

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

PROPRIEDADES DO SANGUE E EFEITO DO MERGULHO FORÇADO SOBRE O  
PERFIL HEMATOLÓGICO DE *Podocnemis erythrocephala* (SPIX, 1824) (TESTUDINES,  
PODOCNEMIDIDAE) DO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS

**MARCIO QUARA DE CARVALHO SANTOS**

**Manaus, Amazonas**

**Mai, 2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

PROPRIEDADES DO SANGUE E EFEITO DO MERGULHO FORÇADO SOBRE O  
PERFIL HEMATOLÓGICO DE *Podocnemis erythrocephala* (SPIX, 1824) (TESTUDINES,  
PODOCNEMIDIDAE) DO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS

**MARCIO QUARA DE CARVALHO SANTOS**

ORIENTADOR: JAYDIONE LUIZ MARCON, Dr.

CO-ORIENTADORA: ELIZABETH GUSMÃO AFFONSO, Dra.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica, área de concentração Biodiversidade Amazônica.

**Manaus, Amazonas**

**Maior, 2011**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAM

S237p Santos, Marcio Quara de Carvalho

Propriedades do sangue e efeito do mergulho forçado sobre o perfil hematológico de *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824) (Testudines, Podocnemididae) do Médio Rio Negro, Amazonas / Marcio Quara de Carvalho Santos. - Manaus, AM : UFAM, 2011.

67 f.: il. color.; 30 cm

Inclui referências.

Dissertação (Mestre em Diversidade Biológica). Universidade Federal do Amazonas. Orientador: Prof. Dr. Jaydione Luiz Marcon.

1. Quelônios 2. Hematologia I. Marcon, Jaydione Luiz (Orient.) II.  
Título

CDU (2007): 598.13(043.3)

*Dedico este trabalho aos meus pais Alexandre e Fátima, pelo apoio em todos os momentos de minha vida pessoal, acadêmica e profissional.*

## AGRADECIMENTOS

*À DEUS, nosso mestre que nos ensina diariamente que a maior de todas as lições é o amor a tudo.*

*À minha família: meus pais Alexandre e Fátima, minha irmã Bruna e minha avó Adelaide que sempre estiveram ao meu lado, tanto nos momentos difíceis, me dando forças, quanto nos momentos de felicidade, celebrando as conquistas.*

*À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela infra-estrutura, por viabilizar a minha participação em vários congressos científicos realizados fora do estado e pelos excelentes profissionais que compõem o Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica (PPG-DB), permeando desde a parte administrativa até os docentes.*

*Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e em especial à Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ), ao Laboratório de Fisiologia Aplicado à Piscicultura (LAFAP/CPAQ), Laboratório Temático de Solos e Plantas (LTSP/CPEC) e ao Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos (LCIA/CPEN) pela assistência nas análises de água e de sangue.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão de bolsa de mestrado que foi primordial durante estes dois anos.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro aos projetos do grupo de pesquisa ao qual estou inserido o que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.*

*Ao meu orientador Dr. Jaydione Luiz Marcon pela contribuição intelectual e por acreditar no meu sucesso e no sucesso deste trabalho.*

*À minha co-orientadora e mãe-científica Dra. Elizabeth Gusmão Affonso, pelo exemplo de profissionalismo, de garra e determinação, pelo brilhantismo e pelo imensurável apoio durante toda minha vida científica até o presente momento.*

*Ao Dr. Marcos Tavares Dias pelo indispensável auxílio, mesmo à distância, durante a identificação dos tipos leucocitários e pela receptividade e boa vontade no esclarecimento dos incontáveis questionamentos que surgiram ao longo desses dois anos.*

*Aos doutores José Fernando Marques Barcellos, Paulo Henrique Rocha Aride e Wallice Luiz Paxiúba Duncan pelos valiosos conselhos atribuídos durante a avaliação do projeto de dissertação.*

*Ao mestre Jackson Pantoja pela autorização na utilização da licença para a captura dos quelônios.*

*Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia (LabFisio/UFAM): Dra. Rosany Piccolotto, Dra. Thaís Billalba, M.Sc. Paulo Cruz, M.Sc. Alessandra Magalhães, Cláudio Sampáio, Gabriel Gonçalves, Carmel Pereira e Rebeca Brandão pelos conselhos, pela ajuda nas análises e, principalmente, pela agradável convivência.*

*Aos integrantes da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura e em especial aos amigos do Laboratório de Fisiologia Aplicado à Piscicultura (LAFAP): Marieta Queiroz, Alcione Alfon e Ana Maria Dias pelo auxílio nas análises de água e de sangue, além da ótima convivência e das palavras de incentivo.*

*Aos pescadores: Alfredo, Pinheiro, Adalto, Romualdo, Rosimar e Suzete pela ajuda durante as excursões. Estas pessoas simples, mas de coração enorme, contribuíram não somente com a captura dos animais, mas zelaram pela nossa segurança e bem-estar.*

*À todos da minha turma de mestrado e aos alunos de doutorado que estudaram comigo, pela troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração.*

*À minha prima Hananda, pela tradução do resumo para o inglês.*

*Aos meus amigos de longa data: Enide Luciana, Cláudio Neto, Brenda Leite, Dryelle Galvão e Nathália Flores por trazerem luz, nos momentos em que a escuridão foi mais forte.*

*Como disse Vinícius de Moraes, "a gente não faz amigos, reconhece-os", e durante esse mestrado tive a imensa honra de conhecer e trabalhar com várias pessoas que passaram por minha vida e deixaram contribuições inesquecíveis, portanto, meus sinceros agradecimentos à Adriano Teixeira de Oliveira, Jefferson Raphael Gonzaga de Lemos, Rejane Souza de Aquino Sales, Iracimar Batista do Carmo e Elenice Martins Brasil, e a tantos outros que moram dentro do meu coração.*

*À todos que participaram direta ou indiretamente para realização e concretização deste trabalho.*

*Impossível não me emocionar enquanto escrevo estes agradecimentos, pois todos vocês passaram, de alguma forma, pela minha existência e contribuíram para torná-la melhor, mais bela e mais iluminada. E graças a vocês meu sonho tornou-se realidade e chegou ao fim. Que será apenas o começo ...*

