

**UVV - CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**RESPOSTA HUMORAL E CINÉTICA LEUCOCITÁRIA DE
TRACAJÁS (*PODOCNEMIS UNIFILIS* (TROSCHER, 1848))
INOCULADAS EXPERIMENTALMENTE COM *ESCHERICHIA
COLI***

Regina Mamede Costa

VILA VELHA – ESPÍRITO SANTO

Março de 2011

UVV - CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA

**RESPOSTA HUMORAL E CINÉTICA LEUCOCITÁRIA DE
TRACAJÁS (*PODOCNEMIS UNIFILIS* (TROSCHER, 1848))
INOCULADAS EXPERIMENTALMENTE COM *ESCHERICHIA
COLI***

Regina Mamede Costa

Orientador: Prof. Dr. Dominik Lenz

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência Animal do Centro Universitário Vila Velha, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

VILA VELHA – ESPÍRITO SANTO

Março de 2011

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C837r Costa, Regina Mamede.

Resposta humoral e cinética leucocitária de tracajás (*Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848)) inoculadas experimentalmente com *Escherichia coli* / Regina Mamede Costa. – 2011.

86 f.: il.

Orientador: Dominik Lenz.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro Universitário Vila Velha, 2011.

Inclui bibliografias.

1. Quelônio. 2. Hemograma. 3. Eletroforese I. Lenz, Dominik. II. Centro Universitário Vila Velha. III. Título.

CDD 597.92

UVV – CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Resposta humoral e cinética leucocitária de tracajás (*Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848)) inoculadas experimentalmente com *Escherichia coli*

Autor: Regina Mamede Costa

Orientador: Prof. Dr. Dominik Lenz

Vila Velha, 18 de março de 2011

Banca examinadora

PROF. DR./DRA. _____

PROF. DR./DRA. _____

PROF. DR./DRA. _____

COMISSÃO DE ÉTICA, BIOÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL (CEUA-UVV)

PARECER CONSUBSTANCIADO

“A solução é voltar ao marco zero.
Desaprender para aprender.
Deletar para escrever em cima.
Houve um tempo em que eu pensava que, para isso, seria preciso nascer de novo,
mas hoje sei que dá pra renascer várias vezes nesta mesma vida.
Basta desaprender o receio de mudar.”

Martha Medeiros

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter iluminado os meus caminhos até o dia de hoje.

Aos meus pais (in memoriam) e a tia Sônia meus eternos mestres, pelos valiosos ensinamentos de vida.

As minhas queridas irmãs Raquel e Ruth, pelo inestimável amor e amizade.

A minha família, José Geraldo e Anna Clara, sem a qual a minha vida não teria sentido algum.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr. Dominik Lenz, pela orientação prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. MSc. Marcelo Renan de Deus Santos pela co-orientação, pelo companheirismo, apoio e amizade em todas as horas.

Ao Prof. Dr. Paulo Dias Ferreira Junior e a aluna discente do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistemas Aline Silva Gomes que gentilmente cederam os animais para essa pesquisa.

Ao Prof. MSc. Marcus Alexandre Vaillant Bellome pelo preparo das amostras de *Escherichia coli*.

Ao Prof. MSc. Fernando Luiz Tobias pela ajuda nas sorologias.

A Anderson Pereira Neto e Marcillo Altoé Boldrini pelo imenso auxílio nos exames hematológicos, pelo grande carinho e amizade.

A Patrícia Caldeira, por todos os momentos em que juntas, compartilhamos nossos medos, angústias e muitas alegrias. Por você estar sempre ao meu lado, por ser uma grande amiga e por ter a certeza que estaremos sempre juntas.

As minhas queridas amigas Adriana, Virginia e Cristina por todos os momentos especiais de convívio. Sem a presença de vocês na minha vida, eu jamais teria conseguido!

A todos os professores do PMCA pelos ensinamentos transmitidos.

A todos os professores e funcionários do Biopráticas, por todos os ensinamentos e serviços prestados.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Biometria das tartarugas *Podocnemis unifilis* (tracajás) do grupo teste (n=10) e controle (n=10). Média, desvio padrão e amplitude..... 39
- Tabela 2: Média e desvio padrão da variação da série bioquímica de tartarugas *Podocnemis unifilis* inoculadas com *Escherichia coli* - Vila Velha – 2010..... 49
- Tabela 3: Média, desvio padrão e intervalo de referência (entre parênteses) das frações de proteína do grupo teste e controle ao final do experimento - Vila Velha – 2010..... 50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: *Podocnemis unifilis* A. Detalhe padrão colorido da cabeça. B. Único barbelo debaixo do queixo – Vila Velha- 2010..... 21
- Figura 2: Colheita de amostra sangüínea de tartarugas *Podocnemis unifilis* na veia coccígea dorsal – Vila Velha – 2010..... 32
- Figura 3: Células sanguíneas de *Podocnemis unifilis* (coloração pelo método Panótico Rápido): a) Eritrócitos, eritroblasto (seta centro direita) e eritrócito policromatófilo (seta em baixo), b) heterófilo, c) eosinófilo, d) linfócito, e) monócito (grande) e linfócito (pequenos), f) trombócitos..... 40
- Figura 4: Representação do eletroforetograma das proteínas séricas de tartarugas *Podocnemis unifilis*: a) Albumina, b) α 1-globulina, c) α 2-globulina, d) β 1-globulina, e) β 2-globulina e f) γ -globulina.... 66

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1:	Valores médios \pm DP do VG obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	41
Gráfico 2:	Valores médios \pm DP da CThe obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	42
Gráfico 3:	Valores médios \pm DP do Hb obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	42
Gráfico 4:	Valores médios \pm DP do VCM obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	43
Gráfico 5:	Valores médios \pm DP do CHCM obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	43
Gráfico 6:	Valores médios \pm DP da PPT obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	44

Gráfico 7:	Valores médios \pm DP dos trombócitos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	44
Gráfico 8:	Valores médios \pm DP da contagem total de leucócitos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	45
Gráfico 9:	Valores médios \pm DP dos monócitos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	46
Gráfico 10:	Valores médios \pm DP dos linfócitos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	46
Gráfico 11:	Valores médios \pm DP dos eosinófilos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	47
Gráfico 12:	Valores médios \pm DP dos heterófilos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de <i>E. coli</i> em tartarugas <i>P. unifilis</i> mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010.....	47

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A	Valores hematológicos do grupo teste de tartarugas <i>P. unifilis</i> criadas em cativeiro. Média, desvio padrão e intervalo de referência (entre parênteses) - Vila Velha – 2010.....	85
Apêndice B	Valores hematológicos do grupo controle de tartarugas <i>P. unifilis</i> criadas em cativeiro. Média, desvio padrão e intervalo de referência (entre parênteses) - Vila Velha – 2010.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CRC: comprimento retilíneo de carapaça

CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

cm: centímetro

cm³: centímetro cúbico

dL: decilitro

E. coli: Escherichia coli

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

Eos: eosinófilo

Eritr: eritrócito

fL: ficolitro

g: grama

Hb: hemoglobina

He: hemácias

Ht: hematócrito

IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente

LRC: largura retilínea de carapaça

Leuco: leucócito

Linfo: linfócito

µL: microlitro

Mg: miligrama

mL: mililitro

mm³: milímetro cúbico

Mono: monócito

P. unifilis: Podocnemis unifilis

Pt: proteína total

PPT: proteína plasmática total

rpm: rotações por minuto

Tromb: trombócito

VCM: volume corpuscular médio

VG: Volume Globular

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 <i>Podocnemis unifilis</i>.....	20
2.2 Hematologia de Répteis.....	23
2.3. Imunologia de Répteis.....	26
2.4 <i>Escherichia coli</i>.....	28
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Geral.....	30
3.2 Específicos.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Animais.....	31
4.2 Coleta Sanguínea.....	31
4.3 Exames Hematológicos.....	33
4.3.1. Volume Globular (VG) ou Hematócrito (Ht).....	33
4.3.2 Hemoglobina (He).....	33
4.3.3 Índices Hematimétricos.....	34
4.3.4 Contagem Total de Hemácias e Leucócitos.....	34
4.3.5 Contagem de Trombócitos.....	35
4.3.6 Proteína Plasmática Total (PPT).....	35
4.3.7 Contagem Diferencial de Leucócitos.....	35
4.4 Análises Bioquímicas Plasmática.....	36
4.5 Inoculação Experimental por Via Subcutânea.....	36
4.6 Soroaglutinação Macroscópica.....	37
4.7 Análise Estatística.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1 Biometria.....	39
5.2 Hematologia.....	39
5.2.1 Eritrograma e total de trombócitos.....	41
5.2.2 Leucograma.....	45
5.3 Análises Bioquímicas Plasmáticas.....	48

5.4 Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR).....	50
6. DISCUSSÃO.....	51
6.1 Biometria.....	51
6.2 Hematologia.....	51
6.3 Análises Bioquímicas Plasmáticas.....	60
6.4 Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR).....	67
7. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICES.....	84

Costa, RM. **Resposta humoral e cinética leucocitária de tracajás (*Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848)) inoculadas experimentalmente com *Escherichia coli*.** [Dissertação de Mestrado]. Vila Velha: Pós-graduação em Ciência Animal, UVV – Centro Universitário Vila Velha, 2011.

RESUMO

Podocnemis unifilis é um quelônio de grande importância econômica e cultural para as populações da Amazônia. São ameaçados por poluição ambiental e doenças. No entanto, são pouco estudados, principalmente quanto à composição hematológica e resposta humoral a agentes infecciosos, mais especificamente com relação a animais brasileiros e sua relação com aspectos fisiológicos e ambientais. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a resposta humoral e leucocitária induzida pela inoculação experimental por *Escherichia coli* isolada em tartarugas *Podocnemis unifilis* criadas em cativeiro. Os indivíduos foram divididos em dois grupos: grupo teste (n=10) e grupo controle (n=10). A infecção experimental no grupo teste foi realizada pela aplicação pela via subcutânea da suspensão de *Escherichia coli* isolada. Os animais foram submetidos a três exposições, com intervalo de 0, 15 e 28 dias. Para simular condições semelhantes de manejo no grupo controle foi inoculado por via subcutânea com solução do meio de cultura. Amostras de sangue de todos os animais foram coletadas no dia anterior a inoculação das soluções e novas amostras coletadas nos dias 15, 28 e 42 dias nos dois grupos. Foram realizados estudos comparativos de hematologia, bioquímica plasmática, eletroforese de proteínas e prova de soroaglutinação. Com base nos resultados, conclui-se que a inoculação de *Escherichia coli* não alterou dignificamente a série de glóbulos vermelhos das tartarugas. No entanto houve discreta anemia macrocítica normocrômica. O leucograma mostrou uma variação nos números, caracterizada por um processo inflamatório reativo à inoculação da substância teste e controle. Para a avaliação da bioquímica plasmática determinou-se a proteína total, albumina, globulina, relação A:G, glicose e eletroforese de proteínas séricas. Os valores obtidos para os dois grupos foram comparados, sendo que a análise estatística revelou diferenças significativas ao nível de 5% para as contagens relativas da relação A:G e glicose. As amostras de soro sanguíneo das tartarugas testadas foram reagentes a *Escherichia coli* demonstrando a susceptibilidade desses grupos ao agente ao final do experimento e apontando a necessidade de provas sorológicas mais específicas para sua caracterização. Os resultados deste estudo certamente poderão ser usados como indicadores do estado fisiológico e auxílio no diagnóstico de doenças em populações desta espécie em vida livre e cativeiro.

Palavras-Chave: hemograma, bioquímica sérica, eletroforese, soroaglutinação, *Podocnemis unifilis*

Costa, RM. **Humoral and leukocyte kinetics of turtles *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) experimentally inoculated with *Escherichia coli***. [Dissertação de Mestrado]. Vila Velha: Pós-graduação em Ciência Animal, UVV – Centro Universitário Vila Velha, 2011.

ABSTRACT

The *Podocnemis unifilis* turtle is of substantial economic and cultural importance to peoples of the Amazon. *P. unifilis* is threatened by environmental pollution and disease. However, little is known about their cellular and humoral response to infectious agents. *P. unifilis* is threatened by environmental pollution and disease. However, they are little studied, especially regarding the composition and hematological humoral response to infectious agents, specifically with respect to Brazilian animals and their relationship to physiological and environmental aspects. The aim of this study was therefore to evaluate the cellular and humoral response to an iatrogenic infection with *Escherichia coli* *P. unifilis* turtles in captivity. The subjects were divided into two groups: test group (n = 10) and control group (n = 10). Experimental infection in the test group was performed by the application of subcutaneous *Escherichia coli*. The animals underwent three exposures at intervals of 0, 15 and 28 days. A control group was inoculated subcutaneously with a solution of culture medium. Blood samples from all animals were collected the day before the inoculation and at days 15, 28 and 42 days in both groups. With the samples, values of hematology, plasma biochemistry, protein electrophoresis and agglutination test were performed. Based on the results, we conclude that the inoculation of *Escherichia coli* did not alter the series of red blood cells of turtles. However there was a slight normochromic macrocytic anemia in the animals of both groups. The WBC showed a variation in numbers, characterized by an inflammatory reactive process to the inoculation of test and control group. For the assessment of plasma biochemistry total protein, albumin, globulin, the A: G, glucose and serum protein electrophoresis was determined. The values obtained for the two groups were compared, and statistical analysis revealed significant differences at 5% for the counts on the ratio A: G and glucose. Samples of blood serum of turtles tested were reactive with *Escherichia coli* demonstrated the susceptibility of these groups to the agent at the end of the experiment, indicating a need for more specific serological tests for its characterization. The results of this study certainly could be used as indicators of physiological status and aid in the diagnosis of diseases in populations of this species in the wild and captivity.

Keywords: haematology, serum biochemistry, electrophoresis, serum agglutination, *Podocnemis unifilis*

1 INTRODUÇÃO

Os quelônios são animais de grande importância econômica e cultural para as populações da Amazônia¹. A tartaruga de água doce *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) é uma espécie comum na região Amazônica que pertence à subordem pleurodira, família Podocnemidae². Esta espécie possui ampla distribuição geográfica em rios e florestas inundadas das regiões norte e centro-oeste do Brasil, Bolívia, Colômbia, Peru, Equador e Venezuela e Guianas³. Atualmente, a International Union for Conservation of Nature-IUCN, classifica esta espécie como vulnerável na lista de espécies ameaçadas de extinção⁴.

Há centenas de anos na Amazônia, os quelônios têm sido utilizados como importante fonte de alimento para populações ribeirinhas⁵, sendo considerados, dentre todos os répteis, os mais explorados para consumo humano⁶. Baseados na Partners in Amphibian and Reptile Conservation (PARC), Gibbons *et al.*⁷ descrevem fatores conhecidos ou suspeitos de estarem associados ao declínio populacional dos répteis, sendo eles: degradação e perda do hábitat, introdução de espécies invasoras, doenças, uso insustentável, mudanças climáticas globais e poluição ambiental. As doenças e seus agentes são parte dos ecossistemas e participam de um conjunto de inter-relações com os componentes bióticos e abióticos do meio, contribuindo com a dinâmica das populações envolvidas. Portanto, as doenças, assim como predadores, disponibilidade de alimentos, abrigo, temperatura e outros mais, vão atuar sobre as populações mantendo um equilíbrio dinâmico e conseqüentemente a integridade do meio⁸.

Na investigação clínica de répteis, amostras sanguíneas podem ser facilmente obtidas e são de grande valor diagnóstico. Através do hemograma, identifica-se possíveis processos inflamatórios, facilitando a triagem e tratamento dos animais⁹. Além de diagnosticar doenças, os exames laboratoriais podem servir como bioindicadores de qualidade ambiental, uma vez que a saúde do meio ambiente influencia na biologia e ecologia dos organismos que vivem nele⁸.

O conhecimento dos valores hematológicos normais de determinada espécie são importantes para elucidar diagnósticos de enfermidades de animais, tanto naqueles mantidos em cativeiro quanto nos de vida livre¹⁰. Esses valores podem sofrer variações por diversas causas tais como manejo animal, idade, tamanho,

habitat, sexo, sazonalidade, temperatura e dieta, o que dificulta ainda mais os primeiros passos de pesquisas para estabelecer parâmetros hematológicos de referência e comparações entre indivíduos e populações^{8,11}.

Os quelônios são pouco estudados, principalmente quanto à composição hematológica e resposta humoral a agentes infecciosos, mais especificamente com relação a animais brasileiros e sua relação com aspectos fisiológicos e ambientais¹².

Diante do exposto, este trabalho se propõe a avaliar a resposta humoral e leucocitária induzida pela inoculação experimental de *Escherichia coli* isolada e inativada em tartarugas da espécie *P. unifilis* (Troschel, 1848) criadas em cativeiro.

As informações obtidas por esse modelo de infecção certamente poderão ser usados como indicadores do estado fisiológico e auxílio no diagnóstico de doenças em populações desta espécie em vida livre e cativeiro.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Podocnemis unifilis*

Na região amazônica, o gênero *Podocnemis* é bastante encontrado e sua classificação é descrita com a Ordem Testudines, subordem Pleurodira, família Pelomedusidae². Na América do Sul encontramos seis espécies do gênero *Podocnemis*: *P. vogli* (Muller, 1935), *P. lewyana* (A. Duméril, 1852), *P. expansa* (Schweigger, 1812), *P. unifilis* (Troschel, 1848), *P. sextuberculata* (Cornalia, 1849) e *P. erythrocephala* (Spix, 1824); sendo as quatro últimas encontradas no Brasil, principalmente na bacia Amazônica³.

A espécie *Podocnemis unifilis*, popularmente conhecida como tracajá, é uma tartaruga pleurodira, caracterizada por mover a cabeça e o pescoço lateralmente em um plano horizontal¹³, com ocorrência registrada para todos os tipos de águas (branca, preta e clara) nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco, no Brasil, Peru, Colômbia, Venezuela, Equador, Bolívia e Guianas, e dos rios Tocantins e Araguaia³.

Uma das características que a diferencia das demais espécies de quelônios da região é o seu padrão colorido¹³. Filhotes juvenis e machos adultos exibem manchas amarelas na região cefálica, as quais vão desaparecendo conforme o desenvolvimento do animal e, nas fêmeas adultas, elas acabam por sumir completamente. Os machos possuem cauda maior e são menores que as fêmeas¹⁴. Em geral, *P. unifilis* apresenta um único barbelo embaixo da mandíbula^{3,15}, o que lhe confere o nome específico (Fig. 1). A espécie *P. unifilis* pode atingir até 50 cm de comprimento¹.



Fonte A: GOMES, A.S., 2010

B: COSTA, R. M., 2010

Figura 1 - *Podocnemis unifilis* A. Detalhe padrão colorido da cabeça. B. Único barbelo debaixo da mandíbula.

