

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL**

Aspectos hematológicos de *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820)  
(Testudines, Chelidae) na Reserva Biológica Municipal Santa Cândida,  
Juiz de Fora, Minas Gerais

Erika Gabriela Latorre Hurtado

Juiz de Fora  
2018

Erika Gabriela Latorre Hurtado

Aspectos hematológicos de *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820)  
(Testudines, Chelidae) na Reserva Biológica Municipal Santa Cândida,  
Juiz de Fora, Minas Gerais

Dissertação apresentada ao programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas,  
área de concentração: Comportamento e  
Biologia Animal, Universidade Federal  
de Juiz de Fora, como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Bernadete Maria de Sousa

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Juiz de Fora  
2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Latorre, Erika .

Aspectos hematológicos de *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae) na Reserva Biológica Municipal Santa Cândida, Juiz de Fora, Minas Gerais / Erika Latorre. -- 2018.  
58 f.

Orientador: Bernadete Maria de Sousa

Coorientador: Rodrigo Luiz Fabri

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2018.

1. Hemograma. 2. Bioquímica Sanguínea. 3. Quelônios. 4. *Hydromedusa maximiliani*. I. Sousa, Bernadete Maria de, orient. II. Fabri, Rodrigo Luiz, coorient. III. Título.

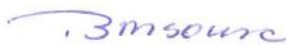
Erika Gabriela Latorre Hurtado

**Aspectos hematológicos de *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae) na Reserva Biológica Municipal Santa Cândida, Juiz de Fora, Minas Gerais.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

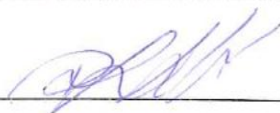
Aprovada em 28 de fevereiro de 2018

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof.ª Dr.ª Bernadete Maria de Sousa (Orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri (Coorientador)  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

Prof. Dr. Fabiano Matos Viera  
Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz



---

Prof.ª Dr.ª Danielle Maria de Oliveira Aragão  
Universidade Federal de Juiz de Fora

À minha família que está sempre ao meu lado me apoiando, visando meu crescimento pessoal e profissional. Aos animais não humanos que me incentivaram a seguir meu caminho profissional. À vocês o meu eterno agradecimento e amor.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por colocar no meu caminho grandes oportunidades.

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Bernadete Maria de Sousa e meu co-orientador, Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri que acreditaram no meu potencial e me apoiaram nesse mestrado.

Aos meus colaboradores e amigos, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iara Alves Novelli e Prof. Dr. Fabiano Matos Vieira pelo apoio no projeto do mestrado e pela amizade.

A Lucio Marco de Lemos e Juarez Rocha Reis do laboratório LEMOS pela colaboração nas análises das amostras.

Ao laboratório de Bioquímica da UFJF, pelo fornecimento do material necessário para as análises das amostras sanguíneas.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Danielle Maria de Oliveira Aragão pelo apoio e o tempo investido nas análises das amostras.

A minha equipe de campo e meus grandes amigos Rosielle Concolato da Costa, Wesley da Silva Monteiro, Matheus Dutra, Sr. Altair Mendes da Costa e ao Sr. Miguel, funcionário da reserva, pela colaboração e companhia em todos esses campos de muito trabalho.

Ao pessoal do laboratório de herpetologia – répteis da UFJF por ter me acolhido.

Aos meus pais Paúl Latorre e Amparo Hurtado, minha irmã Nicole Latorre e meu tio Christian Hurtado, que mesmo à distância, me brindaram o apoio e o amor que me deu força para concluir satisfatoriamente esta etapa da minha vida. Os meus filhos peludos equatorianos Tomás, Cafú, Mika e Rocky, e meus filhos brasileiros Ozzy, Gaia e Fubá que me trazem alegrias no dia a dia. O meu avô Marcolino Hurtado e a minha filha canina Eva Maria que me ajudaram a ser a grande pessoa e profissional que sou atualmente e de quem sinto muita saudade todos os dias. A o resto da minha família que sempre está me apoiando e ficam orgulhosos com cada um dos meus logros.

A os meus amigos brasileiros que são como uma família para mim e que me apoiaram durante todo meu mestrado e as minhas amigas no Equador que mesmo à distância, me deram o apoio e a amizade.

Ao meu namorado Lucas de Castro, pelo amor, apoio, paciência, companheirismo, incentivo e dedicação sempre.

A OEA e a CAPES pelo financiamento.

A Pós-Graduação e a Universidade Federal de Juiz de Fora pelo acolhimento e a grande oportunidade.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1 BIOLOGIA DE <i>HYDROMEDUSA MAXIMILIANI</i> .....	13
2.2 COLETA SANGUÍNEA EM QUELÔNIOS.....	14
2.3 HEMATOLOGIA.....	15
2.4 CÉLULAS SANGUÍNEAS .....	15
2.4.1 Eritrócitos .....	15
2.4.2 Trombócitos .....	16
2.4.3 Leucócitos.....	17
2.4.3.1 Basófilos .....	17
2.4.3.2 Eosinófilos .....	18
2.4.3.3 Heterófilos .....	18
2.4.3.4 Linfócitos.....	19
2.4.3.5 Monócitos .....	19
2.4.3.5.1 Azurófilos .....	19
2.5. BIOQUÍMICA SANGUÍNEA .....	20
2.5.1 Ureia .....	20
2.5.2 Creatinina.....	20
2.5.3 Ácido Úrico .....	20
2.5.4 Fosfatase Alcalina.....	21
2.5.5. Alanina Aminotransferase (ALT) .....	21
2.5.6 Aspartato Aminotransferase (AST) .....	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 ÁREA DE ESTUDO .....	23
3.2 AMOSTRAGEM DOS ESPÉCIMES DE <i>HYDROMEDUSA MAXIMILIANI</i> .....	24
3.3 AMOSTRAGEM SANGUÍNEA .....	26
3.4 MORFOLOGIA E MORFOMETRIA DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS .....	27
3.5 HEMOGRAMA .....	27
3.6 BIOQUÍMICA SANGUÍNEA .....	29
3.7 ÍNDICE DE ESTRESSE (RAZÃO HETERÓFILO/LINFÓCITO) .....	29
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	29
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapa de juiz de fora com as principais reservas biológicas. Retângulo (Reserva Biológica Municipal Santa Cândida). .....	23
<b>Figura 2:</b> Marcação permanente na placa marginal da carapaça e marcação temporária feita com caneta corretiva em <i>Hydromedusa maximiliani</i> . .....	24
<b>Figura 3:</b> <i>Hydromedusa maximiliani</i> . Comprimento máximo da carapaça (CMC), largura máxima da carapaça (LMC), altura máxima da carapaça (AMC), comprimento máximo do plastrão (CMP) e largura máxima do plastrão (LMP) (Adaptado de Guide d'Identification CITES-Tortues em Novelli, 2006).....	25
<b>Figura 4:</b> Sexagem dos espécimes de <i>Hydromedusa maximiliani</i> pelas características externas. A) Macho e fêmea juntos para observação da diferença de tamanho corporal, sendo o macho nº 1 e a fêmea nº 4; B) eversão do pênis do macho durante a manipulação, destacando a concavidade do plastrão; C) fêmea destacando plastrão plano. ....	26
<b>Figura 5:</b> A) Coleta sanguínea da veia jugular externa de <i>Hydromedusa maximiliani</i> ; B) elaboração de esfregaços sanguíneos em campo após a coleta sanguínea. ....	27
<b>Figura 6:</b> Esfregaço sanguíneo de <i>H. maximiliani</i> corado com panótico rápido. Eritrócitos (Er); Heterófilo (He); Eosinófilos (Eo); Basófilo (Ba); Monócito (Mo); Linfócitos (Ly); Trombócitos (Th). Barras de escala: 5 µm.....	31
<b>Figura 7:</b> Área (µm <sup>2</sup> ) dos eritrócitos e núcleo em várias espécies de quelônios de água doce do mundo. 1. <i>Hydromedusa maximiliani</i> (Chelidae), Brasil (Presente Estudo), 2. <i>Podocnemis erythrocephala</i> , (Podocnemididae), Brasil (SANTOS et al., 2011). 3. <i>Emys orbicularis galloitalica</i> , (Emydidae) e <i>Mauremys caspica</i> , (Geoemydidae), Irã (JAVANBAKHT et al. 2013). 4. <i>Emys orbicularis galloitalica</i> , (Emydidae), Turquia (METIN et al., 2006). 5. <i>Emys orbicularis galloitalica</i> , (Emydidae), Turquia (ARIKAN & ÇIÇEK, 2010). 6. <i>Emys orbicularis galloitalica</i> , (Emydidae) Irã (COLAGAR & JAFARI, 2007). 7. <i>Emys orbicularis hellenica</i> , (Emydidae) e <i>Mauremys rivulata</i> , (Geoemydidae) (UĞURTAŞ et al., 2003). 8. <i>Emys orbicularis</i> , (Emydidae) e <i>Mauremys rivulata</i> , (Geoemydidae), Turquia (ÇIÇEK et al., 2015). 9. <i>Emys trinacris</i> , (Emydidae), Itália (ARIZZA et al., 2014).....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Aferições dos indivíduos de <i>H. maximiliani</i> capturados na RBMSC. Comprimento máximo da carapaça (CMC), largura máxima da carapaça (LMC), altura máxima da carapaça (AMC), comprimento máximo do plastrão (CMP) e largura máxima do plastrão (LMP).....	30
<b>Tabela 2:</b> Tamanho médio dos eritrócitos e núcleos de <i>H. maximiliani</i> com seus desvios padrão (C: comprimento do eritrócito, L: largura do eritrócito, TE: tamanho do eritrócito, CN: comprimento do núcleo, LN: largura do núcleo, TN: tamanho do núcleo; TN /TE: razão nucleocitoplásmica).....	34
<b>Tabela 3:</b> Tamanho médio de leucócitos e trombócitos com seus desvios padrão em <i>Hydromedusa maximiliani</i> (CT: comprimento do trombócito, LT: largura do trombócito). .....	34
<b>Tabela 4:</b> Hemograma com seu respectivo desvio padrão de <i>Hydromedusa maximiliani</i> . Hematócrito (HCT); hemoglobina (HGB); eritrócitos (RBC); leucócitos (WBC); hemoglobina corpuscular média (HCM); volume corpuscular médio (VCM); concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).....	36
<b>Tabela 5:</b> Contagem diferencial de leucócitos representada em porcentagem com seu respectivo desvio padrão de <i>Hydromedusa maximiliani</i> . .....	36
<b>Tabela 6:</b> Contagem diferencial de leucócitos representada em valores absolutos com seu respectivo desvio padrão de <i>Hydromedusa maximiliani</i> . .....	36
<b>Tabela 7:</b> Índice de estresse de <i>Hydromedusa maximiliani</i> calculado a partir da razão Heterófilo/Linfócito.....	36
<b>Tabela 8:</b> Bioquímica sanguínea de <i>Hydromedusa maximiliani</i> . Uréia; Fosfatase Alcalina (FA); Aspartato Aminotransferase (AST); Alanina Aminotransferase (ALT); Creatinina; e Ácido Úrico.....	36
<b>Tabela 9:</b> Valores do hemograma de 3 espécies de quelônios de água doce da família Chelidae ( <i>Hydromedusa maximiliani</i> , <i>Prynops geoffroanus</i> e <i>Hydromedusa tectifera</i> ). Hematócrito (HCT); hemoglobina (HGB); eritrócitos; leucócitos.....	37
<b>Tabela 10:</b> Valores da bioquímica sanguínea de 2 espécies de quelônios de água doce da família Chelidae ( <i>Hydromedusa maximiliani</i> e <i>Hydromedusa tectifera</i> ). .....	37
<b>Tabela 11:</b> Índice de estresse de <i>Hydromedusa maximiliani</i> calculado a partir da razão Heterófilo/Linfócito de 2 espécies de quelônios de água doce da família Chelidae ( <i>Hydromedusa maximiliani</i> e <i>Phrynops geoffroanus</i> em ambientes urbanos e criatório). .....	38

## RESUMO

Entre os quelônios, *Hydromedusa maximiliani* é endêmica de regiões montanhosas, com distribuição na região da Mata Atlântica ao longo de montanhas no sudeste e parte do nordeste do Brasil. O objetivo deste estudo foi analisar a hematologia de uma população *H. maximiliani* da Reserva Biológica Municipal de Santa Cândida (RBMSC), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Foram capturados doze indivíduos (cinco machos, quatro fêmeas e três juvenis). Foram coletadas amostras de sangue e 10 esfregaços de sangue foram feitos para cada indivíduo e o restante armazenado em tubos de coleta com heparina para serem analisados no laboratório. Os esfregaços de sangue foram analisados no microscópio e as células do sangue foram medidas e foi feita a contagem diferencial de leucócitos. O hemograma foi feito manualmente para determinar: hematócrito, hemoglobina, eritrócitos totais, leucócitos totais e contagem diferencial, trombócitos e foram calculados os índices hematimétricos. Dentro da bioquímica sanguínea foram calculados: ureia, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e ácido úrico. Os resultados foram relatados usando estatística descritiva e para comparar os resultados entre indivíduos de diferentes sexo e idade, foi utilizado o teste t. Os eritrócitos desta espécie são grandes e elipsoidais como outras espécies de quelônios de água doce. Houve uma diferença significativa no tamanho dos eritrócitos entre machos, fêmeas e juvenis. Os machos mostraram um eritrócito e núcleo maiores possivelmente relacionados ao seu maior peso e tamanho em relação às fêmeas adultas e aos juvenis, nesta espécie. Também foram identificados cinco tipos de leucócitos (heterófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos). Os leucócitos menores e mais comuns foram linfócitos e os maiores foram heterófilos e eosinófilos. Dentro do hemograma o hematócrito, a hemoglobina e os eritrócitos apresentaram níveis altos em juvenis e o hematócrito apresentou menor nível em fêmeas. Os machos apresentaram um maior número de linfócitos e menor de leucócitos, acontecendo o inverso com os juvenis. Quanto à bioquímica sanguínea, os juvenis apresentaram níveis maiores de fosfatase alcalina e aspartato aminotransferase devido a uma maior atividade osteoblástica e muscular. Finalmente, as fêmeas e os juvenis apresentaram um maior índice de estresse crônico devido a um maior número de heterofilo comparado com o número de linfócitos.

Palavras-chave: Hemograma, Bioquímica Sanguínea, Quelônios.

