,8	12, 1	12,6	12,5	7,2	8,0 - 15,0g/dL
VGM	38	36	62	40	67	78	54	65	40 – 60fL
CHGM	33	35	35	33	34	34	54	20	30 – 36g/dL
PPT	7,4	7,8	7,4	7,2	7,6	8,8	7,6	8,0	6,7 - 7,5g/dL
Fibrinogênio	200	800	200	<300	300	1.200	<30 0	<300	300 – 700mg/dL
Leucócitos	9.400	9.000	9.400	11.350	6.0 50	5.950	6.05 0	5.000	4.000 - 12.000x10 ³ mm ³

** VG- Volume globular; VGM- Volume globular médio; CHGM- Concentração da hemoglobina globular média; PPT- Proteína plasmática total.

Tabela 2. Resultados dos parâmetros hematológicos de amostras sanguíneas dos animais 3 e 4 analisadas em diferentes intervalos de tempo (2h, 26h, 52h e 74h).

Parâmetros	ANIMAL 3				ANIMAL 4				Valores Padrão
	2h	26h	52h	74h	2h	26h	52h	74h	
VG	33	33	33	33	31	32	33	33	24 – 46%
Eritrócitos	4,0	4,0	7,2	6,5	6,5	7,5	3,9	6,5	5,0 - 10,0x10 ⁶ /µL
Hemoglobina	9,7	10,8	10,2	10	10,5	10,9	10,5	10	8,0 - 15,0g/dL
VGM	82	82	46	51	48	43	85	50	40 – 60fL
CHGM	29	33	31	30	34	34	32	30	30 – 36g/dL
PPT	8,2	8,6	8,2	8,2	8,0	8,4	8	8,2	6,7 - 7,5g/dL
Fibrinogênio	<300	400	<300	200	<300	800	<300	<300	300 – 700mg/dL
Leucócitos	4.500	5.950	4.500	7.600	6.350	6.200	6.350	7.600	4.000 - 12.000x10 ³ mm ³

** VG- Volume globular; VGM- Volume globular médio; CHGM- Concentração da hemoglobina globular média; PPT- Proteína plasmática total.

Tabela 3. Resultados dos parâmetros hematológicos de amostras sanguíneas dos animais 5 e 6 analisadas em diferentes intervalos de tempo (2h, 26h, 52h e 74h).

Parâmetros	ANIMAL 5				ANIMAL 6				Valores Padrão
	2h	26h	52h	74h	2h	26h	52h	74h	
VG	32	33	32	33	28	33	28	28	24 – 46%
Eritrócitos	6,3	6,1	5,1	5,8	6,1	5,6	10,4	5,8	5,0 - 10,0x10 ⁶ /µL
Hemoglobina	10,1	15,3	10,1	10,2	8,6	14	8,6	8,5	8,0 - 15,0g/dL
VGM	51	54	63	57	46	59	27	48	40 – 60fL
CHGM	31	46	31	31	31	42	31	30	30 – 36g/dL
PPT	7,8	8,0	7,8	7,6	7,0	7,4	7,0	7,0	6,7 - 7,5g/dL
Fibrinogênio	400	1000	400	400	400	<300	400	400	300 – 700mg/dL
Leucócitos	3.850	5.850	3.850	7.300	11.900	10.900	11.900	11.000	4.000 - 12.000x10 ³ mm ³

** VG- Volume globular; VGM- Volume globular médio; CHGM- Concentração da hemoglobina globular média; PPT- Proteína plasmática total.

Tabela 4. Resultados dos parâmetros hematológicos de amostras sanguíneas dos animais 7 e 8 analisadas em diferentes intervalos de tempo (2h, 26h, 52h e 74h).

Parâmetros	ANIMAL 7				ANIMAL 8				Valores Padrão
	2h	26h	52h	74h	2h	26h	52h	74h	
VG	29	30	29	30	33	34	33	33	24 – 46%
Eritrócitos	5,4	5,8	6,5	3,3	6,9	8,6	6,6	6,8	5,0 - 10,0x10 ⁶ /μL
Hemoglobina	14,2	10,3	14,2	10,3	11,3	11,2	11,3	10,8	8,0 - 15,0g/dL
VGM	54	52	45	91	48	39	50	48	40 – 60fL
CHGM	49	34	49	34	34	33	34	33	30 – 36g/dL
PPT	7,6	8,0	7,6	7,6	6,8	7,0	6,8	7,0	6,7 - 7,5g/dL
Fibrinogênio	400	<300	400	400	400	400	400	600	300 – 700mg/dL
Leucócitos	8.250	9.800	8.250	12.800	9.400	10.950	9.400	12.700	4.000 - 12.000x10 ³ mm ³

** VG- Volume globular; VGM- Volume globular médio; CHGM- Concentração da hemoglobina globular média; PPT- Proteína plasmática total.