**A TODOS VOCÊS MEU MUITO OBRIGADO!!!**

*“Não queira ser bravo, quando  
basta ser inteligente”.*

Paulo Coelho

*“Sonhe com o que você quiser. Vá  
para onde você queira ir. Seja o que você  
quer ser, porque você possui apenas uma  
vida e nela só temos uma chance de fazer  
aquilo que queremos.*

*Tenha felicidade bastante para  
fazê-la doce. Dificuldades, para fazê-la forte.  
Tristeza, para fazê-la humana. E esperança  
suficiente para fazê-la feliz”.*

Clarice Lispector

## RESUMO

A irapuca, *Podocnemis erythrocephala*, é a espécie menos estudada entre os podocnemídeos amazônicos e vem sofrendo grande pressão antrópica, que tem contribuído para o declínio de seus estoques naturais. Este trabalho teve como objetivo determinar os parâmetros hematológicos, as características morfológicas e citoquímicas das células do sangue, bem como o efeito do mergulho forçado sobre o perfil sanguíneo de *P. erythrocephala*, gerando informações relevantes para a elaboração de planos de manejo e estratégias de conservação para a espécie. As análises revelaram que o sexo exerceu menor influência sobre o perfil hematológico dos animais, diferentemente do crescimento. Foi verificado que espécimes recém-eclodidos apresentaram valores do eritrograma inferiores em relação aos animais imaturos e maduros, ao contrário das concentrações de glicose e colesterol total, que foram superiores, confirmando a alta demanda metabólica que os recém-eclodidos possuem. De forma geral, as alterações encontradas nos parâmetros sanguíneos refletiram adaptações fisiológicas em função do comportamento e da história natural da espécie. Em função do efeito do sexo e da fase de crescimento sobre os parâmetros sanguíneos, foram estabelecidos intervalos de referência para recém-eclodidos, machos imaturos, machos maduros, fêmeas imaturas e fêmeas maduras. A partir da análise morfológica das células sanguíneas da irapuca, foram identificados eritrócitos, trombócitos, linfócitos, azurófilos, heterófilos, eosinófilos e basófilos com características morfológicas semelhantes às descritas para outros podocnemídeos. As análises dos constituintes citoquímicos indicaram que os heterófilos, eosinófilos e basófilos são as células mais ativas do sistema imunológico nesta espécie, sendo responsáveis principalmente pela atividade fagocítica, devido a presença de glicogênio, lipídeos e peroxidase. Não foram observadas alterações no eritrograma dos animais submetidos a 30 e 60 minutos de submersão forçada. O aumento nos níveis plasmáticos de lactato, cálcio e magnésio, em função do tempo de mergulho, refletiram ajustes fisiológicos para a manutenção do equilíbrio ácido-base, enquanto que as alterações nos níveis de triglicerídeos e colesterol total indicam que, em situações de anóxia, a irapuca ativa o catabolismo lipídico para a produção de ATP, de forma complementar à glicólise anaeróbica. A irapuca demonstrou ser uma espécie resistente à 60 minutos de mergulho forçado, entretanto períodos superiores podem causar acidose metabólica e exaustão dos substratos energéticos. As informações geradas no presente estudo servirão de base para a avaliação do estado de saúde desta espécie de quelônio amazônico.

**Palavras-chave:** citoquímica, hematologia, *Podocnemis erythrocephala*, submersão forçada



## ABSTRACT

Irapuca, *Podocnemis erythrocephala*, is the poorly studied turtle species among the Amazonian *Podocnemis* and suffers from large predatory pressure by the human population, causing a decline in their natural stocks. This study aimed to determine the hematological parameters, the morphological and cytochemical features of blood cells, as well as the effect of forced diving on the blood profile of *P. erythrocephala*, generating relevant information to the proposition of management plans and conservation strategies for this species. Analysis revealed that sex exercised little influence on the blood profile of the animals, unlike the growth. It was found that hatchlings showed lower eritrogram than immature and mature animals, unlike the concentrations of glucose and total cholesterol that were higher, confirming the high metabolic rate of hatchlings. Overall, the changes found in blood parameters reflected changes in physiological function of the behavior and natural history of the species. Due the effect of sex and development phase on the blood parameters, reference ranges were established for hatchlings, immature males, mature males, immature females and mature females. From the morphological analysis of blood cells from irapuca erythrocytes, thrombocytes, lymphocytes, azurophilic, heterophils, eosinophils and basophils were identified with morphological characteristics similar to those described for other Podocnemidid species. Cytochemical analysis indicated that heterophils, eosinophils and basophils are the most active cells of the immune system of this species, being primarily responsible for phagocytic activity due the presence of glycogen, lipid and peroxidase. No changes were observed on the eritrogram of animals subjected to 30 and 60 minutes of forced submersion. Increased levels of plasma lactate, calcium and magnesium, according to the dive time, reflected physiological adjustments to maintain the acid-base balance, whereas changes in the levels of total cholesterol and triglycerides indicated that during anoxia, the irapuca activated the ATP production from lipid catabolism, as a complementary way to anaerobic glycolysis. The irapuca proved to be a tolerant species to 60 minutes of forced diving, although higher periods might cause metabolic acidosis and depletion of energy substrates. These values constitute a basis for assessing the health status of wild irapucas.

**Keywords:** cytochemistry, forced submersion, hematology, *Podocnemis erythrocephala*

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$ : microlitros  
 $\mu\text{S/cm}$ : microSiemens por centímetro  
A/G: razão Albumina/Globulina  
ATP: adenosina trifosfato  
 $\text{Ca}^{2+}$ : cálcio  
 $\text{CaCO}_3$ : carbonato de cálcio  
CC: comprimento da carapaça  
CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média  
cm: centímetros  
 $\text{CO}_2$ : dióxido de carbono  
dL: decilitros  
DP: desvio padrão  
EROs: espécies reativas de oxigênio  
fL: fentolitros  
g: gramas  
 $\text{H}^+$ : íon hidrogênio  
Hb: hemoglobina  
HCM: hemoglobina corpuscular média  
 $\text{HCO}_3^-$ : íon bicarbonato  
Ht: hematócrito  
IC: intervalo de confiança  
L: litros  
mg: miligramas  
 $\text{Mg}^{2+}$ : magnésio  
MGGW: May Grunwald-Giemsa-Wright  
mmol/L: milimol por litro  
 $\text{NAD}^+$ : nicotinamida adenina dinucleotídeo  
PAS: ácido Periódico de Schiff  
pg: picogramas  
RBC: contagem de eritrócitos  
UI: unidade internacional  
VCM: volume corpuscular médio  
 $\mu\text{m}$ : micrômetros