## ABSTRACT

*Hydromedusa maximiliani* is endemic to mountainous regions, with distribution in the Atlantic Forest region along mountains in the southeast and part of northeastern Brazil. The objective of this study was to analyze the hematology of a *H. maximiliani* population of the Reserva Biológica Municipal Santa Cândida (RBMSC), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. Twelve individuals (five males, four females and three juveniles) were captured. Blood samples were collected and 10 blood smears were made for each individual and the remainder stored in heparin tubes for analysis in the laboratory. The blood smears were analyzed under the microscope and the blood cells were measured and differential leukocyte counting was done. The hemogram was done manually to determine: hematocrit, hemoglobin, total erythrocytes, total leukocytes and differential counts, thrombocytes and hematimetric. For blood biochemistry were calculated: urea, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and uric acid. The results were reported using descriptive statistics and to compare the results between individuals of different sex and age, t test was used. The erythrocytes of this species are large and ellipsoidal like other species of freshwater chelonians. There was a significant difference in erythrocyte size between males, females and juveniles. Males showed a larger erythrocyte and nucleus possibly related to their larger weight size in relation to adult females and juvenile. Five types of leukocytes (heterophiles, eosinophils, basophils, monocytes and lymphocytes) were also identified. The smallest and most common leukocytes were lymphocytes and the largest were heterophiles and eosinophils. Hematocrit, hemoglobin and erythrocytes were high in juveniles and hematocrit was lower in females. The males presented a greater number of lymphocytes and less of leucocytes, and in juveniles was the opposite. As for blood biochemistry, juveniles presented higher levels of alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase due to increased osteoblastic and muscular activity. Finally, females and juveniles presented a higher chronic stress index due to a greater number of heterophils compared to the number of lymphocytes.

**Key Words:** Hemogram, Blood Biochemistry, Chelonia.

## 1 INTRODUÇÃO

Na América do Sul ocorre uma grande variedade de quelônios, encontrando-se espécimes de oito famílias. Sendo a família Chelidae a mais diversificada com 23 espécies, das quais, 20 ocorrem no Brasil (SOUZA, 2004; COSTA e BÉRNILS, 2014). *Hydromedusa maximiliani* (MIKAN, 1820) (Testudines, Chelidae), conhecida como cágado da serra ou cágado pescoço de cobra, é uma espécie endêmica de regiões de Mata Atlântica. Está distribuída numa extensão de 471.747,80 km<sup>2</sup> ao longo das bacias hidrográficas mais meridionais da região Atlântico Leste, porção setentrional da região Atlântico Sudeste, leste da bacia do rio Paraná e alto rio São Francisco (Vogt *et al.*, 2015). Segundo Costa *et al.* (2015), a distribuição da espécie *H. maximiliani* inclui 48 localidades: 5 no estado de Bahia, 2 em Espírito santo, 21 no estado de Minas Gerais, 10 no Rio de Janeiro, e 10 no estado de São Paulo.

Atualmente, a destruição das matas ao longo dos rios e a elevada quantidade de poluentes domésticos, industriais e agropecuários têm sido as principais ameaças para a fauna de répteis (RODRIGUES, 2005). Pela perda de habitat e a diminuição do tamanho das populações, *H. maximiliani* é considerada desde 1996 como uma espécie Vulnerável (Vu) B1+2cd segundo a “International Union for Conservation of Nature” (IUCN, 2017). Porém, no Brasil, essa espécie foi categorizada como Dados Insuficientes (DD) devido à falta de informação sobre a taxa de redução populacional (VOGT *et al.*, 2015). Atualmente, *H. maximiliani* não se encontra mais no livro vermelho de espécies ameaçadas brasileiras (ICMBio, 2016).

O meio ambiente influencia na biologia e ecologia dos organismos que nele habitam e métodos como os exames laboratoriais além de serem usados para a determinação do estado de saúde de animais silvestres, podem indicar a qualidade ambiental (FALCE, 2009). A avaliação do perfil sanitário, que inclui análises hematológicas (hemograma e bioquímica sanguínea), parasitológicas, microbiológicas e achados clínicas e patológicas, é importante para determinar o estado de saúde de uma população (CHRISTOPHER *et al.*, 1999). A hematologia de animais silvestres brasileiros é ainda pouco conhecida, especialmente em répteis (CARVALHO *et al.*, 2014), por isso, são necessárias pesquisas que acrescentem maiores informações sobre o assunto. O sangue é responsável pelo transporte de nutrientes, gases, resíduos metabólicos e células, dessa forma, é essencial realizar avaliações hematológicas

adequadas para determinar o estado de saúde dos animais, diagnóstico e prevenção de doenças, estabelecimento de valores de referência e para manejo e conservação de populações em cativeiro e de vida livre (FERRONATO, 2008; MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011). O hemograma determina o hematócrito, a hemoglobina, e a contagem de células como: eritrócitos, leucócitos e trombócitos (MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011). A bioquímica sanguínea constitui um complemento dentro do estudo hematológico. Deve-se considerar que os resultados hematológicos podem variar dependendo da estação, idade, sexo, dieta, habitat e estado reprodutivo (VERNBERG, 1955; HARTMAN & LESSLER, 1964, TAYLOR & JACOBSON, 1982; BOLTEN & BJORNDAL, 1992; ANDERSON et al., 1997; KNOTKOVA et al., 2002; PIRES et al., 2006; CASAL & ORÓS, 2007; STACY et al., 2011). Muitas doenças como infecções por hemoparasitos e respostas inflamatórias, podem estar associadas a alterações patológicas em parâmetros hematológicos (STACY et al., 2011). Os resultados hematológicos também tem permitido avaliar o índice de estresse crônico de uma população a partir da determinação da razão heterófilo/linfócito, que pode ser maior em animais expostos a ambientes poluídos e cativeiro (FERRONATO, 2008).

Para a compreensão dos parâmetros hematológicos e suas possíveis mudanças é importante analisar primeiro a morfologia e a morfometria das células sanguíneas, já que podem variar dependendo da espécie analisada. O tamanho dos eritrócitos indica a posição das espécies na escala evolutiva e muitos estudos demonstraram que os tamanhos de eritrócitos variam em membros das 4 ordens de répteis (HARTMAN & LESSLER, 1964; SZARSKI e CZOPEK, 1966; SAINT-GIRONS, 1970; Mader, 2000; SEVINC et al., 2000; ARIKAN et al., 2004; CAMPBELL, 2004; ARIKAN et al., 2009). Não existem estudos com abordagem hematológica de *H. Maximiliani* por isso, este estudo objetivou analisar a morfologia e morfometria das células sanguíneas, assim como também determinar valores hematológicos e bioquímicos dessa espécie em Juiz de Fora, Minas Gerais. Esta pesquisa representa o ponto de partida para outras que permitam a obtenção de resultados laboratoriais e dados fisiológicos para estabelecer padrões sobre a biologia da espécie que poderão ser usados para seu adequado manejo e preservação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Biologia de *Hydromedusa maximiliani*

Cágados do gênero *Hydromedusa* da sub-ordem Pleurodira e da família Chelidae tem uma distribuição restrita a América do Sul (PRITCHARD, 1979; ERNST & BARBOUR, 1992; SOUZA, 2005a; 2005b). Dentro desse gênero, existem duas espécies: *Hydromedusa maximiliani* e *Hydromedusa tectifera*, conhecidas comumente como “cágados pescoço de cobra” ou cágados de pescoço comprido” (SOUZA, 1995a; SOUZA, 2005a). As duas espécies podem ocorrer de forma simpátrica, com *H. maximiliani* em áreas acima de 600m de altitude e *H. tectifera* em áreas mais baixas (SOUZA, 2005b). Em áreas em que não ocorre *H. tectifera*, *H. maximiliani* pode ser encontrada em altitudes inferiores a 100m; na ausência de *H. maximiliani*, *H. tectifera* pode ser encontrada em altitudes superiores a 900m (RIBAS e MONTEIRO-FILHO 2002; SOUZA, 2005b). Enquanto a o comprimento da carapaça, *H. tectifera* pode atingir 300mm (ERNST & BARBOUR, 1992) e *H. maximiliani*, no máximo 200mm (SOUZA, 2005a). Além do tamanho corporal, estas espécies podem se diferenciar pela presença de duas dobras de pele nos cantos da boca em *H. maximiliani* e uma listra preta que se inicia na margem distal e se estende até o final do pescoço, dividindo a cabeça do cágado em duas partes, superior e inferior em *H. tectifera* (ERNST & BARBOUR, 1992).

*H. maximiliani* é uma espécie da Mata Atlântica cuja distribuição inclui regiões dos estados de Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (IVERSON, 1992; ARGÔLO & FREITAS, 2002; SOUZA & MARTINS, 2009). Também são encontradas populações na Ilha Grande (Rio de Janeiro) e na Ilha Bela (São Paulo) (SOUZA & MARTINS, 2009). Habitam riachos estreitos (0,60-1,80m de profundidade) e rios (2,10-6,80m de profundidade) de águas translúcidas e relativamente frias (14,5- 20°C), com fundo argiloso ou arenoso, pedras e folhas de vegetação na margem (GUIX et al., MIRANDA & NUNES, 1992). Os indivíduos desta espécie podem chegar a pesar 520g (SOUZA & MARTINS, 2009) e a sua dieta é baseada em pequenos invertebrados como larvas de ninfas de insetos, alguns crustáceos, anelídeos, aranhas, anfíbios, lagartos e carniça (YAMASHITA 1990; GUIX et al. 1992; SOUZA, 1995; SOUZA & ABE, 1995; 1997a; 1997b; 1998; NOVELLI & SOUSA, 2006; NOVELLI et al. 2013). O período de setembro-janeiro que apresenta mais chuvas

é o de maior atividade para esta espécie, enquanto entre maio e agosto, período caracterizado por baixas temperaturas e estiagem a atividade é menor (SOUZA, 1995; SOUZA & ABE 1997b). *H. maximiliani* desloca-se pouco, em média 2 m/dia (SOUZA 1995, SOUZA & ABE 1997b). O ambiente terrestre é de grande importância para o forrageio (NOVELLI et al., 2013), e para hibernação e postura (FAMELLI et al. 2011). A maturidade sexual é tardia, os machos atingem com 12 anos de idade e as fêmeas aos 15 anos (FAMELLI et al. 2011). O ninho desta espécie se restringe apenas a uma cova rasa e os filhotes nascem durante o mês de outubro, após a incubação durante a estação seca (SOUZA, 1995; SOUZA & ABE, 1997b).

## **2.2 Coleta sanguínea em quelônios**

O volume sanguíneo em répteis varia dependendo da espécie, mas geralmente representa 5 a 8 % do peso corporal e na maioria de répteis pode ser coletado até um volume de 10% do volume sanguíneo (ou 1% do peso corporal) sem comprometer o estado de saúde do animal (MADER, 2000; CAMPBELL, 2012).

Em quelônios, a coleta sanguínea pode ser feita nos seguintes locais: coração, veia jugular, veia ou artéria braquial, veia coccígea ventral, seio orbital, veia escapular e pelo corte das unhas (JACOBSON, 1993; CAMPBELL, 2012). A punção cardíaca pode ser usada principalmente em quelônios jovens antes da calcificação da carapaça usando uma agulha maior 20-18G, no entanto, em adultos torna-se um procedimento mais complexo devido a que a carapaça perfurada e depois restaurada usando epóxi (JACOBSON, 1992; CAMPBELL, 2012). Para espécimes do gênero *Hydromedusa* pelo fato de apresentar um pescoço comprido, o melhor local para a coleta sanguínea é a veia jugular (GARCIA-NAVARRO & PACHALY, 1994).

Embora o anticoagulante de eleição é o EDTA (ácido etilenodiaminoacético), este causa hemólise nas amostras de algumas espécies de répteis, especialmente em quelônios. É recomendável o uso de outro anticoagulante como a heparina, que pode conservar o plasma para ser usado em análises bioquímicas (CAMPBELL, 2012). No caso dos esfregaços sanguíneos, eles devem ser feitos sem utilização de anticoagulante, logo depois da coleta sanguínea (MADER, 2000; CAMPBELL, 2012).



## **2.3 Hematologia**

O principal local de produção das células sanguíneas de répteis e anfíbios é a medula óssea, mas órgãos viscerais como o fígado e baço também podem contribuir com essa função (CANFIELD, 1998).

A hematologia é uma ferramenta importante para determinar o estado de saúde dos indivíduos e diagnosticar doenças como anemia, reações inflamatórias, parasitemias, alterações hematopoiéticas e hemostáticas (JACOBSON, 1993; CAMPBELL, 2012).

A avaliação hematológica inclui análises de eritrócitos, leucócitos e trombócitos no sangue periférico. A resposta celular no sangue de répteis é menos previsível do que em animais endotérmicos cujo microambiente é mais estável. Existem alguns fatores que dificultam o estabelecimento de parâmetros hematológicos em répteis. Os valores hematológicos podem apresentar mudanças influenciadas por fatores externos como as condições ambientais e/ou por fatores intrínsecos como a idade e o sexo do animal (VERNBERG, 1955; HARTMAN & LESSLER, 1964; TAYLOR & JACOBSON, 1982; BOLTEN & BJORNDAL, 1992; ANDERSON *et al.*, 1997; KNOTKOVA *et al.*, 2002; PIRES *et al.*, 2006; CASAL & ORÓS, 2007; STACY *et al.*, 2011; CAMPBELL, 2012). Outras mudanças podem acontecer durante a coleta do sangue e o processamento do mesmo como o local de coleta, o anticoagulante, o corante e método de contagem celular usados (CAMPBELL, 2012).

## **2.4 Células Sanguíneas**

### **2.4.1 Eritrócitos**

Produzidos na medula através de eritroblastos, podendo ser gerados em outras fontes secundárias como o baço e o fígado, eritrócitos maduros podem se dividir na corrente sanguínea e na medula segundo alguns estudos (GOULART, 2004). Diferentemente de mamíferos que apresentam eritrócitos em forma de discos bicôncavos com margem circular espessa e a parte central fina e anucleada, em répteis, assim como nas aves, existem algumas diferenças quanto à morfologia, com um formato elíptico e um núcleo oval condensado e centralizado (RASKIN, 1999; KERR, 2003; FRANDSON *et al.*, 2011). Ocasionalmente eritrócitos imaturos podem ser encontrados na periferia sanguínea dos répteis especialmente em animais muito jovens

ou em processo de ecdise, são irregulares, com um núcleo centralizado, citoplasma basofílico e são de tamanho reduzido em relação aos maduros.

Quando o citoplasma é normal cora de rosa uniformemente, o aumento da basofilia do citoplasma (policromasia), variações do tamanho da célula (anisiocitose) e mudanças na forma (poiquilocitose), podem ser indicativos de alterações nessas células (RASKIN, 1999).

#### **2.4.2 Trombócitos**

Em répteis a produção de trombócitos é similar à das aves. A célula madura tem uma forma elíptica, quando em desenvolvimento são menores e o citoplasma é menos basofílico. O núcleo, centralmente posicionado, possui uma cromatina nuclear densa, que se cora em roxo, enquanto que o citoplasma é menos corado e contém poucos grânulos azurofílicos. Durante os últimos estágios de desenvolvimento, a cromatina nuclear se torna mais densa e grânulos plasmáticos específicos aparecem. Trombócitos ativos são comuns e aparecem como agrupamentos de células com citoplasmas irregulares e vacúolos (HAWKEY & DENNET, 1989).