Tabela 5. Resultados dos parâmetros hematológicos de amostras sanguíneas dos animais 9 e 10 analisadas em diferentes intervalos de tempo (2h, 26h, 52h e 74h).

Parâmetros	ANIMAL 9				ANIMAL 10				Valores Padrão
	2h	26h	52h	74h	2h	26h	52h	74h	
VG	42	39	42	43	36	36	36	37	24 – 46%
Eritrócitos	8,0	7,4	6,4	7,4	9,1	9,1	9,2	8,6	5,0 - 10,0x10 ⁶ /μL
Hemoglobina	14,3	14,8	14,3	14,5	11,8	12,2	11,8	11,8	8,0 - 15,0g/dL
VGM	52	53	66	58	39	39	39	43	40 – 60fL
CHGM	34	38	34	34	32	34	33	32	30 – 36g/dL
PPT	6,8	6,8	6,8	6,8	7,6	7,4	7,6	7,8	6,7 - 7,5g/dL
Fibrinogênio	200	<300	<300	400	<300	<300	<300	400	300 – 700mg/dL
Leucócitos	9.200	7.750	9.200	9.200	6.150	11.650	6.150	13.150	4.000 - 12.000x10 ³ mm ³

** VG- Volume globular; VGM- Volume globular médio; CHGM- Concentração da hemoglobina globular média; PPT- Proteína plasmática total.

Foi observado que os valores de VG e da hemoglobina aumentaram na maior parte das amostras, diferente dos resultados do trabalho de Júnior Dias (1986), onde esses mesmos parâmetros analisados em amostras de bovinos

mantidas na temperatura de 5°C diminuíram.

O aumento dos valores de VGM nos diferentes intervalos de tempo deveu-se ao fato de que a quantidade de eritrócitos diminuiu mais rapidamente em

relação ao VG e a hemoglobina, pois tais parâmetros hematológicos são utilizados para os cálculos do referido índice globular, enquanto que, para o cálculo da CHGM onde se utiliza da concentração de hemoglobina e VG, os valores encontrados não sofreram alterações significativas para o período de tempo estudado. Os resultados dos valores de PPT, nas 2h e 52h foram iguais e nas 26h foram maiores que em 74h. O fibrinogênio foi o parâmetro que permaneceu com valores mais estáveis nos diferentes tempos avaliados.

Nas 26h após a coleta, a maioria dos resultados não variaram muito, similar às observações realizadas por Dalanhhol et al. (2009) onde verificaram que em sangues conservados a 4°C, não houve mudanças no VG e VGM, nas primeiras 24 horas. As demais alterações também são mais lentas a essa temperatura, de modo que o sangue pode ser guardado de um dia para o outro no refrigerador, desde que não sofra congelamento.

O valor de VGM aumentou em quatro amostras nas primeiras 26h neste trabalho, diferindo do trabalho de Oliveira et al. (2010) que nas primeiras 12h, este parâmetro apresentou diminuição.

No presente estudo, os valores de VG e PPT aumentaram na maioria das amostras e a contagem global dos

leucócitos aumentou em cinco amostras e diminuiu nas outras cinco em 26h. Estes resultados diferiram dos resultados de Franco et al. (2007) onde os valores de VG, PPT e leucócitos diminuíram em 24 horas.

Nos resultados obtidos por Júnior Dias (1986), a CHGM foi o parâmetro que apresentou diferença entre as amostras refrigeradas, o que não foi observado neste estudo.

Uma observação interessante, obtida a partir deste estudo, foi que os resultados dos valores da maioria dos parâmetros analisados foram iguais nas análises de 2h e 52h, com exceção das contagens de eritrócitos que variaram muito. Suspeita-se que este acontecimento se deva à permanência da segunda alíquota em repouso na geladeira. Porém, mais experimentos devem ser realizados para confirmação ou rejeição desta hipótese.