É apontada como uma espécie predominantemente herbívora na natureza aceitando carne e peixe em cativeiro^{16,17,18}. Os exemplares jovens de tracajá consomem proporcionalmente mais alimentos de origem animal que os adultos¹⁴. A dieta do tracajá no período de seca, em uma várzea do médio Solimões (AM)¹⁹, é constituída por matéria vegetal, de sedimento e de matéria animal. Os filhotes praticam neustofagia, que consiste na ingestão de material flutuante na superfície da água^{15,18}.

A reprodução dos quelônios é sazonal e os filhotes eclodem nos períodos em que as condições ambientais são favoráveis^{15,20}. O fotoperíodo, temperatura, ciclo térmico (variação de temperatura entre dia e noite) e a oferta de alimentos são fatores importantes na reprodução^{21,22}. A reprodução da *P. unifilis* é anual, e a desova e incubação ocorrem entre os meses de junho a outubro, sendo o pico em julho e agosto, durante a época de estiagem^{15,20}. Sua maturidade sexual ainda não está definida; supõe-se que ocorrerá após os sete anos de vida^{14,23}.

A desova se dá em vários tipos de substratos - praias de areia ou argilosas e barrancos de barro, de acordo com Fachín-Terán e Von Mülhen²⁴. Porém, diferentemente da tartaruga-da-amazônia, esta espécie não desova em grupo²⁵. Na Amazônia, o período de nidificação coincide com os meses secos do ano em cada região, e em cada ninho são depositados de 11 a 35 ovos, podendo ocorrer até duas desovas por ano^{15,20}. O período de incubação dura entre 50 a 70 dias, e, após quebrarem a casca dos ovos, os filhotes podem ficar até sete dias dentro dos ovos e permanecerem por até duas semanas dentro do ninho antes de emergir¹⁵.

A determinação sexual depende da temperatura de incubação dos ninhos, sendo que ninhos com altas temperaturas (acima de 32° C em média) geram fêmeas e os que se desenvolvem sob temperaturas mais baixas (cerca de 28°C) originam machos²⁶.

Para reduzir os impactos sobre as populações de quelônios, é necessário conhecimento sobre a ecologia das espécies para estabelecer estratégias de conservação e manejo¹⁸. Segundo Molina²⁷, uma das maneiras de se conhecer o comportamento da espécie é através de estudos em cativeiro.

2.2 Hematologia de Répteis

A obtenção de dados hematológicos e bioquímicos em répteis é importante para monitoramento do estado de saúde, diagnóstico e prevenção de doenças, estabelecimento de valores de referência para o manejo e a conservação de populações de vida livre^{28,29,30}.

De acordo com Jacobson³¹ e Sypek e Borysenko³², historicamente existe uma discrepância na terminologia dos tipos celulares sanguíneos e tecidos hemopoiéticos dos répteis. Os valores hematológicos normais para répteis determinados por diferentes laboratórios podem variar bastante dependendo da amostragem sanguínea, manejo e técnicas de análise³³. Fatores como idade, tamanho, sexo, estação do ano, estresse, dieta, hormônios circulantes, temperatura e hidratação podem afetar os parâmetros hematológicos, dificultando o estabelecimento de valores sanguíneos de referência e comparações entre indivíduos e populações^{8,10,34}.

Nos répteis são encontrados eritrócitos nucleados, leucócitos e trombócitos³⁷, apesar de haver diferenças entre os autores quanto à classificação de alguns leucócitos, como heterófilos e eosinófilos³⁹. Os leucócitos são classificados em dois grupos: acidófilos (heterófilos e eosinófilos) e basófilos (linfócitos, monócitos e basófilos)³³.

Os leucócitos são corpúsculos incolores envolvidos nos mecanismos de defesas celulares e imunocelulares do organismo. Os eritrócitos, os trombócitos e os linfócitos são morfológicamente similares entre as várias espécies e a diferenciação entre estas duas últimas células é difícil⁹.

Os trombócitos estão relacionados ao sistema de coagulação sanguínea, sendo análogos às plaquetas de mamíferos. Quando não ativados possuem formato arredondado, com núcleo denso arredondado ou oval³⁸.

Segundo Pitol *et al.*³⁵, em estudo realizado com tartarugas *Phrynops hilarii* adultas de ambos os sexos, capturadas no Rio Guaíba e mantidas em cativeiro, demonstraram que, durante as análises, os diferentes tipos de leucócitos podem sofrer grandes variações ao longo do ano as quais, se não forem bem interpretadas, podem levar a um diagnóstico errôneo. A contagem total de eritrócitos tende a ser maior antes do período de hibernação e menor logo após este período³⁶.

Estudos hematológicos em répteis são escassos e, ao contrário do que acontece em mamíferos e aves, poucos trabalhos podem ser citados³⁷. Os dados hematológicos são utilizados para detectar condições que afetam o organismo como um todo e que alteram qualitativa ou quantitativamente as células sanguíneas como anemias, doenças inflamatórias, parasitemias, distúrbios hematopoiéticos e disfunções hemostáticas³⁸.

As principais características morfológicas destas células estão apresentadas no quadro 2.1.

Células sangüíneas	Características Morfológicas
Eritrócitos	São elipsoidais; o núcleo central, oval a arredondado, contém cromatina densamente púrpura com as margens quase sempre irregulares.
Heterófilos	Células grandes circulares a ovais, citoplasma incolor, conteúdo grânulos vermelho-alaranjado o núcleo é excêntrico e basofílico.
Eosinófilos	Células grandes redondas, com grânulos citoplasmáticos eosinofílicos esféricos esparsos. Núcleo excêntrico.
Linfócitos	Células pequenas arredondadas, com núcleo redondo bem definido rocho-azulado ocupando quase todo citoplasma, que é tipicamente escasso e basofílico.
Monócitos	Células grandes com formato redondo ou amebóide, citoplasma moderadamente basofílico com bordas bem definidas ou irregulares. O núcleo é basofílico, redondo a oval, com contorno irregular excêntrico, podendo apresentar formato denteado.
Basófilos	Células pequenas, esféricas, com citoplasma bem definido, com numerosos grânulos pequenos e basofílicos que muitas vezes encobertam o núcleo central e esférico. Células extremamente raras.

Trombócitos	Células ovaladas e menores que os eritrócitos, com um delicado citoplasma incolor, núcleo central oval ou redondo. Alguns trombócitos podem ser confundidos com pequenos linfócitos, se não exibirem o citoplasma nitidamente.
-------------	--

Quadro 2.1 – Principais características morfológicas das células sanguíneas de répteis. Campbell³⁸.

Os eritrócitos são morfológicamente similares entre as várias espécies de répteis, apresentando-se ovais e nucleados e representando a maior parte das células sanguíneas circulantes⁴⁰.

Os heterófilos possuem importante papel na defesa do organismos assumindo, provavelmente, o papel representado pelos neutrófilos nos mamíferos. São células grandes de núcleo excêntrico, de formato oval ou arredondado, e grânulos intracitoplasmáticos que se colorem em vermelho-alaranjado com corantes tipo Romanowsky. Estas células estão envolvidas com a morte celular, incluindo a quimiotaxia, opsonização, ingestão e lise^{10,11}. O número de heterófilos também pode estar aumentado em caso de necrose tecidual. Em animais sadios os heterófilos representam de 30 a 45% do total de leucócitos, podendo atingir o índice de 65% em casos de infecção bacteriana¹⁰.

De acordo com Montali⁴² e Hawkey e Dennett¹¹, em tartarugas e crocodilianos, os heterófilos periféricos apresentam núcleo único oval ou raramente bilobado em posição periférica, com cromatina densa e citoplasma com grânulos fusiformes eosinofílicos, ao passo que em Squamata (serpentes e lagartos) o heterófilo possui núcleo redondo ou multilobado, com grânulos citoplasmáticos angulares ou pleomórficos que se coram eosinofílicamente.

Os linfócitos são células mononucleares esféricas com núcleo também esférico que se cora intensamente pelos corantes hematológicos. Estas células são responsáveis pela defesa imunológica humoral e celular do organismo¹¹. O número absoluto de linfócitos circulantes pode variar de acordo com a espécie, idade, sexo, estação do ano, estado nutricional, presença de hemoparasitas, metazoários e na vigência de processos inflamatórios crônicos¹⁰.

Pouco se sabe sobre a origem e a função dos azurófilos, podendo-se afirmar apenas que o aumento no número ou alteração nas características morfológicas são

indicativos de processo infeccioso. São encontrados em répteis, ocorrendo em pequena quantidade em lagartos, crocodilos e quelônios, e em grande número em serpentes. Possuem função semelhante a dos monócitos, de onde derivam. Seu formato é predominantemente esférico, podendo variar de pequeno a grande. O citoplasma contém inúmeros grânulos eosinofílicos finos e parecidos com poeira, que dão a ele coloração vermelha alaranjada¹¹.

Os basófilos são caracterizados pela presença de grande quantidade de grânulos basofílicos citoplasmáticos que podem, até mesmo, impedir a visualização do núcleo celular. Acredita-se que estas células estejam envolvidas com processos alérgicos possuindo receptores para imunoglobulina E. Representam de 10 a 25% do total de leucócitos, podendo ter essa porcentagem diminuída em períodos de hibernação¹⁰.

Na descrição de leucócitos e trombócitos circulantes leva-se em conta, além da forma e tamanho das células e de seus constituintes, a característica tintorial destes. As colorações mais utilizadas para esta finalidade contêm corantes azurofílicos que reagem com grupamentos ácidos, e eosinofílicos que reagem com grupamentos básicos da célula^{11,41}. Romanowsky idealizou um método em que uma solução de corantes poderia corar diferentes estruturas. Misturas dos corantes eosina e azul de metileno são preparadas segundo proposição de vários autores: Diff-Quick, Wright, Giemsa, May-Grünwald-Giemsa, Leishman e outros (que dão os respectivos nomes aos corantes, segundo Leishman, Giemsa, etc.)³⁸.

Os trombócitos e linfócitos também são similares entre as várias espécies, porém, em alguns répteis a distinção entre os dois tipos celulares pode ser difícil³⁶. Existe uma diferença morfológica apreciável entre as células da série granulocítica e monocítica, sendo importante caracterizar os tipos celulares das várias espécies de interesse¹¹. Em adição, o número relativo de vários leucócitos (linfócitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos) no sangue varia consideravelmente entre diferentes espécies de répteis⁴⁰.

2.3 Imunologia de Répteis

O sistema imunológico é composto por órgãos, estruturas, células, e fatores que estão diretamente envolvidos na atividade de defesa do hospedeiro contra

agentes patogênicos (vírus, bactérias, fungos e parasitas) e células transformadas (tumores)⁴³. A resposta imune é um processo complexo que envolve células especializadas e moléculas efetoras. Muitas dessas interações e funções efetoras provavelmente existem no sistema imune do réptil, porém, muito poucas foram investigadas e menos ainda foram identificadas⁴⁴.

Diferentes estudos têm sido desenvolvidos visando descrever o comportamento imunológico de répteis. Desse modo, já foram avaliados os efeitos de estressores como subnutrição⁴⁵, foram estudadas a morfologia e a função de órgãos linfóides^{46,47,48,49,50}, foi avaliada a resposta imune celular⁵¹, foram estudados antígenos de superfície e imunoglobulinas linfocíticas⁵², e fez-se descobertas, como a presença de células de Langerhans⁵³.

Os leucócitos são responsáveis pela resposta imune, sendo que sua ação determina a imunidade inata e adaptativa, conferindo ao corpo um sistema de defesa integral que lhe permite uma interação com seu entorno, garantindo-lhe que não seja afetado por microorganismos ou ambientes desfavoráveis⁴³. Segundo Almosny e Monteiro⁶⁷, os répteis apresentam diferentes tipos de leucócitos: basófilos, eosinófilos, heterófilos, azurófilos, monócitos e linfócitos. Tem se visto que informações que possam revelar os mecanismos imunes são tão valiosas quanto aquelas que elucidam os mecanismos de evolução deste sistema⁴⁴.

A função mais importante da resposta imune humoral é a produção de moléculas solúveis (anticorpos ou imunoglobulinas) que são sintetizadas e secretadas pelos linfócitos B. Os anticorpos se ligam a fatores específicos do patógeno invasor. Após a estimulação pelo patógeno, os anticorpos são sintetizados e liberados na corrente sanguínea, onde circulam até que se deparam e se ligam ao patógeno específico⁴⁴.

Mamíferos produzem 5 classes de imunoglobulinas (IgG, IgD, IgA, IgM, IgE) enquanto répteis produzem no máximo duas classes IgM e IgY⁴⁴. O IgM e IgY, são semelhantes ao IgM e IgG de mamíferos respectivamente. Isotipos de imunoglobulina homóloga ao IgA, IgD, e IgE ainda não foram identificadas em quelônios e outros répteis⁴³.

Os estudos em hematologia de répteis têm tentado estabelecer a nomenclatura para os diferentes tipos sanguíneos, a qual tem sofrido modificações sustentadas pela imunologia, que elucidada com maior profundidade a natureza dos elementos celulares sanguíneos³².

Segundo Jacobson⁴³ a sorologia é baseada no princípio de que a maioria das moléculas estranhas é capaz de provocar uma resposta imune humoral distinta em vertebrados (exceto Agnatha) que podem ser ensaiadas. Na sorologia, o complexo antígeno-anticorpo pode ser medido e os resultados utilizados para auxiliar no diagnóstico da doença de base e doenças em animais. Dos vários testes sorológicos disponíveis para avaliar a exposição dos animais aos patógenos, apenas alguns foram desenvolvidos para uso na determinação da exposição de répteis a patógenos específicos.

2.4 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* compreende cinco espécies, das quais a *Escherichia coli* é a mais comum e clinicamente a mais importante do gênero^{54,55}. A *E. coli* é considerada uma das bactérias de grande interesse da família Enterobacteriaceae. Os organismos da espécie *E. coli* são Gram negativos, possuem a forma de bastonetes, não formam esporos, geralmente são móveis pela presença de flagelos peritríquios, existindo também cepas imóveis, algumas possuem cápsula e são considerados como parte da microbiota normal do trato intestinal do homem e da maioria dos animais de sangue quente⁵⁶. As bactérias pertencentes a este grupo possuem uma grande heterogeneidade em relação a sua ecologia, seus hospedeiros e seu potencial patogênico. São amplamente distribuídas mundialmente, podendo ser encontradas no trato intestinal de animais e humanos, contaminando a vegetação, o solo e a água⁵⁷.

A habilidade destes microorganismos na produção de doenças está associada a sua diversidade antigênica. Muitos antígenos foram descritos e são usados para classificar as linhagens para fins epidemiológicos⁵⁸. Este é um dos patógenos bacterianos mais versáteis. Algumas linhagens são membros importantes da microbiota intestinal em seres humanos e animais, enquanto outras possuem fatores de virulência que as permite provocar infecções no trato gastrointestinal ou em outros locais do organismo⁵⁹.

Embora *E. coli* seja a bactéria anaeróbia facultativa predominante na mucosa intestinal dos mamíferos saudáveis, coexistindo sem causar danos ao hospedeiro,

várias cepas, ao adquirir fatores de virulência específicos, tornaram-se potencialmente danosas⁵⁴.

Os fatores de virulência podem ser classificados em duas categorias não excludentes: os que promovem a colonização e invasão bacteriana e aqueles que causam danos ao hospedeiro. No primeiro caso, citam-se cápsula, fimbrias e adesinas; entre fatores de virulência que causam danos ao hospedeiro considerando-se o antígeno LPS (endotoxina), exotoxinas e enzimas hidrolíticas⁵⁹.

Até o momento, tem sido proposto seis grupos patogênicos de *E. coli* associadas às gastroenterites em seres humanos e outros animais: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC)^{55,56}.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a resposta humoral e leucocitária induzida pela inoculação experimental por *E. coli* em tartarugas da espécie *P. unifilis* (Troschel, 1848) criadas em cativeiro.

3.2 Específicos

- Avaliar a resposta leucocitária frente à inoculação de um agente infeccioso.

- Avaliar as alterações bioquímicas plasmáticas de proteína total e frações frente a uma inoculação antigênica.

- Avaliar a cinética da resposta humoral frente à inoculação de um antígeno bacteriano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal (CEUA-UVV) do Centro Universitário Vila Velha – UVV, protocolo número 138/2010 – CEUA.

Foram utilizados 20 tracajás (*P. unifilis*), de tamanhos diferentes, nascidos entre 2007 e 2008, criados em cativeiro desde o nascimento no Biotério do Centro Universitário Vila Velha – UVV (Campus Nossa Senhora da Penha). Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: um grupo controle com 10 animais, e um grupo teste composto também por 10 animais.

Os animais foram identificados, examinados e pesados. A identificação foi realizada por meio de ranhuras realizadas nos escudos marginais^{23,60,61,62,63}. Todos os espécimes foram pesados com dinamômetro Pesola® (escala de 0,10 g) e a biometria dos animais (comprimento e largura retilíneas da carapaça) com o paquímetro Mitutoyo® (escala de 0,1 mm). Não foi possível determinar o sexo das tartarugas estudadas, pois não apresentavam dimorfismo sexual externo.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em tanques separados com capacidade de volume de água de 2.40 m³/100 cada um, contendo plataformas para termorregulação e mantidos com as mesmas condições de água, luz, temperatura e alimentação. O grupo controle foi mantido no seu espaço original junto com mais animais da mesma espécie, mas com densidade de indivíduos diferente.

4.2 Coleta Sanguínea

Foram coletadas amostras sanguíneas dos 20 espécimes (grupo controle e grupo teste). Para a obtenção das amostras sanguíneas e dos dados de biometria foi realizada apenas contenção manual das tartarugas. O manejo foi realizado em sala específica no Biotério do Centro Universitário Vila Velha – UVV (Campus Nossa Senhora da Penha).

Amostras sanguíneas de aproximadamente 1,5 ml respeitando o volume máximo de 0,5% do peso vivo^{38,66,67} foram coletadas por venopunção da veia coccígea dorsal localizada longitudinalmente à cauda, entre a cloaca e a extremidade da cauda^{64,65} com seringa plástica descartável de 3ml e agulha de 12,7mm x 0,45mm (Fig. 2).



Fonte: COSTA, R. M., 2010

Figura 2 - Colheita de amostra sanguínea de tartarugas *Podocnemis unifilis* na veia coccígea dorsal – Vila Velha - 2010

O sangue obtido foi colocado em tubos devidamente identificados contendo heparina sódica (Liquemine®), como anticoagulante³⁷.

Em avaliações hematológicas de quelônios a heparina é o anticoagulante de escolha, já que o EDTA quela o cálcio e outros íons metálicos, causando hemólise extensa em sangue de répteis^{68,69,70}. A heparina impede a coagulação sanguínea por interferir na conversão da protombina em trombina, sendo eficaz por um período de 10 a 12 horas⁷¹.