Dentre suas múltiplas funções, podemos citar sua capacidade de fagocitose, participando ativamente na defesa do organismo, a capacidade de transformar-se em eritrócitos, se houver um aumento na demanda de eritrócitos (GOULART, 2004; PENDL, 2006), e sua participação nos processos de hemostasia (SYPEK & BORYSENKO 1988; GOULART, 2004). Essas células em mamíferos podem ser conhecidas como plaquetas, e possuem importante papel criando uma barreira física para uma abertura no vaso sanguíneo, controlando sangramento. Elas formam um coágulo estável a base de fibrina através de uma aglomeração plaquetária, mediadores químicos são liberados pelas plaquetas juntamente com fibrinogênio e diversos fatores de coagulação do plasma sanguíneo, resultando na coagulação do sangue (CUNNINGHAM, 1999).

São normalmente menores em mamíferos do que em aves e répteis, visíveis como fragmentos granulados de coloração azul pálida, mas normalmente ambas se apresentam menores que as hemácias (KERR, 2003). Segundo Ramos (1992) foi relatada a presença de trombócitos em processos inflamatórios por corpo estranho em tartarugas tigre d'água, sugerindo a participação dessas células em processos inflamatórios nos répteis. Poucos trabalhos descreveram perfis hematológicos em

quelônios devido às diferenças na metodologia de contagem. Os valores aumentados no número de trombócitos podem ter algum sentido biológico com as alterações de leucócitos devido ao fatos dos animais amostrados estarem bem adaptados ao meio (FERRONATO, 2008).

### **2.4.3 Leucócitos**

São células brancas e suas precursoras, que utilizam o fluxo sanguíneo como meio de transporte até o seu sítio de atuação final nos tecidos. Seu número circulante reflete o equilíbrio entre demanda e fornecimento (KERR, 2003).

São divididas em duas categorias, granulócitos ou mielócitos (basófilos, eosinófilos e heterófilos) e os agranulócitos (linfócitos, monócitos e azurófilos), com base na ausência ou presença de grânulos citoplasmáticos que se coram com o sangue comum (FRANDSON *et al.*, 2011).

Em répteis o desenvolvimento é semelhante ao dos mamíferos e são associados a espaços extravasculares do estoma reticular da medula óssea. As células maduras migram para o endotélio celular dos sinusóides para entrar na corrente sanguínea, e diminuem em tamanho e o citoplasma torna-se menos basofílico. A cromatina torna-se intensamente condensada com a maturidade e nas células em que o núcleo é lobulado ele passa de arredondado para segmentado (HAWKEY & DENNET, 1989).

#### **2.4.3.1 Basófilos**

Estas células nucleadas geralmente são pequenas, mas de tamanho variável que podem conter grânulos redondos, com múltiplos compostos incluindo a heparina que evita a coagulação sanguínea e a histamina que relaxa a musculatura dos vasos sanguíneos (FRANDSON *et al.*, 2011). Compõem cerca de 0 a 40% dos leucócitos totais (RASKIN, 1999).

São pequenos, com o tamanho variando de 7 a 20µm, com células circulares que contêm grânulos citoplasmáticos basofílicos e metacromáticos, o que pode camuflar o núcleo (HAWKEY & DENNET, 1989).

Difícilmente são vistos em quelônios e fatores como sazonalidade parecem ter pouca influência sobre números de basófilos. Estudos têm mostrado que em répteis os basófilos possuem imunoglobulinas de superfície reativas com a liberação de histamina

(FUDGE, 2000) e estes reagem por degranulação (ROSSKOPF, 1999). O aumento destas células são associados a certos hemoparasitos como hemogregarinas e tripanosomas, e infecções virais como por exemplo Iridovírus (SYPEK e BORYSENKO, 1988).

#### **2.4.3.2 Eosinófilos**

Possuem como característica citoplasma granuloso, núcleo isolado ou bilobado, pouco oval arredondado, geralmente constituem mais de 20% do total dos leucócitos.

Sua função está envolvida com a fagocitose dos imunocomplexos associado com infecções parasitárias, em períodos de alta atividade metabólicas dos animais os eosinófilos aparecem em baixa proporção e em períodos de baixo metabolismo existem altas concentrações na corrente sanguínea (FUDGE, 2000). Esta função de desintoxicação se realiza por inativação da histamina (RASKIN, 1999). Sua relevância clínica quando apresenta alta concentração na corrente sanguínea (eosinofilia) está correlacionada a reações alérgicas, parasitismo, lesão tecidual, ciclo estral, gestação e parto (KERR, 2003).

#### **2.4.3.3 Heterófilos**

Seu tamanho varia conforme a espécie reptiliana, podendo ser de 10 a 23µm, e apresentam o citoplasma com numerosos grânulos, alongados em bastonetes, ovais ou fusiformes (REGAN et al., 2011).

Tem uma função análoga aos neutrófilos dos mamíferos, incluindo fagocitose e atividade antimicrobiana (ROSSKOPF, 1999; ARIKAN & ÇIÇEK, 2010; STACY et al., 2011). Apresentando níveis elevados de heterófilos em porcentagens hematológicas relatadas em animais saudáveis, que podem ser associados com baixas contagens de células brancas totais, no entanto, fatores como hibernação e estresse são determinantes para elevar ou diminuir respectivamente o número de células circulantes (FUDGE, 2000). Heterófilos tóxicos podem estar presentes em répteis com infecções bacterianas, inflamação grave ou necrose (CAMPBELL, 2004). Um indicativo de estresse crônico pode ser observado pelo aumento de heterófilos e a diminuição de linfócitos (FERRONATO, 2008).

#### **2.4.3.4 Linfócitos**

A formação de linfócitos nos répteis é semelhante à dos mamíferos e aves (HAWKEY & DENNET, 1989). São células com tamanho variado (5,5 a 14,5µm). Podem conter pequenos grânulos azurófilos citoplasmática com uma prevalência variada, mas frequentemente maior que 50% do total de leucócitos (MADER, 2000; CAMPBELL, 2004; ARIKAN *et al.*, 2004, 2009). O núcleo é compacto e circular, semelhante aos trombócitos (RASKIN, 1999). Com uma nucleação relativamente grande e em contrapartida uma pequena quantidade de citoplasma na maioria das espécies estas células são o segundo tipo de leucócitos circulantes mais comuns, sendo conhecidos três tipos de linfócitos (linfócito B, linfócito T e linfócito NK), sendo que não possuem diferenças estruturais (Kassab *et al.*, 2009; FRANDSON *et al.*, 2011 ).

O aumento de linfócitos na corrente sanguínea é denominada como linfocitose, tendo relevância na clínica para répteis em casos de inflamação, cicatrização, e doenças infecciosas de origem bacterianas e virais (MADER, 2000).

#### **2.4.3.5 Monócitos**

São as maiores células da periferia sanguínea dos répteis (HAWKEY & DENNET, 1989). Semelhante a de mamíferos, com citoplasma de coloração azul-cinzenta, podendo apresentar vacúolos ou granulações (FUDGE, 2000).

Em répteis já foi observado que os monócitos podem ser afetados por fatores sazonais. São células nucleadas e ovais sendo importantes na resposta à infecção granulomatosa microbiana por ter funcionalidade fagocítica (FUDGE, 2000). Os monócitos aumentam durante estimulações antigênicas crônicas, inflamação crônica ou doença parasitária (GREGORY *et al.*, 2004). Têm sua origem na medula óssea, porém estes se diferenciam em macrófagos quando migram dos vasos para os tecidos (CUNNINGHAM, 1999).

##### **2.4.3.5.1 Azurófilos**

São células presentes em anfíbios e répteis, especialmente em muitas espécies de serpentes (CANFIELD, 1998; FUDGE, 2000) que são monócitos diferenciados, apresentando uma granulação rosa semelhante a uma poeira, com grande quantidade de

citoplasma e núcleos em formas ovais, arredondados ou em forma de “U”, podendo conter alguns vacúolos citoplasmáticos claros (CAMPBELL, 2004; REAGAN et al., 2008).

Acredita-se que a azuropenia representa uma resposta antigênica a doenças de ordem infecciosas em répteis (MADER, 2000).

## **2.5. Bioquímica sanguínea**

### **2.5.1 Ureia**

Embora répteis não podem concentrar urina, produtos nitrogenados são excretados em diversas quantidades de ácido úrico, ureia e amônia dependendo do ambiente natural do animal. Em quelônios de água doce, a amônia e a ureia são excretados em quantidades iguais (DAVIES, 1981; BRAUN, 1998).

A ureia plasmática age aumentando a osmolalidade plasmática, reduzindo a perda de água corporal. Concentrações plasmáticas elevadas de ureia podem ocorrer em répteis que habitam áreas desérticas, especialmente algumas espécies de cágados (CAMPBELL, 1996). Patologicamente, o aumento dos níveis de ureia plasmática estão relacionados com doença renal, azotemia pré-renal e grande quantidade de proteína na dieta (CAMPBELL, 1996).

### **2.5.2 Creatinina**

Os valores normais de creatinina plasmática em répteis são geralmente muito baixos. Uma elevação nos níveis de creatinina podem estar associados com uma desidratação severa e doença renal. Em répteis, as análises de creatinina não são importantes para o diagnóstico de doenças renais e pré-renais (CAMPBELL, 1996).

### **2.5.3 Ácido Úrico**

O metabolismo uricotélico está associado ao desenvolvimento do ovo, no lugar da amônia, que é tóxica, se elimina nitrogênio na forma de ácido úrico porque mesmo a ureia seria nociva em excesso (TROIANO et al., 2001; BACILA, 2003). O intervalo de 7,7 a 615,4 mg/dl é considerado como índice normal para quelônios (JACOBSON, 1992).

O ácido úrico é o produto final do catabolismo de proteínas, nitrogênio não proteico e purinas em répteis (FRYE, 1991; TROIANO *et al.*, 2001). Os valores normais estão entre 0 e 10 mg/dl, para a maioria de répteis. Um aumento dos níveis de ácido úrico estão associados com doença renal severa e gota úrica (CAMPBELL, 1996). Bacteremias e septicemias severas, drogas nefrotóxicas como aminoglicosídeos e sulfas podem causar doença renal (CAMPBELL, 1996).

A avaliação dos níveis de ácido úrico sanguíneo não é um indicativo sensível para doença renal em répteis, já que para ter um aumento considerável, dois terços dos rins devem estar afunccionais. A dieta é muito importante para avaliação de enzimas renais, sendo que répteis carnívoros têm maiores concentrações de ácido úrico no sangue devido as altas quantidades de proteína (CAMPBELL, 1996; MITCHELL & TULLY, 2009).

#### **2.5.4 Fosfatase Alcalina**

A enzima fosfatase alcalina está amplamente distribuída no organismo de répteis, porém não existe suficiente informação para interpretar os valores da mesma de forma adequada. Em alguns répteis, um aumento nos valores desta enzima está relacionado com atividade osteoblástica aumentada, doença hepatobiliar ou distocia (CAMPBELL, 2008). Fisiologicamente, pode ocorrer um aumento da FA em répteis jovens quando comparado com adultos da mesma espécie (CAMPBELL, 1996; MARTÍNEZ-SILVESTRE *et al.*, 2011). A hipovitaminose D3 pode causar um aumento da atividade dessa enzima durante uma doença metabólica óssea (CAMPBELL, 2008). Tem sido descrito um incremento de FA associado a períodos de imaturidade em espécies de crescimento rápido, também em fêmeas com problemas reprodutivos crônicos (McARTHUR, 2001).

#### **2.5.5. Alanina Aminotransferase (ALT)**

A ALT não é considerada uma enzima específica de algum órgão, e não é importante para o diagnóstico de doença hepática. O nível normal em répteis é menor de 20UI/L. Um aumento nos níveis desta enzima pode estar associado a uma dieta inadequada prolongada que podem causar alterações hepáticas, especialmente em animais em cativeiro (CAMPBELL, 2012).

### **2.5.6 Aspartato Aminotransferase (AST)**

Embora a atividade de AST não é específica de um órgão, o aumento da AST no sangue é um indicativo de doença hepatocelular (BOYD, 1988; DIVERS, 2000; ALMOSNY & MONTEIRO, 2007). Geralmente, o nível de AST normal é menor de 250 UI/L. O aumento dos níveis no sangue está relacionado com uma doença muscular ou hepática. Em animais de vida livre o aumento desta enzima pode estar associado à atividade muscular relacionada com a agressão do macho na época reprodutiva (NEVAREZ *et al.*, 2002; CAMPBELL, 2012).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade-SISBIO, licença número 54910-2. Também foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Pró-Reitoria de Pesquisa / UFJF (Protocolo número 025/2016-CEUA).

#### 3.1 Área de estudo

Os espécimes de *H. maximiliani* foram capturados na Reserva Biológica Municipal Santa Cândida (RBMSC) (Figura 1), criada pelo Decreto Municipal 2904/83, localiza-se a oeste da área central de Juiz de Fora (21° 41'20'' S e 43° 20' 40''W), região da Zona da Mata, sudeste do estado de Minas Gerais. Tem uma área de 113, 3 ha e faz divisa com os bairros Monte Castelo, Carlos Chagas, Milho Branco, Recanto dos Bruggers e São Pedro (CENTRO DE PESQUISAS SOCIAIS-UFJF, 2007; NOVELLI et al., 2013; PJF, 2016).

A vegetação típica é do bioma Mata Atlântica, o relevo é inclinado, apresentando vales com morros que variam de 60 a 200m de altura e altitudes extremas que variam de 760 a 960m acima do nível do mar. É Floresta Estacional Semidecídua Montana devido ao caráter semidecíduo de muitos de seus elementos arbóreos nas estações do ano de menor pluviosidade e temperaturas mais baixas (LAFETÁ, 1998).



**Figura 1:** Mapa de Juiz de Fora com as principais Reservas Biológicas. Retângulo (Reserva Biológica Municipal Santa Cândida).