Nas Figuras 1 a 4 estão apresentadas células dos esfregaços sanguíneos de um mesmo animal (animal 2) nos quatro diferentes tempos para verificação da presença de alterações em sua morfologia. Nas 2h e 26h após a coleta os eritrócitos e os leucócitos não apresentaram alterações morfológicas. Já nos períodos de 52h e 74h foram visualizadas alterações, como exemplo nos neutrófilos, que apresentaram vacuolização

citoplasmática e tumefação nuclear, devido à perda do padrão da cromatina. Os monócitos apresentaram vacúolos no citoplasma, os linfócitos halo mais claro ao redor do núcleo e as hemácias apresentaram-se aglomeradas e com aspecto alterado. Essas alterações morfológicas apresentadas pelos leucócitos no período de 52h e 74h após a coleta foram semelhantes ao observado por DALANHOL et al. (2009).

Segundo estes autores, vários neutrófilos são afetados, o núcleo cora-se mais homoganeamente, os lobos nucleares separam-se, a margem citoplasmática torna-se franjada ou imprecisa e surgem pequenos vacúolos citoplasmáticos.

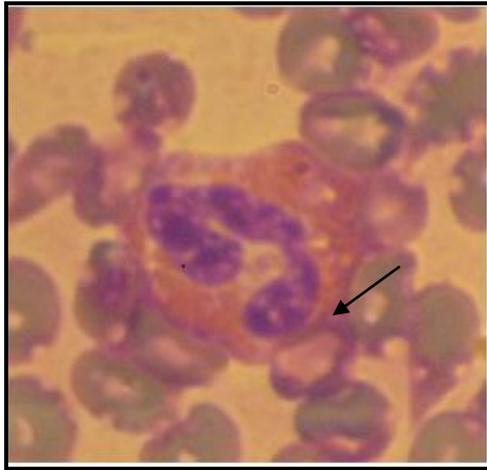
A contagem de leucócitos pode diminuir muito se houver excesso de EDTA, por diluição da amostra sanguínea.

As alterações degenerativas nos leucócitos afetarão muito as contagens diferenciais, mas a conservação a 4°C previne significativamente esse problema ao menos até 24 horas.

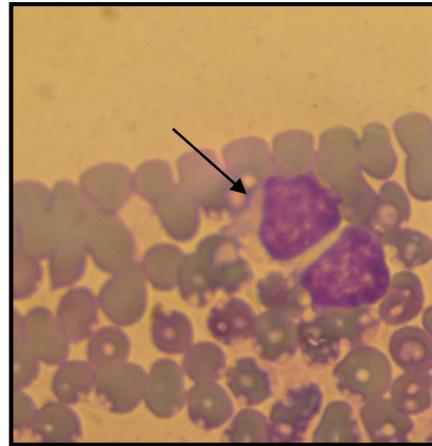
Enquanto que, Oliveira et al. (2010) mencionaram que a concentração de EDTA e o tempo de armazenagem não influenciaram os resultados da contagem de leucócitos, nem houve interação entre eles ou deles com a temperatura de conservação em seu estudo.

Como ocorreram variações dos resultados obtidos nos valores dos diferentes parâmetros, como diminuição ou aumento, quando comparados entre os tempos analisados (citando como exemplo o animal 1 que no período de 52h o resultado da contagem de eritrócitos teve uma diminuição quando comparada com os outros tempos), suspeita-se que essa variação em alguns valores pode ter acontecido devido à possibilidade de erros nas técnicas, pois a realização dos hemogramas não foi de forma automatizada aumentando a probabilidade de erros. Sugere-se a repetição do experimento com duplicatas, além da avaliação de amostras com outros intervalos de tempo.

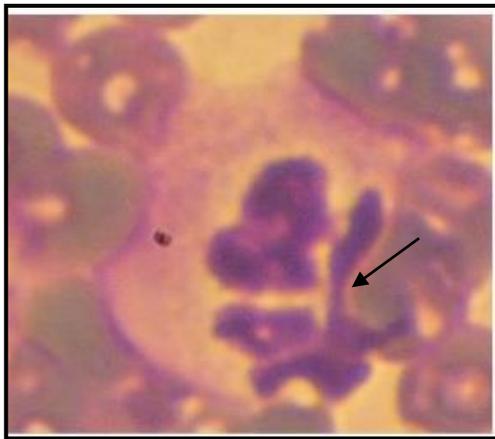
Figura 1. Imagens demonstrando a morfologia dos eritrócitos e dos leucócitos no tempo de análise de 2h (setas).