Também foram confeccionados dois esfregaços sanguíneos frescos de cada animal para posterior contagem diferencial de leucócitos e análise morfológica dos

eritrócitos. Amostras de sangue de todos os animais foram coletadas no dia anterior a inoculação das soluções no grupo controle e teste. Novas amostras foram coletadas nos dias 15, 28 e 42 dias nos dois grupos.

As análises laboratoriais para a contagem hematológica foram realizadas no mesmo dia em que as amostras sanguíneas foram colhidas no Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário “Professor Ricardo Alexandre Rippler” do Centro Universitário Vila Velha – UVV (Campus Nossa Senhora da Penha). As amostras foram mantidas sob refrigeração entre 4 a 8°C até o momento da análise.

As amostras destinadas à análise bioquímica plasmática e teste de soroaglutinação macroscópica foram centrifugadas e o plasma mantido congelado numa temperatura de menos 20°C até o momento da análise.

4.3 Exames Hematológicos

Com as amostras sanguíneas coletadas foram realizados os seguintes exames hematológicos:

4.3.1 Volume globular (VG) ou Hematócrito (Ht)

O volume globular consiste no volume de hemácias da amostra sanguínea, ou seja, é o volume ocupado pelas hemácias em determinada quantidade de sangue. A determinação é pela técnica de microhematócrito^{8,71}.

Cerca de dois terços de um tubo capilar foi preenchido com a amostra, sendo vedado com uma massa própria e colocado em uma centrífuga para microhematócrito. Após centrifugação a 10.000 rpm durante 5 minutos foi realizada a leitura com o auxílio de um cartão de hematócrito para a obtenção do resultado em porcentagem.

4.3.2 Hemoglobina (He)

A concentração de hemoglobina sanguínea foi realizada pelo método da cianometahemoglobina³⁶. Para realizar a determinação da hemoglobina foi utilizado um kit comercial da empresa Labtest®. Em tubos de ensaio devidamente identificados e com uma pipeta automática, foram adicionados 5 mL do reagente de cor de hemoglobina e 20 µL da amostra. Logo após, objetivando a lise dos eritrócitos

e retirada de seus núcleos da mistura de sangue-reagente de cianometahemoglobina a solução foi homogeneizada e centrifugada. O sobrenadante resultante foi utilizado para a análise, fornecendo, assim, um valor mais apurado da concentração de hemoglobina em g/dL. As leituras foram realizadas no analisador LABQUEST® que foi ajustado a 100% de transmissão, em 540nm.

4.3.3 Índices Hematimétricos

Esses índices são: volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Os valores foram calculados a partir dos valores obtidos para hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb) e contagem total de hemácias (CTHe)³⁶. As equações dos índices são apresentadas abaixo:

$$\text{VCM (fl)} = \text{Ht} \times 10 \div \text{CTHe} \times 10^5$$

$$\text{CHCM (g/dL)} = \text{Hb} \times 100 \div \text{Ht}$$

4.3.4 Contagem Total de Hemácias e Leucócitos

Esse procedimento foi realizado na câmara de Neubauer. Utilizou-se o diluente isotônico de Natt e Herrick⁷³. Num tubo de ensaio, utilizando pipeta automática, 20 µL da amostra foram misturados a 4 mL do diluente. Assim que a solução foi homogeneizada, a câmara de Neubauer foi preenchida para realizar uma contagem dois grupos celulares (hemácias e leucócitos). A contagem foi dada em células por milímetros cúbicos, sendo baseada na técnica de Almonsy e Monteiro⁶⁷.

Em cinco pequenos quadrantes do quadrante central da câmara, foram contados as hemácias. Assim, o cálculo do número de hemácias por milímetro cúbico (mm³) foi feito com a seguinte fórmula; levando-se em conta que a diluição utilizada foi 1:100:

$$\text{Contagem total de hemácias (mm}^3\text{)} = \text{N}^\circ. \text{ de hemácias contadas} \times 100 \times 10 \times 5$$

Onde, 100 refere-se à diluição, 10 à altura da câmara e 5 à área contada.

A diluição utilizada para contagem de leucócitos foi à mesma para contagem de hemácias, com uso de solução de Natt e Herrick⁷³. Também foi utilizada a

câmara de Neubauer para a contagem de leucócitos, diferindo apenas à área de contagem. Os leucócitos foram contados nos 4 quadrantes maiores dos cantos externos da câmara. A fórmula para o cálculo do número de leucócitos por milímetro cúbico seguiu a seguinte fórmula:

$$\text{Contagem total de leucócitos (mm}^3\text{)} = \text{n}^\circ \text{ de leucócitos} \times 100 \times 10 \times \frac{1}{4}$$

Sendo o fator 100 referente à diluição, o fator 10 referente à altura da câmara e o fator $\frac{1}{4}$, à divisão das quatro áreas contadas.

4.3.5 Contagem de Trombócitos

A técnica utilizada para contagem deste tipo celular foi realizada nas extensões sanguíneas a partir da contagem do número de trombócitos em cada 1000 eritrócitos contados. O cálculo em mm^3 foi obtido com a seguinte fórmula:

$$\text{Trombócitos /mm}^3 = \text{n}^\circ \text{ de trombócitos} \times \text{contagem total de eritrócitos} \div 1000$$

4.3.6 Proteína Plasmática Total (PPT)

Foi calculada após leitura do hematócrito, utilizando o plasma contido no tubo capilar. Esse procedimento foi realizado quebrando-se cuidadosamente o capilar com a finalidade de separar o volume de eritrócitos e o de leucócitos do plasma, sendo este último colocado sobre a superfície do refratômetro calibrado com água destilada. A dosagem da proteína plasmática total foi feita com uso do refratômetro e a unidade medida utilizada foi g/dL.

4.3.7 Contagem Diferencial de Leucócitos

Para a identificação dos tipos celulares foram utilizadas as extensões sanguíneas realizadas no dia da coleta. Os esfregaços sanguíneos foram corados pelo método Panótico Rápido^{74,75} sendo: solução 1 ou fixador que apresentasse coloração azulada, a solução 2 ou revelador de coloração vermelha, e a solução 3 ou corante de coloração roxa. Posteriormente, a lâmina foi lavada com água corrente e colocada para secar. A leitura foi realizada em microscópio óptico na objetiva com aumento de 100x. Por meio dessa contagem, foram avaliadas as seguintes células: heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos.

4.4 Análises Bioquímicas Plasmáticas

Foram realizadas análises dos níveis plasmáticos de: proteína total e fracionada, glicose e eletroforese de proteínas.

Foi utilizado o método de biureto e verde bromocresol para a dosagem da concentração de proteínas totais e fracionadas e para a eletroforese de proteínas o método de eletroforese capilar.

A eletroforese capilar baseia a separação das proteínas pelo seu tamanho e outras propriedades físico-químicas, através do fluxo em um tubo capilar. Devido à sua alta resolução, a eletroforese capilar permite a separação de bandas pouco visíveis no método convencional, como os picos de Beta1 (transferrina e hemopexina) e Beta2 (complemento C3), resultando em um padrão de seis bandas.

Essas análises foram realizadas na Divisão Veterinária Laboratório de Análises Clínicas Hermes Pardini em Belo Horizonte - MG em parceria com o Instituto de Ensino, Pesquisa e Preservação Ambiental Marcos Daniel, Vitória – ES. Os valores séricos da globulina foram obtidos através da diferença entre proteínas totais e albumina e pela divisão dos valores da albumina pelos valores da globulina obteve-se a relação albumina/globulina. A eletroforese só foi realizada com as amostras dos dois grupos no 42º dia.

Os valores séricos da glicose foram obtidos nos dias das coletas de materiais, utilizando-se inicialmente o glicosímetro manual e a partir do 15º dia com o Accu-Chek® Active (Roche®) imediatamente após a coleta utilizando sangue total, conforme orientação do fabricante. A dosagem de glicose foi realizada colocando-se uma gota de sangue em tiras de teste de glicose e levada ao aparelho medidor de glicose previamente calibrado, onde após 30 segundos o medidor indicava sua dosagem.

4.5 Inoculação Experimental de *Escherichia coli* por Via Subcutânea

Para a avaliação da reação imunológica dos animais inoculados com *E. coli*, resposta leucocitária ao agente infectado bem como do efeito da frequência de exposições e da concentração do inóculo, foi preparado um isolado da cultura pura da bactéria *E. coli* cepa EDL1284 segundo a escala 3 de MacFarland, inativada com

o uso de Gentamicina, pelo Laboratório de Microbiologia do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Vila Velha - UVV. A cepa EDL-1284 foi escolhida para o estudo por ser um isolado nacional e estar devidamente tipificada⁷⁶.

Antes da inoculação, uma fração do inóculo foi incubada a 37°C por 24h para verificar a sua esterilidade. A aplicação do inoculado no grupo teste foi realizada na região cervical por via subcutânea de 0,5ml da suspensão de *E. coli* isolada contendo 50% do volume de óleo mineral como adjuvante. Para simular condições semelhantes de manejo no grupo controle foi inoculado em todos os animais na região cervical por via subcutânea 0,5 ml da solução do meio de cultura com o antibiótico (Gentamicina) utilizado na preparação da *E. coli* isolada com 50% óleo mineral como adjuvante. Os animais nos dois grupos foram submetidos a três exposições, sendo o intervalo entre as exposições de 0, 15 e 28 dias.

4.6 Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR)

Segundo Wray e Davies⁷⁷, a soroaglutinação rápida é uma prova simples, prática e pouco dispendiosa. A reação de aglutinação caracteriza-se pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e partículas insolúveis que contêm determinantes antigênicos em sua superfície. Colocando essa suspensão em contato com o soro a ser testado, verifica-se se este possui o anticorpo em questão, o que se traduz pela aglutinação das partículas, facilmente visível a olho nu.

Na realização da sorologia de macroaglutinação, foi utilizada uma placa de vidro transparente, com 45 quadrados de 2 cm x 2 cm e pipetas de 20µl e 100 µl com ponteiros estéreis.

A técnica de soroaglutinação utilizada foi adaptada da Reação de Weil-Felix^{78,79}. O método de Weil-Félix foi o escolhido por ser de fácil execução e de baixo custo. Na soroaglutinação macroscópica foram seguidos os seguintes procedimentos: na placa de vidro bem limpa e no meio de cada quadrado, foi colocado 20µl de soro a ser pesquisado; em seguida, acrescenta-se ao lado, sem que se misturem, 20 µl de antígeno e, após, homogeneizar bem com um bastão de vidro ou similar. A leitura do teste foi realizada a olho nu, observando-se assim os níveis de aglutinação após 4 minutos.

Os soros foram classificados com os seguintes critérios:

- 4+ 100% de aglutinação (cor de fundo transparente a ligeiramente opaca)
- 3+ 75% de aglutinação (cor de fundo ligeiramente turva)
- 2+ 50% de aglutinação (cor de fundo moderadamente turva)
- 1+ 25% de aglutinação (cor de fundo turva)
- Não ocorreu aglutinação

A diluição inicial do soro foi de 1:2 para reação com o isolado obtido, tendo como título final a diluição máxima onde ocorrer à aglutinação de 50% ou mais de *E. coli* isolada. A maior diluição testada estimada será de 1:4048. O título do soro será dada pela mais alta diluição que apresenta aglutinação nítida.

4.7 Análise Estatística

Foi realizada análise descritiva dos dados, através de tabelas com média e desvio padrão. A comparação das variáveis entre os grupos foi feita através do teste t de independência, por meio do programa SPSS – Social Package Statistical Science, versão 15. O nível de significância usado para o teste foi de 5% ($p < 0.05$). O software utilizado na elaboração dos gráficos foi o SigmaPlot® versão 2000.

5 RESULTADOS

5.1 Biometria

Os dados biométricos (largura, comprimento e peso) das tartarugas *P. unifilis* descritos na tabela 1 foi baseado em todos os indivíduos utilizados no experimento.

A comparação entre a média dos pesos no início e ao final do experimento não detectou diferença significativa entre os dois grupos nos dois tempos.

Tabela 1 – Dados biométricos de tartarugas *P. unifilis* (tracajás) criadas em cativeiro, Vila Velha – 2010.

Característica	Grupo teste (n=10)			Grupo controle (n=10)		
	\bar{x}	DP	Intervalo de referência	\bar{x}	DP	Intervalo de referência
CRC (mm)	118,2	14,2	101-122	113,5	7,1	99-145
LRC (mm)	94,3	9,0	84-100	92,1	4,9	83-113
Peso (g) inicial	278	79,3	160-430	252,5	47,6	180-330
Peso (g) final	245	82,4	170-440	275	63,6	180-320

Legenda: CRC, comprimento retilíneo da carapaça; LRC, largura retilínea da carapaça; \bar{x} , média; DP, desvio padrão.

5.2 Resultados Hematológicos

Os resultados obtidos nas análises hematológicas estão apresentados no apêndice A e B.

Com relação à classificação morfológica das células foram identificados, seis tipos celulares: eritrócitos, trombócitos e os seguintes leucócitos em ordem de predominância: heterófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos. Não foram encontrados basófilos (Fig.3).

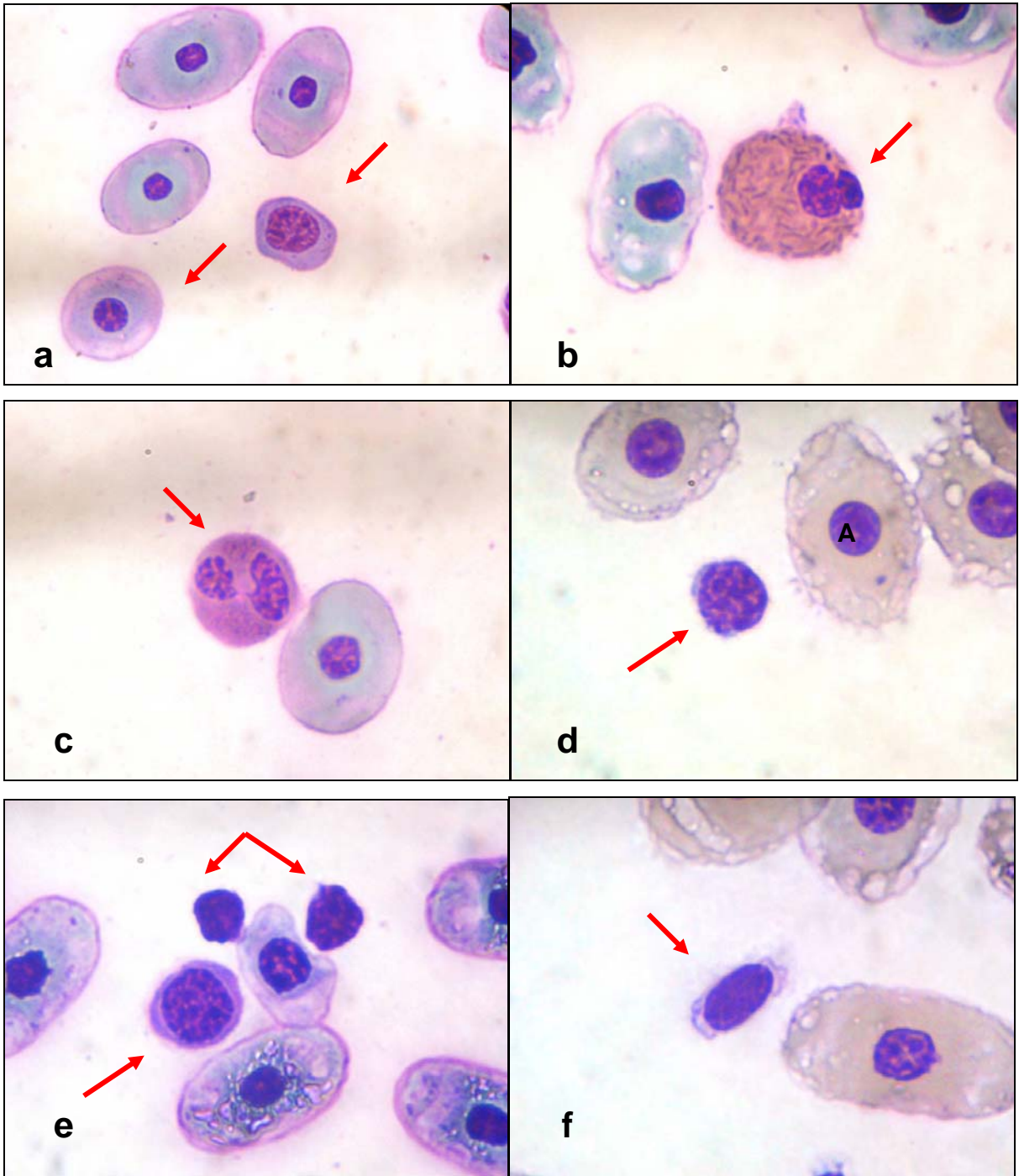


Figura 3 – Células sanguíneas de *Podocnemis unifilis* (coloração pelo método Panótico Rápido): a) Eritrócitos, eritroblasto (seta centro direita) e eritrócito policromatófilo (seta em baixo), b) heterófilo, c) eosinófilo, d) linfócito, e) monócito (grande) e linfócito (pequenos), f) trombócitos.

5.2.1 Eritrograma e total de trombócitos

Os gráficos de 1 a 7 mostram os valores de média e desvio padrão (média \pm DP) obtidos no eritrograma e contagem total de trombócitos do grupo teste e controle obtido antes e durante as três inoculações da substância teste e controle.

A análise estatística mostrou não haver diferenças entre os grupos, para os valores hematológicos de VG, Hb, CHCM, PPT e trombócitos. Há diferenças significativas quanto as seguintes variáveis hematológicas: CThe e VCM.

- Volume globular (VG) ou Hematócrito (Ht)

Os valores obtidos nas quatro coletas apresentam distribuição normal, sem diferença significativa entre os grupos. Os resultados nos dois grupos foram semelhantes, contudo, houve aumento do VG no 15º e 28º dias e decréscimo ao final de 42 dias (Gráfico 1).

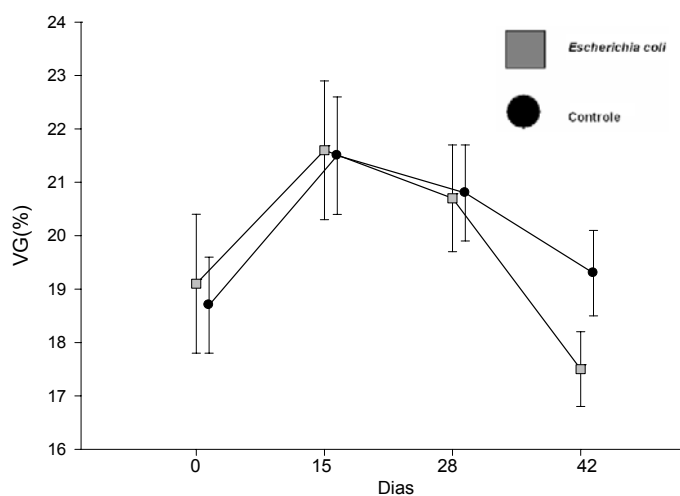


Gráfico 1 – Valores médios \pm DP do VG obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010

- Contagem Total de Hemácias (CThe)

A média da CThe (Gráfico 2) foi maior nos animais do grupo controle que no grupo teste. No grupo teste observou-se uma queda na contagem total de hemácias no 28º dia com diferença significativa entre as médias nos dois grupos ($p=0,033$).