### 3.2 Amostragem dos espécimes de *Hydromedusa maximiliani*

As capturas foram feitas manualmente com auxílio de puçás, duas vezes por mês, durante um ano, começando em setembro de 2016. Após a captura dos indivíduos se realizou a seguinte metodologia:

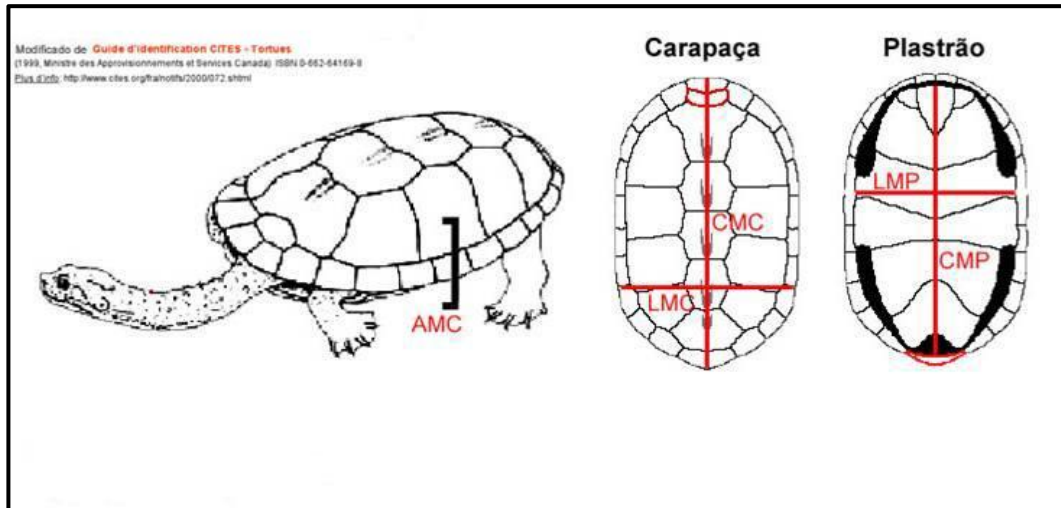
- **Marcação:** foram feitas dois tipos de marcação. Uma marcação permanente, feita com auxílio de serra metálica na placa marginal da carapaça (SOUZA, 1995a) e uma temporária usando caneta corretiva que foi usada para ajudar na visualização dos indivíduos durante as capturas (Figura 2).



**Figura 2:** Marcação permanente na placa marginal da carapaça e marcação temporária feita com caneta corretiva em *Hydromedusa maximiliani*.

- **Morfometria:** os indivíduos foram pesados com dinamômetro Pesola<sup>®</sup> (precisão de 10g) e as seguintes medidas foram aferidas, por meio de paquímetro manual Western<sup>®</sup> (precisão de 0,1mm) conforme figura 1:
  - a) **CMC** = Comprimento máximo da carapaça, medido em linha reta desde a borda anterior até a borda posterior da carapaça.
  - b) **LMC** = Largura máxima da carapaça, medida em linha reta, onde ocorre a maior distância entre a borda lateral dos escudos marginais de um lado ao outro.
  - c) **AMC** = Altura máxima da carapaça, medida perpendicularmente ao plastrão, ao nível de maior distância entre os escudos do plastrão e os vertebrais da carapaça.

- d) **CMP** = Comprimento máximo do plastrão, medido em linha reta desde o escudo intergular até o ponto de junção dos escudos anais.
- e) **LMP** = Largura do plastrão, medido em linha reta através da sutura entre os escudos abdominais e peitorais, de um ponto de junção entre estes dois.



- Sexagem e determinação da idade: os exemplares foram identificados quanto ao sexo pelas características externas. Os machos apresentam-se maiores e com maior massa corpórea, também têm uma concavidade no plastrão nas placas anais (ERNEST & BARBOUR, 1989) e a cauda significativamente mais longa (GUIX et al., 1992). Os indivíduos jovens foram identificados pelo formato da carapaça e coloração do plastrão; assim, a partir da sétima escama posterior dos escudos marginais, os jovens apresentam um aspecto denteado (SOUZA,

**Figura 3:** *Hydromedusa maximiliani*. Comprimento máximo da carapaça (CMC), largura máxima da carapaça (LMC), altura máxima da carapaça (AMC), comprimento máximo do plastrão (CMP) e largura máxima do plastrão (LMP) (Adaptado de Guide d'Identification CITES-Tortues em Novelli, 2006).

1995b). Em quanto à cor, os jovens apresentam o plastrão amarelo claro com manchas negras periféricas ou totalmente escuro (SOUZA, 1995a; SOUZA, 1995b).



**Figura 4:** Sexagem dos espécimes de *Hydromedusa maximiliani* pelas características externas. A) Macho e fêmea juntos para observação da diferença de tamanho corporal, sendo o macho nº 1 e a fêmea nº 4; B) eversão do pênis do macho durante a manipulação, destacando a concavidade do plastrão; C) fêmea destacando plastrão plano.

### 3.3 Amostragem sanguínea

As amostras sanguíneas foram coletadas do ramo externo da veia jugular, em volume de 2ml usando uma seringa de 3ml com agulha de 24G x 3/4'' previamente heparinizados (SINGH & KUMAR, 2008). O sangue foi adicionado em um tubo de coleta heparinizado (Vacutainer®), e 0,5 ml da amostra foi usado para fazer o esfregaço sanguíneo e o restante foi transportado em um isopor com gelo artificial até o laboratório de Bioquímica da UFJF e o laboratório LEMOS onde foi processado dentro das 4 horas após a coleta (ANDRADE *et al.*, 2014).



**Figura 5:** A) Coleta sanguínea da veia jugular externa de *Hydromedusa maximiliani*; B) elaboração de esfregaços sanguíneos em campo após a coleta sanguínea.

### 3.4 Morfologia e morfometria das células sanguíneas

Foram feitos 10 esfregaços por indivíduo que foram corados usando Panótico Rápido. Uma vez secos, foram selecionados aleatoriamente esfregaços sanguíneos de cada indivíduo para serem analisados no microscópio Olympus BX51. As microfotografias foram tiradas utilizando uma câmera Olympus DP73. Para cada indivíduo foram selecionados aleatoriamente 50 eritrócitos e de cada célula foram aferidas as seguintes medidas; comprimento (CE) e largura (LE); e comprimento e largura do núcleo (CN e LN). O tamanho dos eritrócitos (TE) e o tamanho do núcleo (TN) foram calculados usando as fórmulas:  $CELE\pi /4$  e  $CNLN\pi /4$  (UĞURTAŞ et al., 2003). Foram calculadas as razões CE/LE e CN/LN; e as relação núcleo/ citoplasma TN/TE. Além disso, as medidas de leucócitos (heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos) e trombócitos (CT, LT) também foram aferidas e o tamanho das células foi determinado usando a fórmula:  $A = \pi r^2$ .

### 3.5 Hemograma

- Hematócrito (Htc): a determinação do hematócrito foi feita por centrifugação do sangue em tubos capilares a 10.000 RPM por 5 minutos em centrífuga para microhematócrito digital (Benfer DHM – 6 ®) e a leitura foi realizada usando um leitor de hematócrito (MADER, 2000). O resultado foi expresso em porcentagem (%).

- Hemoglobina (Hb): a concentração de hemoglobina foi realizada pelo método da cianometahemoglobina no aparelho automatizado ABX Micro 60 – OT (Horiba ®) e o resultado foi expresso em g/dl (CAMPBELL, 1989).
- Contagem Total de Eritrócitos: foi realizada utilizando uma câmara de Neubauer, usando uma mistura de 4 ml de diluente isotônico Natt & Herrick (NATT & HERRICK, 1952) com 20 µl de amostra de sangue com heparina. A solução homogeneizada foi preenchida na câmara de Neubauer e foi feita a contagem no microscópio em aumento de 400 vezes. Para a contagem celular foram utilizados cinco quadrantes, na área do quadrante central da câmara e para a obtenção do número de eritrócitos por microlitro (µl) foi multiplicado pelo fator de correção (x 10.000).
- Contagem Total de Leucócitos: foi realizada em câmara de Neubauer com diluição a 1:20 em líquido de Turk (Renylab ®). Foram contados quatro quadrantes grandes laterais e multiplicado pelo fator de correção (x 50). O resultado foi expresso em µl de sangue.
- Contagem de Trombócitos: a contagem foi feita utilizando o esfregaço sanguíneo a partir da contagem do número de trombócitos em cada 500 eritrócitos.
- Contagem diferencial de Leucócitos: foi feita utilizando o esfregaço sanguíneo corado em corante tipo Romanowsky May – Grunwald – Giemsa ( Renylab ®). As lâminas foram analisadas no microscópio ótico em objetiva de imersão, para diferenciar as seguintes células: neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos segundo WORK et al. (1998).
- Índices Hematimétricos: o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir dos dados obtidos para o hematócrito (Htc), hemoglobina (Hb) e contagem total de eritrócitos (He) (CAMPBELL, 1989). As equações utilizadas foram:

$$VCM \text{ fl} = Ht \times 10 \div He \times 10^5$$

$$HCM \text{ pg} = Hb \times 10 \div He \times 10^5$$

$$CHCM \text{ }^g_{dl} = Hb \times 100 \div Ht$$

### **3.6 Bioquímica sanguínea**

Para os resultados dos exames bioquímicos foram utilizados kits comerciais. As enzimas processadas foram uréia, creatinina e ácido úrico, visando determinar a função renal e ALT, AST e fosfatase alcalina (FA) para determinar a função hepática.

### **3.7 Índice de estresse (Razão Heterófilo/Linfócito)**

Foi realizado dividindo o número absoluto de heterófilos pelo de linfócitos (LANCE & ELSEY, 1999). Essa razão é um indicativo de estresse crônico, que é representada por uma elevação na contagem total de heterófilos e uma diminuição dos linfócitos (SIEGEL, 1980).

### **3.8 Análises estatísticas**

Os resultados do perfil hematológico foram apresentados usando estatística descritiva (desvio padrão). Para a comparação dos dados obtidos entre indivíduos de diferentes sexos, idade e dados da morfometria foi utilizado o teste T- student.

## 4 RESULTADOS

Para este estudo, foram capturados 12 indivíduos de *H. maximiliani* (cinco machos, quatro fêmeas e três juvenis). A massa corporal foi em média de  $400 \pm 191,31$  g para machos e  $315 \pm 71,88$  g para fêmeas (Tabela 1). Os juvenis tiveram uma média de peso corporal de  $76,67 \pm 30,56$  g; no entanto, estes apresentaram tamanhos diferentes devido à diferença no tempo de eclosão (Tabela 1). O comprimento da carapaça foi  $17,06 \pm 2,94$ cm,  $14,68 \pm 0,57$ cm e  $9,12 \pm 1,47$  cm para machos, fêmeas e juvenis, respectivamente.

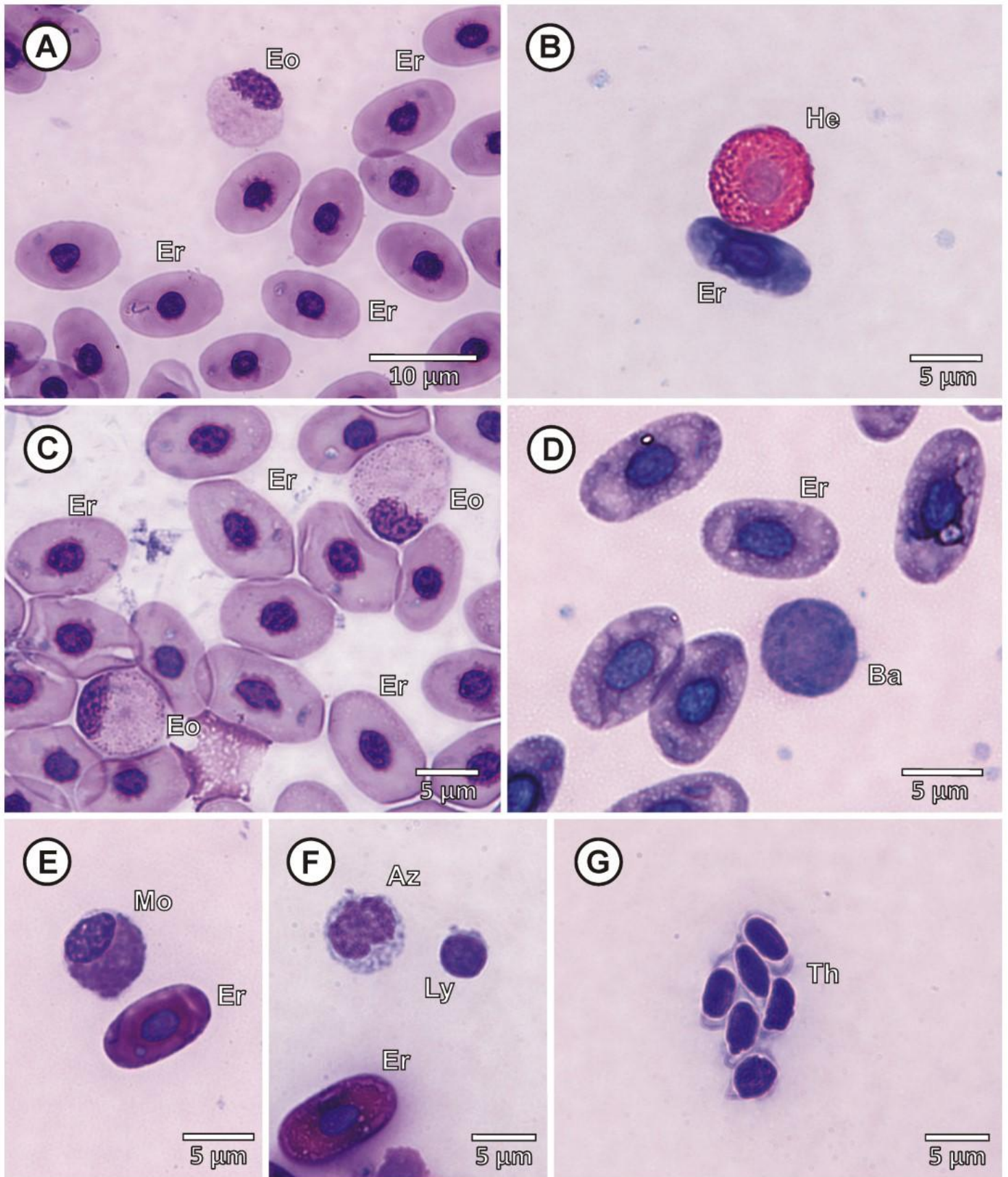
**Tabela 1:** Aferições dos indivíduos de *Hydromedusa maximiliani* capturados na RBMSC. Comprimento máximo da carapaça (CMC), largura máxima da carapaça (LMC), altura máxima da carapaça (AMC), comprimento máximo do plastrão (CMP) e largura máxima do plastrão (LMP).

Sexo/Idade	Massa corporal (g)	CMC (cm)	LMC (cm)	AMC (cm)	CMP (cm)	LMP (cm)
Macho (n=5)	$400 \pm 191,31$	$17,06 \pm 2,94$	$10,22 \pm 0,64$	$4,42 \pm 0,40$	$12,04 \pm 0,79$	$7,21 \pm 0,39$
Fêmea (n=4)	$315 \pm 71,88$	$14,68 \pm 0,57$	$9,06 \pm 0,14$	$3,92 \pm 0,07$	$11,10 \pm 0,30$	$7,21 \pm 0,32$
Juvenil (n=3)	$76,67 \pm 30,56$	$9,12 \pm 1,47$	$6,04 \pm 0,39$	$2,04 \pm 0,27$	$6,87 \pm 0,66$	$4,42 \pm 0,39$

Nos esfregaços sanguíneos foram identificadas sete tipos de células sanguíneas: eritrócitos nucleados, heterofilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos e trombócitos (Figura 6).