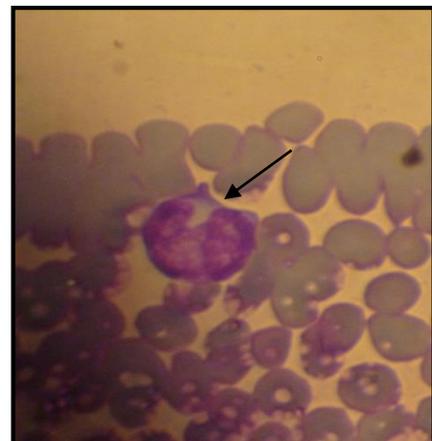
Eosinófilo



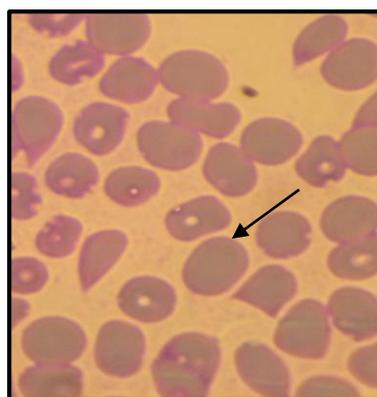
Linfócitos



Neutrófilo

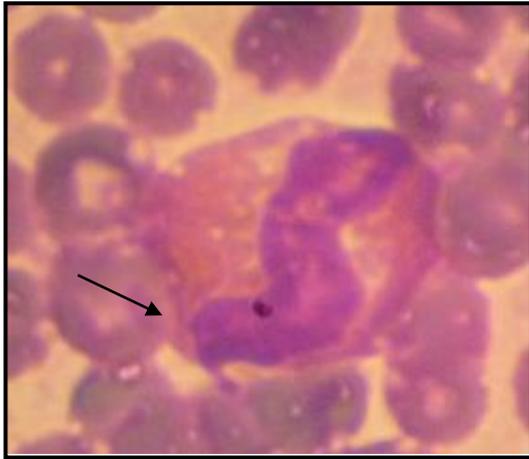


Monócito

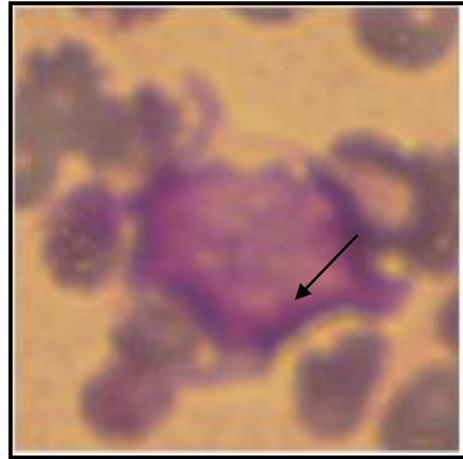


Eritrócitos

Figura 2. Imagens demonstrando a morfologia dos eritrócitos e dos leucócitos no tempo de análise de 26h (setas).



