

## FRAGILIDADE OSMÓTICA DOS ERITRÓCITOS DE BOVINOS DAS RAÇAS HOLANDESA, GIROLANDO E GIR, CRIADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO

### ERYTHROCYTE OSMOTIC FRAGILITY OF BOVINE OF HOLSTEIN, GIR/HOLSTEIN CROSSBREED AND GIR BREEDS, RAISED IN THE STATE OF SÃO PAULO - BRAZIL

Valéria Aparecida Caobianco Sant'Ana<sup>1</sup> Eduardo Harry Birgel<sup>2</sup> Gerson Barreto Mourão<sup>3</sup>  
Regina Mieke Sakata Mirandola<sup>4</sup>

#### RESUMO

Foi estudada a fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE) de bovinos das raças Holandesa, Girolando e Gir, criados no Estado de São Paulo, objetivando estabelecer os valores padrões de referência e determinar a influência de fatores raciais. Para isso, examinaram-se amostras de sangue de 210 fêmeas, 70 de cada raça. As amostras foram colhidas em 18 propriedades produtoras de leite, em condições semelhantes de manejo e de alimentação. Os resultados demonstraram significativas diferenças ( $p < 0,05$ ) entre as três raças estudadas, sendo animais da raça Holandesa aqueles que apresentaram hemácias mais frágeis e os da raça Gir as mais resistentes; os híbridos da raça Girolando apresentaram valores intermediários. Os resultados foram distribuídos em gráficos e apresentados numericamente, em termos de 5, 50 e 95% de hemólise.

**Palavras-chave:** fragilidade osmótica, eritrócito, bovino, raças.

#### SUMMARY

The erythrocyte osmotic fragility (EOF) of bovine of Holstein, Gir/Holstein crossbreed and Gir breeds was studied, raised in the State of São Paulo/Brazil with the aim of establishing standard values of reference and determining the influence of breeding factors. In order to do this, the blood samples of 210 females, 70 of each breed were examined. The samples were collect from 18 milk producing establishments, under similar handling and feeding conditions. The results demonstrated significant differences ( $p < 0.05$ ) among the three studied breeds, the Holstein animals being the breed that presented the most fragile erythrocytes and those of the Gir breed the most resistant; the hybrids of the Gir/Holstein crossbreed presented intermediate values. The results were distributed in graphics and resented, numerically, in terms of 5, 50 and 95% of haemolysis.

**Key words:** erythrocyte osmotic fragility, bovine, breeds.

#### INTRODUÇÃO

O teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE) foi definido como sendo uma das formas de medir a variação da resistência dos glóbulos vermelhos à hemólise, quando essas células eram expostas à ação de soluções salinas hipotônicas. A utilização dessa prova em hematologia clínica permitiu que fossem observadas variações dos resultados em enfermidades como algumas formas de anemia, alterações metabólicas ou carenciais e na avaliação da ação de algumas drogas sobre o sistema hematopoético. Para melhor avaliação da FOE, os resultados deveriam ser representados em gráficos, nos quais a porcentagem de hemólise distribuía-se no eixo das ordenadas, e as concentrações das soluções hipotônicas de NaCl no eixo das abscissas, resultando numa curva sigmóide que representava a distribuição da frequência acumulativa da fragilidade osmótica dos eritrócitos, numa população de células normais (PONDER, 1948) ou através da curva derivativa, idealizada por PERK *et al.* (1964). A representação dos resultados da FOE, também poderá ser representada pelo conceito de “incremento hemolítico” e determinaria

<sup>1</sup>Mestre. Curso de Pós graduação de Clínica Veterinária, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ). Universidade de São Paulo (USP). Rua. Judite França Costa, 183, 05592-040, São Paulo, SP. E-mail: vsant\_ana@hotmail.com. Autor para correspondência.

<sup>2</sup>Professor Titular, Departamento de Clínica Médica, FMVZ, USP.

<sup>3</sup>Professor, Mestre, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Metodista.