Nesse estudo os eritrócitos de *H. maximiliani*, se apresentaram como células nucleadas, homogêneas em tamanho, forma e cor (Figura 6). Eles foram elípticos com um citoplasma roxo pálido. O núcleo violeta-azul estava colocado centralmente com cromatina condensada basófila. Alguns eritrócitos apresentaram inclusões citoplasmáticas ou vacuolas.





**Figura 6:** Esfregaço sanguíneo de *Hydromedusa maximiliani* corado com panótico rápido. Eritrócitos (Er); Heterófilo (He); Eosinófilos (Eo); Basófilo (Ba); Monócito (Mo); Linfócitos (Ly); Trombócitos (Th). Barras de escala: 5 μm.

O tamanho dos eritrócitos foi de  $172,49 \pm 13,57 \mu\text{m}^2$  e o tamanho do núcleo foi de  $21,39 \pm 0,74 \mu\text{m}^2$  (Tabela 2). Ao comparar o tamanho dos eritrócitos entre indivíduos de diferentes sexos, os machos apresentaram uma célula significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que as fêmeas. E quanto a comparação baseada na idade dos indivíduos, os adultos apresentaram uma célula e núcleo significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que os juvenis.

Os heterófilos apresentaram grandes grânulos citoplasmáticos eosinofílicos e fusiformes (Figura 6). O núcleo basófilo foi segmentado e deslocado para a borda da célula. A média para o tamanho foi de  $50,69 \pm 1,3 \mu\text{m}^2$  (Tabela 3).

Os eosinófilos (Figura 6) apresentaram grânulos citoplasmáticos eosinofílicos redondos. O núcleo foi basófilo, de forma redonda-oval, alguns se apresentaram bilobados e localizados perto da membrana. O tamanho foi de  $48,73 \pm 4,13 \mu\text{m}^2$  (Tabela 3).

Os basófilos foram células pequenas de cerca de  $40,10 \pm 2,50 \mu\text{m}^2$  (Tabela 3). Eles foram identificados pelo seu citoplasma que se apresentou profundamente basofílico preenchido com grânulos redondos de púrpura-azul escuro. O núcleo foi redondo e centralizado (Figura 6).

O citoplasma dos monócitos (Figura 6) foi preenchido com grânulos azul-cinza e o núcleo foi oval ou em forma de rim localizado perto da membrana. Os azurófilos (Figura 6), um tipo de monócito, teve um citoplasma ligeiramente mais claro do que os monócitos regulares. O tamanho médio foi de  $45,72 \pm 3,65 \mu\text{m}^2$  (Tabela 3).

Os linfócitos (Figura 6) foram células redondas com um citoplasma corado de azul e um núcleo reticular esférico. Eles mostraram uma maior relação núcleo-citoplasma do que as outras células. O tamanho foi de  $27,50 \pm 1,16 \mu\text{m}^2$  (Tabela 3).

Os trombócitos (Figura 6) foram as menores células encontradas nos esfregaços sanguíneos de *H. maximiliani*. Eles se apresentaram redondos ou elipsoidais, com ausência de grânulos no citoplasma hialino e o núcleo foi grande e basófilo, colocado centralmente. O comprimento médio dos trombócitos foi de  $11,05 \pm 0,93 \mu\text{m}$  e a largura média foi de  $5,92 \pm 0,36 \mu\text{m}$  (Tabela 3).

Nenhum tipo de leucócito mostrou diferença significativa quando comparados entre indivíduos de diferentes sexos e idades.

**Tabela 2:** Tamanho médio dos eritrócitos e núcleos de *Hydromedusa maximiliani* com seus desvios padrão (C: comprimento do eritrócito, L: largura do eritrócito, TE: tamanho do eritrócito, CN: comprimento do núcleo, LN: largura do núcleo, TN: tamanho do núcleo; TN /TE: razão nucleocitoplásmica).

<b>Sexo/Idade</b>	<b>CE (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>LE (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>C/L</b>	<b>TE (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>CN (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>LN (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>CN/LN</b>	<b>TN (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>TN/TE</b>
Macho (n=250)	20,08±1,85	11,86±1,52	1,71±0,19	188,16±36,10	5,96±0,64	4,6±0,70	1,32±0,21	21,65±4,69	0,12±0,021
Fêmea (n=200)	19,15±1,24	10,93±1,49	1,78±0,23	164,7±27,81	6,28±0,64	4,46±0,59	1,43±0,24	21,97±3,77	0,12±0,023
Juvenil (n=150)	19,05±1,80	10,99±0,88	1,74±0,20	164,6±21,97	6,02±0,63	4,33±0,55	1,41±0,21	20,55±3,76	0,13±0,04
<b>Média</b>	<b>19,42±0,57</b>	<b>11,6±0,52</b>	<b>1,74±0,04</b>	<b>172,49±13,57</b>	<b>6,08±0,17</b>	<b>4,46±0,14</b>	<b>1,39±0,06</b>	<b>21,39±0,74</b>	<b>0,12±0,005</b>

**Tabela 3:** Tamanho médio de leucócitos e trombócitos com seus desvios padrão em *Hydromedusa maximiliani* (CT: comprimento do trombócito, LT: largura do trombócito).

<b>Sexo/Idade</b>	<b>Heterófilos (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Eosinófilos (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Basófilos (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Monócitos (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Linfócitos (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Trombócitos</b>	
						<b>CT (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>LT (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Macho</b>	50,42±6,40	51,39±5,73	42,94±9,07	43,7±5,97	28,83±4,41	10±1,20	6,33±0,84
<b>Fêmea</b>	52,1±6,19	50,84±7,54	39,13±8,12	49,94±7,32	26,97±4,72	11,41±1,25	5,66±0,62
<b>Juvenil</b>	49,54±6,81	43,98±2,22	38,22±2,36	43,53±3,36	26,7±3,63	11,75±1,26	5,79±0,66
<b>Média</b>	<b>50,69±1,3</b>	<b>48,73±4,13</b>	<b>40,10±2,50</b>	<b>45,72±3,65</b>	<b>27,50±1,16</b>	<b>11,05±0,93</b>	<b>5,92±0,36</b>

No caso do hemograma, foram analisadas oito amostras (cinco machos, duas fêmeas e um juvenil) do total de 12 indivíduos capturados, no caso da bioquímica sanguínea foram analisadas 10 amostras (cinco machos, três fêmeas e dois juvenis) devido à dificuldade de captura, recaptura, quantidade de sangue coletado e contratempos com o processamento das amostras no laboratório.

No hemograma, o único juvenil amostrado apresentou valores muito diferentes quando comparados com os resultados obtidos dos machos e das fêmeas. O juvenil apresentou hematócrito, hemoglobina e contagem de trombócitos altos de 38%, 10,9 g/dl e  $34 \times 10^3$  células/ $\mu$ l respectivamente. Além disso, o número total de leucócitos (200 células/ $\mu$ l) no juvenil foi baixo quando comparado com os dos adultos (Tabela 4).

Na contagem diferencial leucocitária, os machos apresentaram uma porcentagem de heterófilos ( $28,6 \pm 3,75$ ), eosinófilos ( $5,4 \pm 1,4$ ) e monócitos ( $3,4 \pm 2,2$ ) baixos e linfócitos elevados ( $59,8 \pm 6,82$ ). No caso do único juvenil amostrado, este apresentou heterófilos altos (53) e linfócitos (23) baixos (Tabela 5-6).

**Tabela 4:** Hemograma com seu respectivo desvio padrão de *Hydromedusa maximiliani*. Hematócrito (HCT); hemoglobina (HGB); eritrócitos (RBC); leucócitos (WBC); hemoglobina corpuscular média (HCM); volume corpuscular médio (VCM); concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

<b>Sexo/Idade</b>	<b>HCT (%)</b>	<b>HGB (g/dL)</b>	<b>RBC x10<sup>6</sup> (cél/μl)</b>	<b>WBC (cél /μl)</b>	<b>HCM (fL)</b>	<b>VCM (pg)</b>	<b>CHCM g/dL</b>	<b>Trombócitos x10<sup>3</sup> (cél/ μl)</b>
Macho (n=5)	25,5±1,1	7,78±0,35	0,6±0,03	5245±1069,18	128,79±5,6	422,92±26,91	30,72±1,33	18±2,79
Fêmea (n=2)	19±6	6,05±1,85	0,5±0,09	4687,5±812,5	123,65±20	387,25±67,25	31,95± 0,35	21±5
Juvenil (n=1)	38	10,9	0,7	200	162,7	567,2	28,7	34
Média (Machos e Fêmeas)	22,25±3,25	6,92±0,87	0,55±0,05	4966,25±278,75	126,22±2,57	405,09±17,84	31,34±0,62	19,5±1,5

**Tabela 5:** Contagem diferencial de leucócitos representada em porcentagem com seu respectivo desvio padrão de *Hydromedusa maximiliani*.

<b>Leucócitos (Valor %)</b>						
<b>Sexo/Idade</b>	<b>Basófilo</b>	<b>Eosinófilo</b>	<b>Heterófilo</b>	<b>Linfócito</b>	<b>Monócito</b>	
Macho (n=5)	2,8±0,66	5,4±1,4	28,6±3,75	59,8±6,82	3,4±2,2	
Fêmea (n=2)	2,5±0,5	8,5±3,5	41,5±6,5	32,5±7,5	15±2	
Juvenil (n=1)	4	10	53	23	10	
Média (Machos e Fêmeas)	2,65±0,15	6,95±1,55	35,05±6,45	46,15±13,65	9,2±5,8	

**Tabela 6:** Contagem diferencial de leucócitos representada em valores absolutos com seu respectivo desvio padrão de *Hydromedusa maximiliani*.

<b>Leucócitos Valor absoluto (células/μl)</b>					
<b>Sexo/Idade</b>	<b>Basófilo</b>	<b>Eosinófilo</b>	<b>Heterófilo</b>	<b>Linfócito</b>	<b>Monócito</b>
Macho (n=5)	126,25±22,07	309±143,86	1371,05±201,37	3317±761,77	121,1±53,26
Fêmea (n=2)	121,25±43,75	370±95	1892,5 ±32,5	1584,36±615,63	719,38±215,62
Juvenil (n=1)	8	20	106	46	20

Foi determinado o índice de estresse crônico usando a razão heterofilo/linfócito obtendo uma média de  $0,97 \pm 0,41$ , o índice foi maior no juvenil (2,30) e menor nos machos ( $0,56 \pm 0,17$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7:** Índice de estresse de *Hydromedusa maximiliani* calculado a partir da razão Heterófilo/Linfócito.

Sexo/Idade	Índice de estresse
Macho (n=4)	$0,56 \pm 0,17$
Fêmea (n=2)	$1,39 \pm 0,52$
Juvenil (n=1)	2,30
Média (Machos e Fêmeas)	$0,97 \pm 0,41$

Nas análises bioquímicas os juvenis apresentaram valores elevados de FA ( $63,57$  UI/L) e AST ( $51,07 \pm 24,88$  UI/L), e no caso da ureia, apresentou valores baixos ( $12,03 \pm 5,33E-15$  mg/dL) (Tabela 8).

**Tabela 8:** Bioquímica sanguínea de *Hydromedusa maximiliani*. Uréia; Fosfatase Alcalina (FA); Aspartato Aminotransferase (AST); Alanina Aminotransferase (ALT); Creatinina; e Ácido Úrico.

Sexo/Idade	Ureia (mg/dL)	FA (UI/L)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	Creatinina (mg/dL)	Ácido Úrico (mmol/L)
Macho (n=5)	$37,74 \pm 4,12$	$35,39 \pm 6,73$	$37,54 \pm 15,69$	$14,62 \pm 2,70$	$0,50 \pm 0,19$	$5,04 \pm 0,62$
Fêmea (n=3)	$22,78 \pm 0,18$	$33,47 \pm 2,23$	$22,26 \pm 5,09$	$17,7 \pm 3,83$	$0,29 \pm 0,02$	$3,91 \pm 0,10$
Juvenil (n=2)	$12,03 \pm 5,33E-15$	63,57	$51,07 \pm 24,88$	10,47	$0,32 \pm 0,01$	3,71
Média	$24,18 \pm 7,45$	$44,14 \pm 9,73$	$36,96 \pm 8,32$	$14,26 \pm 2,10$	$0,37 \pm 0,07$	$4,22 \pm 0,41$

Finalmente, se compararam os resultados de algumas análises sanguíneas com outras espécies da família Chelidae. Os resultados deste estudo foram comparados com valores hematológicos de indivíduos em cativeiro e em vida livre, sendo que o hematócrito, a hemoglobina e os eritrócitos totais não mostraram uma grande diferença nas 3 espécies de quelônios de água doce (*Hydromedusa maximiliani*, *Phrynops geoffroanus* e *Hydromedusa tectifera*). A única diferença marcada entre estas espécies

comparadas foi à contagem de leucócitos totais, na qual *H. maximiliani* apresentou a quantidade menor desta célula (Tabela 9). Não foram comparados os dados da contagem diferencial de leucócitos devido a estes dados serem muito influenciáveis por fatores ambientais como sazonalidade, estado reprodutivo, dieta, etc., e fatores patológicos como doenças parasitárias, alterações inflamatórias e neoplasias.

**Tabela 9:** Valores do hemograma de 3 espécies de quelônios de água doce da família Chelidae (*Hydromedusa maximiliani*, *Phrynops geoffroanus* e *Hydromedusa tectifera*). Hematócrito (HCT); hemoglobina (HGB); eritrócitos; leucócitos.

Hemograma	Presente estudo <i>Hydromedusa maximiliani</i>	<i>Phrynops geoffroanus</i> ambiente urbano (Afonso, 2011)	<i>Phrynops geoffroanus</i> criatório (Afonso, 2011)	<i>Hydromedusa tectifera</i> Cativoiro (Ludwing, 2004)
HCT (%)	22,25±3,25	26,63± 4,15	25,7 ± 4,95	21,93±3,12
HGB (g/dL)	6,92±0,87	4,46 ± 1,11	4,93 ± 0,82	7,12±1,411
Eritrócitos x10 <sup>6</sup> (cél/μl)	0,55±0,05	0,45 ± 0,09	0,57 ± 0,12	0,43±0,073
Leucócitos (cél/μl)	4966,25±278,75	19470 ± 4420	10130 ± 2,43	18635,9±9215,8

Nas análises bioquímicas os resultados foram muito parecidos, porém o resultado da fosfatase alcalina do juvenil foi maior nesse estudo em comparação com os machos e as fêmeas (Tabela 10).