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 - Perfil hematológico da irapuca *Podocnemis erythrocephala* Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae) do médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil**

- Tabela 1. Dados biométricos (média  $\pm$  DP) e número amostral (n) das classes de tamanho de *Podocnemis erythrocephala* coletada no Arquipélago de Mariuá, médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil ..... 21
- Tabela 2. Diferenças entre sexo, fase de crescimento (FC) e interação sexo e fase de crescimento dos parâmetros sanguíneos de *Podocnemis erythrocephala* coletada no Arquipélago de Mariuá, médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil ..... 22
- Tabela 3. Intervalos de referência estabelecidos para o eritrograma e a bioquímica plasmática de recém-eclodidos e de machos e fêmeas imaturos e maduros de *Podocnemis erythrocephala* coletados no Arquipélago de Mariuá, médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil ..... 27

### **CAPÍTULO 2 - Caracterização morfológica e citoquímica das células sanguíneas da irapuca *Podocnemis erythrocephala* Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae) do médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil**

- Tabela 1. Diâmetro maior, diâmetro menor e área (média  $\pm$  desvio padrão) das células sanguíneas de *Podocnemis erythrocephala* ..... 39
- Tabela 2. Intensidade das reações citoquímicas obtidas para as células sanguíneas de *Podocnemis erythrocephala*..... 39

### **CAPÍTULO 3 - Efeito do mergulho forçado sobre os parâmetros hematológicos da irapuca *Podocnemis erythrocephala* Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae)**

- Tabela 1. Dados biométricos dos exemplares de *Podocnemis erythrocephala* submetidos a diferentes tempos de submersão forçada..... 58
- Tabela 2. Parâmetros eritrocitários de *Podocnemis erythrocephala* submetida a diferentes tempos de submersão forçada ..... 60
- Tabela 3. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de *Podocnemis erythrocephala* submetida a diferentes tempos de submersão forçada..... 61

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 2 – Caracterização morfológica e citoquímica das células sanguíneas da irapuca *Podocnemis erythrocephala* Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae) do médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil**

Figura 1. Fotomicrografias das células sanguíneas de *Podocnemis erythrocephala* coradas com MGGW. Eritrócito (A, seta inferior), eritrócito com núcleo deslocado pela presença de hemoparasita (A, seta superior), trombócito (B), linfócito (C), azurófilo (D), heterófilo (E, seta inferior), eosinófilo (E, seta superior) e basófilo (F)..... 42

Figura 2. Fotomicrografias das reações citoquímicas das células sanguíneas de *Podocnemis erythrocephala*. Basófilo (A), eosinófilo (B, seta inferior) e heterófilo (B, seta superior) corados com azul de bromofenol; basófilo (C) corado com azul de toluidina; eosinófilo (D), azurófilo (E), basófilo (F) e heterófilo (G) corados com sudan black B; eosinófilo (H, seta superior), heterófilo (H, seta inferior), basófilo com marcação falso-positiva (I, seta superior) e trombócito (I, seta inferior) corados com ácido periódico de Schiff; heterófilo (J, seta esquerda), eosinófilo (J, seta direita) e basófilo (K) corados com orto-toluidina-peróxido de hidrogênio; reticulócito (L) corado com azul brilhante de cresil (seta) ..... 43

### **CAPÍTULO 3 - Efeito do mergulho forçado sobre os parâmetros hematológicos da irapuca *Podocnemis erythrocephala* Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae)**

Figura 1. Níveis de lactato no plasma de *Podocnemis erythrocephala* submetida a diferentes tempos de submersão forçada ..... 62

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	01
Referências .....	06
OBJETIVOS .....	12
Geral .....	12
Específicos.....	12
HIPÓTESES .....	13
CAPÍTULO 1 - Perfil hematológico da irapuca <i>Podocnemis erythrocephala</i> Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae) do médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil .....	14
Resumo .....	15
Introdução.....	16
Material e Métodos.....	17
Área de estudo e captura dos animais .....	17
Coleta sanguínea e classificação dos animais .....	18
Determinação dos parâmetros sanguíneos .....	18
Monitoramento da qualidade de água .....	19
Análise estatística .....	19
Resultados e Discussão .....	20
Agradecimentos .....	28
Referências .....	28
CAPÍTULO 2 - Caracterização morfológica e citoquímica das células sanguíneas da irapuca <i>Podocnemis erythrocephala</i> Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae) do médio rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil .....	33
Resumo .....	34
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	37
Obtenção e aclimação dos animais.....	37
Coleta sanguínea e análise morfológica das células.....	37

Determinação das reações citoquímicas das células sanguíneas.....	38
Resultados .....	38
Discussão.....	44
Agradecimentos.....	48
Referências .....	48
CAPÍTULO 3 - Efeito do mergulho forçado sobre os parâmetros hematológicos da irapuca <i>Podocnemis erythrocephala</i> Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae) .....	52
Resumo .....	53
Introdução.....	54
Material e Métodos.....	56
Desenho experimental .....	56
Determinação dos parâmetros sanguíneos .....	56
Monitoramento da qualidade de água .....	57
Análise estatística .....	57
Resultados e Discussão .....	58
Agradecimentos.....	65
Referências .....	65
CONCLUSÕES GERAIS .....	68

## INTRODUÇÃO GERAL

Os quelônios da família Podocnemididae compreendem três gêneros de água doce: *Erymnochelys*, *Peltocephalus* e *Podocnemis*. O gênero *Erymnochelys* está representado por apenas uma espécie restrita a Madagascar, *E. madagascariensis*. O gênero *Peltocephalus*, grupo-irmão de *Podocnemis*, também é monoespecífico, sendo representado por *P. dumerilianus*, que se distribui entre o leste da Colômbia, sudoeste da Venezuela e noroeste do Brasil (Pritchard e Trebbau, 1984). O gênero *Podocnemis*, distribuído pela região setentrional cisandina da América do Sul, é o mais representativo, com seis espécies viventes: *P. lewyana*, *P. vogli*, *P. erythrocephala*, *P. expansa*, *P. sextuberculata* e *P. unifilis* (Mittermeier e Wilson, 1974; Pritchard e Trebbau, 1984; Fantin, 2008).