<sup>4</sup>Técnica Nível Superior, Departamento de Clínica Médica, FMVZ USP.

a quantidade adicional de hemólise em tubos consecutivos de solução salina de concentrações diferentes. A apreciação e comparação dos resultados poderiam, também, serem feitas pelos valores numéricos, representando a concentração da solução salina em que houve a hemólise mínima (5%), hemólise máxima (95%) ou a fragilidade osmótica média das hemácias, momento em que ocorria hemólise de 50% dessas células (SUESS *et al.*, 1948).

Na literatura pertinente à hematologia clínica veterinária, observou-se um pequeno número de pesquisas sobre fragilidade osmótica dos eritrócitos, particularmente em bovinos. Na literatura especializada brasileira, a situação revelou-se mais grave, não havendo citações referentes à determinação de valores e curvas padrões de referência para animais domésticos criados em condições de manejo e ambiente peculiares à pecuária brasileira. Esses fatos motivaram o objetivo desta pesquisa: estabelecer padrões de referência para FOE em taurinos e zebuínos, das raças Holandesa, Girolando e Gir, criados no Estado de São Paulo.

Na literatura compulsada puderam ser destacados trabalhos pioneiros que estabeleceram valores de referência para a fragilidade osmótica dos eritrócitos de bovinos (Lyon, 1918 apud SCARBOUROUGH (1931) e SOLIMAN & AMROUSI, 1966). Na década de 70 foram realizados testes de avaliação da fragilidade osmótica dos eritrócitos em zebuínos adultos e saudáveis, obtendo como resultados médios, hemólises em soluções cujas concentrações variavam entre  $0,68 \pm 0,00\text{g/dl}$  e  $0,45 \pm 0,01\text{g/dl}$  de NaCl, respectivamente, para FOE mínima e máxima (PILLAI *et al.*, 1976). OLUSANYA & ADEPOJU (1979) demonstraram em zebuínos adultos a seguinte variação dos resultados (valores expressos em g/dl de NaCl): fragilidade mínima (5% de hemólise)  $0,55 \pm 0,03$ ; fragilidade máxima (95% de hemólise)  $0,35 \pm 0,05$ . A seguir, BINDER & MATHOIS (1986) realizaram o teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos em amostras sanguíneas colhidas de 80 vacas sadias, observando que o resultado era melhor representado pela concentração de NaCl em que ocorria 50% de hemólise; os valores obtidos variaram entre 0,49 e  $0,71\text{g/dl}$  de NaCl.

Os resultados do teste de FOE podem sofrer influências de vários fatores de variabilidade, como volume, diâmetro e deformabilidade do eritrócito (JAIN, 1993), temperatura e pH das soluções utilizadas no teste (PARPART *et al.*, 1947; OYEWALE, 1992) e fatores etários (PERK *et al.*, 1964), além das variações conseqüentes a inúmeras enfermidades (JAIN, 1986).

Na análise da literatura compulsada, destacou-se a verificação da influência de fatores relacionados à espécie e à raça dos animais, pois PERK *et al.* (1964) e COLDMAN *et al.* (1969) vislumbraram a possibilidade de fatores de variabilidade relacionados às espécies animais e suas raças atuarem sobre a FOE. Estes autores estabeleceram curvas acumulativas e derivativas da FOE em várias espécies de animais domésticos ou de uso em laboratórios de pesquisa, bem como determinaram os valores médios para hemólise mínima e máxima de indivíduos jovens e adultos dessas espécies animais.

Em 1988, FAIRLEY *et al.* realizaram pesquisa comparando os resultados de diversos parâmetros hematológicos de duas raças de cabras, incluindo entre eles o teste de FOE. Para esse parâmetro hematológico, verificaram que as cabras da raça Pygmy apresentavam hemácias significativamente mais frágeis do que de animais da raça Toggenburg.

Em São Paulo, AYRES *et al.* (1997) avaliaram a FOE em bovinos da raça Holandesa e zebuínos da raça Nelore, adultos e saudáveis, observando que os animais da raça Holandesa possuíam hemácias mais frágeis do que as dos zebuínos da raça Nelore.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o estabelecimento dos valores padrões de referência para o teste de fragilidade osmótica eritrocitária de bovinos das raças Gir, Girolando e Holandesa, criados no Estado de São Paulo, colheram-se amostras de sangue de 210 bovinos, do sexo feminino, sendo 70 de cada uma das referidas raças, com idade variando de 1 dia a 108 meses, clinicamente sadios e criados no Estado de São Paulo, em condições semelhantes de manejo e alimentação. Os bovinos que apresentaram valores hematológicos diferentes daqueles estabelecidos como padrão para as raças por TÁVORA (1997) não foram incluídos nos grupos experimentais, assim como aqueles que possuíam anticorpos contra antígenos do Vírus da Leucose dos Bovinos e da *Brucella abortus*.