**Tabela 10:** Valores da bioquímica sanguínea de 2 espécies de quelônios de água doce da família Chelidae (*Hydromedusa maximiliani* e *Hydromedusa tectifera*).

Bioquímica Sanguínea	Presente estudo <i>Hydromedusa maximiliani</i>	<i>Hydromedusa tectifera</i> Cativoiro (Ludwing, 2004)
Úreia (mg/dL)	24,18 ± 7,45	26,94±19,28
FA (UI/L)	44,14 ±9,73	28,05±10,77
Creatinina (mg/dL)	0,37 ± 0,07	0,33±0,12
Ácido Úrico (mmol/L)	4,22 ± 0,41	1,49±0,48

Os dados do índice crônico foram menores nos indivíduos adultos de *H. maximiliani* quando comparado com os dados de *P. geoffroanus* de ambiente urbano e criatório (Tabela 11).

**Tabela 11:** Índice de estresse de *Hydromedusa maximiliani* calculado a partir da razão Heterófilo/Linfócito de 2 espécies de quelônios de água doce da família Chelidae (*Hydromedusa maximiliani* e *Phrynops geoffroanus* em ambientes urbanos e criatório).

Sexo/Idade	Índice de estresse		
	<i>Hydromedusa maximiliani</i> Presente Estudo	<i>Phrynops geoffroanus</i> ambiente urbano (Afonso, 2011)	<i>Phrynops geoffroanus</i> criatório (Afonso, 2011)
Macho	0,56±0,17	2,07 ± 1,1	2,17 ± 0,6
Fêmea	1,39±0,52	2,37 ± 1,25	2,45 ± 0,99
Juvenil	2,30	-----	-----
Média	0,97±0,41	2,45 ± 0,99	2,28 ± 0,78



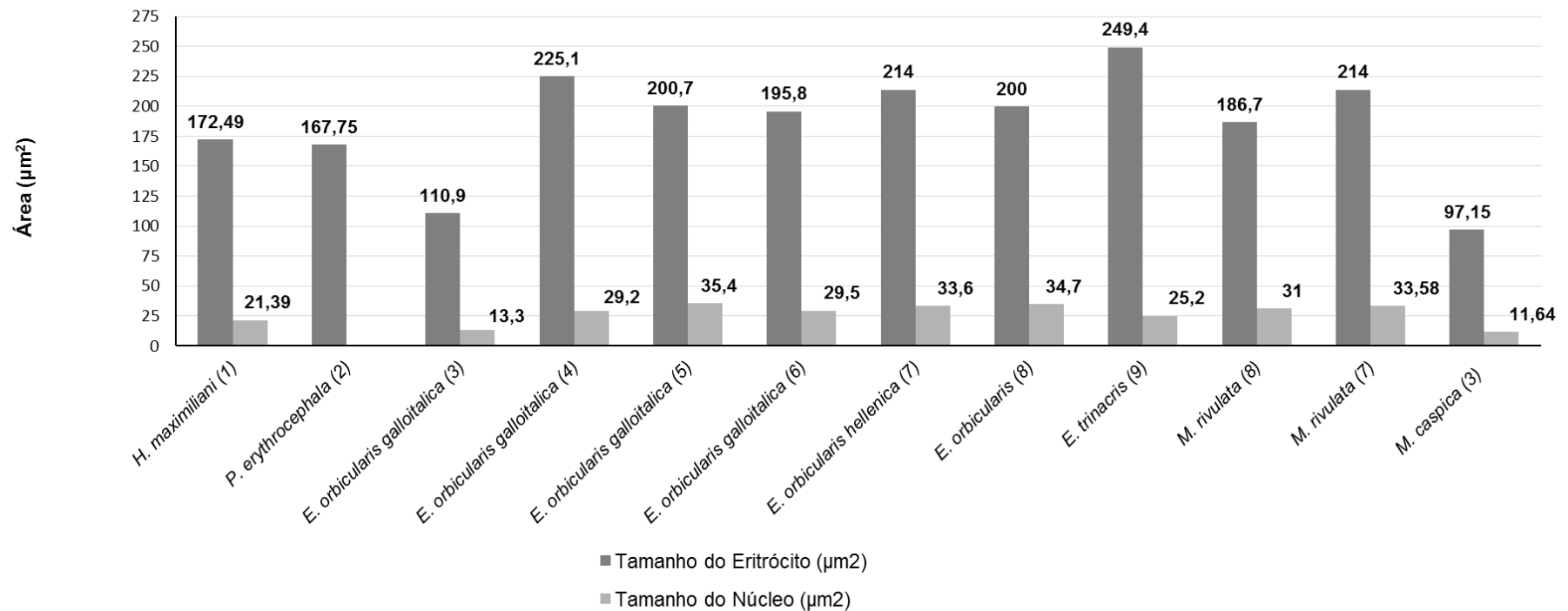
## 5 DISCUSSÃO

Os eritrócitos são especializados em armazenar oxigênio e dióxido de carbono, de modo que sua relação superfície-tamanho é importante para a troca de gases nos tecidos. Portanto, um pequeno eritrócito tem uma troca maior do que uma célula de maior tamanho (HARTMAN & LESSLER, 1964; SEVINC *et al.*, 2000). O tamanho do eritrócito mostra o lugar em que a uma espécie se encontra na escala evolutiva. Nos répteis, *Sphenodon punctatus*, quelônios e crocodilianos os eritrócitos são maiores (HARTMAN & LESSLER, 1964, SAINT GIRONS, 1970). Embora, os quelônios tenham um grande eritrócito, eles têm a menor quantidade celular dentre os répteis; existe uma relação entre o número de células e o tamanho das mesmas (RYERSON, 1949; DUGUY, 1970).

Estudos com o jabuti do deserto *Gopherus agassizii* (ALLEMAN *et al.*, 1992) e com as tartarugas verdes *Caretta caretta* (CASAL & ORÓS, 2007) mostraram a presença de pequenas inclusões intracitoplasmáticas. Estas inclusões basófilas ou estruturas claras são frequentemente observadas no citoplasma de eritrócitos de quelônios saudáveis e outras espécies de répteis (CASAL & ORÓS, 2007; CAMPBELL, 2004). Eles foram considerados por ALLEMAN *et al.* (1992) como organelas degeneradas, possivelmente mitocôndrias.

Segundo Saint Girons (1970), as espécies de quelônios da subordem Cryptodira tem os eritrócitos maiores quando comparado com outros répteis. De acordo com um estudo de Javanbakht *et al.* (2013), desenvolvido com três espécies de testudines, o tamanho dos eritrócitos do jabuti *Testudo graeca* foi de  $67,21 \pm 1,41 \mu\text{m}^2$ , menor que as espécies de água doce, *Emys orbicularis* (Emydidae) e *Mauremys caspica* (Geoemydidae) com um tamanho de eritrócitos de  $110,9 \pm 2,17 \mu\text{m}^2$  e  $97,15 \pm 2,27 \mu\text{m}^2$ , respectivamente. Outros estudos (METIN *et al.*, 2006; ARIKAN & ÇIÇEK, 2010; COLAGAR & JAFARI, 2007; UĞURTAŞ *et al.*, 2003; ARIZZA *et al.*, 2014; ÇIÇEK *et al.*, 2015) confirmaram o grande tamanho dos eritrócitos da família Emydidae, com o eritrócito de maior tamanho ( $249,4 \pm 21,58 \mu\text{m}^2$ ), em *Emys trinacris* (Figura 7). Existem poucos estudos desenvolvidos em espécies de quelônios da subordem pleurodira, um deles foi sobre *Podocnemis erythrocephala* (Podocnemididae) que apresentou um tamanho do eritrócito de  $167,75 \pm 23,03 \mu\text{m}^2$  (SANTOS *et al.*, 2011) (Figura 7). No presente estudo, em *H. maximiliani*, outra espécie de cágado, mostrou um tamanho do eritrócito de  $172,49 \pm 13,57 \mu\text{m}^2$  e um tamanho do núcleo de  $21,39 \pm 0,74 \mu\text{m}^2$  (Tabela

2). As razões C/L e CN/LN em *H. maximiliani* confirmaram a forma elipsoidal do eritrócito e do núcleo (Tabela 2).. Em termos de relação C/L, as espécies aquáticas apresentam eritrócitos mais elipsoidais do que jabutis como *T. graeca*. Por outro lado, *T. graeca* possui um núcleo mais elipsoidal em termos de CN/LN (UĞURTAŞ et al., 2003; ARIKAN & ÇIÇEK, 2010). Em conclusão, as espécies terrestres têm eritrócitos mais especializados para a troca de gases do que as espécies aquáticas devido à adaptação a algumas condições ambientais como a temperatura e a pressão atmosférica (RUIZ et al., 1983) e/ou condições de atividade relacionadas à saúde, reprodução, forrageamento, etc. (CAMPBELL, 2004; ALLANDER & FRY, 2008).



**Figura 7:** Área (µm<sup>2</sup>) dos eritrócitos e núcleo em várias espécies de quelônios de água doce do mundo. 1. *Hydromedusa maximiliani* (Chelidae), Brasil (Presente Estudo), 2. *Podocnemis erythrocephala*, (Podocnemididae), Brasil (SANTOS et al., 2011). 3. *Emys orbicularis galloitalica*, (Emydidae) e *Mauremys caspica*, (Geoemydidae), Irã (JAVANBAKHT et al. 2013). 4. *Emys orbicularis galloitalica*, (Emydidae), Turquia (METIN et al., 2006). 5. *Emys orbicularis galloitalica*, (Emydidae), Turquia (ARIKAN & ÇIÇEK, 2010). 6. *Emys orbicularis galloitalica*, (Emydidae) Irã (COLAGAR & JAFARI, 2007). 7. *Emys orbicularis hellenica*, (Emydidae) e *Mauremys rivulata*, (Geoemydidae) (UĞURTAŞ et al., 2003). 8. *Emys orbicularis*, (Emydidae) e *Mauremys rivulata*, (Geoemydidae), Turquia (ÇIÇEK et al., 2015). 9. *Emys trinacris*, (Emydidae), Itália (ARIZZA et al., 2014).

Em relação ao tamanho, em *H. maximiliani* com uma razão TN/TE de  $0,12 \pm 0,005$ , o núcleo representa o 12% do tamanho total do eritrócito (Tabela 2). De acordo com Arizza et al. (2014) e Uğurtaş et al. (2003), não houve diferenças significativas entre o tamanho dos eritrócitos de machos e de fêmeas, neste estudo, os espécimes machos de *H. maximiliani* apresentaram uma célula significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que as fêmeas e em quanto a idade dos indivíduos, os adultos apresentaram eritrócitos e núcleos significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) do que os juvenis. Esta diferença pode estar relacionada com a massa corporal e ao tamanho dos machos de *H. maximiliani*, que são mais pesados e maiores do que as fêmeas e os juvenis (SOUZA & ABE, 1997; NOVELLI et al., 2013) (Tabela 1). O tamanho dos eritrócitos pode ser aumentado associado às células e ao crescimento corporal (SNYDER & SHEFOR, 1999). Feder (1976; 1977), observou em salamandras, o aumento do tamanho dos eritrócitos devido aos requisitos de hemoglobina que aumentam com as crescentes demandas de oxigênio do organismo. Não só idade, tamanho e sexo podem causar diferenças nos tamanhos e quantidade de células sanguíneas, mas também nas estações. Um estudo de Pagés et al. (1992) concluiu que o tamanho do núcleo de eritrócitos foi menor nos quelônios em outono do que em outras estações. Esse fenômeno poderia ser uma resposta compensatória ao aumento do hematócrito (PAGÉS et al., 1992).

Os leucócitos reptilianos são classificados em dois grupos: granulócitos (heterófilos, eosinófilos, basófilos) e células mononucleares (linfócitos, monócitos, azurofílicos). Eles podem diferir em número e morfologia de grânulos, padrões de coloração citocinêmica e concentração no sangue periférico dependendo das espécies e gêneros (ALLEMAN et al., 1999; STACY et al., 2011).

Neste estudo, o menor leucócito foi linfócito mas foi o mais numeroso, o que acontece comumente em diferentes espécies de répteis segundo Saint Girons (1970). Os maiores leucócitos foram o heterófilo e o eosinófilo (Tabela 3). O trombócito foi a menor célula no sangue periférico (Tabela 3).

Em quanto ao hemograma, o número de eritrócitos do sangue periférico em répteis é menor do que em mamíferos e aves, sendo especialmente alto na contagem total em lagartos. Essa diferença é justificada pela maior capacidade que tem aves e mamíferos para transporte de oxigênio comparado com espécies ectodermas (RASKIN, 2000).

O valor normal do hematócrito da maioria dos répteis varia entre 15 e 55% (FRYE, 1991). É um valor que tem sido associado com a idade dos animais sendo maior

em adultos devido ao fato de ter um maior tempo de submersão que os juvenis (STAMPER et al. 2005). Estudos feitos na tartaruga *Mauremys leprosa* tem demonstrado um aumento do hematócrito durante outono (PAGÉS et al. 1992).

A concentração de hemoglobina de muitas espécies de répteis variam entre 6 e 12 g/dL, embora os valores sejam geralmente inferiores a 10 g / dL (MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011). Estudos feitos na tartaruga *Chrysemys picta*, tem demonstrado que quando mantido em baixas temperaturas do inverno, a hemoglobina mostra uma maior afinidade pelo oxigênio, o que facilita a absorção do mesmo durante o mergulho, permitindo a hibernação dentro da água (MAGINNISS et al. 1983; 2004).

Nesse estudo, a contagem de eritrócitos totais, o hematócrito e o hemograma foram maiores em juvenis do que fêmeas e machos e as fêmeas apresentaram um hematócrito menor (Tabela 4). Embora esses valores são frequentemente menores em juvenis devido a hemodiluição, esse aumento pode ser devido a fatores patológicos como desidratação. Além da diminuição desses valores em juvenis, também pode haver uma diminuição associada ao sexo, sendo menor nas fêmeas e associada à sazonalidade apresentando uma diminuição nos valores depois da hibernação associada à anorexia (McARTHUR et al. 2001).

A contagem de leucócitos variam entre 4000 e 33000 cel/ $\mu$ L (MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011). Aumento no número de heterófilos geralmente é sazonal (valores máximos no verão e menores durante a hibernação) (STAMPER et al. 2005). Patologicamente, o aumento pode estar associado à doenças inflamatórias e/ou infecciosas, presença de neoplasias e estresse (MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011). Nesse estudo, os heterófilos foram mais altos em juvenil possivelmente causado por estresse provocado pela captura e a coleta sanguínea, em machos, os valores foram menores possivelmente devido ao período da captura no inverno durante a hibernação.