De acordo com Santos (2008), a Amazônia brasileira é o centro da diversidade do gênero *Podocnemis*, sendo que quatro espécies ocorrem na região: *P. expansa* (tartaruga-da-Amazônia), *P. sextuberculata* (iaçá) e *P. unifilis* (tracajá), amplamente distribuídas pela bacia do Rio Amazonas, e *P. erythrocephala* (irapuca), que ocorre na bacia do Rio Negro e nos Rios Tapajós e Trombetas (Mittermeier e Wilson, 1974; Hoogmed e Ávila-Pires, 1990). As duas outras espécies, *P. lewiana* e *P. vogli*, ocorrem respectivamente no Rio Magdalena e bacia do Rio Sinu (Colômbia) e na bacia do Rio Orinoco (Colômbia e Venezuela) (Vanzolini, 2001). Outras espécies de quelônios também ocorrem na região Amazônica, como *Peltocephalus dumerilianus* (cabeçudo), *Geochelone carbonaria* e *G. denticulata* (jabuti), *Chelus fimbriatus* (matamatá), *Kinosternon scorpioides* (muçua), *Rhinoclemmys punctularia* (aperema), *Platemys platycephala* (jabuti-machado) e *Phrynops nasutus* (cágado) (Molina e Rocha, 1996).

Os podocnemidídeos constituem um importante recurso para as populações ribeirinhas da região amazônica, pois os indivíduos adultos e os ovos dessas espécies são utilizados como fonte alimentar, sendo capturados indiscriminadamente durante todo o ano. A pressão da coleta dos ovos e da caça dos espécimes adultos tem ocasionado um declínio nos estoques naturais desses animais (Vogt, 2001; Novelle, 2006), principalmente das espécies de maior porte, como a tartaruga da Amazônia e o tracajá, direcionando a caça para as espécies de menor tamanho como a iaçá no Rio Amazonas e a irapuca no Rio Negro (Rebêlo e Pezutti, 2000; Lima, 2007).

Dentre todos os podocnemidídeos amazônicos, a irapuca é a espécie menos conhecida do ponto de vista biológico. Segundo Viana et al. (2008), esta é a menor espécie do gênero sendo facilmente distinguida de suas congêneres devido ao seu pequeno porte (comprimento

inferior a 32 cm), coloração que vai de marrom-escuro a preto, carapaça expandida na porção posterior, presença de um par de barbelos embaixo do queixo e uma faixa vermelha brilhante que se estende da parte de trás da cabeça até os tímpanos. Nos machos adultos, esse padrão de coloração persiste, enquanto que nas fêmeas essa cor alterna para marrom-escuro (Pritchard e Trebbau, 1984).

Esta espécie apresenta hábito alimentar essencialmente herbívoro, sendo que mais de 90% do volume de sua dieta é composta por frutos e sementes (Santos-Jr, 2009). De acordo com Mittermeier e Wilson (1974), esses animais podem se alimentar eventualmente de matéria animal, como peixes e moluscos. O período reprodutivo da irapuca ocorre entre os meses de outubro e janeiro com dois picos máximos de desova, em outubro e dezembro (Rueda-Almonacid et al., 2007). O número de ovos varia de 5 a 14 e a postura ocorre geralmente durante a noite em áreas de campina. Os ovos são alongados, podendo apresentar a casca dura ou levemente flexível (Mittermeier e Wilson, 1974; Novelle, 2006).

Apesar da baixa quantidade de posturas, em comparação com *P. expansa*, que possui postura média de 107 ovos/fêmea (Lima, 2007), os ovos de irapuca são amplamente cobiçados como fonte protéica. Batistella (2003) observou a prática da coleta de ovos de irapuca na região de Santa Isabel do Rio Negro (AM) por famílias, durante o período de desova e verificou que a quantidade de ovos coletados é equivalente ao número de posturas.

Essa grande pressão predatória aliada à sua distribuição restrita, bem como à escassez de projetos conservacionistas, contribuíram para que *P. erythrocephala* fosse classificada pela IUCN dentro da categoria vulnerável (IUCN, 2010) e que constasse no apêndice II do CITES (CITES, 2010).

Embora a importância social, econômica e biológica dessa espécie seja notória, a irapuca carece de estudos. Os poucos trabalhos existentes na literatura abordam aspectos da biologia reprodutiva (Novelle, 2006; Lima, 2007; Ferrara et al., 2009), genética molecular (Santos, 2008; Fantin, 2008; Fantin et al., 2010), ecotoxicologia (Schneider, 2007), alimentação e anatomia digestória (Santos-Júnior., 2009; Magalhães, 2010) e ecologia geral (Batistella, 2003; Batistella e Vogt, 2008; Bernhard, 2010). Porém, não existem estudos sobre seus aspectos fisiológicos e, especialmente, hematológicos.

O uso de informações a respeito dos aspectos biológicos é crucial para a manutenção das populações existentes e para o restabelecimento de populações em declínio (Pough et al., 2003). Nesse sentido, a utilização de métodos e técnicas fisiológicas vem se estabelecendo como uma prática cada vez mais usual em estudos ecológicos de animais selvagens. De acordo com Stevenson et al. (2005), a fisiologia é uma importante ferramenta, pois possibilita



a compreensão detalhada dos mecanismos que podem causar os problemas conservacionistas, tendo como base o eritrograma e a bioquímica plasmática.

A hematologia também é importante para subsidiar o diagnóstico do estado de saúde dos animais selvagens ou de cativeiro, podendo ser utilizada para avaliar as respostas adaptativas dos animais frente às alterações ambientais, sejam elas de origem natural ou antrópica (Tavares-Dias e Moraes, 2004; Marcon et al., 2008). Na literatura, o quadro sanguíneo de diferentes espécies de quelônios tem sido utilizado com diversas finalidades, seja para o estabelecimento de valores hematológicos de referência (Gelli et al., 2009; Oliveira-Júnior et al., 2009; Santos et al., 2009; Yilmaz e Tosunoglu, 2010), determinação do estado de saúde dos animais em ambiente natural (Stamper et al., 2005; Chaffin et al., 2008; Ferronato et al., 2009; Flint et al., 2010) ou em cativeiro (Perpiñán et al., 2008; Rangel-Mendoza et al., 2009; Tavares-Dias et al., 2009), comparações entre diferentes estágios de vida (Bolten e Bjorndal, 1992; Deem et al., 2009) ou avaliação de estresse fisiológico (Crocker et al., 1999; Gregory e Schmid, 2001).