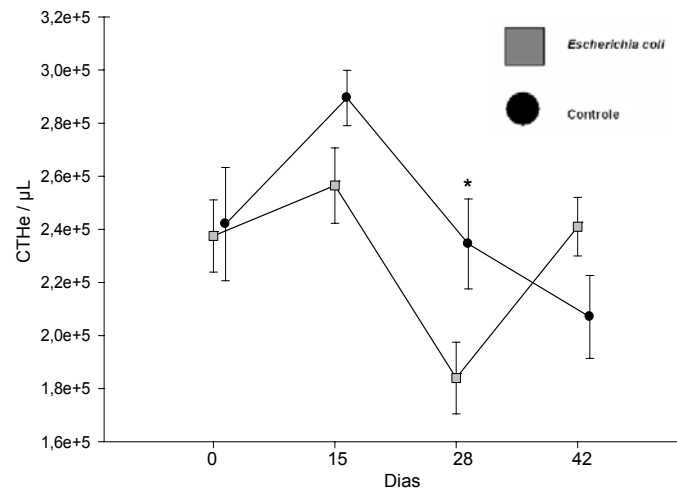


Gráfico 2 – Valores médios \pm DP da CThe obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010. * $p < 0.05$

- Hemoglobina

Os resultados obtidos nos dois grupos foram semelhantes, porém, os valores médios estão ligeiramente abaixo de 6g/dL (Gráfico 3).

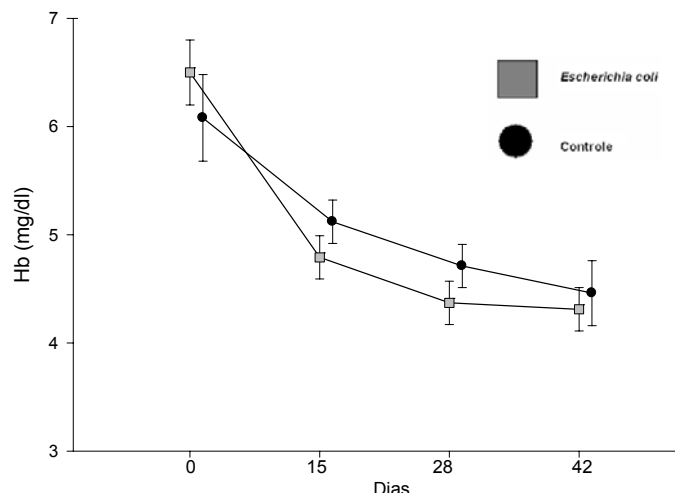


Gráfico 3 – Valores médios \pm DP do Hb obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010

- *Volume corpuscular médio (VCM)*

O VCM (Gráfico 4) foi maior nos animais do grupo teste do que no grupo controle. Houve um aumento gradual do VCM no 15º dia e no 28º com diferença significativa entre os dois grupos nesses dias ($p=0,033$ e $p=0,034$ respectivamente).

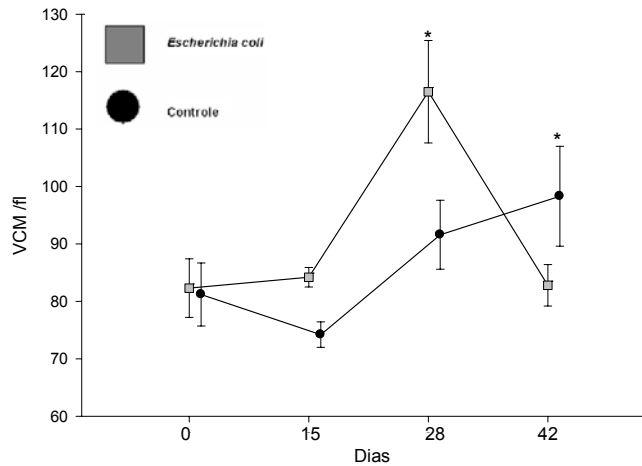


Gráfico 4 - Valores médios \pm DP do VCM obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010. * $p<0,05$

- *Concentração corpuscular média (CHCM)*

Os valores da CHCM (Gráfico 5) obtidos nas quatro coletas estatisticamente não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

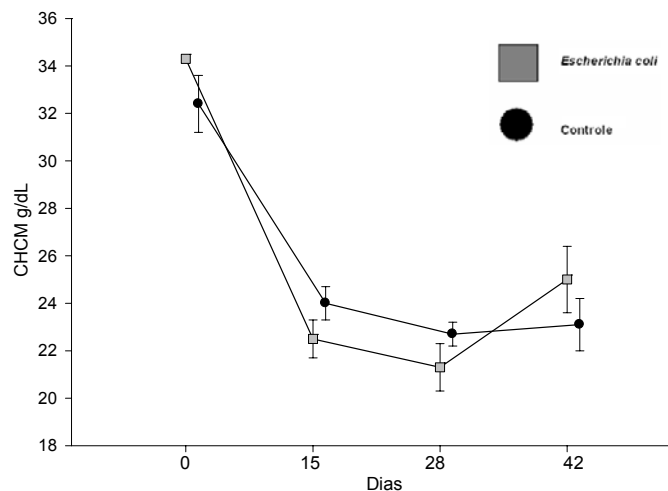


Gráfico 5 - Valores médios \pm DP do CHCM obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010

- *Proteína Plasmática Total (PPT)*

Não houve diferença entre os resultados entre os dois grupos (Gráfico 6).

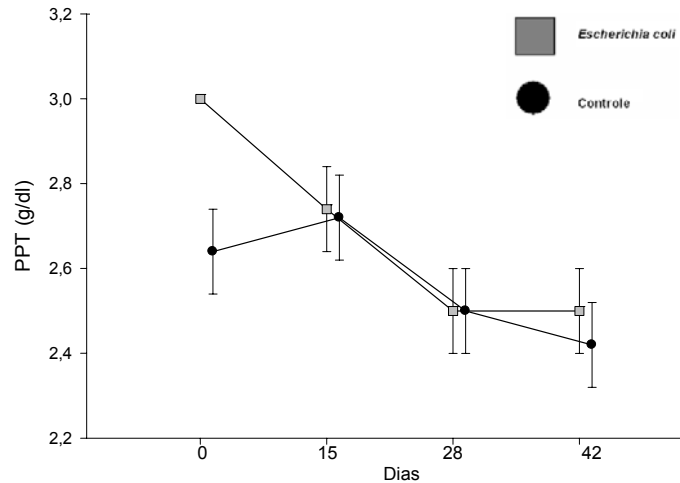


Gráfico 6 – Valores médios \pm DP da PPT obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010

- *Trombócitos*

Os trombócitos tiveram média de valores absolutos muito próximos (Gráfico 7). Não houve diferença significativa entre as médias dos resultados nos dois grupos. Já o grupo controle apresentou maior variação de valores.

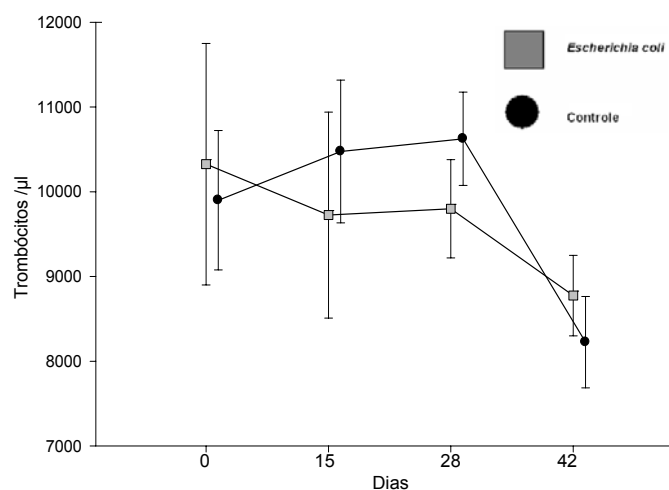


Gráfico 7 - Valores médios \pm DP dos trombócitos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010

5.2.2 Leucograma

Os gráficos de 8 a 12 mostram os valores de média e desvio padrão (média \pm DP) obtido no leucograma antes e durante as três inoculações do antígeno e do controle.

Houve um aumento progressivo na média da contagem total de leucócitos, monócitos, linfócitos e heterófilos nos 4 tempos analisados. A média da contagem de linfócitos do grupo teste teve um pico 15 dias após inoculação diminuindo e igualando-se posteriormente com o grupo controle. Houve um pico eosinofílico no 42º dia no grupo teste enquanto o grupo controle apresentou diminuição progressiva.

- Leucócitos

A contagem total de leucócitos apresentou um aumento gradual no decorrer do experimento nos dois grupos (Gráfico 8) mas sem diferença significativa.

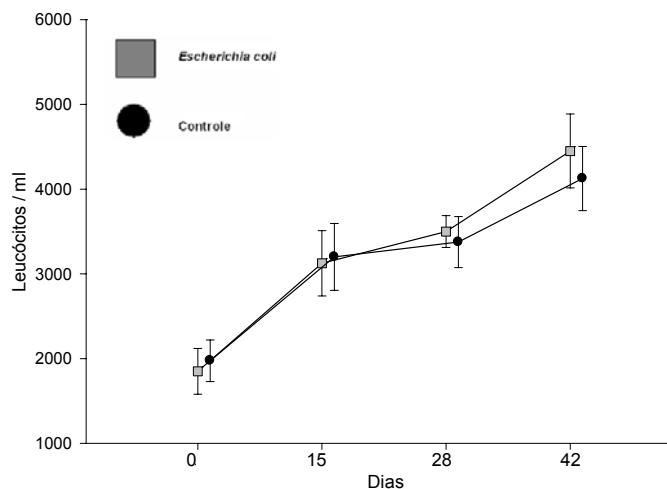


Gráfico 8 - Valores médios \pm DP da contagem total de leucócitos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010

- Monócitos

Houve um aumento gradual do número total de monócitos (Gráfico 9) nos dois grupos do início até o final do experimento sem diferença significativa entre os grupos.

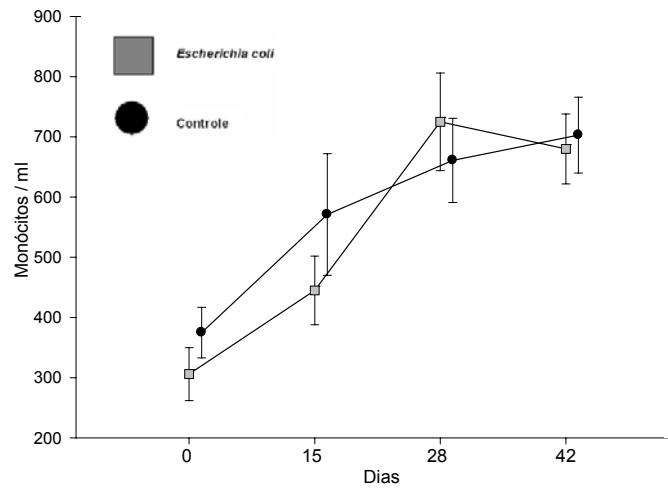


Gráfico 9 - Valores médios \pm DP dos monócitos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010

- Linfócitos

A média dos resultados dos linfócitos (Gráfico 9) no grupo teste foram superiores ao grupo controle. Há diferença significativa entre os grupos no 15º dia ($p=0,021$).

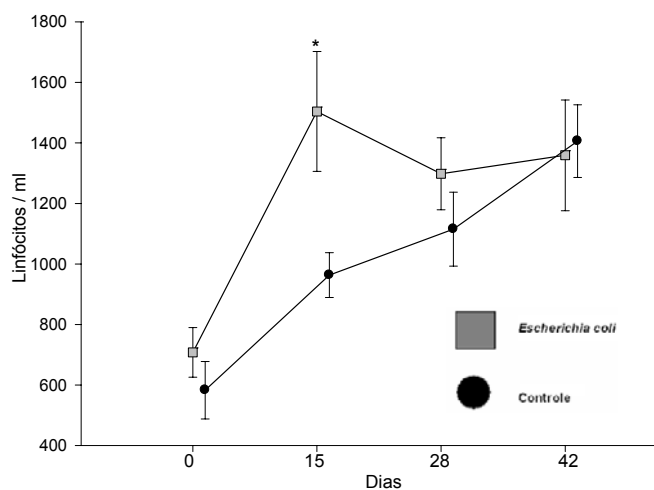


Gráfico 10 - Valores médios \pm DP dos linfócitos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010. * $p<0,05$

- Eosinófilos

A média na contagem de eosinófilos (Gráfico 11) no grupo teste foi inferior ao grupo controle. No grupo teste houve um declínio na 2ª e 3ª amostras e no 42º dia um aumento abrupto na quantidade de eosinófilos com diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,004$).

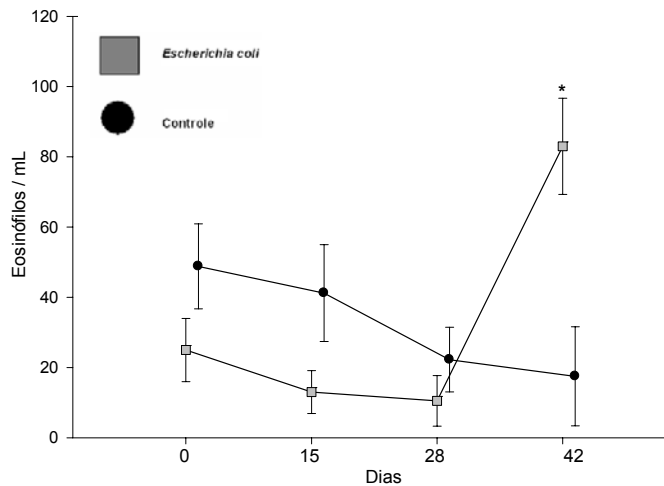


Gráfico 11 - Valores médios \pm DP dos eosinófilos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010. * $p<0,05$

- Heterófilos

Não houve diferença significativa entre os dois grupos (Gráfico 12).

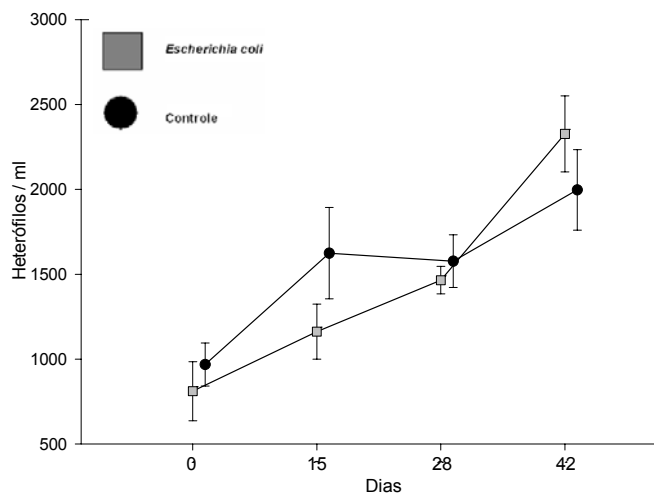


Gráfico 12 - Valores médios \pm DP dos heterófilos obtidos antes e durante as três inoculações da suspensão de *E. coli* em tartarugas *P. unifilis* mantidas em cativeiro, Vila Velha – 2010

5.3 Análises Bioquímicas Plasmáticas

Os resultados obtidos nas análises bioquímicas plasmáticas estão apresentados na Tabela 2 e 3.

No dia 0 da coleta após a centrifugação das amostras coletadas, as obtidas das tartarugas de número 2 e 6 do grupo controle coagularam.

Para padronizar o n amostral, foram retiradas de cada grupo as amostras 02 e 06, ficando um total de 64 amostras.

5.3.1 Bioquímica plasmática

Entre os parâmetros bioquímicos analisados (Tabela 2), não houve diferença entre os valores de proteína total e albumina entre os grupos, porém a média da relação albumina:globulinas do grupo teste foi menor que a do controle no 15^o dia (nível de significância de 5%). A média da glicose no grupo teste foi menor que a do grupo controle no dia 0 e no dia 42.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da variação da série bioquímica de tartarugas *P. unifilis* inoculadas com *E. coli* - Vila Velha – 2010

Dias	Proteína Total (g/dL)		Albumina (g/dL)		Globulinas (g/dL)		A:G (g/dL)		Glicose (g/dL)	
	Grupo teste	Grupo controle	Grupo teste	Grupo controle	Grupo teste	Grupo controle	Grupo teste	Grupo controle	Grupo teste	Grupo controle
0	2,50	2,85±0,06	1,30	1,38±0,05	1,20	1,48±0,05	1,10	0,93±0,05	23,9±4,7*	28,5±3,9*
15°	2,55±0,8	2,73±0,46	1,05±0,27	1,30±0,22	1,50±0,13	1,43±0,28	0,67±0,20*	0,93±0,11*	48,7±21,8	58,8±14,4
8°	2,77±0,63	2,59±0,30	1,11±0,17	1,23±0,08	1,66±0,66	1,36±0,24	0,74±0,20	0,93±0,14	34,3±8,6	43,6±15,6
42°	2,63±0,35	2,54±0,20	1,21±0,16	1,19±0,04	1,41±0,20	1,35±0,18	0,87± 0,05	0,90±0,09	39,0±5,9*	49,3±12,5*

* p<0.05

5.3.2 Eletroforese de proteínas

Os valores encontrados na eletroforese de proteínas (Tabela 3) não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Tabela 3 – Média, desvio padrão e intervalo de referência (entre parênteses) das frações de proteína de tartarugas *P. unifilis* inoculadas com *E. coli* ao final do experimento - Vila Velha – 2010

	Albumina (g/dL)	α 1 (g/dL)	α 2 (g/dL)	β 1 (g/dL)	β 2 (g/dL)	γ (g/dL)
Grupo teste	0,24±0,04 (0,20- 0,31)	0,64±0,07 (0,59-0,78)	0,68±0,14 (0,53-0,89)	0,36±0,13 (0,20-0,61)	0,56±0,09 (0,44-0,72)	0,12±0,02 (0,08-0,14)
Grupo controle	0,29±0,08 (0,18-0,38)	0,66±0,07 (0,58-0,78)	0,65±0,18 (0,23-0,82)	0,32±0,10 (0,25-0,56)	0,51±0,06 (0,39-0,53)	0,09±0,03 (0,04-0,14)

5.4 Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR)

Os soros sangüíneos foram testados pela prova de SAR em duas amostras do plasma sangüíneo que foram escolhidas de forma aleatória do grupo teste (controle positivo) e duas do grupo controle (controle negativo) no dia 0 e no 42º dia.