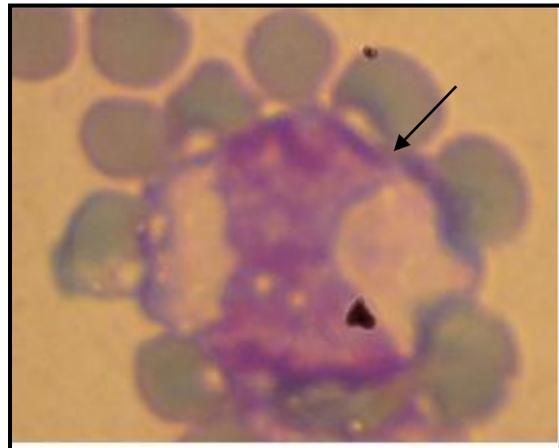
Eosinófilo



Linfócito



Neutrófilos



Monócito

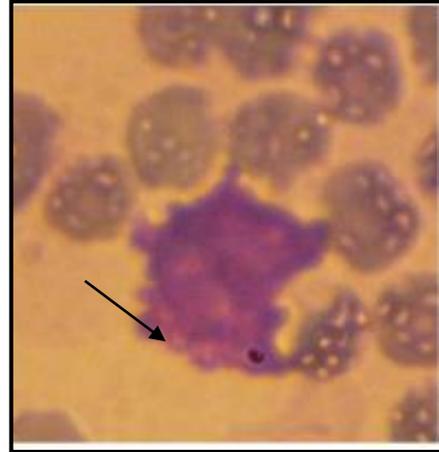


Eritrócitos

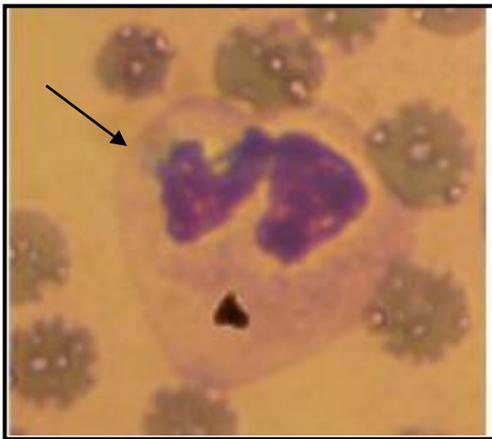
Figura 3. Imagens demonstrando a morfologia dos eritrócitos e de células brancas no tempo de análise de 52h (setas).



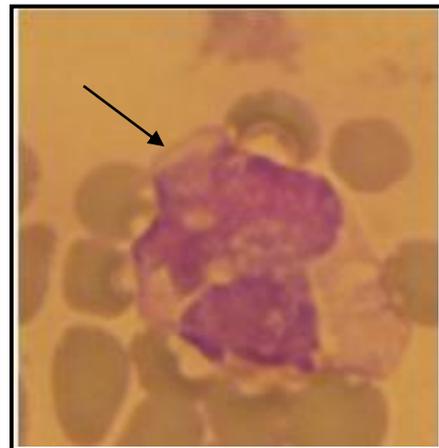
Eosinófilo



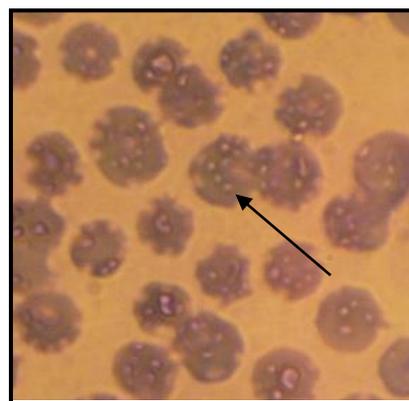
Linfócito



Neutrófilo

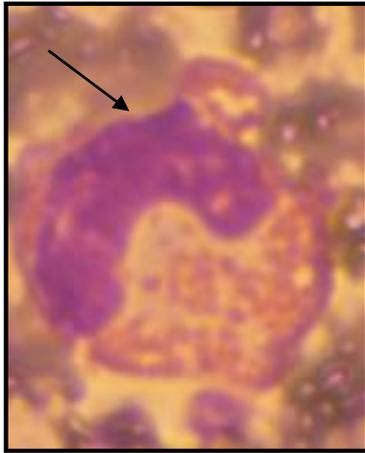


Monócito

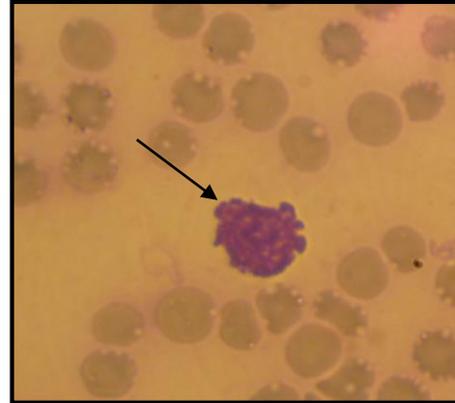


Eritrócitos

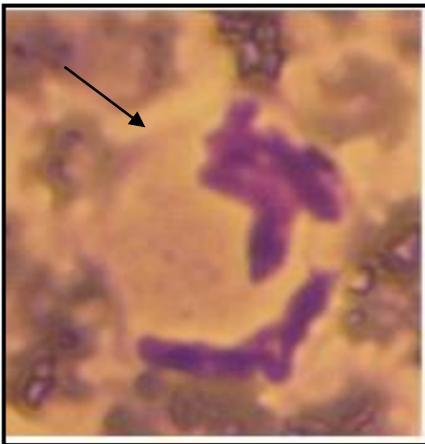
Figura 4. Imagens demonstrando a morfologia dos eritrócitos e de células brancas no tempo de análise de 74h (setas).