Em relação aos podocnemídeos, as informações a respeito da hematologia são escassas e com finalidades diferenciadas. Tavares-Dias et al. (2009) utilizaram os parâmetros hematológicos para comparar o estado de saúde de espécimes bem e mal nutridos de *P. expansa* provenientes de cativeiro e encontraram reduções significativas no eritrograma, leucograma e nos metabólitos plasmáticos dos animais mal nutridos, indicando anemia normocítica-hipocrômica severa e imunodeficiência nesses animais. Oliveira-Junior et al. (2009) estabeleceram valores hematológicos de referência para *P. expansa* provenientes de cativeiro e verificaram que o perfil sanguíneo dessa espécie não sofreu influência do sexo. Embora essas informações sejam importantes, ainda são fragmentadas e incompletas, sendo necessária uma intensificação nos estudos hematológicos com as espécies do gênero *Podocnemis*, incluindo *P. erythrocephala*.

O acompanhamento do sistema imune é igualmente importante durante a avaliação do estado de saúde dos animais, visto que a identificação e quantificação das células leucocitárias fornecem indícios do estado imunológico do organismo (Tavares-Dias e Moraes, 2007). Segundo Pistol et al. (2007), a identificação dos leucócitos dos mamíferos pode ser facilmente obtida com base nas características morfológicas das células, entretanto, em répteis, essa identificação é inconsistente e problemática (Work et al., 1998). Exemplos de informações contraditórias são relatados na literatura em relação aos leucócitos granulócitos, afirmando que os quelônios apresentam duas formas de eosinófilos, uma madura, o eosinófilo tipo 1, e outra imatura, o eosinófilo tipo 2 (Kelényi e Németh, 1969; Saint Girons, 1970). Entretanto,

Zapata et al. (1981) classificaram ambos os tipos celulares como heterófilos. Trabalhos mais recentes têm demonstrado que estas células pertencem à linhagens celulares distintas, ou seja, eosinófilos e heterófilos (Azevedo e Lunardi, 2003; Pistol et al., 2007). Estas células também podem ser denominadas de acidófilos quando não é possível distinguí-las durante a contagem diferencial de leucócitos (Canfield, 1998).

O principal motivo para essa inconsistência na classificação leucocitária dos répteis é a falta de conhecimento sobre as linhagens celulares desses animais. Segundo Work et al. (1998), Tavares-Dias (2006 a,b) e Hulme-Moir e Clark (2010), a utilização de colorações citoquímicas tem possibilitado a demonstração dos constituintes químico-enzimáticos e, conseqüentemente, auxiliado na identificação e caracterização morfológica e funcional das células sanguíneas. Na literatura, as técnicas citoquímicas vêm sendo amplamente utilizadas para a identificação celular de mamíferos (Al Izzi et al. 2007; Hulme-Moir e Clark, 2010), aves (Andreasen e Latimer, 1990; Salakij et al., 2003), peixes (Ueda et al., 2001; Tavares-Dias e Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006a,b; Tavares-Dias e Moraes, 2007) e répteis (Salakij et al., 2002; Azevedo e Lunardi, 2003; Alberio et al., 2005; Carvalho et al., 2006; Chung et al., 2009).

Azevedo e Lunardi (2003) utilizaram as reações citoquímicas para caracterizar dois tipos de eosinófilos no sangue da tartaruga *Chrysemys dorsibignih* e observaram que essas células correspondem a dois tipos celulares com linhagens distintas, eosinófilos e heterófilos. Oliveira et al. (2011), estudando os aspectos morfológicos e citoquímicos das células sanguíneas de recém-eclodidos de *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata*, caracterizaram sete tipos celulares em todas as três espécies: eritrócitos, trombócitos, linfócitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e azurófilos. Além disso, os constituintes químico-enzimáticos de heterófilos e eosinófilos indicam que estas duas células são as mais importantes para o sistema imunológico desses animais nesta fase de vida. Os mesmos tipos celulares identificados por Oliveira et al. (2011) foram encontrados em exemplares adultos de *P. expansa* (Oliveira-Junior et al., 2009). Esses resultados sugerem que os animais do gênero *Podocnemis* podem apresentar as mesmas células sanguíneas, no entanto são necessários estudos com as demais espécies desse gênero, para verificar se os tipos celulares apresentam um padrão conservativo.

Os parâmetros hematológicos também podem ser utilizados como indicadores de estresse fisiológico (Crocker et al., 1999; Tavares-Dias e Moraes, 2004) que pode ser definido como um conjunto de respostas do organismo do animal, diante de estímulos desagradáveis, agressivos e ameaçadores. No ambiente natural, o principal fator estressante a

que os quelônios, principalmente os podocnemídeos amazônicos, são submetidos é o mergulho forçado. A submersão forçada desses organismos ocorre principalmente em função do uso de malhadeiras que, na região Amazônica, são muito utilizadas pelas populações ribeirinhas para captura de diversos organismos aquáticos, principalmente peixes (Pezzuti et al., 2008). O problema surge quando os quelônios ficam presos nas redes, podendo permanecer por longos períodos sem contato com o ar atmosférico.

Os quelônios são animais reconhecidos pela habilidade de realizar longos mergulhos, entretanto, as respostas fisiológicas adaptativas para sobreviver às situações de hipóxia, e até mesmo anóxia, podem variar entre as espécies, o tamanho e a temperatura da água. De acordo com Sasso e Epperly (2006), a tartaruga marinha *Caretta caretta* apresentou altas taxas de mortalidade quando submetida à apnéia por um período de 50 minutos, durante o verão, e por 10 minutos, durante o inverno. As espécies *Rheodytes leukops* e *Elseya albagula* utilizam a respiração bimodal para permanecer em aerobiose durante a submersão, aumentando significativamente a duração do mergulho (Gordos et al., 2004; Mathie e Franklin, 2006), enquanto que *Chrysemys picta* e *Trachemys scripta* hibernam em águas temperadas no período do inverno, permanecendo submersas em condições de anóxia durante meses (Crocker et al., 1999). Estas informações demonstram que o tempo de tolerância à apnéia varia entre as espécies. Nesse sentido, é fundamental avaliar as alterações fisiológicas provenientes do estresse causado pelo mergulho forçado, pois dependendo da duração da apnéia, os animais podem entrar em estado de coma e morrerem por afogamento (Sasso e Epperly, 2006).