As amostras de 5ml de sangue, para a realização das provas de fragilidade osmótica, foram colhidas por punção da veia jugular externa pelo sistema de colheita com aspiração por vácuo (sistema vacunteiner), utilizando-se, como anticoagulante o EDTA K<sub>3</sub>. As amostras de sangue, para o transporte da fazenda ao laboratório, foram acondicionadas em recipiente de isopor contendo gelo conservador artificial no seu interior, sendo as provas de fragilidade osmótica dos eritrócitos realizadas antes do decurso de 24 horas.

Os testes de fragilidade osmótica dos eritrócitos foram realizados segundo técnica descrita por JAIN (1986) a partir da diluição seqüencial de uma solução a 10% de cloreto de sódio, tamponada, com pH 7.4, segundo recomendações de PARPART *et al.* (1947).

A avaliação estatística foi definida segundo modelo de ajuste não linear, utilizando o programa para computador CurveExpert 1.3 (HYAMS, 1995). Para determinar a curva de FOE, utilizou-se uma função não linear conhecida por modelo de Harris (FARAZDAGHI & HARRIS, 1968), apresentada a seguir:  $y = 1/(a+bx^c)$ , onde  $y$  = porcentagem de hemólise;  $a$  = ponto de hemólise mínima;  $b$  = constante de integração;  $c$  = coeficiente da taxa de hemólise;  $x$  = concentração de NaCl.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do sistema SAS (SAS, 1995) pelo procedimento NLIN (não linear). Os parâmetros  $a$ ,  $b$  e  $c$  definidos no modelo de Harris apresentado foram estimados para todos os animais individualmente. A comparação de contrastes entre os parâmetros dos valores estimados de 5, 50 e 95% de hemólise pelo modelo de Harris, obtidos para a FOE, para os três grupos experimentais, formados por animais das raças de bovinos Holandesa, Girolando e Gir, foi realizada através de análise de variância, pelo método dos quadrados mínimos. As médias ajustadas permitiram a avaliação comparativa de contrastes através do teste de Tukey nos pontos estimados.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos nos testes de fragilidade osmótica dos eritrócitos realizados nas amostras de sangue circulante de bovinos das raças Holandesa, Girolando e Gir sadios, criados no Estado de São Paulo, formaram os grupos para estabelecer valores e curvas padrões de referência conforme demonstrados na tabela 1 e figuras a seguir.

Tabela 1 – Valores de referência da fragilidade osmótica dos eritrócitos de 210 fêmeas bovinas sadias das raças Holandesa, Girolando e Gir, criadas no Estado de São Paulo, expressos em termos de médias e desvios padrão das concentrações de NaCl em g/dl nas soluções e nos graus de hemólise.

| Raças     | Número de animais | Porcentagem de hemólise |               |               |
|-----------|-------------------|-------------------------|---------------|---------------|
|           |                   | 5                       | 50            | 95            |
| Holandesa | 70                | 0,72 ± 0,05a            | 0,61 ± 0,04a  | 0,51 ± 0,04a  |
| Girolando | 70                | 0,69 ± 0,05 b           | 0,57 ± 0,05 b | 0,47 ± 0,05 b |
| Gir       | 70                | 0,64 ± 0,05 c           | 0,51 ± 0,05 c | 0,42 ± 0,04 c |
| Geral     | 210               | 0,68 ± 0,05             | 0,56 ± 0,05   | 0,47 ± 0,04   |

NOTA: Médias ajustadas seguidas de mesma letra na coluna não apresentaram diferenças estatisticamente significante ( $P>0,05$ ), pelo teste de Tukey.