As quatro amostras foram testadas utilizando-se o soro não diluído e soro diluído na proporção 1:2 e 1:8 em solução salina 0,85% de NaCl. Os resultados obtidos nos dois grupos foram de positividade frente ao antígeno testado.

Todos os soros mostraram-se reagentes frente ao antígeno testado não sendo possível diferenciar a freqüência de aglutininas entre o controle positivo e o negativo das tartarugas pesquisadas. Frente a esse resultado as outras amostras sorológicas não foram testadas.

6 DISCUSSÃO

6.1 Biometria

Um animal do grupo teste apresentou perda de 100 g (66,6% do peso inicial) entre o início e o final do experimento. Os resultados hematológicos desse animal indicam um quadro de eosinofilia que talvez possa estar associada à infecção parasitária e estimulação do sistema imune³⁸.

6.2 Hematologia

Estudos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue têm sido realizados em outras espécies de tartarugas em várias regiões do mundo.

Sobre infecção experimental em répteis há poucos trabalhos na literatura. Podemos citar o trabalho de Ramos⁴¹ sobre a avaliação de aspectos morfológicos, histoquímicos, imunohistoquímicos e ultra-estruturais do processo inflamatório crônico induzido pela inoculação de *Mycobacterium marinum* vivo e morto pelo calor em tartarugas tracajá *Podocnemis unifilis* e o de Ramos *et al.*⁸⁰ que avaliou a resposta inflamatória induzida experimentalmente por um corpo estranho em tartarugas de água doce (*Trachemys dorbignyi*).

Com base na análise do teste t de independência, houve diferenças significativas nas variáveis CThe, VCM, linfócitos e eosinófilos (nível de significância 5%).

Os valores hematológicos variam dependendo da coleta sangüínea, manejo e técnicas de análise, condições sazonais do habitat, idade, gênero, estado nutricional, uso de anestésicos, local da coleta, mudanças ambientais, incluindo a temperatura e modificações segundo o gênero do animal^{10,37,66}. Além desses fatores Wilkinson⁶⁶, discute a possibilidade de se apresentar dificuldades para distinguir os diferentes tipos celulares presentes em répteis, porém podem existir variações de interpretação, dificultando a interpretação dos dados, sendo difícil distinguir se a diferença foi por mudanças fisiológicas no paciente ou por critérios de indentificação celular.

6.2.1 Eritrograma

- Número de Eritrócitos ou VG

Valores de VG considerados normais para répteis em geral, variam de 20% a 40%^{9,10,37}. Os valores considerados normais podem apresentar diferenças entre diversos autores, uma vez que os livros generalizam os valores para muitas espécies diferentes.

Nas espécies de água doce, Frair⁸¹ mencionou que geralmente os eritrócitos ocorrem em menores números, porém, são de maior tamanho quando comparados com as espécies terrestres. Apesar de grande variação nos valores hematológicos de répteis, em geral valores inferiores a 20% podem representar anemia e, quando superiores a 40%, hemoconcentração ou eritrocitose (policitemia)³⁸.

Eritrócitos jovens em animais sadios podem estar presentes tanto fisiologicamente como em animais que realizam ecdise^{8,10,36,40,67}. Répteis jovens tendem a apresentar maior grau de policromasia que os adultos³⁸.

Nesse estudo talvez as repetidas coletas com intervalo de poucos dias (0, 15 e 28 dias) levaram a um quadro de anemia crônica. O VCM alto pode ser indicativo da presença de eritrócitos policromatófilicos representando talvez, um indicador sensível da atividade hematopoiética da medula óssea em resposta a um possível processo anêmico.

A média de eritrócitos obtida nesse trabalho comparado aos trabalhos realizados com tartarugas *P. expansa* os valores obtidos nessa investigação foram inferiores ao encontrado por Oliveira-Júnior; Tavares-Dias e Marcon⁸⁴ 25.1 ± 6.9 , Rossini *et al.*⁸⁵ 35.7 ± 0.98 , Martinez *et al.*⁸⁶ $34,30 \pm 12,68$ em fêmeas e $31,75 \pm 3,10$ em machos e por Tavares-Dias *et al.*⁸⁷ comparando o estado nutricional dos animais mantidos em cativeiro o valor médio de VG no grupo controle foi de 25.1 ± 7.0 e no grupo desnutrido foi de 18.4 ± 5.2 .

- Contagem Total de Hemácias (CTHe)

Os répteis apresentam menor quantidade de hemácias em comparação com a de mamíferos e aves; a CTHe parece ser inversamente proporcional ao tamanho das hemácias. Os valores de CTHe, Hb e VG variam em função de diversos fatores,

inclusive ambiente (CTHE é maior antes do período de hibernação; esse parâmetro é menor logo após a hibernação), estado nutricional e sexo (machos tendem a apresentar CThe mais elevada que fêmeas)³⁸. Este fato cria para o clínico uma dificuldade maior para a interpretação de resultados em exames hematológicos⁹.

A diminuição do número de hemácias observada nesse trabalho talvez indique um quadro de anemia macrocítica (VCM alto) e normocrômica (CHCM normal). As anemias não regenerativas geralmente estão relacionadas às doenças inflamatórias crônicas, especialmente as associadas a agentes infecciosos⁸⁸. Nesse experimento não se provocou uma infecção, mas talvez a presença das toxinas da *E. coli* possa ter levado ao quadro de anemia.

A média obtida para CThe foi diferente do encontrado por Rangel-Mendoza *et al.*⁸⁹ em *Dermatemys mawii* ($0.53 \times 10^{12}/L$ e $0.42 \times 10^{12}/L$). Já comparando aos trabalhos realizados com tartarugas *P. expansa* o valor obtido nessa investigação foi inferior ao encontrado por Martinez *et al.*⁸⁶ ($0,47 \pm 0,18 \times 10^9/L$ e $0,43 \pm 0,05 \times 10^9/L$), Oliveira-Júnior; Tavares-Dias e Marcon⁸⁴ ($0.28 \pm 0.07 \times 10^6/\mu L$), Rossini *et al.*⁸⁵ ($0.91 \pm 0.09 \times 10^6/\mu L$) e por Tavares-Dias *et al.*⁸⁷ ($0.280 \pm 0.070 \times 10^6/\mu L$ e $0.220 \pm 0.060 \times 10^6/\mu L$).

É preciso destacar que os animais usados no estudo de Rangel-Mendoza *et al.*⁸⁹, Martinez *et al.*⁸⁶, Oliveira-Júnior; Tavares-Dias e Marcon⁸⁴, Rossini *et al.*⁸⁵ e Tavares-Dias *et al.*⁸⁷ foram animais machos e fêmeos, de vida livre e cativo, que diferem daqueles utilizados nessa pesquisa que foram animais criados em cativeiro sem dimorfismo sexual externo. Além disso, estas diferenças podem se dar em função de fatores inerentes a metodologia de contagem, animais de cativeiro e vida livre, entre outros.

- Hemoglobina

Segundo Mader⁹ a concentração normal de hemoglobina em répteis varia de 6 a 12 g/dL. A redução na hemoglobina foi observada pela diminuição dos valores de CHCM nos dois grupos, o que nos leva a crer que a anemia foi provavelmente devido à coleta de sangue, pois não houve diferença entre os grupos.

A concentração de hemoglobina apresentou valores menores que o encontrado por Brites⁹⁰ em *Phrynops geoffroanus* machos expostos à influência urbana no rio Uberabinha (4,50 a 10,0 g/dL); Troiano e Silva⁹¹ em tartaruga terrestre

Argentina *Chelonoides chilensis chilensis* ($10 \pm 1,54$ g/dL machos e $10 \pm 1,49$ g/dL fêmeas); Wack e Hatcher⁸³ em *Elseya novaeguineae* (8,2 e 10,0 g/dL fêmeas e machos respectivamente), Marks e Citino⁹² em *Testudo radiata* ($6,7 \pm 1,5$ g/dL) e por Rossini *et al.*⁸⁵ (11.8 ± 0.54 g/dL) e Oliveira-Júnior, Tavares-Dias e Marcon⁸⁴ (6.5 ± 1.2 g/dL) em tartarugas *P. expansa*.

No trabalho de Tavares-Dias *et al.*⁸⁷ comparando o estado nutricional de *P. expansa* mantidas em criatório encontrou diferenças significativas no valor médio de Hb no grupo controle (6.5 ± 1.9 g/dL) e no grupo desnutrido (1.9 ± 1.3 g/dL). A concentração da Hb no grupo desnutrido foi muito inferior ao encontrado nesse trabalho.

- Índices Hematimétricos

Os índices volume corpuscular médio (VCM) e concentração corpuscular média (CHCM) estão relacionados ao volume dos eritrócitos e sua concentração de hemoglobina, sendo usados para classificar morfológicamente as anemias⁷¹. Esses índices têm como foco a classificação morfológica de anemias ao relacionar volume eritrocitário e sua concentração de hemoglobina³⁷.

Baixos VCM e CHCM indicam anemias microcíticas hipocrômicas causadas por anemia por deficiência de ferro. Um VCM alto sugere anemias macrocíticas causadas por anemias megaloblásticas, devido à deficiência de ácido fólico ou vitamina B12, desordens congênitas de DNA ou reticulocitose. Em razão de o VCM refletir o volume médio de muitas células, um valor dentro da faixa normal pode ocorrer em pacientes cujo tamanho de glóbulos vermelhos varia, e inclui células microcíticas e macrocíticas⁹⁴.

As médias dos valores dos índices hematimétricos obtidos foram menores que os obtidos por Rangel-Mendoza *et al.*⁸⁹ em tartarugas de água doce *Dermatemys mawii* de vida livre e em cativeiro (VCM 824.05fL e 887.3fL e CHCM 7.79g/dL e 7.73 g/dL respectivamente) e em tartarugas *P. expansa* por Rossini *et al.*⁸⁵ (VCM 411.1 ± 22.9 fL e CHCM 32.7 ± 1.4 g/dL) e Oliveira-Júnior, Tavares-Dias e Marcon⁸⁴ (VCM 922.3 ± 150.2 fL e CHCM 26.2 ± 5.4 g/dL).

Tavares-Dias *et al.*⁸⁷ comparando o estado nutricional de *P. expansa* mantidas em criatório o valor do VCM foi de 922.0 ± 150.0 fL e 852.0 ± 72.0 fL superiores ao obtidos nesse trabalho. Já no valor do CHCM esse autor encontrou diferença

significativa entre os grupos (26.2 ± 5.4 g/dL no grupo controle e 10.0 ± 5.1 g/dL no grupo desnutrido) valores inferiores ao encontrado nesse trabalho.

O cálculo dos índices hematimétricos CHCM e VCM em eritrócitos nucleados não leva em conta o volume do núcleo. Assim, é provável que os valores não reproduzam com exatidão a realidade das proporções hemoglobínicas, sendo, portanto um tema importante para outros estudos.

- Proteína Plasmática Total

A proteína está entre os mais importantes fatores nutricionais de alimentação de animais⁹⁵. Os resultados obtidos já eram esperados, visto que a alimentação é o principal fator que influencia nos níveis de PPT⁹⁵. O fato de não haver diferença entre os resultados de PPT entre os grupos é resultado de uma dieta semelhante com valores protéicos semelhantes. A inoculação de *E. coli* não foi capaz de alterar os valores de proteína total através da produção de anticorpos

6.2.2 Leucograma

- Contagem Total de Leucócitos

Uma leucocitose é, em geral, resultante de um processo infeccioso, mas também pode ocorrer após uma situação de estresse e traumatismos⁹⁷. O aumento de leucócitos observado nesse experimento provavelmente foi provocado pelo processo inflamatório no local das inoculações. Três animais tanto do grupo controle quanto do teste apresentaram reação local na região cervical na região da inoculação das suspensões o que justifica o quadro inflamatório. Houve aumento na contagem total de leucócitos desses animais de forma gradual no decorrer do experimento com pico no 42º dia.

Os valores da contagem total de leucócitos avaliados apresentam grande amplitude de variação. Quando confrontados com outros estudos os valores apresentam muitas variações que podem ser em decorrência da metodologia utilizada pelos pesquisadores, diferenças de idade, variações fisiológicas, estresse durante a manipulação dos animais, temperatura, entre outros.

Como exemplo podemos citar o trabalho de Rangel-Mendoza *et al.*⁸⁹ e compara tartarugas de água doce *Dermatemys mawii* de vida livre e em cativeiro o valor da contagem total de leucócitos foi de $13.45 \times 10^9/L$ e $13.65 \times 10^9/L$ respectivamente. Em tartarugas *P. expansa* mantidas em zoológico Martinez *et al.*⁸⁶ o valor médio da contagem de leucócitos foi de $3,08 \pm 1,26 \times 10^9/L$ em fêmeas e de $3,80 \pm 1,40 \times 10^9/L$ para machos. Tavares-Dias *et al.*⁸⁷ comparando o estado nutricional de *P. expansa* mantidas em criatório encontrou diferenças significativas no valor médio da contagem total de leucócitos entre o grupo controle ($6701.0 \pm 4048.0 \mu L$) e o grupo desnutrido ($4616.0 \pm 1916.0 \mu L$).

- Monócitos

Houve um aumento gradual do número total de monócitos nos dois grupos provavelmente devido à persistência do processo inflamatório por causa da presença do óleo mineral, que retarda a liberação do antígeno. A inflamação crônica leva a monocitose.

Em geral, há baixa quantidade de monócitos no esfregaço sangüíneo de répteis normais, variando de 0 a 10% na contagem diferencial de leucócitos³⁸. Brites⁹⁰ reportou para *P. geoffroanus* do rio Uberlândia uma porcentagem de 1,5%. Outros estudos apresentaram valores médios de $0,51 \times 10^3/mm^3$ em *Terrapene carolina carolina* com phaeohyphomycose¹⁰⁰ de $0,3 \times 10^3/mm^3$ em *Clemmys muhlenbergii*⁸². Os monócitos estão presentes em uma variedade de processos inflamatórios, sendo comuns em respostas granulomatosas relacionadas a infecções bacterianas^{32,36,101} e processos crônicos¹⁰.

Em tartarugas *P. expansa* capturadas pós-postura Rossini *et al.*⁸⁵ encontrou o valor médio de monócitos foi de $0.06 \pm 0.02 \times 10^3/\mu L$. Já em tartarugas dessa mesma espécie mantidas em zoológicos Martinez *et al.*⁸⁶ encontrou o valor médio de monócitos de $0,04 \pm 0,02 \times 10^9/L$ em fêmeas e de $0,08 \pm 0,04 \times 10^9/L$ para machos.

- Linfócitos

O número de linfócitos em répteis é extremamente variável, sendo afetado por muitos fatores tais como: espécie, idade, sexo, sazonalidade, estado nutricional, parasitismo por hemoprotozoários e metazoários¹⁰. A população de linfócitos no

sangue de répteis também é variável; em algumas espécies pode responder por mais de 80% da contagem diferencial normal de leucócitos³⁸. O aumento de linfócitos, linfocitose, decorre de processos inflamatórios, reparo de feridas, infecção parasitária (espirorchiase, anisakiase e hematozoários) e doença viral³⁶.

A tendência à linfocitose observadas nas tartarugas nesse grupo indica uma resposta imunológica desses animais à inoculação de suspensão da *E. coli*.

Comparando com dados de outras espécies de quelônios de água doce, animais sadios da espécie *Clemmys muhlenbergii*, em cativeiro, apresentaram valores maiores (valor médio de machos: $8,2 \times 10^3 \text{ mm}^3$)⁸² e animais enfermos da espécie *Orlitilia borneensis* também tiveram valores mais elevados (valor médio: $5,7 \times 10^3 \text{ mm}^3$)¹⁰².

Tavares-Dias *et al.*⁸⁷ comparando o estado nutricional de *P. expansa* mantidas em criatório o valor médio dos linfócitos no grupo controle foi de $1.090,0 \pm 962,0 \mu\text{L}$ e no grupo desnutrido foi de $846,0 \pm 540,0 \mu\text{L}$. Avaliando as alterações na contagem total de leucócitos esse autor coloca que elas podem ser utilizadas como importante indicadore do estado de saúde de tartarugas quando que sofrem qualquer condição adversa e, em muitos casos também pode ser uma ferramenta útil para avaliar o sistema imunológico. A menor contagem de leucócitos foi devido à redução de azurófilos, heterófilos e números basófilos causada por más condições nutricionais durante o experimento.

Em tartarugas *P. expansa* capturadas pós-postura Rossini *et al.*⁸⁵ encontrou o valor médio de linfócitos foi de $1,5 \pm 0,21 \times 10^3 / \mu\text{L}$. Já Oliveira-Júnior, Tavares-Dias e Marcon⁸⁴ em tartarugas da mesma espécie mantidas em criatório o valor médio de $730,0 \pm 996,0 \mu\text{L}$ e Martinez *et al.*⁸⁶ em tartarugas mantidas em zoológicos o valor médio de linfócitos foi de $1,05 \pm 0,13 \times 10^9 / \text{L}$ em fêmeas e de $0,85 \pm 0,17 \times 10^9 / \text{L}$ para machos.

- Eosinófilos

A participação dos eosinófilos na contagem dos leucócitos está estimada entre 7 a 20% em répteis¹⁰.

O número de eosinofilos nos répteis pode variar como decorrência da resposta a uma variedade de parasitas, ao ambiente (sazonalidade) e a estímulos

não específicos¹⁰³. Eosinofilia pode ser associada às infecções parasitárias ou estimulação do sistema imune³⁸.

De acordo com Tavares-Dias *et al.*⁸⁷, a contagem de eosinófilos não varia em casos de desnutrição em *P. expansa*.

Em tartarugas *P. expansa* capturadas pós-postura Rossini *et al.*⁸⁵ encontrou o valor médio de eosinófilos foi de $0.14 \pm 0.37 \times 10^3 / \mu\text{L}$. Já Oliveira-Júnior, Tavares-Dias e Marcon⁸⁴ em tartarugas da mesma espécie mantidas em criatório o valor médio de $491.0 \pm 337.0 \mu\text{L}$.

Nesse estudo, não foi realizado exames coproparasitológicos que pudessem confirmar a ocorrência de endoparasitas.

- Heterófilos

O aumento crescente do número de heterófilos nos dois grupos nesse estudo indica que houve uma reação ao estímulo repetido pela inoculação sem uma influência direta da *E.coli*.

Segundo Campbell³⁶, os heterófilos de répteis sadios podem representar mais de 40% da contagem diferencial de leucócitos podendo também ser influenciada por fatores sazonais. A principal função dos heterófilos é a fagocitose. O aumento significativo de sua quantidade em répteis costuma estar associado à doença inflamatória, em especial infecção microbiana e parasitária, ou lesão tecidual³⁸.