Os resultados obtidos no presente trabalho têm como objetivo gerar as primeiras informações sobre a hematologia e o estado de saúde de *Podocnemis erythrocephala* em ambiente natural, que poderão contribuir de forma relevante para a elaboração de planos de manejo e estratégias de conservação em suas áreas de ocorrência.

No primeiro capítulo desta dissertação, serão abordados os efeitos de fatores como o sexo e a fase de crescimento sobre os parâmetros sanguíneos de *Podocnemis erythrocephala* capturada em ambiente natural, culminando no estabelecimento de intervalos hematológicos de referência para a espécie. No segundo capítulo, os estudos serão direcionados para a identificação e caracterização morfológica e citoquímica das células sanguíneas da irapuca, analisando os constituintes químico-enzimáticos e fornecendo informações sobre as principais funções das células, enquanto que no último capítulo será analisado o efeito da submersão forçada sobre os parâmetros hematológicos da irapuca, verificando a capacidade adaptativa desta espécie às situações de anóxia.

## REFERÊNCIAS

- Alberio, S.O.; Diniz, J.A.; Silva, E.O.; Souza, W.; DaMatta, R.A. 2005. Cytochemical and functional characterization of blood and inflammatory cells from the lizard *Ameiva ameiva*. *Tissue and Cell*, 37: 193–202.
- Al-Izzi, S.A.L.; Gawas, M.M.; Belhaj, K.M. 2007. Cytochemistry of sheep bone marrow cells. *Veterinarski Arhiv*, 77: 387-396.
- Andreason, C.B.; Latimer, K.S. 1990. Cytochemical staining characteristics of chicken heterophils and eosinophils. *Veterinary Clinical Pathology*, 19: 51-54.
- Azevedo, A.; Lunardi, L.O. 2003. Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of the turtle (*Chrysemys dorbignii*). *Acta Histochemica*, 105: 99-105.
- Batistella, A.M. 2003. *Ecologia de nidificação de Podocnemis erythrocephala (Testudines, Podocnemididae) em campinas no Médio Rio Negro-AM*. Dissertação de Mestrado (Ecologia). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 48p.
- Batistella, A.M.; Vogt, R.C. 2008. Nesting ecology of *Podocnemis erythrocephala* (Testudines, Podocnemididae) of the Rio Negro, Amazonas, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*, 7: 12-20.
- Bernhard, R. 2010. *Dinâmica populacional de Podocnemis erythrocephala, no rio Ayuanã, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado (Ecologia), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 106p.
- Bolten, A.B.; Bjorndal, K.A. 1992. Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationships. *Journal of Wildlife Diseases*, 28: 407-413.
- Canfield, P.J. 1998. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Australian Veterinary Journal*, 76: 793-800.
- Carvalho, R.L.; Antoniazzi, M.M.; Jared, C.; Silva, A.M.J.; Santos, A.A.; Egami, M.I. 2006. Morphological, cytochemical, and ultrastructural observations on the blood cells of the reptile *Tupinambis merianae* (Squamata). *Comparative Clinical Pathology*, 15: 169–174.
- Chaffin, K.; Norton, T.M.; Gilardi, K.; Poppenga, R.; Jensen, J.B.; Moler, P.; Cray, C.; Dierenfeld, E.S.; Chen, T.; Oliva, M.; Oraggi, F.C.; Gibbs, S.; Mazzaro, L.; Mazet, J. 2008. Health assessment of free-ranging alligator snapping turtles (*Macrochelys temminckii*) in Georgia and Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 44: 670-686.
- Chung, C.; Cheng, C.; Chin, S.; Lee, A.; Chi, C. 2009. Morphologic and cytochemical characteristics of asian yellow pond turtle (*Ocadia sinensis*) blood cells and their hematologic and plasma biochemical reference values. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40: 76–85.
- CITES, 2003. Appendices I, II and III. Disponível em: <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>. (válido a partir de 14 de Outubro de 2010).

- Crocker, C.E.; Ultsch, G.R.; Jacson, D.C. 1999. The physiology of diving in a north-temperate and three tropical turtle species. *Journal of Comparative Physiology B*, 169: 249-255.
- Deem, S.L.; Norton, T.M.; Mitchell, M.; Segars, A.; Alleman, A.R.; Cray, C.; Poppenga, R.H.; Dodd, M.; Karesh, W.B. 2009. Comparison of blood values in foraging, nesting, and stranded loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along the coast of Georgia, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 45: 41-56.
- Fantin, C. 2008. *Desenvolvimento de marcadores moleculares de microssatélites para o estudo do sistema reprodutivo em três espécies de tartarugas do gênero Podocnemis*. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 99p.
- Fantin, C.; Farias, I.P.; Monjeló, L.A.S.; Hrbek, T. 2010. Polyandry in the red-headed river turtle *Podocnemis erythrocephala* (Testudines, Podocnemididae) in the Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Research*, 9: 435-440.
- Ferrara, C.R.; Schneider, L.; Vogt, R.C.; Burger, J. 2009. The role of receptivity in the courtship behavior of *Podocnemis erythrocephala* in captivity. *Acta Ethologica*, 12:121–125.
- Ferronato, B. O.; Genoy-Puerto, A.; Piña, C.I.; Souza, F.L.; Verdade, L.M.; Matushima, L.M. 2009. Notes on the hematology of free-living *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in polluted rivers of Southeastern Brazil. *Zoologica*, 26: 795-798.
- Flint, M.; Morton, J.M.; Limpus, C.J.; Patterson-Kane, J.C.; Murray, P.J.; Mills, P.C. 2010. Development and application of biochemical and haematological reference intervals to identify unhealthy green sea turtles (*Chelonia mydas*). *The Veterinary Journal*, 185: 299–304.
- Gelli, D.; Ferrari, V.; Zanella, A.; Arena, P.; Pozzi, L.; Nannarelli, S.; Vaccaro, C.; Bernardini, D.; Romagnoli, S. 2009. Establishing physiological blood parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *European Journal of Wildlife Research*, 55: 59-63.
- Gordos, M.A.; Franklin, C.E.; Limpus, C.J.; Wilson, G. 2004. Blood-respiratory and acid-base changes during extended diving in the bimodally respiring freshwater turtle *Rheodytes leukops*. *Journal of Comparative Physiology B*, 174: 347-354.
- Gregory, L.F.; Schmid, J.R. 2001. Stress responses and sexing of wild Kemp's Ridley Sea Turtles (*Lepidochelys kempii*) in the Northeastern Gulf of Mexico. *General and Comparative Endocrinology*, 124: 66-74.
- Hoogmoed, M.S.; Ávila-Pires, T.C. 1990. New distribution data for *Podocnemis erythrocephala* (Spix) with remarks on some other turtle taxa (Reptilia: Chelonia: Pelomedusidae). *Zoologische Mededelingen*, 64: 21-24.
- Hulme-Moir, K.L.; Clark, P. 2010. Cytochemistry of leukocytes from the family Macropodidae. *Comparative Clinical Pathology*, in press.
- IUCN 2010. *IUCN Red List of Threatened Species*. Versão 2010.4. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 14 de Novembro de 2010.