O ajuste das médias dos parâmetros obtidos para o teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos das 210 fêmeas bovinas sadias das raças Holandesa, Girolando e Gir, criadas no Estado de São Paulo permitiu configurar as curvas acumulativa e derivativa gerais ( $y$ ) em função da concentração de cloreto de sódio ( $x$ ) pelo do modelo de Harris,  $y=1/(0,0100+8,3790x^{11,5954})$ , onde o coeficiente de determinação da curva, ou seja o ajuste da curva foi 90% ( $R^2=0,90$ ) dos dados originais. As curvas gerais podem ser observadas na figura 1. As curvas derivativa e acumulativa apresentaram-se com os formatos clássicos das curvas de fragilidade osmótica dos eritrócitos.

A análise dos resultados apresentados na tabela 1 demonstrou que os valores médios para as porcentagens de hemólise do teste de FOE de 210 fêmeas bovinas sadias apresentaram diferenças estatisticamente significativas para as três raças estudadas, considerados os graus de 5, 50 e 95% de hemólise. As fêmeas bovinas da raça Holandesa apresentaram hemácias osmoticamente mais frágeis do que as das outras raças, sendo essas células dos zebuínos da raça Gir as mais resistentes à hemólise por ação da força osmótica de soluções de NaCl menos concentradas. Os animais híbridos destas duas espécies estudadas – *Bos taurus* e *Bos indicus*, da raça Girolando apresentaram resultados intermediários aos obtidos nas duas espécies de bovinos.

As curvas acumulativas e derivativas, representando o valor de referência da FOE para as fêmeas bovinas sadias das raças Holandesa, Girolando e Gir, criadas no Estado de São Paulo estão representadas na figura 2. A curva acumulativa para os animais da raça Holandesa foi delineada pela função  $y=1/0,0099+22,89x^{15,2018}$  e o coeficiente de determinação das curvas dos animais utilizados neste grupo foi 94% ( $R^2=0,94$ ). Para estabelecer as demais curvas padrões as funções ( $y$ ) e ajuste da curva ( $R^2$ ) foram, respectivamente, para os animais das raças Girolando e Gir:  $y=1/0,0100+12,14x^{12,4747}$  e  $R^2=0,92$ ;  $y=1/0,099+42,2731x^{12,3878}$  e  $R^2=0,99$ . Nessa figura 2, observou-se que as linhas representativas dos valores obtidos para os taurinos da raça Holandesa possuíam um maior platô de hemólise total e a curva acumulativa sofria declínio em concentrações mais elevadas, ou seja, mais próximas da concentração fisiológica indicando células osmoticamente mais frágeis. No entanto a linha representativa dos resultados obtidos para os zebuínos da raça Gir indicavam que a hemólise ocorria em soluções mais diluídas, demonstrando, assim, uma maior resistência

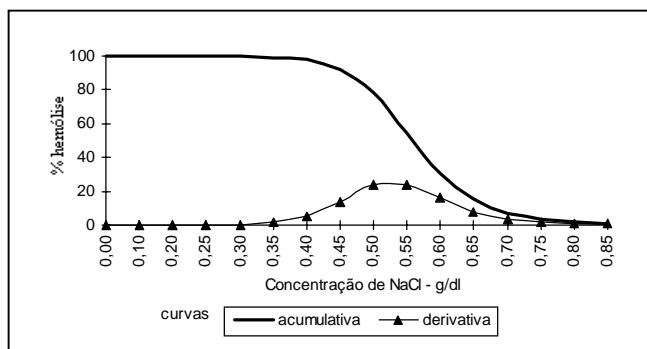


Figura 1 – Curvas acumulativa e derivativa da fragilidade osmótica dos eritrócitos de 210 fêmeas bovinas saudáveis, criadas no estado de São Paulo.

globular. Os animais híbridos da raça Girolando apresentaram resultados intermediários e, portanto, a linha representativa da curva acumulativa ficou entre as duas outras. O gráfico que ocupa a posição inferior da figura 2, representando as curvas derivativas das acumulativas demonstrou que a população utilizada neste experimento, por apresentar apenas um pico de hemólise, foi uniforme.