Os eosinófilos compõem 7% a 20% dos leucócitos totais em répteis saudáveis, com menor porcentagem em lagartos e maior em quelônios (CAMPBELL, 2004). O aumento de eosinófilos é maior durante a hibernação (AL-BADRY & NUZHY, 1983). Em indivíduos do gênero *Trachemys* é comum uma contagem alta destas células (MARTÍNEZ-SILVESTRE et al., 2011). Um incremento na contagem dos eosinófilos também pode estar associado a infecções parasitárias e a estimulação do sistema imunológico (McARTHUR et al. 2001).

Muitas espécies de répteis saudáveis têm maior contagem de linfócitos do que de heterófilos (STRIK et al., 2007). Na maioria das espécies de répteis, os linfócitos

compõem até 80% dos leucócitos totais (SYPEK & BORYSENKO, 1988; DIVERS *et al.*, 1996; TROIANO *et al.*, 1997; WORK *et al.*, 1998; ALLEMAN *et al.*, 1999). Eles também variam com o sexo (as fêmeas de algumas espécies pode ter uma concentração significativamente maior de linfócitos que os machos da mesma espécie), estado nutricional (diminuição associado à desnutrição) e a estação do ano (diminui no inverno e aumenta no verão) (ALLEMAN *et al.* 1999; Le BLANC, 2001; DICKINSON *et al.* 2002; KESSAB *et al.*, 2009). Estudos feitos em tartarugas marinhas da espécie *Caretta caretta* tem demonstrado um aumento do valor dos linfócitos associados a idade, sendo maior em indivíduos mais idosos (KAKIZOE *et al.*, 2007). Nesse estudo, os machos apresentaram um maior número de linfócitos e os juvenis um menor número, confirmando a associação dos níveis da célula com a idade descrita em outros quelônios.

Os quelônios saudáveis de água doce possuem 65% de basófilos (BRENNER *et al.*, 2002; INNIS *et al.*, 2007). A variação sazonal na concentração de basófilos é leve, com menos basófilos em jabutis durante a hibernação e um aumento durante períodos ativos (SAINT GIRONS, 1970; CHRISTOPHER *et al.*, 1999). A porcentagem de basófilos é bastante afetada pela idade e região geográfica (WORK *et al.*, 1998).

Em alguns répteis, um aumento nos valores de fosfatase alcalina está relacionado com atividade osteoblástica aumentada, doença hepatobiliar ou distocia (CAMPBELL, 2008). Fisiologicamente, pode ocorrer um aumento da FA em répteis jovens quando comparado com adultos da mesma espécie (CAMPBELL, 1996; MARTÍNEZ-SILVESTRE *et al.*, 2011) o que explicaria os resultados desse estudo no qual a FA do juvenil está muito elevada em comparação com machos e fêmeas (Tabela 8).

O aumento dos níveis no sangue do AST do juvenil nesse estudo pode estar relacionado com atividade muscular já que essa enzima não é específica para o diagnóstico de doenças hepáticas (NEVAREZ *et al.*, 2002; CAMPBELL, 2012).

No caso da Ureia, o juvenil apresentou um valor menor comparado com machos e fêmeas, mas não deve-se considerar como uma diminuição patológica porque o intervalo de 7,7 a 615,4 mg/dl é considerado como índice normal para quelônios (JACOBSON, 1992).

Finalmente, a razão heterófilos/linfócitos foi analisada como indicador de estresse crônico, pois o estresse acelera a secreção dos hormônios do córtex da suprarrenal, influenciando na diminuição dos eosinófilos e linfócitos e favorecendo o

aumento dos heterófilos (POST et al., 2003). Quanto maior a proporção de heterófilos, maior o índice de estresse do animal (MATOS & MATOS, 1988). Nesse estudo as fêmeas e os juvenis apresentaram um índice de estresse maior de  $1,39 \pm 0,52$  e  $2,30$ , respectivamente (Tabela 7). Esse aumento no número de heterófilos pode ter sido causado pela ação antrópica no local, a manipulação durante a coleta sanguínea e aferição biométrica, que tornou-se crônico devido à várias recapturas durante este estudo.

## 6 CONCLUSÕES

Todos os resultados apresentados nesse trabalho não puderam ser analisados completamente devido às dificuldades para a captura e recaptura dos espécimes, ao tamanho pequeno da população, manipulação e processamento das amostras no laboratório, à coleta de uma pouca quantidade de sangue e principalmente a falta de parâmetros sanguíneos de referência. Por esse motivo a maioria dos resultados foram comparados entre espécimes da mesma população categorizando a mesma por sexo e idade e usado parâmetros de referência e estudos desenvolvidos com outras espécies de quelônios da família Chelidae, como *H. tectifera* e *P. geoffroanus*.

Esse estudo é o primeiro baseado em hematologia de *H. maximiliani*, uma espécie considerada vulnerável e é de grande importância a continuação de estudos que abordem hematologia desta espécie, considerando mudanças sazonais e outros aspectos da biologia da mesma como por exemplo, o tempo de submersão, fator que pode causar variações consideráveis nos valores hematológicos. Estudos com populações maiores podem fornecer dados estatisticamente mais representativos e que poderão ser utilizados para estabelecer parâmetros hematológicos para essa espécie.

Deve-se focar em estudos que abordem a biologia e ecologia dessa espécie e que permita futuramente desenvolver projetos de conservação da mesma.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-BADRY, K.S.; NUZHY, S. Hematological and biochemical parameters in active and hibernating sand vipers. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 74 A, p. 137-141. 1983.
- ALLANDER, M. C.; FRY, M. M. Amphibian haematology. **Veterinary Clinics Exotic Animals**, v. 11, p. 463-480. 2008.
- ALLEMAN, A. R.; JACOBSON, E. R.; RASKIN, R. E. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 1645-51. 1992.
- ALLEMAN, A. R.; JACOBSON, E. R.; RASKIN, R. E. Morphologic, cytochemical staining and ultrastructural characteristics of blood from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 507-14. 1999.
- ALMOSNY, N. R. P.; MONTEIRO, A. M. Patologia clínica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA J. C. S.; CATÃO- DIAS, J. L. (Ed.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. p. 939-966.
- ANDERSON, N.L.; WACK, R.F.; HATCHER, R. Hematology and clinical chemistry reference ranges for clinically normal, captive New Guinea snapping turtle (*Elseya novaguineae*) and the effects of temperature, sex, and sample type. **Journal Zoo Wildlife Medicine**, v. 28, p. 394-403. 1997.
- ANDRADE, R.; DA SILVA, G.; FERNANDES, S.; GÓMEZ, W.; AGY, B.; ALFREDO, R. et al. Estúdio comparativo de valores hematológicos de serpientes de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) de vida libre y de cautiverio. **Biotemas**, v. 27, n. 2, p.109-115. 2014.
- ARGÔLO, A.J.S.; FREITAS, M.A. Hydromedusa maximiliani. Geographic distribution. **Herpetological Review**, v. 33, n. 2, p. 150. 2002
- ARIKAN, H.; KUMLUTAŞ, Y.; TURKOZAN, O.; BARAN, İ.; ILGAZ, C. The morphology and size of blood cells of some viperid snakes from Turkey. **Amphibia-Reptilia**, v. 25, p. 465-470. 2004.
- ARIKAN, H.; GOCMEN, B.; ATATUR, M.K.; KUMLUTAŞ, Y.; ÇIÇEK, K.. Morphology of peripheral blood cells from various Turkish snakes. **North-Western Journal of Zoology**, v. 5, p. 61-73. 2009.

- ARIKAN, H.; AND ÇIÇEK, K. Morphology of peripheral blood cells from various species of Turkish herpetofauna. **Acta Herpetologica**, v. 5, p. 179–198. 2010.
- ARIZZA, V.; RUSSO, D.; MARRONE, F.; SACCO, F.; ARCULEO, M. Morphological characterization of the blood cells in the endangered Sicilian endemic pond turtle, *Emys trinacris* (Testudines: Emydidae). **Italian Journal of Zoology**, v. 81, p. 344-353. 2014.
- BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Robe Editorial, 2003. P. 583.
- BOLTEN, A.B.; BJORNDAL, K.A. Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationships. **Journal Wildlife Diseases**, v. 28, p. 407–413. 1992.
- BOYD, J.W. Serum enzymes in the diagnosis of diseases in man and animals. **Journal of Comparative Pathology**, v. 98, p. 381–404. 1988.
- BRAUN, J.P.; LEFEBVRE, H. P.; Kidney function and damage. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestical animals**. 6° Ed. San Diego: Academic Press, 1998. p. 485-528.
- BRENNER, D.; LEWBART, G.; STEBBINS, M. et al. Health survey of wild and captive bog turtles (*Clemmys muhlenbergii*) in North Carolina and Virginia. **Journal of Zoological Wildlife Medicine**, v. 33, n.4, p. 311–6. 2002.
- CAMPBELL, H.A.; MICHELI, M.A.; ABE, A. A seasonally dependent change in the distribution and physiological condition of Caiaman crocodilus yacare in Paraguay River basin. **Wildlife Research**, v.35, n. 2, p. 150–157. 2008.
- CAMPBELL, J.; LAMAR, W. **The venomous reptiles of Latin America**. Nueva York: Cornell University Press, 1989.
- CAMPBELL, T.W. Clinical pathology. In: MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. Londres: W.B.Saunders Co., 1996. p. 248-257.
- CAMPBELL, T.W.. Haematology of lower vertebrates In: ACVP; ASVCP. (Eds). **55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) and 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP)**. Middleton WI, USA: International Veterinary Information Service, Ithaca NY, 2004.
- CAMPBELL, T.W. Hematology of reptiles. In: THRALL, M.A. (Ed). **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. p. 277–297.

- CANFIELD, P.J. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. **Australian Veterinary Journal**, v.76, n.12, p.793-800. 1998.
- CARVALHO, D.; BARROS, K.; SANTOS, A.; SANTOS, A. Perfil bioquímico em serpentes - revisão de literatura. **Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, v.9, n. 1, p. 56-61. 2014.
- CASAL, A.B; AND ORÓS, J. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 158–165. 2007.
- CENTRO DE PESQUISAS SOCIAIS-UFJF. **Anuário Estatístico de Juiz de Fora 2007**: base de dados 2006. Juiz de Fora: Editora UFJF, 2006.
- CHRISTOPHER, M.; BERRY, K.; WALLIS, I.; NAGY, K.; HENEN, B.; PETERSON, C. Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the mojave desert. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, p. 212-238. 1999.
- ÇIÇEK, K.; ARIKAN, H.; AYAZ, D. Blood Cells Morphology and Erythrocytes Count of Two Freshwater Turtles, *Emys orbicularis* and *Mauremys rivulata*, from Turkey. **Ecologia Balkanica**, v.7, p. 21-27. 2015.
- COLAGAR, H.; JAFARI, N. Red blood cell morphology and plasma proteins electrophoresis of the European pond terrapin *Emys orbicularis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p.1578–1581. 2007.
- COSTA, H; BÉRNILS, R. **Répteis brasileiros: Lista de espécies. Herpetologia Brasileira**. 2014. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2014.03-07-MudancasTaxonomicas.pdf>>. Acesso em: outubro, 2017.
- COSTA, H; REZENDE, D; MOLINA, F; NASCIMENTO, L. New Distribution Records and Potentially Suitable Areas for the Threatened Snake-Necked Turtle *Hydromedusa maximiliani* (Testudines: Chelidae). **Chelonian Conservation and Biology**, vol. 14, n. 1, p. 88–94. 2015.
- CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1999. p. 114.

- DAVIES, P.M.C. Anatomy and physiology. In: COOPER, J.E.; JACKSON, O.F. (Eds.), *Diseases of the Reptilia*. San Diego: Academic Press, 1981. p. 9.
- DICKINSON, V. M.; JARCHOW, J.; TRUEBLOOD, M. H. Hematology and plasma biochemistry reference range values for free-ranging desert tortoises in Arizona. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, p. 143-153. 2002.
- DIVERS, S. J.; REDMAYNE, G.; AVES, E. K. Haematological and biochemical values of 10 green iguanas (*Iguana iguana*). **Veterinary Record**, v. 138, p. 203–205. 1996.
- DIVERS, S.J. Reptilian renal and reproductive diseases diagnosis. In: FUDGE, A.M. (Ed.). **Laboratory Medicine: avian and exotic pets**. Philadelphia, PA: W.B. Saunders. 2000.p. 217-222.
- ERNST, C.H.; BARBOUR, R.W. **Turtles of the World**. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, 1992. p. 313.
- FALCE, M.C.L.B. **Hematologia de répteis**. 2009. Monografia (Curso de Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos) - Universidade Castelo Branco. Instituto Quallitas de pós-graduação, Campinas, São Paulo, 2009.
- FAMELLI, S.; BERTOLUCI, J.; MOLINA, F.B.; MATARAZZO-NEUBERGER, W.M. Structure of a population of *Hydromedusa maximiliani* (testudines, Chelidae) from Parque Estadual da Serra do Mar, an Atlantic Rainforest Preserve in Southeastern Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**. v. 10, n.1, p. 132-137, 2011.
- FEDER, M.E. Lunglessness, body size, and metabolic rate in salamanders. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 49, p. 398 - 406. 1976.
- FEDER, M.E. Oxygen consumption and activity in salamanders: effect of body size and lunglessness. **Journal of Experimental Zoology**, v. 202, p. 403 - 413. 1977.
- FERRONATO, B.O. ***Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) em ambiente antrópico: perfil hematológico e microbiota oral**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), Piracicaba, 2008.
- FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.205-365

- FRYE, F.L. **Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry**. Malabar, Florida: Krieger Publishing, 1991.
- FUDGE, A. M. **Laboratory medicine avian and exotic pets**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. p.185-264.
- GARCIA-NAVARRO, E.K.; PACHALY, R. Hematologia dos répteis. In: o **Manual de hematologia veterinária**. 1 ed. São Paulo: Varela, 1994. p.125-132.
- GOULART, C.E.S. **Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis**. Rio de Janeiro: LF Livros de Veterinária, 2004. p.329.
- GREGORY, C.R.; LATIMER, K.S.; FONTENOT, D.K. Chronic monocytic leukemia in an inland bearded dragon, *Pogona vitticeps*. **Journal of Herpetology Medicine and Surgery**, v. 14, p. 12–6. 2004.
- GUIX, J.C.; MIRANDA, J.R.; NUNES, V.S. Observaciones sobre la ecología de *Hydromedusa maximiliani*. Boletín de la Asociación Herpetológica Española, v. 3, p. 23-25. 1992.
- HARTMAN, F.A.; LESSLER, M.A. Erythrocyt in fishes, amphibia and reptiles. **Biological Bulletin**, v.126, p. 83-88. 1964.
- HAWKEY, C.M., DENNETT, T.B. Hematology of Reptiles ,In Comparative veterinary haematology. London: Wolfe Publishing Limited,pp 259 – 275 , 1989
- ICMBio,. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. 2016. Disponível em: <[http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/dcom\\_sumario\\_executivo\\_livro\\_vermelho\\_ed\\_2016.pdf](http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/dcom_sumario_executivo_livro_vermelho_ed_2016.pdf)>. Acesso em: outubro, 2017
- INNIS, C. J.; TLUSTY, M.; WUNN, D. Hematologic and plasma biochemical analysis of juvenile head-started northern red-bellied cooters (*Pseudemys rubriventris*). **Journal of Zoological Wildlife Medicine**, v. 38, p. 425–32. 2007.
- IUCN. INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES – IUCN. **IUCN Red List of Threatened Species**. 2017. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: outubro, 2017.
- IVERSON, J.B. **A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World**. Privately printed, 1992. p. 363.
- JACOBSON, E.R. Laboratory investigations. In: BEYNON, P.H.; LAWTON, M.P.E.;