Kelényi, G.; Németh, A. 1969. Comparative histochemistry and electron microscopy of the eosinophil leukocytes of vertebrates. A study of avian, reptile, amphibian and fish leukocytes. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 20: 405-422.

Lima, J.P. 2007. *Aspectos da ecologia reprodutiva de Podocnemis expansa, Podocnemis sextuberculata e Podocnemis unifilis (Testudines, Podocnemididae) na Reserva Biológica do Abufari, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado (Biologia de Água Doce e Pesca Interior). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 74p.

Magalhães, M.S. 2010. Morfologia do tubo digestório aplicada à compreensão da dieta em quelônios da família Podocnemididae. Dissertação de Mestrado (Biologia de Água Doce e Pesca Interior), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 78p.

Marcon, J.L.; Silva, M.G.; Batista, G.S.; Farias, R.S.; Monteiro, L.B.B. 2008. Fisiologia e Bioquímica de quelônios e suas implicações para o manejo e a criação em cativeiro. In: Andrade, P.C.M. (Ed). *Criação e manejo de quelônios no Amazonas*. Manaus: Ibama, ProVárzea, p.193-221.

Mathie, N.J.; Franklin, C.E. 2006. The influence of body size on the diving behaviour and physiology of the bimodally respiring turtle, *Elseya albagula*. *Journal of Comparative Physiology B*, 176: 739-747.

Mittermeier, R.A.; Wilson, R.A. 1974. Redescription of *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824), an Amazonian Pelomedusid turtle. *Papeis Avulsos de Zoologia*: 28, 147-162.

Molina, F.B.; Rocha, M.B. 1996. *Identificação, caracterização e distribuição dos quelônios da Amazônia brasileira*. Centro Nacional dos Quelônios da Amazônia: Belém. 24p.

Novelle, S.M.H. 2006. *Caracterização do micro-habitat dos ninhos e predação dos ovos de Podocnemis erythrocephala em áreas de desova no Rio Ayuanã, AM*. Dissertação de Mestrado (Ecologia). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 80p.

Oliveira, A.T.; Cruz, W.R.; Lima, J.P.; Araújo, S.B.; Araújo, M.L.G.; Marcon, J.L.; Tavares-Dias, M.T. 2011. Morphological and cytochemical characterization of thrombocytes and leukocytes in hatchlings of three species of Amazonian freshwater turtles. *Veterinarski arhiv*, in press.

Oliveira-Junior, A.A.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L. 2009. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Research in Veterinary Science*, 86: 146-151.

Perpinan, D.; Hernandez-Divers, S.M.; Latimer, K.S.; Akre, T.; Hagen, C.; Buhlmann, C.A.; Hernandez-Divers, S.J. 2008. Hematology of the Pascagoula map turtle (*Graptemys gibbonsi*) and the southeast Asian box turtle (*Cuora amboinensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 39: 460-463.

Pezzuti, J.C.B.; Silva, D.F.; Lima, J.P.; Kemenes, A.; Garcia, M.; Paraluppi, N.D.; Monjeló, L.A.S. 2008. Ecologia de quelônios pelomedusídeos na Reserva Biológica do Abufari. In: Andrade, P.C.M. (Ed). *Criação e manejo de quelônios no Amazonas*. Manaus: Ibama, ProVárzea, p. 127-173.

- Pistol, D.L.; Issa, J.P.M.; Caetano, F.H.; Lunardi, L.O. 2007. Morphological characterization of the leukocytes in circulating blood of the turtle (*Phrynops hilarii*). *International Journal of Morphology*, 25: 677-682.
- Pough, F.H.; Janis, C.M.E.; Heiser, J.B.A. 2003. *A Vida dos Vertebrados*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu. 699p.
- Pritchard, P.C.H.; Trebbau, P. 1984. *Turtles of Venezuela*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. p. 33-43.
- Rangel-Mendoza, J.; Weber, M.; Zenteno-Ruiz, C.E.; López-Luna, M.A. 2009. Hematology and serum biochemistry comparison in wild and captive Central American river turtles (*Dermatemys mawii*) in Tabasco, Mexico. *Research in Veterinary Science*, 87: 313-318.
- Rebêlo, G.; Pezzuti, J. 2000. Percepções sobre o consumo de quelônios na Amazônia. Sustentabilidade e alternativas ao manejo atual. *Ambiente & Sociedade*, 6/7: 85-105.
- Rueda-Almonacid, J.V.; Carr, J.L.; Mittermeier, R.A.; Rodríguez-Mahecha, J.V.; Mast, R.B.; Vogt, R.C.; Rhodin, A.G.J.; Ossa-Velásquez, J.; Rueda, J.N.; Mittermeier, C.G. 2007. *Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico*. Serie de guías tropicales de campo N° 6. Conservación Internacional. Editorial Panamericana, Formas e Impresos. Bogotá, Colombia. 538p.
- Saint Girons, H. 1970. The pituitary gland. In: Gons, C.; Parsons, T.S. (Eds). *Biology of the Reptilia*. New York and London, Academic Press, p. 135-99.
- Salakij, C.; Salakij, J.; Narkkong, N.A. 2003. Hematology and ultrastructure of blood cells in banded krait (*Bungarus fasciatus*). *Journal of Electron Microscopy Society of Thailand*, 17: 55-60.
- Salakij, C.; Salakij, J.; Apibal, S.; Narkkong, N.A.; Chanhom, L.; Rochanapat, N. 2002. Hematology, morphology, cytochemical staining and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*). *Veterinary Clinical Pathology*, 31: 116-126.
- Santos, M.R.D.; Ferreira, L.S.; Batistote, C.; Grossman, A.; Bellini, C. 2009. Valores hematológicos de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) juvenis selvagens do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 46: 491-499.
- Santos, R.C. 2008. *Estrutura genética das populações de irapuca (Podocnemis erythrocephala, Podocnemididae) da Amazônia Brasileira: implicações para a conservação*. Dissertação de Mestrado (Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 64p.
- Santos-Júnior, L.B. 2009. *Dieta de Podocnemis erythrocephala (Testudines: Podocnemididae) no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado (Biologia de Água Doce e Pesca Interior). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 36p.
- Sasso, C.R.; Epperly, S.P. 2006. Seasonal sea turtle mortality risk from forced submergence in bottom trawls. *Fish Research*, 81: 86-88.