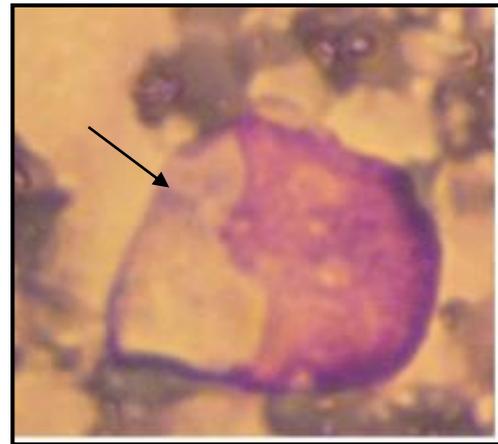
Eosinófilo



Linfócito



Neutrófilo



Monócito



Eritrócitos

Conclusões

Os resultados dos parâmetros avaliados na análise de 2h encontraram-se dentro dos valores de normalidade para a espécie.

Após a análise no tempo de 2h os valores das contagens de eritrócitos foram os que mais variaram. Não houve grande variação nos valores dos parâmetros avaliados entre os períodos de 2h e 26h. Os resultados dos valores da maioria dos parâmetros analisados foram iguais nas análises de 2h e 52h.

Os parâmetros avaliados nas amostras sanguíneas mantiveram-se com valores próximos, ocorrendo alterações na contagem global de leucócitos no período de análise de 52h e 74h. A divisão das alíquotas pode ter sido um fator influenciador no padrão dos resultados. As amostras de sangue de bovinos destinadas a exame laboratorial, se conservadas a temperatura adequada, podem ser examinadas até 24h.

Referências Bibliográficas

1. COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. 566 p.
2. DALANHOL, M.; BARROS, M.; MAZUCHELLI, J.; SILVA, P.H.; HASHIMOTO, Y.; LARGURA, A. Efeitos da estocagem de sangue periférico nas determinações do hemograma automatizado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 2009.
3. DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D; STÖBER, M. **Exame Clínico dos Bovinos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419 p.
4. FRANCO, D.F.; NEGRI, D.; REMUSKA, R.D.; ALVES, M.L.; SACCO, S.R. Alterações no hemograma de cães causadas pela refrigeração da amostra. **Revista Científica eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 8, 2007.
5. GOMES, V.; MOURA, J.A.; MADUREIRA, K.M.; BAPTISTELLA, F.; BLAGITZ, M.G.; BENESI, F. Valores de referência e influência da idade no eritrograma de bubalinos da raça murrhah. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 301-304, 2010.
6. JAIN, N.C. The eosinophils. In: JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, cap. 27, p. 731-755, 1986.
7. JÚNIOR DIAS, R.F. Alterações do eritrograma de bovinos em relação ao tempo e temperatura pós-colheita das amostras de sangue. **Semina**, v. 7, p. 10-17, 1986.
8. LISBÔA, J.A.N.; BENESI, F.J.; MARUTA, C.A.; MIRANDOLA, R.M.S.; TEIXEIRA, C. M.C. Tempo de viabilidade de amostras de sangue venoso bovino destinadas ao exame hemasogástrico, quando mantidos sob conservação em água gelada. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 271-286, 2001.
9. OLIVEIRA, A.C.; FILHO RIBEIRO, J.D.; GUIMARÃES, J.D.; SILVA, A.R.; DANTAS, W.M.F.; BONFÁ, L.P.; FARIAS, S.K. Concentração de anticoagulante, tempo e temperatura de armazenamento sobre os parâmetros hematológicos no hemograma automatizado. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2521-2526, 2010.
11. SIMON, C.F.; FISCHER, C.B.D.; SILVEIRA, F.; ALLGAYER, M.C. Patologia clínica: colheita, conservação e remessa de amostras. **Veterinária em Foco**, v. 4, n. 2, p. 131-141, 2007.

12. WINTROBE, M.M. Variations in the size and hemoglobin content of eritrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica. Internationales Magazin fur Slutforschung**, v. 51, p. 31, 1933.