- COOPER, L.E. Manual of reptiles. Londres: British Small Animal Veterinary Association, 1992. p.50-62.
- JACOBSON, E.R. Blood collection techniques in reptiles: laboratory investigations. In: FOWLER, M.E. Zoo & wild animal medicine. 3 ed. Denver, Colorado: W,B. Saunders Co., 1993. p.144-152
- JAVANBAKHT, H.; VAISSI, S.; PARTO, P. The morphological characterization of the blood cells in the three species of turtle and tortoise in Iran. **Research in Zoology**, v. 3, p. 38–44. 2013.
- KAKIZOE, Y.; SAKAOKA, K.; KAKIZOE, F. et al. Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). **Journal of Zoological Wildlife Medicine**, v. 38, p. 77-84. 2007.
- KASSAB. A.; SHOUSHA, S.; FARGANI, A. Morphology of Blood Cells, Liver and Spleen of the Desert Tortoise (*Testudo graeca*). **The Open Anatomy Journal**, v. 1, p. 1-10. 2009.
- KNOTKOVÁ, Z.; MAZANEK, S.; HOVORKA, M.; SLOBODA, M.; KNOTEK, Z. Haematology and plasma chemistry of Bornean River turtles suffering (*Chelonia mydas*) from the United Arab Emirates. **Comparative Haematology International Journal**, v. 8, p. 102–107. 2002.
- LAFETÁ, R. C. A. **Espécies lenhosas de Solanum (Solanaceae) da Reserva Biológica Santa Cândida**. 1998. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.
- LANCE, V.A.; ELSEY, R.M. Plasma catecholamines and plasma corticosterone following restraint stress in juvenile alligators. **Journal of Experimental Zoology**, v. 283, p. 559-565. 1999.
- LeBLANC, C. J. Clinical differentiation of chinese water dragon, *Physignatus spp.* Leukocytes. **Journal of Herpetological Medicine and Surgery**, v. 11, n. 3, p. 31-33. 2001.
- LUDWING, G. **Análise Hematológica e Bioquímica em Cágados pescoço de cobra (*Hydromedusa tectifera*) mantidos em cativeiro**. 2004. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias) –Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2004.

- MADER, D.R. Normal hematology of Reptiles. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. (Eds). **Veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 1126-1132.
- MAGINNISS, L.A.; EKELUND, S.A.; ULTSCH, G.R. Blood oxygen transport in common map turtles during simulated hibernation. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, p. 232-241. 2004.
- MAGINNISS, L.A.; TAPPER, S.S.; MILLER, L.S. Effect of chronic cold and submergence on blood oxygen transport in the turtle, *Chrysemys picta*. **Respiratory Physiology**, v. 53, p. 15-29. 1983.
- MARTÍNEZ-SILVESTRE, A., LAVÍN, S., & CUENCA, R. Hematología y citología sanguínea en reptiles. **Clínica Veterinaria de Pequeños Animales**, v. 31, n. 3, p. 131-141. 2011.
- MATOS, M. S.; MATOS, P. F. **Laboratório clínico médico-veterinário**. Ed. Atheneu, 1988. p.180.
- MC ARTHUR, S.D.J.; WILKINSON, R.J.; BARROWS, M.G. Tortoises and turtles. **Manual of Exotic Pets BSAVA**, v.4, p. 208-222. 2001.
- METIN, K.; TÜRKOZAN, O.; KARGIN, F.; KOCA, Y.B.; TASKAVAK, E.; KOCA, S. Blood cell morphology and plasma biochemistry of the captive European pond turtle *Emys orbicularis*. **Acta Veterinaria Brno**, v. 75, p. 49–55. 2006.
- MITCHELL, M.A.; TULLY, T.N. **Manual of Exotic Pet Practice**. Missouri: Saunders, 2009.
- NATT, M.; HERRICK, C. A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. **Poultry Science**, v. 31, n. 4, p. 735-738. 1952.
- NEVAREZ, J.G.; MITCHELL, M.A., Le BLANC, C.; GRAHAM, P. Determination of plasma biochemistries, ionized calcium, vitamin D3, and hematocrit values in captive green iguanas (*Iguana iguana*) from El Salvador. In: *Proceedings of the Association of Reptile and Amphibian Veterinarians*. Reno: 9th Annual Conference, 2002. p. 87-93.
- NOVELLI, I.A.; SOUSA, B.M. Hábitos alimentares de *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae) da Reserva Biológica Municipal Santa Candida, Juiz de Fora. Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zoociências, Juiz de Fora**. v. 8, n. 2, p. 210. 2006.
- NOVELLI, I. A.; GOMIDES, S. C.; BRUGIOLO, SONIA SIN SINGER; SOUSA, B.

- M. Alimentary habits of *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) (Testudines, Chelidae) and its relation to prey availability in the environment. **Herpetology Notes**, v. 6, p. 503-511. 2013.
- PAGÉS, T.; PEINADO, V.I.; VISCOR, G. Seasonal Changes In Hematology And Blood Chemistry Of The Freshwater Turtle *Mauremys Caspica leprosa*. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 103A, p. 275-278. 1992.
- PENDL, H. Morphological Changes In Red Blood Cells of Birds And Reptiles And Their Interpretation. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 61, n. 1. 2006.
- PIRES, T.T.; ROSTAN, G.; GUIMARÃES, J.E. Hemograma e determinação da proteína plasmática total de tartarugas marinhas da espécie *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), criadas em cativeiro, Praia do Forte, Município de Mata de São João – Bahia. Brazil. **Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 43, p. 348–353. 2006.
- PJF. Prefeitura de Juiz de Fora. **Reserva Biológica Municipal Santa Cândida**. Disponível em: [https://www.pjf.mg.gov.br/secretarias/sma/unidades\\_de\\_conservacao.php](https://www.pjf.mg.gov.br/secretarias/sma/unidades_de_conservacao.php). Acesso em: outubro 2016.
- POST, J.; REBEL, M. J.; TER HUURNE, A. A. H. M. Automated blood cell count: a sensitive and reliable method to study corticosterone-related stress in broilers. **Poultry Science**, v.82, p. 591-595. 2003.
- PRITCHARD, P. C. H. Encyclopedia of Turtles. Hong Kong: T. F. H. Publications, 1979.
- RAMOS, M. C. C. **Avaliação qualitativas, quantitativas e ultra-estruturais da resposta inflamatória induzida experimentalmente por corpo estranho em tartarugas tigras d'água (*Trachemys dorbini*, Duméril e Bibron, 1835)**. 1992. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada)-Universidade de São Paulo, 1992.
- RASKIN, R.E. Reptile complete blood count. In: FUDGE, A.M. (Ed): **Laboratory medicine: Avian and exotic pets**. Philadelphia: Saunders Company, 2000. p. 193-197.
- RASKIN, R.E., Reptilian Complete Blood Count, In: FUDGE, A.M. (Ed). **Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets**. Philadelphia: WB Saunders, 1999. p. 193-197.



- REAGAN, W.J.; DENICOLA, D.B.; IRIZARRY, A.R. **Atlas de Hematologia Veterinaria: Especies Domesticas e não Domesticas comuns**. Ames: Blackwell, 2008.
- RIBAS, E.R.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A. Distribuição e habitat das tartarugas de água-doce (Testudines, Chelidae) do Estado do Paraná, Brasil. **Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 15-32. 2002.
- RODRIGUES, M. T.. A conservação de répteis brasileiros: os desafios para um país magadiverso. In: **Conservação Internacional- Brasil. Megadiversidade**. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2005. v. 1, p. 87-94.
- ROSSKOPF, W.J.J. Disorders of Reptilian Leukocytes and Erythrocytes, In: FUDGE, A.M. (Ed). **Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets**. Philadelphia: WB Saunders, 1999. p. 198-203.
- RUIZ, G.; ROSENMANN, M.; VELOSO, A. Respiratory and hematological adaptations to high altitude in *Telmatobius* frogs from the Chilean Andes. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 76A, p. 109-113. 1983.
- RYERSON, D.L. 1949. A preliminary survey of reptilian blood. **Journal Entomology and Zoology**, v. 41, p. 49-55.
- SAINT GIRONS, M.C. Morphology of the circulating blood cell. In: GANS, C.; PARSONS, T.C. (Ed). **Biology of the reptilia**, v. 3. New York: Academic Press; 1970.
- SANTOS, M. Q. C.; OLIVEIRA, A. T.; SALES, R. S. A.; CARMO, I. B.; TAVARES-DIAS, M.; AFFONSO, E. G.; MARCON, J. L. 2011. **Caracterização morfológica das células sanguíneas da Irapuca (testudines, podocnemididae) do médio rio negro, Amazonas**. XVII congresso brasileiro de engenharia de pesca (cobep), Belém – Pará, 2011.
- SEVINC, M.; UĞURTAŞ, İ.H.; YILDIRIMHAN, H.S. Erythrocyte measurements in *Lacerta rudis* (Reptilia, Lacertidae). **Turkey Journal of Zoology**, v. 24, p. 207-209. 2000.
- SIEGEL, H.S. Physiological stress in birds. **Bioscience**, v. 30, p. 529-534. 1980.
- SINGH, M.; KUMAR, P. Simple method of blood sampling from Indian freshwater turtles for genetic studies. **Acta Herpetologica**, v. 3, n. 1, p. 65-69. 2008.
- SNYDER, G.K.; SHEAFOR, B.A. Red blood cells: centerpiece in the evolution of the vertebrate circulatory system. **American Zoologist**, v. 39, p. 189 – 198. 1999.

- SOUZA, F.L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, v. 3, n. 1, p. 15-27. 2004.
- SOUZA, F.L. The Brazilian Snake-necked Turtle, *Hydromedusa maximiliani*. **Reptilia**, v. 40, p. 47-51. 2005a.
- SOUZA, F.L. Geographical distribution patterns of South American side-necked turtles (Chelidae), with emphasis on Brazilian species. **Revista Española de Herpetología**, v. 19, p. 33-46. 2005b.
- SOUZA, F.L. **História natural do cágado *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1820) no Parque Estadual de Carlos Botelho, SP, região de Mata Atlântica (Testudines, Chelidae)**. 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1995a.
- SOUZA, F.L. *Hydromedusa maximiliani* (Maximilian’s Snake-necked Turtle). Juvenile morphology. **Herpetological Review**, v. 26, n. 1, p. 34-35. 1995b
- SOUZA, F.L.; ABE, A.S. Observations on feeding habits of *Hydromedusa maximiliani* (Testudines: Chelidae) in southeastern Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 1, p. 320-322. 1995.
- SOUZA, F.L.; ABE, A.S. Population structure, activity, and conservation of the neotropical freshwater turtle, *Hydromedusa maximiliani*, in Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, v. 2, p. 521-525. 1997a.
- SOUZA, F.L.; ABE, A.S. Seasonal variation in the feeding habits of *Hydromedusa maximiliani* (Testudines, Chelidae). **Boletín de La Asociación Herpetológica Española**, Logroño, v. 8, p.17-20. 1997b.
- SOUZA, F.L.; ABE, A.S. Resource partitioning by the Neotropical freshwater turtle, *Hydromedusa maximiliani*. **Journal of Herpetology**, Columbus, n.32, p. 106-112. 1998.
- SOUZA, F.L.; MARTINS, F.I. *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1825)-Maximilian’s Snake-Necked Turtle, Brazilian Snake-Necked Turtle. In: RHODIN, A.G.J. et al. (Eds). **Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC**. 2009. Disponível em: <<http://www.iucn-tftsg.org/cbftt>>.

- STACY, N.I.; ALLEMAN, R.; SAYLER, K.A. Diagnostic hematology of reptiles. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, p. 87-108. 2011.
- STAMPER, M.A.; HARMS, C.A.; EPPERLY, S.P et al. Relationship between barnacle epibiotic load and hematologic parameters in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*), a comparison between migratory and residential animals in Pamlico Sound, North Carolina. **Journal of Zoological Wildlife Medicine**, v. 36, p. 635-641. 2005.
- STRIK, N. I.; ALLEMAN, A.R.; HARR, K.E. Circulating inflammatory cells. In: JACOBSON, E.R. (Ed). **Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text**. Cabo Raton, Florida: CRC Press, 2007. p. 167-218.
- SYPEK, J.; BORYSENKO, M. Reptiles. In: ROWLEY, A.F.; RATCLIFFE, N.A. (Ed). **Vertebrate blood cells**. Cambridge (UK): Cambridge University Press, 1988. p. 211–56.
- SZARSKI, H.; CZOPEK, G. Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles. **Bulletin De l'Academie Polonaise Des Sciences. Serie Des Sciences Biologiques**, v. 14, p. 433-437. 1966.
- TAYLOR, JR.; R.W.; JACOBSON, E.R. Hematology and serum chemistry of the gopher tortoise, *Gopherus polyphemus*. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 72 A, p. 425–428. 1982.
- TROIANO, J. C.; VIDAL, J. C.; GOULD, J.; GOULD, E. Haematological reference intervals of the south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) in captivity. **Comparative Haematology International**, 7. 2. P. 109–112, 1997.
- TROIANO, L.E. et al. Blood biochemical profile of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in captivity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.7, n.2, p. 15-21. 2001.
- UĞURTAŞ, İ.H.; SEVINC, M.; YILDIRIMHAN, H.S. Erythrocyte size and morphology of some tortoises and turtles from Turkey. **Zoology Studies**, v. 42, p. 173-178. 2003.
- VERNBERG, J.F. Hematological studies on salamanders in relation to their ecology. **Herpetologica**, v. 11, p. 129-133. 1955.
- VOGT, R. C.; FAGUNDES, C. K.; BATAUS, Y. S. L.; BALESTRA, R. A. M. et al. **Avaliação do Risco de Extinção de *Hydromedusa maximiliani* (Mikan, 1825) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna**

**brasileira.** 2015. Disponível em:  
<<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/estado-de-conservacao/7403-repteis-hydromedusa-maximiliani-cagado-da-serra.html>>.

Acesso em: outubro, 2017

WORK, T.M.; RASKIN, R.E.; BALAZS, G.H. et al. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p.1252–7. 1998.

YAMASHITA, C. *Hydromedusa maximiliani*. Ecology. **Herpetological Review**, v. 21, p. 19. 1990.