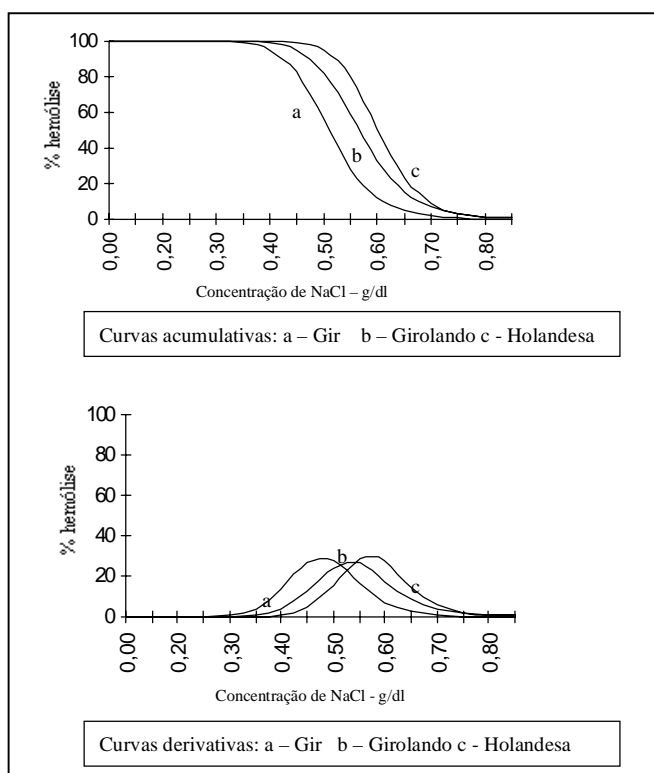


Figura 2 – Curvas padrão de referência acumulativas e derivativas da fragilidade osmótica dos eritrócitos de fêmeas bovinas saudáveis das raças Holandesa, Girolando e Gir, criadas no Estado de São Paulo.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que a FOE de bovinos criados no Estado de São Paulo variaram, apresentando diferenças estatisticamente significativas nas três raças de bovinos estudadas. Os resultados da influência de fatores raciais sobre os resultados da FOE permitiu a constituição de grupos experimentais homogêneos tanto para taurinos da raça Holandesa (*Bos taurus*) e zebuínos da raça Gir (*Bos indicus*), como para bovinos híbridos, da raça Girolando. Estes resultados demonstraram que as curvas acumulativas e derivativas construídas, com os referidos resultados para os três tipos raciais, foram semelhantes mas não iguais às definidas por PERK *et al.* (1964) e COLDMAN *et al.* (1969). Na presente pesquisa demonstraram-se diferenças significativas entre os resultados obtidos nos três grupos raciais estudados. O valor da fragilidade corpuscular média observado foi maior nos bovinos da raça Holandesa e menor nos zebuínos da raça Gir, ocupando os valores dos híbridos da raça Girolando posição intermediária. Tal verificação, de forma análoga, confirma outros parâmetros hematológicos dessas mesmas raças obtidos por TÁVORA (1997). Infelizmente, na literatura compulsada, foram encontrados poucos resultados de trabalhos assemelhados para serem feitas as devidas comparações, porém os resultados obtidos nesta pesquisa confirmaram aqueles encontrados por AYRES *et al.* (1997). Estes autores determinaram que maiores valores de concentração de NaCl, causavam maior hemólise nos taurinos da raça Holandesa ( $0,52 \pm 0,04\text{g/dl}$ ) do que nos zebuínos da raça Nelore ( $0,49 \pm 0,06\text{g/dl}$ ), ou seja, tais valores significaram que as hemácias dos taurinos da raça Holandesa eram osmoticamente mais frágeis do que as dos zebuínos. Na pesquisa realizada por FAIRLEY *et al.* (1988), que estudaram a FOE em duas raças de caprinos, demonstrou-se, também, diferenças significativas entre os resultados obtidos; esses autores atribuíram as diferenças observadas à composição da membrana do eritrócito.