Dois trabalhos descrevem a ocorrência de enfermidades em quelônios de vida livre, associada a um aumento no número de heterófilos absolutos. Knotkova *et al.*¹⁰² relatam à ocorrência de lesões necróticas no casco do cágado *Orlitilia borneensis* (valor médio de $4,3 \pm 2,4 \times 10^3 \text{ mm}^3$) e Joyner *et al.*¹⁰⁰ descrevem casos de lesões fúngicas na espécie terrestre *Terrapene carolina carolina* (valor médio de $6,14 \pm 2,4 \times 10^3 \text{ mm}^3$).

Tavares-Dias *et al.*⁸⁷ comparando o estado nutricional de *P. expansa* mantidas em criatório o autor concluiu que a desnutrição afeta a resposta heterofílica.

Em tartarugas *P. expansa* capturadas pós-postura Rossini *et al.*⁸⁵ encontrou o valor médio de heterófilos foi de $4.1 \pm 0.45 \times 10^3 / \mu\text{L}$. Já Oliveira-Júnior, Tavares-Dias e Marcon⁸⁴ em tartarugas da mesma espécie mantidas em criatório o valor médio de $2883.0 \pm 1064.0 \mu\text{L}$ e Martinez *et al.*⁸⁶ em tartarugas mantidas em zoológicos o valor

médio de linfócitos foi de $1,96 \pm 0,13 \times 10^9/L$ em fêmeas e de $2,90 \pm 0,21 \times 10^9/L$ para machos.

6.2.3 Trombócitos

Os trombócitos de répteis apresentam funções semelhantes a plaquetas de mamíferos sendo importante na formação de trombos, coagulação sanguínea e cicatrização de feridas^{9,36}, além de estarem associados a respostas inflamatórias⁸⁰. Segundo Campbell³⁸ trombócitos imaturos de répteis se assemelham aos de aves; quando presentes no esfregaço sanguíneo indicam resposta regenerativa. Muitos trabalhos na literatura reportam a ocorrência de trombócitos em quelônios e devido a diferenças na metodologia de contagem, torna-se difícil fazer uma comparação entre os dados.

Em geral, condições patológicas com presença de endotoxinas podem causar lesões vasculares, que culminam em quebra da homeostasia sanguínea, por interromper o equilíbrio na produção de substâncias procoagulantes e anticoagulantes, além de expor o subendotélio, ativando fatores tissulares da coagulação. Com isso inicia-se a formação de coágulos com ativação trombocitária e do sistema fibrinolítico, aumentando-se a demanda trombocitária⁹⁶.

Foi observada uma diminuição gradual na contagem de trombócitos no grupo teste (15, 28 e 42 dias após a inoculação). Visto que o grupo controle não apresentou uma trombocitopenia devido ao aumento da demanda de trombócitos pelas lesões vasculares causado pelas repetidas coletas, sugere-se que a trombocitopenia observada no grupo teste possa ser decorrente da presença de toxinas *E. coli*.

Em relação aos trombócitos os resultados obtidos nesse trabalho apresentaram uma variação de valores. Os valores médios encontrados por Oliveira-Júnior; Tavares-Dias e Marcon⁸⁴ em tartarugas *P. expansa* foi de $4058,0 \pm 1915,0 \mu l$ e por Tavares-Dias *et al.*⁸⁷ o valor médio no grupo controle foi de $4058,0 \pm 1915,0 \mu l$ e no grupo desnutrido de $3809,0 \pm 2072,0 \mu l$. Os resultados no grupo desnutrido foram muito inferiores ao obtido nessa pesquisa.

6.3 Análises Bioquímicas Plasmáticas

Há pelo menos uma centena de proteínas plasmáticas descritas e identificadas, no homem e nos animais, com inúmeras funções no organismo. As principais e mais conhecidas proteínas são a albumina, globulina e suas frações, e o fibrinogênio, cujos valores normais variam de acordo com a idade, espécie animal e condições fisiológicas¹¹⁰.

A eletroforese de proteínas é de grande valor como método auxiliar para o diagnóstico de doenças e compreensão de alterações fisiológicas^{111,110}, pois mudanças dramáticas nas frações protéicas são evidentes em diversas enfermidades e podem auxiliar na procura de um real diagnóstico, quando outros testes são pouco conclusivos.

Ela tem se mostrado um teste diagnóstico auxiliar muito útil em mamíferos e aves, que ainda precisa ser explorado na clínica de répteis e anfíbios¹¹². Somente pequenas mudanças no padrão eletroforético não podem ser consideradas como diagnóstico de uma doença específica, porém os resultados da eletroforese quando devidamente interpretados, podem ser úteis como prognóstico e diagnóstico auxiliar na avaliação clínica¹¹³.

- Proteínas totais (Pt)

Em répteis os valores normais de proteína plasmática total geralmente variam de 3 a 8 g/dL³⁶. A determinação da proteína total sérica através do método de biureto é considerada mais acurada e precisa do que pela refratometria¹¹⁴.

As proteínas totais representam o equilíbrio entre o anabolismo e catabolismo protéico, e as alterações são importantes na determinação de enfermidades relacionadas com a hipoproteinemia e hiperproteinemia⁶⁷.

A hipo ou hiperproteinemia são atribuídas principalmente a diminuição de albumina e/ou aumento de globulina. Considera-se hiperproteinemia valores acima de 7g/dL e pode ocorrer em consequência de desidratação ou hiperglobulinemia associada à doença inflamatória crônica¹¹³. Hipoproteinemia em répteis está relacionada à má nutrição, má absorção, às enteropatias e às doenças renais crônicas e hepáticas⁶⁷. Porém, devem-se considerar outras causas como má

absorção, má digestão, enteropatias com perda de proteínas, hemorragia grave e doença hepática ou renal crônica¹¹⁵.

A média das proteínas totais foi ligeiramente inferior à encontrada em outros trabalhos. No grupo teste houve um ligeiro aumento entre o 15º e 28º dias, enquanto que no grupo controle houve uma queda gradual do início até o final do experimento, sem diferença significativa entre os grupos.

Estudos realizados em tartarugas *P. unifilis* de vida livre a média encontrada por Malta e Nascimento¹¹⁶ foi de $4,16 \pm 1,03$ g/dL.

Na literatura há vários trabalhos em tartarugas da espécie *P. expansa*. Em animais mantidos em criatório comercial a média encontrada por Santos *et al.*¹⁰⁵ foi de $4,43 \pm 0,55$ g/dL, valores acima dos encontrados por Martinez *et al.*⁸⁶ em animais mantidos em zoológicos que encontrou o valor médio de $4,37 \pm 1,57$ g/dL em fêmeas e de $3,75 \pm 0,79$ g/dL para machos. Mundim *et al.* (1999) em animais no seu habitat natural o valor médio foi de $3,23 \pm 0,50$ g/dL e Oliveira-Júnior; Tavares-Dias e Marcon⁸⁴ foi de $3,5 \pm 1,3$ g/dL.

Tavares-Dias *et al.*⁸⁷ comparando o estado nutricional de *P. expansa* mantidas em criatório encontrou diferenças significativas no valor médio de proteínas totais no grupo controle ($3,5 \pm 1,3$ g/dL) e no grupo desnutrido ($1,6 \pm 0,8$ g/dL).

Rangel-Mendoza *et al.*⁸⁹ comparando tartarugas de água doce *Dermatemys mawii* de vida livre e em cativeiro o valor de proteínas totais foi de 1.85 g/dL e 1.7 g/dL respectivamente.

- Albumina

Segundo Dessauer¹¹⁷, o plasma de répteis de todos os maiores grupos contém uma proteína com propriedades análogas à albumina humana, com baixo peso molecular, sendo uma proteína hidrofílica de relativamente alta carga, sendo que as tartarugas de água doce geralmente têm baixas concentrações de albumina.

A albumina é uma proteína sintetizada no fígado que corresponde a cerca de 50% do total de proteínas no soro^{118, 119}. Desempenha importante papel no transporte de diversas substâncias e manutenção da pressão oncótica¹¹⁹.

Para a albumina as médias encontradas neste trabalho não apresentaram diferenças nos dia 15, 28 e 42. A média da albumina foi ligeiramente inferior à

encontrada em outros trabalhos. Em *P. unifilis* de vida livre a média encontrada por Malta e Nascimento¹¹⁶ foi de $1,55 \pm 0,46$ g/dL.

Santos et al¹⁰⁵ em tartarugas *P. expansa* mantidas criatório comercial a média encontrada foi de $2,51 \pm 0,32$ g/dL. Já para Martinez et al.⁸⁶ em animais dessa mesma espécie em animais mantidos em zoológicos o valor médio de albumina foi de $1,92 \pm 0,38$ g/L em fêmeas e de $1,78 \pm 0,23$ g/L para machos.

Esta diferença entre os valores pode ser atribuída às diferentes técnicas utilizadas nos estudos, sendo que Bolten et al⁶⁹ ao testarem duas técnicas distintas apresentaram resultados significativamente diferentes para alguns parâmetros bioquímicos, inclusive para a albumina.

- Globulinas

Com relação a alterações de valores sangüíneos, a hipo ou hiperproteinemia são atribuídas principalmente a diminuição de albumina e/ou aumento de globulina. As hipoalbuminemias em répteis estão associadas freqüentemente à má nutrição, podendo-se incluir também má absorção e má digestão, geralmente associadas a parasitismo intestinal, enteropatias, severa perda de sangue, e doenças hepáticas ou renais crônicas³⁶.

Em relação às globulinas, os resultados encontrados neste estudo para o grupo teste e grupo controle, não diferiram estatisticamente, sendo que os valores do grupo teste foram ligeiramente superiores ao controle. Esse achado talvez seja uma resposta de defesa do organismo à inoculação da substância teste e controle, uma vez que elevações plasmáticas de globulinas são freqüentes em reações inflamatórias.

As hiperproteinemias ocorrem com a hemoconcentração (desidratação) ou elevação das globulinas em doenças inflamatórias crônicas³⁶.

O valor média das globulinas foi ligeiramente inferior ao encontrado em outros trabalhos. Em *P. unifilis* de vida livre a média encontrada por Malta e Nascimento¹¹⁶ (2005) foi de $2,62 \pm 0,85$ g/dL. Santos et al (2005) em tartarugas *P. expansa* mantidas criatório comercial a média encontrada foi de $1,92 \pm 1,46$ g/dL.

Em tartarugas *P. expansa* mantidas em zoológicos Martinez et al.⁸⁶ o valor médio de globulinas foi de $1,96 \pm 0,46$ g/L em fêmeas e de $1,98 \pm 0,59$ g/L para machos.

Pires *et al.*¹⁰⁶ em 22 amostras plasmáticas de tartarugas marinhas (*Caretta caretta*) de vida livre obteve um valor médio de $2,69 \pm 0,46$ g/dL e de $3,54 \pm 0,93$ g/dL em tartarugas de cativeiro.

- Relação Albumina:Globulina

A relação entre a albumina e globulina é de grande valor na clínica veterinária, servindo de base na classificação do perfil eletroforético das proteínas, bem como na natureza deste perfil.

A relação A:G obtida nesse estudo diferiu estatisticamente do grupo teste para o grupo controle no 15º dia ($p=0,012$). No grupo controle os valores mantiveram-se constantes e no grupo teste houve uma diminuição gradual desses valores no 15º e 28º dias. A razão da maior relação do índice A/G pode ser atribuída ao aumento da concentração de albumina nos animais do grupo controle e maior concentração de globulinas no grupo teste. Os valores da relação albumina/globulina no grupo teste apresentou maior variação de valores e no grupo controle se manteve constantes.

Normalmente espera-se uma razão albumina/globulina maior ou igual a 1. Resultados baixos podem ocorrer em casos de infecções agudas. Segundo observações feitas por Bacila¹²⁰, a relação A/G é importante na avaliação de infecções, quando elas se alteram, invertendo-se os valores pelo incremento que ocorre na concentração das imunoglobulinas, especialmente as γ -globulinas.

Em doenças agudas ou crônicas (processos inflamatórios) se observa um aumento das proteínas plasmáticas totais porque se elevam as globulinas e ocasionalmente diminui a albumina causando-se uma diminuição na a relação albumina/globulinas. Muitas vezes as proteínas totais podem estar em intervalos normais, embora as relações albumina/globulina diminuía, de forma que esta relação tem maior significado clínico¹¹⁰.

Em *P. unifilis* de vida livre a relação A:G encontrada por Malta e Nascimento¹¹⁶ foi de $0,64 \pm 0,25$ g/dL e por Santos *et al.*¹⁰⁵ em tartarugas *P. expansa* a relação foi de $1,55 \pm 1,46$ g/dL.

Em 22 amostras plasmáticas de tartarugas marinhas (*Caretta caretta*) de vida livre, um valor médio de $0,43 \pm 0,10$ g/dL foi obtido e de $0,41 \pm 0,07$ mg/dL em tartarugas de cativeiro por Pires *et al.*¹⁰⁶.

- Glicose

A concentração normal de glicose no sangue de répteis varia de acordo com a espécie, estado nutricional e condições ambientais. Há uma variação sazonal normal. Os valores variam de 60 a 100mg/dL³⁶.

A hipoglicemia nestes animais pode ser resultado de má nutrição, dietas com baixos níveis protéicos, hepatopatias severas e endocrinopatias, enquanto que a hiperglicemia (valores de glicose acima de 200 mg/dL) raramente é documentada nestas espécies, sendo forte indício de diabetes mellitus³⁸.

O nível de variável glicose do grupo controle mostrou-se ligeiramente acima do grupo teste do início ao final do experimento (Gráfico 16). Houve um aumento abrupto dos níveis de glicose no 15º dia, uma queda gradual desses níveis no 28º dia e ao final de 42 dias um ligeiro aumento.

A média do grupo controle no dia 0 de $28,5 \pm 3,9$ mg/dL foi superior e estatisticamente diferente daquela encontrada para o grupo teste de $23,9 \pm 4,7$ mg/dL ($p=0,002$). No 15º e 28º dias não houve diferenças significativas entre os dois grupos. No 42º houve diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,030$).

Tal fato talvez tenha se dado em função do aparelho utilizado para dosar a glicose no dia 0 ser de uma marca diferente do utilizado nos outros dias. O fato de haver diferentes estudos com resultados conflitantes entre si não depende somente da marca ou série específica do glicosímetro, posto que uma mesma marca pode apresentar resultados inconsistentes em diferentes estudos¹⁰⁴. Metodologicamente o recomendável é que se faça um teste comparativo entre o resultado da glicose obtido no glicosímetro com aquele obtido com a dosagem no laboratório, em amostra colhida no momento da realização do teste no glicosímetro.

A concentração de glicose no sangue em alguns répteis também pode variar com a sazonalidade¹⁰⁵, fator que possivelmente não interferiu nas análises da *P. unifilis* por terem sido realizadas durante o verão.

Os achados encontrados nesse estudo podem também ter sido causados pelo estresse de manejo e pela grande variação da temperatura ambiente nos dias da coleta de dados.

Os valores obtidos foram ligeiramente inferiores aos encontrados por outros autores, dos quais Muddin *et al.*¹⁰⁶ relataram uma média de $79,61 \pm 20,53$ mg/dL e Santos *et al.*¹⁰⁷ de $171,33 \pm 23,72$ mg/dL, ao avaliarem o plasma de tartarugas *P.*

expansa de vida livre e criadas em criatório comercial com peso de 0 a 500g respectivamente.

Rangel-Mendoza *et al.*⁸⁹ comparando tartarugas de água doce *Dermatemys mawii* de vida livre e em cativeiro encontrou um valor de 71 mg/dL e 30 mg/dL respectivamente.

Em tartarugas *P. expansa* mantidas em zoológico o valor médio encontrado por Martinez *et al.*⁸⁶ foi de $48,54 \pm 15,63$ mg/L em fêmeas e de $45,50 \pm 6,95$ mg/L para machos. Nessa mesma espécie o valor médio encontrado por Oliveira-Júnior, Tavares-Dias e Marcon⁸⁴ em tartarugas de cativeiro foi de 91.3 ± 17.7 mg/L.

Tavares-Dias *et al.*⁸⁷ comparando o estado nutricional de *P. expansa* mantidas em cativeiro encontrou diferenças significativas no valor médio dos níveis de glicose no grupo controle (91.3 ± 17.7 mg/dL) e no grupo desnutrido (66.8 ± 25.1 mg/dL).

Muro *et al.*⁹⁸ num estudo sobre rinite crônica associada à infecção com herpes em tartarugas *Testudo graeca graeca* encontrou um valor médio de $66,3 \pm 42,9$ mEq/L num grupo de 18 de tartarugas doentes e de $63,1 \pm 42,0$ mEq/L num grupo de 20 animais sadios.

Em 22 amostras plasmáticas de tartarugas marinhas (*Caretta caretta*) de vida livre foi obtido um valor médio de 97 ± 21 mg/dL e de $68,53 \pm 10,29$ mg/dL em animais em cativeiro por Pires *et al.*¹⁰⁸.

- Eletroforese de Proteínas Plasmáticas

A albumina é considerada a mais abundante das proteínas séricas na eletroforese, constituindo de 35 a 50% do seu total. E, sua magnitude auxilia, não só em termos fisiológicos, mas também na interpretação do gráfico obtido por esta técnica, sendo assim um guia útil para diferenciar os picos monoclonais de globulina¹¹⁰.

O fracionamento eletroforético das proteínas séricas permitiu-nos observar cinco frações distintas: albumina, α 1-globulina, α 2-globulina, β 1-globulina, β 2-globulina e γ -globulina (Fig. 4). As bandas protéicas observadas neste trabalho estão de acordo com o relato de Pires *et al.*¹⁰⁶ com tartarugas marinhas *Caretta caretta*.

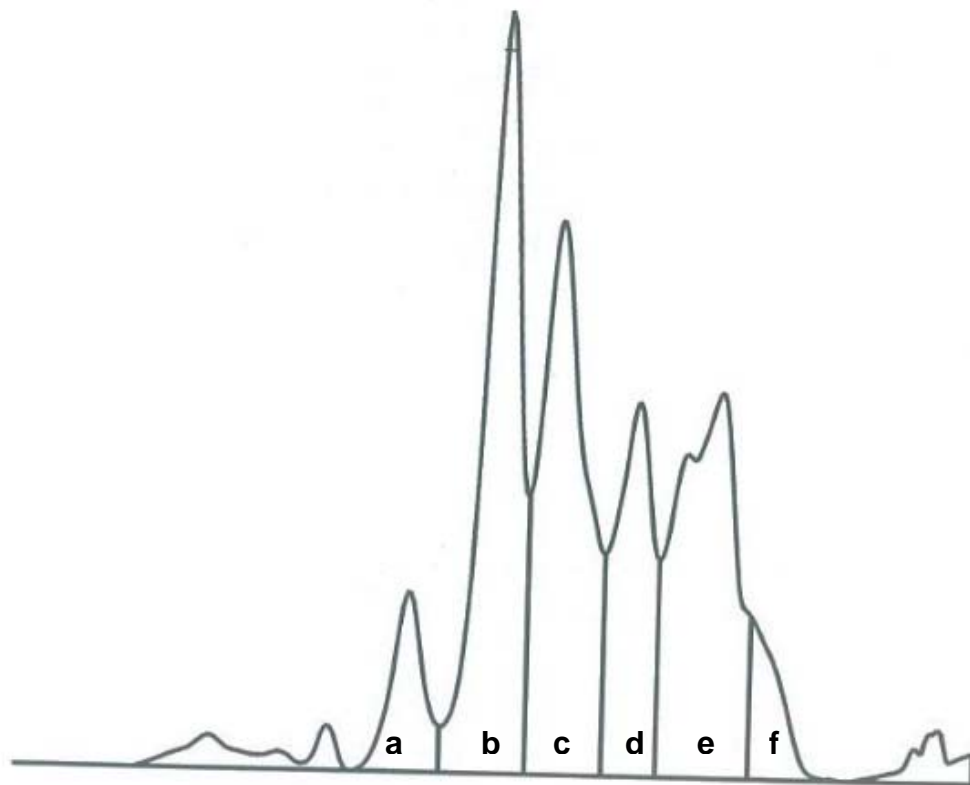


Figura 4 – Representação do eletroforetograma das proteínas séricas de tartarugas *Podocnemis unifilis*: a) Albumina, b) α 1-globulina, c) α 2-globulina, d) β 1-globulina, e) β 2-globulina e f) γ -globulina.

Cray *et al.*¹²¹ e Work *et al.*¹²², em estudos com tartaruga verde (*Chelonia mydas*) também obtiveram a separação das frações em albumina, alfa-1 globulina, alfa-2 globulina, beta globulina e gama globulinas. Vale salientar que estes autores utilizaram plasma em suas análises, onde a presença do fibrinogênio, uma das proteínas de fase aguda que compõe a fração beta globulina¹¹⁰, pode interferir nos resultados.

Os valores encontrados na eletroforese de proteínas (Tabela 3) não apresentaram diferença significativa entre os grupos. As frações α , β e γ globulinas, podem elevar-se em doenças infecciosas, sendo que os anticorpos migram primariamente na fração γ . A fração α -globulina pode aumentar em decorrência da necrose tecidual e diminuir com severa doença hepática, má nutrição e má absorção⁹.

A fração gamaglobulina apresenta taxas aumentadas todas as vezes que se verificar reação inflamatória, imune ou infecciosa, lembrando-se que tal aumento se dá de forma policlonal. Esse padrão aparece como aumento difuso da fração gama,

representado pela presença de uma curva de base larga, demonstrando a produção de todas as classes de imunoglobulinas¹²³.

Estudos de eletroforese de proteínas têm sido realizados em tartarugas marinhas. Os valores das frações protéicas encontrados no presente trabalho foram diferentes aos obtidos por Cray *et al.*¹²¹, que em trabalho com 16 tartarugas verdes de cativeiro, apresentaram os seguintes valores: albumina $3,5 \pm 0,7$ g/dL, alfa-1 globulinas $0,4 \pm 0,2$ g/dL, alfa-2 globulinas $1,2 \pm 0,3$ g/dL, beta globulinas $1,1 \pm 0,2$ g/dL e gama globulinas $1,4 \pm 0,3$ g/dL.

Gicking *et al.*¹¹⁴ para sete fêmeas adultas de tartarugas cabeçudas, apresentaram os seguintes valores: albumina ($0,97 \pm 0,13$ g/dL), alfa globulinas ($0,49 \pm 0,05$ g/dL), beta globulinas ($0,81 \pm 0,14$ g/dL) e gama globulinas ($2,1 \pm 0,64$ g/dL).

Deem *et al.*¹²² em tartarugas marinhas *Dermochelys coriacea* da costa do Congo encontrou os seguintes valores: albumina $18.1 \pm 3,7$ g/dL, alfa-1 globulinas $1.6 \pm 0,7$ g/dL, alfa-2 globulinas $8,2 \pm 2.0$ g/dL, beta globulinas 8.0 ± 1.1 g/dL e gama globulinas 8.1 ± 2.1 g/dL.

Pires *et al.*¹⁰⁶ em 20 tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*), fêmeas, de vida livre e 5 em cativeiro (n=5) encontrou os seguintes valores para os animais de vida livre: albumina $1,39 \pm 0,30$ g/dL, alfa-1 e alfa-2 globulina $0,34 \pm 0,09$ g/dL e $0,42 \pm 0,22$ g/dL, beta globulina $0,57 \pm 0,26$ g/dL e gama globulina $1,16 \pm 0,30$ g/dL. Para os animais cativos estes valores foram de: albumina $1,64 \pm 0,55$ g/dL, enquanto que para as frações alfa-1, alfa-2, beta e gama globulinas de $0,39 \pm 0,24$ g/dL, $0,68 \pm 0,44$ g/dL, $0,68 \pm 0,13$ g/dL e $1,59 \pm 0,31$ g/dL, respectivamente.

6.4 Soroaglutinação Rápida em Placa (SAR)

Considerando-se que as amostras testadas foram reagentes na prova de SAR os resultados indicam que há circulação do agente, levando a crer que os animais já entraram em contato com a *E. coli*. Assim, faz-se necessário o uso de provas sorológicas mais específicas para sua caracterização.

Diversos microrganismos têm sido encontrados causando enfermidades em répteis³⁸. Severas gastroenterites, processos bacterianos pneumônicos e mesmo septicêmicos constituem as principais emergências infecciosas bacterianas encontradas na rotina clínica de répteis, especialmente quando as condições de

cativeiro não são adequadas⁹⁷. Como em qualquer outro animal, as bactérias podem causar doenças por basicamente dois mecanismos: invasão de tecidos e produção de toxina. Varias bactérias patógenas tem sido encontrada nos répteis. A maior parte desses patógenos são bactérias gram negativas e como exemplo podemos citar *Salmonella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Aeromonas sp.*, *Protteu sp.*, *Escherichia coli*, dentre outras e grande parte dessas desenvolve ambos os mecanismos de doença citados acima²¹.

Num estudo com quarenta tartarugas de água doce (*Trachemys dorbigny* e *Phrynops hilarii*) de dois lagos urbanos de Pelotas, Sul do Brasil, Silva *et al.*¹⁰⁷ observaram a presença de aglutininas séricas anti-*Leptospira* através do teste de aglutinação microscópica em onze animais.

Embora a ocorrência de tartarugas soropositivas para a bactéria *E. coli* testada neste trabalho seja restrita, ele mostra a importância de levantamentos sorológicos de cepas patogênicas em populações de tartarugas tanto de vida livre como em cativeiro e a verificação do risco atrelado ao consumo da espécie pelas populações ribeirinhas.

7 CONCLUSÃO

De acordo com o protocolo experimental utilizado nesta pesquisa e com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A inoculação de *E. coli* não foi responsável pela alteração observada no eritrograma. O leucograma evidenciou um processo inflamatório indistinto em relação à presença da *E. Coli*, exceto pela linfocitose observada no grupo teste.
- A determinação da relação A:G mostrou-se útil na detecção da produção de imunoglobulinas responsiva à inoculação de *E. coli*.
- Questões que poderão ser esclarecidas com estudos posteriores:
 - Qual o papel dos trombócitos na resposta à presença de bactérias nos tecidos?
 - Será que os heterófilos não são estimulados por bactérias?

REFERENCIAS

- 1 Vanzolini PE. On clutch size and hatching success of the South American turtles *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) and *P. unifilis* Troschel, 1848 (Testudines, Podocnemididae). An. Acad. Bras. Ciênc. 2003; 75(4): 415-430.

- 2 McArthur S, Wilkinson R, Meyer J. Medicine and surgery of tortoises and turtles. Oxford: Blackwell Publishing, 2004.

- 3 Pritchard PCH, Trebbu P. *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812). In: Pritchard PCH, Trebbau P, editores. The Turtles of Venezuela. Ohio: Athens, Society for Study of Amphibians and Reptiles, 1984; 414p.

- 4 International Union for Conservation of Nature-IUCN. Red List of Threatened Animals. Gland. Acesso em: 2010 nov. 22. Disponível em: www.iucn.org.

- 5 Vogt, RC Temperature controlled sex-determination as a tool for turtle conservation. Chelonian Conservation and Biology, 1994;1(2): 159-162.

- 6 Klemens MW, Thorbjarnarson JB. Reptiles as a food resource. Biodivers. Conserv. 1995;4(3):281-298.

- 7 Gibbons JW, Scott DE, Ryan TJ, Buhlmann KA, Tuberville TD, Metts BS, Greene JL, Mills T, Leiden Y, Poppy S, Winne CT. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. BioScience.2000;50(8):653-666.

- 8 Campbell TW. Hematology of Lower Vertebrates. 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP).2004 Middleton WI, USA. International Veterinary Information Service, Ithaca NY; 2004, p. 1104-1214.

- 9 Mader DR. Normal hematology of reptiles. In: Feldman BV, Zinkl JG, Jain NC. editors. Schalm's veterinary hematology. 5nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Willkins; 2000. p. 1126-1132.

10 Frye FL. Hematology as applied to clinical reptile medicine. In: Frye FL. Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry, 2nd ed. Malabar: Krieger Publishing;1991.p.209-277.

11 Hawkey CM, Dennet TB. A colour of veterinary comparative haematology. Ipswich, UK: Wolfe Medical; 1989.

12 Aguirre AA, Hara TMO, Spraker RT, Jessup DA. Monitoring the health and conservation of marine mammals, sea turtles, and their ecosystems. In: Aguirre AA, Osteld RS, Tabor GM, House C, Pearl MC. editors. Conservation medicine: ecological health in practice. New York: Oxford University Press; 2002. p. 79-94.

13 Pough FH, Andrews RM, Cadle JE, Crump ML, Savitzky AH, Wells KD. Herpetology. 3rd ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall;2004.

14 Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Projeto Quelônios da Amazônia 10 anos. Brasília: IBAMA, 1989.

15 Rueda-Almocid JV, Carr JL, Mittermeier RA, Rodriguez-Mahecha JV, Mast RB, Vogt RC, Rhodin AGJ, Ossa-Velásquez J, Rueda JN, Mittermeier CG. Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos Del trópico. Serie de guías tropicales de campo N° 6. Conservación Internacional. Bogotá:Editorial Panamericana;2007.

16 Teran AF, Vogt RC, Gomez MFS. Food habits of an Assemblage of five species of turtles in the Rio Guaporé, Rondônia, Brazil. J. Herpetol. 1995;29(4):536- 547.

17 Portal RR, Lima MAS, Luz VLF, Bataus YSL, Reis IJ. Espécies vegetais utilizadas na alimentação de *Podocnemis unifilis*, Troschel 1948 (Reptilia, Testudinae, Pelomedusidae) na região do Pracuúba- Amapá- Brasil. Ci. Anim. Bras. 2002;3(1):11-19.

18 Malvasio A, Souza AM, Molina FB, Sampaio FA. Comportamento e preferência alimentar em *Podocnemis expansa* (Shweigger), *P. unifilis* (Troschel) e *P.*

sextuberculata (Cornalia) em cativeiro (Testudines, Pelomedusidae). Rev. Bras. Zool. 2003;20(i):161–168.

19 Balensiefer DC. Dieta de *Podocnemis unifilis* (Testudines, Pelomedusidae) no período de seca numa Várzea do Médio Solimões, Amazonas [dissertação]. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas; 2003.

20 Vogt RC. Tartarugas da Amazônia. Lima:Gráfica Biblos, 2008.

21 Cubas PH, Baptistotte C. Chelonia (Tartaruga, Cágado, Jabuti). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão Dias JL. Tratado de Animais Selvagens. São Paulo: Roca, 2007.

22 Ferreira Junior PD, Castro PTA. Nesting ecology of *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) and *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines, Podocnemididae) in the Javaés River, Brazil. Braz. J. Biol. 2010;70(1): 85-94.

23 Fachin-Teran A, Vogt RC. Estrutura populacional, tamanho e razão sexual de *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no rio Guaporé (RO), norte do Brasil. Phyllomedusa. 2004;3(1):29-42.

24 Fachin-Teran A, Von Mülhen EM. Reproduccion de la taricaya *Podocnemis unifilis* (Troschel, 1848) (Testudines: Podocnemididae) em la varzea del medio Solimões, Amazonas, Brasil. Ecologia Aplicada. 2003;2:125–132.

25 Molina FB. Biologia e comportamento reprodutivo de quelônios. XIV Encontro Anual de Etologia. 1996 ;out. 16-19. Anais de Etologia. Minas Gerais. Uberlândia. 1996. p. 211-221.

26 Souza RR, Vogt RC. Incubation Temperature Influences Sex and Hatchlings Size in the Neotropical Turtle *Podocnemis unifilis*. J. Herpetol. 1994;28:453-464.

27 Molina FB. Observações sobre a biologia e o comportamento reprodutivo de *Trachemys dorbignyi* (Duméril & Bibron,1835) em cativeiro (Reptilia, Testudines,

Emydidae) [tese]. São Paulo; Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências; 1995.

28 Lópes-Oliveira JR, Montané J, Marco I, Masrinez-Silvestre A., Soler J, Lavin S. Effect of venipuncture site on hematologic and biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). J. Wildlife Dis. 2003;39(4):830-836.

29 Metin K, Türkozan O, Kargin F, Basimoglu Koca Y, Taskavak E, Koca S. Blood cell morphology and plasma biochemistry of the captive European Pond Turtle *Emys orbicularis*. Acta Vet. Brno. 2006;75:49-55.

30 Silvestre AM, Domínguez MA, Mateo JA, Pastor J, Marco I, Lavín S, Cuenca R. Comparative hematology and blood chemistry of endangered lizards (*Galottia* species) in the Canary Islands. Vet. Rec. 2004;155:266-269.

31 Jacobson ER. Biology and diseases of reptiles. In: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM. Laboratory animal medicine. Orlando: Academic Press; 1984. p. 449-476.

32 Sypek J, Borysenko M. Reptiles. In: Rowley AF, Ratcliffe NA. editors. Vertebrate Blood Cells. Cambridge: University Press; 1988. p. 211-256.

33 Campbell TW. Clinical pathology. In: Mader DR. editor. Reptile Medicine and Surgery. 2nd ed. St. Louis:Elsevier Inc.; 2006. p. 248-257.

34 Gottdenker NL, Jacobson ER. Effect of venipuncture sites on hematological and clinical biochemical values in desert tortoises (*Gopherus agassizii*). Am J Vet Res. 1995;56(1):19 - 21.

35 Pitol DL, Issa JPM, Caetano FH, Lunardi LO. Radioautography study of the seasonal distribution of leucocytes in turtles *Phrynops hilarii* (Chelonia Chelidae). Micron. 2008;39:1381-1386.

36 Campbell TW. Clinical pathology. In: Mader DR. editor. Reptile Medicine and Surgery. Philadelphia: W. B. Saunders; 1996. p. 248-257.

- 37 Campbell TW. Hematology of Reptiles. In: Thrall MA. Editor. Veterinary hematology and clinical chemistry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 259-276.
- 38 Campbell TW. Hematologia de Répteis. In: Thrall MA. Editor. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. São Paulo: Roca, 2007.
- 39 Pitol DL, Issa JPM, Caetano FH, Lunardi LO. Morphological characterization of the leukocytes in circulating blood of the turtle (*Phrynops hilarii*). Int. J. Morphol. 2007;25(4):677-682.
- 40 Alleman AR, Jacobson ER, Raskin RE. Morphologic, cytochemical staining and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). Am J Vet Res. 1999;60(4):507-514.
- 41 Ramos MCC. Avaliação de aspectos morfológicos, histoquímicos, imunohistoquímicos e ultra-estruturais do processo inflamatório crônico, induzido experimentalmente pela inoculação de *Mycobacterium marinum* vivo e morto pelo calor, em tartarugas tracajá *Podocnemis unifilis*, Troschel, 1848 [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 1997.
- 42 Montali RJ. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). J Comp Pathol. 1988;99(1):1-26.
- 43 Jacobson ER. Infectious Diseases and Pathology of Reptiles. Boca Raton:CR Press, 2007.
- 44 Zimmerman LM, Vogel LA, Bowden RM. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. J Exp Biol. 2010;213:661-671.
- 45 Borysenko M, Lewis S. The effect of malnutrition on immunocompetence and whole body resistance to infection in *Chelydra serpentina*. Dev Comp Immunol. 1979;3:89-100.

- 46 Solas MT, Leceta J, Zapata A. Structure of the cloacal lymphoid complex of *Maiureys caspica*. Dev Comp Immunol. 1981;5(supl. 1):151-156.
- 47 Zapata A, Leceta J, Solas MT. The spleen of *Mauremys caspica*. A histophysiological model for comparative immunology. Dev Comp Immunol. 1981;5(supl. 1):137-142.
- 48 Leceta J, Zapata A. Seasonal changes in the thymus and spleen of the turtle, *Mauremys caspica*. A morphometrical, light microscopical study. Dev Comp Immunol. 1985;9(4):653-668.
- 49 Saad, AH; Torroba, M, Varas, A; Zapata, A. Testosterone induces lymphopenia in turtles. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 28, n. 2, p. 173-178, 1991.
- 50 Varas A, Torroba M, Zapata AG. Changes in the thymus and spleen of the turtle *Mauremys caspica* after testosterone injection: A morphometric study. Dev Comp Immunol. 1992;16(2-3):165-174.
- 51 Mckinney EC, Bentley TB. Cell-mediated immune response of *Chelonia mydas*. Dev Comp Immunol. 1985;9(3):444-452.
- 52 Mead KF, Borysenko M. Surface immunoglobulin on granular and agranular leukocytes in the thymus and spleen of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. Dev Comp Immunol. 1984;8(1):109-120.
- 53 Perez-Torres A, Millan-Aldaco DA, Rondan-Zarate A. Epidemallangerhans cells in the terrestrial turtle, *Kinosternum integrum*. Dev Comp Immunol. 1995;19(3):225-236.
- 54 Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Facultatively anaerobic Gram negative. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9nd ed. Baltimore: Williams e Wilkins; 1994.

55 Campos LC, Trabulsi LR. Escherichia. In: Trabulsi LR, Aalterthum F, Gompertz OF, Candeias JAN. Microbiologia. 3nd Ed. São Paulo: Editora Atheneu; 1999. p. 215-228.

56 Doyle MP, Cliver DO. Escherichia coli. In: Cliver DO. Foodborne diseases. San Diego: Academic Press; 1990. p. 209-216.