Apesar da escassa literatura especializada referindo-se aos valores padrões de referência, em termos médios para populações homogêneas de bovinos, os resultados obtidos nesta pesquisa, para a hemólise inicial (5%) igual a  $0,68 \pm 0,05\text{g/dl}$ ; hemólise total (95%) –  $0,47 \pm 0,04\text{g/dl}$  e fragilidade corpuscular média (50%) –  $0,56 \pm$

0,05g/dℓ foram equivalentes aos determinados por LYON (1918) *apud* SCARBOUROGH (1931), em termos de hemólise inicial; aos apresentados por SOLIMAN & AMROUSI (1966) estabelecidos em vacas, com idades variando de dois a três anos de idade, porém sem especificação das raças; e por BINDER & MATHOIS (1986) que determinaram os valores de referência da FOE em 80 vacas sadias de quatro diferentes raças.

Os resultados para FOE obtidos nas amostras de sangue colhidas de zebuínos da raça Gir, na presente pesquisa, concordaram com os determinados por PILLAI *et al.* (1976), mas discordaram dos resultados referidos por OLUSANYA & ADEPOJU (1979) que estudaram a FOE em bovinos sem especificação do tipo racial e zebuínos da raça White Fulani.

Na presente pesquisa, optou-se por reportar os resultados, configurando-os em gráfico, ou destacando a concentração da solução hipotônica de cloreto de sódio que ocasionou determinadas porcentagens de hemólise. As figuras utilizadas representavam as curvas acumulativas e as curvas derivativas de hemólise, distribuídas em sistema de eixos cartesianos, sendo as concentrações de cloreto de sódio no eixo das ordenadas, e o das porcentagens de hemólise no eixo das abscissas, como já tinha sido referido por inúmeros autores (SOLIMAN & AMROUSI, 1966; PILLAI *et al.*, 1976; OLUSANYA & ADEPOJU, 1979; JAIN, 1986; FAIRLEY, 1988; OYEWALE, 1992; JAIN, 1993; AYRES *et al.*, 1997). Entretanto, a maneira de configurar os gráficos diferiu daqueles apresentados em pesquisas mais antigas, que utilizavam outros intervalos de hemólise no eixo das abscissas (PERK *et al.*, 1964; PONDER, 1948). Os gráficos apresentados na presente pesquisa não se assemelham aos apresentados em trabalhos mais recentes por fazerem a interseção dos eixos do sistema cartesiano nos pontos zeros da porcentagem de hemólise e das concentrações salinas hipotônicas, conseqüentemente, as curvas sigmóides resultantes diferiram de forma significativa: nesta pesquisa a curva sigmóide foi descendente e em várias outras pesquisas referidas na revisão bibliográfica ela foi ascendente (SUESS *et al.*, 1948; JAIN, 1993; FAIRLEY *et al.*, 1988). Tal decisão concordou com a de vários pesquisadores que optaram pela configuração de curvas de hemólise descendentes (COLDMAN *et al.*, 1969; OYEWALE, 1992).

Ainda, para a expressão dos resultados da FOE, foram utilizados dois conceitos: de hemólise inicial – solução salina onde ocorreria hemólise em 5% dos glóbulos vermelhos e hemólise total – solução salina onde se detectava 95% da destruição

dessas células, obedecendo à proposta de vários pesquisadores (SUESS *et al.*, 1948). Entretanto na avaliação dos resultados permitiu-se destacar que a maioria dos pesquisadores não definiu exatamente os valores, em porcentagem, utilizados para expressar as hemólises inicial e total, dificultando sobremaneira a interpretação e, principalmente, a comparação e discussão dos resultados obtidos nesses tipos de pesquisas. A fragilidade corpuscular média, ou seja, a solução salina hipotônica determinante de hemólise de 50% das hemácias, também foi determinada, na presente pesquisa como recomendam PONDER (1948) e SUESS *et al.* (1948), mas não adotado pela maioria dos autores que se dedicaram ao assunto.

## CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu estabelecer os valores de referência para fragilidade osmótica dos eritrócitos de taurinos da raça Holandesa ( $0,72 \pm 0,05$ ;  $0,61 \pm 0,04$ ;  $0,51 \pm 0,04$  – respectivamente, 5%, 50% e 95% de hemólise), zebuínos da raça Gir ( $0,64 \pm 0,05$ ;  $0,51 \pm 0,05$ ;  $0,42 \pm 0,04$  – respectivamente, 5%, 50% e 95% de hemólise) e de seus híbridos – Girolando ( $0,69 \pm 0,05$ ;  $0,57 \pm 0,05$ ;  $0,47 \pm 0,05$  – respectivamente, 5%, 50% e 95% de hemólise), criados no Estado de São Paulo.