57 Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical veterinary Medicine. London: Mosby-Year ed.; 1994.

58 Shelton DR, KarnsA JS, Higgins JA, Van Kessel JAS, Purdue ML, Belt KT, Russel-Anelli J, Debroy C. Impactof microbial diversity on rapid dection of enterohemorrhagic *Escheriachia coli* in surfcewaters. FEMS Microbiol Lett. 2006;261:95-101.

59 Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic *Escheriachia coli*. Foorborne Pathog Dis. 2007;4:134-163.

60 Cagle FR. A system of marking turtles for future identification. Copeia.1939;3:170-173.

61 Jazen FJ, Morjan CL. Repeatability of microenvironment-specific nesting behavior in a turtle with environmental sex determination. Anim Behav. 2001;62:73-82.

62 Kolbe JJ, Janzen FJ. Experimental Analysis of an Early Life-History Stage: Water Loss and Migrating Hatchling Turtles. Copeia. 2002;1: 220-226.

63 Fachín-Terrán A, Vogt RC, Thorbjarnarson JB. Estrutura populacional, proporção de sexos e abundância de Podocnemis sextuberculata (Testudines, Podocnemididae) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. Phyllomedusa 2003;2:43-63.

- 64 Hernandez-Divers SM, Hernandez-Divers SJ, Wyneken J. Angiographic, Anatomic and Clinical Technique Descriptions of a Subcarapacial Venipuncture site for Chelonians. *J. Herp. Med. Surg.* 2002;12(2): 32-37.
- 65 Bulté G, Verly C, Blouin-Demers G. An improved blood sampling technique for hatchling emydid turtles. *Herpetol. Rev.* 2006;37(3):318-319.
- 66 Wilkinson R. Clinical Pathology. In: McArthur S, Wilkinson R, Meyer J. *Medicine and surgery of tortoises and turtles.* Oxford: Blackwell Publishing; 2006.
- 67 Almonsy NRP, Monteiro AO. Patologia Clínica. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão Dias JL. *Tratado de Animais Selvagens.* São Paulo: Roca; 2007.
- 68 Page CD, Mautino A M. Clinical management of tortoise. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet* 1990;12(2):221 – 228.
- 69 Bolten AB, Jacobson ER, Bjorndal KA. Effects of anticoagulant and autoanalyzer on blood biochemical values of loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Am. J. Vet. Res.* 1992;53(12):2224 – 2227.
- 70 Knotková Z, Doubek J, Knotek Z, Hajková P. Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agronomys horsfieldi*). *Acta Vet. Brno.* 2002;71(2):191-198.
- 71 Coles EH. *Patologia Clínica Veterinária.* São Paulo: Manole; 1989. 566p.
- 72 Campbell TW, Ellis C. *Avian & exotic animal hematology & cytology.* 3th ed. Iowa: Blacwell Publishing, 2007. 287p.
- 73 Natt MP, Herrick GA. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poult. Sci.* 1952;31:735 – 738.

74 Rosenfeld G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. Mem. Inst. Butantã. 1947;20:315-328.

75 Birgel EH. Hematologia clínica veterinária. In: Birgel, EH, Benesi, FJ. (Ed.) Patologia clínica veterinária. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária; 1982, p.2

76 Aranda KRS, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. J. Clin. Microbiol. 2004;42:5849–5853.

77 Wray C, Davies RH. Guidelines on detection and monitoring of salmonella infected poultry flocks with particular reference to *Salmonella enteritidis*. In: Report of a Who Consultation on Strategies for Detection and Monitoring of Salmonella Infected Poultry Flocks. Austria: WHO – Veterinary Public Health Unit; 1994.

78 Postic D, Merien F, Perolat P, Baranton G. Diagnostic biologique Leptospirose – Borreliose de lyme. Paris: Institut Pasteur; 2000.

79 Lima AO, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Cançado JR. Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

80 Ramos MCC, Catão-Dias JL, Gaviolle MC, Sinhorini IL. Evaluation of the inflammatory response experimentally induced by a foreign body in fresh water turtles (*Trachemys dorbignyi*). Rev. Esp. Herp. 2001;15:77-83.

81 Frair W. Turtle red blood cell packed volumes, sizes, and numbers. Herpetologica. 1977;33(2):167-190.

82 Brenner D, Lewbart G, Stebbins M, Herman DW. Health survey of wild and captive bog turtle (*Clemmys muhlenbergii*) in North Carolina and Virginia. J. Zoo Wildl. Med. 2002;33(4):311-316.

83 Anderson NL, Wack RF, Hatcher R. Hematology and clinical chemistry reference ranges for clinically normal, captive new guinea snapping turtle (*Elseya novaeguineae*) and the effects of temperature, sex, and sample type. *J. Zoo Wildl. Med.* 1997;28(4):394-403.

84 Oliveira-Júnior AA, Tavares-Dias M, Marcon JL. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Res. Vet. Sci.* 2009;86:146–151.

85 Rossini M, Blanco PA, Marín E, Comerma-Steffensen S, Zerpa H. Haematological values of post-laying Arrau turtle (*Podocnemis expansa*) in the Orinoco River, Venezuela. *Res. Vet. Sci.* 2010.

86 Martínez EO, Hernández OE, Boede EO, Peñazola C, Rodríguez AE. Inventory of the Arrau Sideneck Turtle, *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) in Venezuelan Zoos. Haematology and Blood Chemistry Reference Values. *Revista Científica.* 2007;XVII(5):433-440.

87 Tavares-Dias M, Oliveira-Júnior AA, Silva MG, Marcon JL, Barcellos JFM. Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the Amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Veterinarski Arhiv.* 2009;79(6):601-610.

88 Hawkey CM, Dennet TB. *A colour of veterinary comparative haematology.* Ipswich: Wolfe Medical; 1989.

89 Rangel-Mendoza J, Weber M, Zenteno-Ruiz CE, López-Luna MA, Barba-Macías E. Hematology and serum biochemistry comparison in wild and captive Central American river turtles (*Dermatemys mawii*) in Tabasco, Mexico. *Res. Vet. Sci.* 2009;87:313–318.

- 90 Brites VLC, Rantin FT. The influence of agricultural and urban contamination on leech infestation of freshwater turtles, *Phrynops geoffroanus*, taken from two areas of the Uberabinha river. *Environ. Monit. Assess.* 2004;96(1-3):273, 2004.
- 91 Troiano JC, Silva MC. Valores hematológicos de referencia em tortuga terrestre argentina (*Chelonoides chilensis chilensis*). *Analecta Vet.* 1998;18(1-2):47-51.
- 92 Marks SK, Citino SB. Hematology and serum chemistry of the radiated tortoise (*Testudo radiata*). *J. Zoo Wildl. Med.* 1990;21(3):342-344.
- 93 Kerr MG. 2003. Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária. Bioquímica Clínica e Hematologia. 2ª ed. Roca, São Paulo. 436p.
- 94 Russell KE, Grindem CB. Secondary thrombocytopenia. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. editors. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5nd ed. Philadelphia:Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 487-495.
- 95 Goulart CES. Ordem Squamata Subordem Sauria (Lagarto, Teiú, Iguana). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão Dias JL. *Tratado de Animais Selvagens Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca; 2007. p. 58-67.
- 96 Muro J, Ramis A, Pastor J, Velarde R, Tarres J, Lavin S. Chronic rhinitis associated with hepesviral infection in captive spur-thighed tortoises from Spain. *J. Zoo Wildl. Med.* 1998;34(3):487-495.
- 97 Jacobson ER, Gaskin JM, Brown MB, Harris RK, Gardiner CH, Lapointe JL, Adams HP, Reggiardo C. Chronic upper respiratory tract disease of free-ranging desert tortoises (*Xerobates agassizii*). *J. Zoo Wildl. Med.* 1991;27:296-316.
- 98 Joyner PH, Shreve AA, Spahr J, Foutains AL, Sleeman JM. Phaeohyphomycosis in a free-living eastern box-turtle (*Terrapene carolina Carolina*). *J. Zoo Wildl. Med.* 2006;42(4):883-888.

99 Sypek, J.; Borysenko, M. Reptiles. In: Rowley AF; Ratcliffe, NA. (Ed.). Vertebrate blood cells. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1988. p. 211-256.

100 Knotkonová Z, Mazanek S, Hovorka M, Sloboda M, Knotek Z. Haematology and plasma chemistry of bornean river turtles suffering from shell necrosis and haemogregarine parasites. Veterinární Medicina. 2005;50(9):421-426.

101 Duguy R. Number of blood cells and their variation. In: Gans C, Parson TS. Biology of the reptilian. New York: Academic Press; 1970. p.93-109.

102 Cordova CMM, Valle JP, Yamanaka CN, Cordova MM. Determinação das glicemias capilar e venosa com glicosímetro versus dosagem laboratorial da glicose plasmática. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2009;45(5):378-384.

103 Vladescu, C, Baltac, M.; Trandaburu, T. Research on glycoregulation in *Çacerta agilis chersonensis*. Ann Endocrinol (Paris), v.31, n.5, p.863-868, 1970.

104 Mundim AV, Queiroz RP, Santos ALQ, Beletti ME, Luz VLF. Bioquímica sanguínea da Tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) em seu habitat natural. Biosci. J. 1999 ;15(2):35-43.

105 Santos ALQ, Malta TS, Mundim AV, Alves Júnior JRF, Carvalho SFM. Variação dos constituintes bioquímicos sanguíneos de tartarugas-da-amazônia (*Podocnemis expansa*, Schweigger – 1812) (TESTUDINATA) mantidas em criatório comercial. Arc. Vet. Sci. 2005;10(3):1-8.

106 Pires TT, Rostan G, Bittencourt TCC, Guimarães JE. Hemograma e bioquímica sérica de tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) de vida livre e mantidas em cativeiro, no litoral norte da Bahia. Braz. J. vet. Res. anim. Sci. 2009;46(1):11-18.

107 Silva EF, Seyffert N, Cerqueira GM, Leihns KP, Athanzio DA, Valente ALS, Dellagostin OA, Brod CS. Serum antileptospiral agglutinins in freshwater turtles from Southern Brazil. Braz. J. Microbiol. 2009;40:227-230.

- 108 Martins RTMC. Efeito de coagulase bacteriana sobre o plasma de tartaruga de água doce *Trachemys adiutrix* Vanzolini, 1995 em presença de *Staphylococcus aureus*. Bol. Lab. Hidrobiol. 2009;22:69-76.
- 109 Vanzolini PE. A new species of turtle, *genus Trachemys*, from the state of Maranhão, Brazil (Testudines, Emydidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 1995, 55(1): 111-125.
- 110 Kaneko JJ. Serum proteins and dysproteinemias. In: Kaneko, JJ.; Harvey, JW.; Bruss, ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997. p. 117-138.
- 111 Cray C; Tatum LM. Applications of protein electrophoresis in avian diagnostics. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, Bedford, 1998, v. 12, n. 1, p. 4-10.
- 112 Zaias, J, Cray C. Protein Electrophoresis: A Tool for the Reptilian and Amphibian Practitioner *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 2002, v. 12, n. 1, p.30-32.
- 113 JJ. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, San Diego, 2008, 932p.
- 114 Gicking JC, Foley AM, Harr KE, Raskin RE, Jacobson E. Plasma protein electrophoresis of the Atlantic loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 2004, v. 14, n. 3.
- 115 Campbell TW. Bioquímica Clínica de Répteis. In: THRALL, M.A. (ed): *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. São Paulo: Roca, 2007.
- 116 Malta TS, Nascimento MRBM. Estudo Hematobioquímico na *Podecnemis uniffilis*: Perfil Bioquímico Sanguíneo. *Revista Eletrônica Horizonte Científico*, 2005.

117 Dessauer HC. Blood chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects, p.1-72. In: Gans C. & Parsons T.C. (Eds), *Biology of the Reptilia*. Academic Press, New York, 1970.

118 Santos LC. *Laboratório Ambiental*. Cascavel: Edunioeste, 1999, 341 p.

119 González FHD, Silva SC. *Introdução à bioquímica clínica Veterinária*. Porto Alegre: UFRGS. 2ª ed. 2006, 357pp.

120 Bacila M. *Bioquímica veterinária*. São Paulo: Robe, 2003. 583p.

121 Cray C, Varella R, Bossart GD, Lutz, P. Altered in vitro immune responses in green turtles (*Chelonia mydas*) with fibropapillomatosis. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, Lawrence, 2001, v. 32, n. 4, p. 436-440.

122 Work TM, Rameyer RA, Balazs GH, Cray C, Chang SP. Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*, Ames, v. 37, n. 3, p. 574-581, 2001.

123 Silva ROP, Lopes AF, Faria, RMD. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais* 2008; 18(2): 116-

122 Deem, SL, Dierenfeld ES, Sounguet GP, Alleman R, Cray C, Poppenga RH, Norton TM, Karesh WB. Blood values in free-ranging nesting leatherback sea turtles (*dermochelys coriacea*) on the coast of the Republic of Gabon. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 37(4): 464–471, 2006.

APÊNDICES

Apêndice A – Valores hematológicos do grupo teste de tartarugas *P. unifilis* criadas em cativeiro. Média, desvio padrão e intervalo de referência (entre parênteses) - Vila Velha - 2010

Dias	VG (%)	HE ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	HB (mg/dl)	VCM (fl)	CHCM (g/dl)	LEU (μl)	PPT (g/dl)	T (μl)	Mono (μl)	Linfo (μl)	Eos (μl)	Het (μl)
0	19,1 \pm 3,07 (14-26)	0,23 \pm 0,04 (0,16 \pm 0,30)	6,55 \pm 1,1 (4,8-7,2)	82,3 \pm 16,4 (59-106,3)	34,3 \pm 0,12 (34,1-34,5)	1.850 \pm 867,62 (500-3.500)	3 \pm 0 (2,6-3)	10.32 \pm 4558,3 (5.750-19.500)	306 \pm 141,6 (105-560)	708 \pm 262,5 (235-920)	25 \pm 27,7 (0-60)	811 \pm 556,1 (160-2065)
15°	21,6 \pm 4,29 (15-29)	0,25 \pm 0,04* (0,01 \pm 0,03)	4,79 \pm 0,61 (4-6)	84,15 \pm 5,4* (76,9-92,1)	22,5 \pm 2,5 (18,4-26,7)	3125 \pm 1231,8 (1.500-5.250)	2,74 \pm 0,44 (2-3,4)	9725 \pm 3889,8 (6.000-18.000)	445 \pm 181 (180-735)	1504,5 \pm 635,4* (480-2613)	13 \pm 19,4 (0-53)	1162,5 \pm 556,1 (473-2100)
28°	20,7 \pm 3,09 (15-24)	0,184 \pm 0,04 (0,13-0,29)	4,37 \pm 0,71 (3,3-5,4)	116,6 \pm 28,36* (88,2-170,4)	21,29 \pm 3,07 (16,5-26,0)	3500 \pm 600,92 (2.500-4.500)	2,5 \pm 0,44 (2-3,2)	9800 \pm 1855,17 (7.750-13.750)	725,75 \pm 259,40 (440-1.260)	1298,75 \pm 381,95 (775-2080)	10,5 \pm 22,90 (0-65)	1465 \pm 258,02 (1.100-1890)
42°	17,5 \pm 2,22 (14-21)	0,214 \pm 0,03 (0,17-0,29)	4,31 \pm 0,55 (3,1-5)	82,8 \pm 11,5 (66,7-105,9)	25,00 \pm 4,52 (16,3-32,9)	4450 \pm 1398,41 (2.500-7.250)	2,5 \pm 0,39 (2-3)	8775 \pm 1511,3 (6.750-10.250)	679,75 \pm 184,62 (450-990)	1359 \pm 587,38 (770-2.755)	83,75 \pm 43,72* (0-143)	2327,5 \pm 718,38 (1.200-3.625)

* Valores que representam diferença estatística ($p < 0,05$)

Apêndice B – Valores hematológicos do grupo controle de tartarugas *P. unifilis* criadas em cativeiro. Média, desvio padrão e intervalo de referência (entre parênteses) - Vila Velha – 2010.

Dias	VG (%)	HE ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	HB (mg/dl)	VCM (fl)	CHCM (g/dl)	LEU ($/\mu\text{l}$)	PPT (g/dl)	T ($/\mu\text{l}$)	Mono ($/\mu\text{l}$)	Linfo ($/\mu\text{l}$)	Eos ($/\mu\text{l}$)	Het ($/\mu\text{l}$)
0	18,7 \pm 27,98 (14-23)	0,24 \pm 0,06 (0,01-0,33)	6,08 \pm 1,31 (4,5-7,9)	81,23 \pm 17,62 (60,3-114,3)	32,44 \pm 3,92 (25,0-34,4)	1975 \pm 785,72 (1000-3250)	2,64 \pm 0,41 (2,2-3,04)	9900 \pm 2633,12 (4000-13250)	374,75 \pm 135,35 (138-585)	583 \pm 304,74 (255-1235)	48,75 \pm 38,69 (20-138)	968,5 \pm 407,52 (470-1485)
15°	21,5 \pm 3,53 (17-28)	0,289 \pm 0,03 (0,02-0,03)	5,12 \pm 0,71 (4,1+6,4)	74,15 \pm 7,19* (64,3-86,2)	23,98 \pm 2,20 (20,4-27,8)	3200 \pm 1262,71 (1500-5750)	2,72 \pm 0,28 (2,2-3,2)	10475 \pm 2696,32 (6250-14000)	571 \pm 325,32 (210-1093)	963,5 \pm 238,72* (688-1378)	41,25 \pm 44,08 (0-115)	1624,25 \pm 860,92 (585-2755)
28°	20,8 \pm 2,78 (16-25)	0,234 \pm 0,05* (0,16-0,28)	4,71 \pm 0,72 (3,6-61)	91,67 \pm 19,24* (68,6-127,3)	22,65 \pm 1,69 (19,0-24,4)	3375 \pm 966,45 (1000-4500)	2,5 \pm 0,30 (2-3)	10625 \pm 1756,93 (7250-13500)	661 \pm 223,72 (200-990)	1115,25 \pm 391,42 (370-1875)	22,25 \pm 29,59 (0-65)	1576,5 \pm 497,71 (430-2168)
42°	19,3 \pm 2,40 (15-22)	0,207 \pm 0,04 (0,14-0,30)	4,46 \pm 0,94 (3,2-64)	98,31 \pm 27,97 (66,7-150,0)	23,07 \pm 3,53 (18,5-29,1)	4125 \pm 1209,05 (1750-5750)	2,42 \pm 0,27 (2-2,8)	8225 \pm 1721,79 (6250-10750)	703 \pm 203,89 (315-978)	1406,75 \pm 382,88 (665-1935)	17,5 \pm 45,09* (0-143)	1997,75 \pm 759,19 (770-2990)

* Valores que representam diferença estatística ($p < 0,05$)