O delineamento experimental permitiu demonstrar influência significativa de fatores específicos/raciais sobre a FOE, sendo as hemácias osmoticamente mais frágeis nos taurinos da raça Holandesa do que nos zebuínos da raça Gir, apresentando os animais híbridos – Girolando, valores intermediários.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYRES, C.C., BARROS FILHO, I.R., COSTA, J., *et al.* Determinação da fragilidade osmótica dos eritrócitos em bovinos da raça Holandesa e zebuínos da raça Nelore. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, Gramado, 1997. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997. p.135.
- BINDER, J.P., MATHOIS, H. Die osmotische resistenz der erythrozyten von kühen. **Journal Veterinary Medicine A**, v.33, n.2, p.89-92, 1986.
- COLDMAN, M.F., GENT, M., GOOD, W. The osmotic fragility of mammalian erythrocytes in hypotonic solutions of sodium chloride. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.31, n.4, p.605-609, 1969.
- FAIRLEY, N.M., PRICE, G.S., MEUTEN, D.J. Evaluation of red blood cell fragility in pygmy goats. **American Journal Veterinary Research**, v.49, n.9, p.1598-600, 1988.

- FARAZDAGUI, H., HARRIS, P.M. Plant competition and crop yield. **Nature**, v.217, n.5125, p.289-290, 1968.
- HYAMS, D. **Curveexpert 1.3**. 1995. (software Microsoft).
- JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia : Lea & Febiger, 1993. Comparative hematologic features of some avian and mammalian species: p.19-53.
- JAIN, N.C. **Shalm's veterinary hematology**. Philadelphia : Lea & Febiger, 1986. Hematology techniques: p.64-71.
- OLUSANYA, S.K., ADEPOJU, F.O. Osmotic fragility of erythrocytes of some nigerian species of domestic ruminants. **Bulletin of Animal Health Production Africa**, v.27, n.4, p.237-243, 1979.
- OYEWALE, J.O. Changes in osmotic resistance of erythrocytes of cattle, pigs, rats and rabbits during variation in temperature and pH. **Journal Veterinary Medicine A**, v.39, n.2, p.98-104, 1992.
- PARPART, A.K., LORENZ, P.B., PARPART, E.R., *et al.* The osmotic resistance (fragility) of human red cells. **Journal Clinical Investigation**, v.26, n.4, p.636-640, 1947.
- PERK, K., FREI, Y.F., HERZ, A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. **American Journal Veterinary Research**, v.25, n.107, p.1241-1248, 1964.
- PILLAI, M.G.R., NIRMALAN, G., NAIR, S.G. Osmotic fragility of erythrocytes of certain species of animals. **Kerala Journal of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.139-144, 1976.
- PONDER, E. **Hemolysis and related phenomena**. New York: Grune & Stratton, 1948. 397 p.
- SAS. Statistical Analyses Systems. **User's guide for Windows: statistics**, Cary : SAS Institute, 1995. (versão 6.09).
- SCARBOUROUGH, R.A. The blood picture of normal laboratory animals. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.4, p.69-75, 1931.
- SOLIMAN, M.K., AMROUSI, S.E. Erythrocyte fragility of health fowl, dog, sheep, cattle, buffalo, horse and camel blood. **Veterinary Record**, v.78, n.12, p.429-430, 1966.
- SUESS, J., LIMENTANI, D., DAMESHECK, W., *et al.* Quantitative method for the determination and charting of the erythrocyte hypotonic fragility. **Blood**, v.3, p.1290-303, 1948.
- TÁVORA, J.P.F. **Hemograma de bovinos das raças Gir, Girolando e Holandesa criados no Estado de São Paulo**. Estabelecimento dos valores de referência e avaliação das influências de fatores de variabilidade raciais, etários e sexuais. São Paulo, 1997. 163p. Tese (Doutorado- Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1997.