- Schneider, L. 2007. *Relação entre a bioacumulação de mercúrio em Podocnemis erythrocephala (Podocnemididae, Testudines) e fatores ambientais da bacia do Rio Negro*. Dissertação de Mestrado (Biologia de Água Doce e Pesca Interior). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 48p.
- Stamper, M. A.; Harms, C.; Epperly, S.P.; Braun-McNeill, J.; Avens, L.; Stoskopf, M.K. 2005. 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 Zoo and Wildlife Medicine*, 36: 635-641.
- Stevenson, R.D.; Tuberty, S.R.; Defur, P.L.; Wingfield, J.C. 2005. Ecophysiology and conservation: The contribution of endocrinology and immunology. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 1-3.
- Tavares-Dias, M. 2006a. Cytochemical method for staining fish basophils. *Journal of Fish Biology*, 69: 312-317.
- Tavares-Dias, M. 2006b. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 68, 1822-1833.
- Tavares-Dias, M.; Barcellos, J.F.M. 2005. Peripheral blood cells of the armored Catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: A morphological and cytochemical study. *Brazilian journal of Morphological Sciences*, 26: 157-162.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Villimpres: Ribeirão Preto, SP. 144p.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology* 36, 49-54.
- Tavares-Dias, M.; Oliveira-Junior, A.A.; Silva, M.G.; Marcon, J.L.; Barcellos, J.F.M. 2009. Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the Amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Veterinarski Arhiv*, 79: 601-610.
- Ueda, I.K.; Egami, M.I.; Sasso, W.S.; Matushima, E.R. 2001. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei). Part II. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38: 273-277.
- Vanzolini, P.E. 2001. On the eggs of brasilian *Podocnemis* (Testudines, Podocnemididae). *Biologia Geral Experimental*, 2: 3-17.
- Viana, M.N.S.; Farias, I.P.; Santos, R.C.; Sampaio, M.I.; Monjeló, L.A.S. 2008. Genética Molecular das Populações das Espécies de Quelônios do Gênero *Podocnemis* da Amazônia: Resultados Preliminares. In: Andrade, P.C.M. (Ed). *Criação e manejo de quelônios no Amazonas*. Manaus: Ibama, ProVárzea, p.174-192.
- Vogt, R.C. 2001. Turtles of the Rio Negro. In: Chao, N.L.P.; Prang, G.; Sonneschien, L.; Tlustý, M. (Eds.). *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio*



*Negro Basin, Amazonia, Brazil - Projeto Piaba*. Editora da Universidade Federal do Amazonas: Manaus. p.245-264.

Work, T.M.; Raskin, R.E.; Balazs, G.H.; Whittaker, S.D. 1998. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. *American Journal of Veterinary Research*, 59: 1252–1257.

Yilmaz, N.; Tosunoglu, M. 2010. Hematology and some plasma biochemistry values of free-living freshwater turtles. *North-Western Journal of Zoology*, 6: 109-117.

Zapata, A.; Leceta, J.; Villena, A. 1981. Reptilian bone marrow. An ultrastructural study in the spanish lizard, *Lacerta hispanica*. *Journal of Morphology*, 168: 137–149.

## **OBJETIVOS**

### **GERAL**

Estabelecer os parâmetros hematológicos, as características morfológicas e citoquímicas das células do sangue, bem como testar o efeito do mergulho forçado sobre o perfil sanguíneo de *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824) (Testudines, Podocnemididae) proveniente do médio Rio Negro, Amazonas.

### **ESPECÍFICOS**

1. Quantificar e comparar o eritrograma entre machos e fêmeas e entre exemplares recém-eclodidos, imaturos e maduros de irapuca capturados em ambiente natural;
2. Quantificar e comparar os parâmetros bioquímicos plasmáticos entre machos e fêmeas e entre exemplares recém-eclodidos, imaturos e maduros de irapuca capturados em ambiente natural;
3. Identificar e descrever a morfologia dos eritrócitos, trombócitos e leucócitos do sangue da irapuca;
4. Estabelecer o perfil citoquímico dos eritrócitos, trombócitos e leucócitos do sangue da irapuca;
5. Testar o efeito do mergulho forçado sobre o perfil hematológico da irapuca.

## **HIPÓTESES**

**H0<sub>1</sub>:** O eritrograma e a bioquímica plasmática não serão diferentes entre machos e fêmeas e entre espécimes recém-eclodidos, imaturos e maduros de irapuca de ambiente natural;

**H1<sub>1</sub>:** O eritrograma e a bioquímica plasmática serão diferentes entre machos e fêmeas e entre espécimes recém-eclodidos, imaturos e maduros de irapuca de ambiente natural;

**H0<sub>2</sub>:** Os eritrócitos, trombócitos e leucócitos granulócitos e agranulócitos não reagirão positivamente às colorações citoquímicas;

**H1<sub>2</sub>:** Os eritrócitos, trombócitos e leucócitos granulócitos e agranulócitos reagirão positivamente às colorações citoquímicas.

**H0<sub>3</sub>:** O mergulho forçado de 30 e 60 minutos não ocasionará alterações no eritrograma e na bioquímica plasmática da irapuca;

**H1<sub>3</sub>:** O mergulho forçado de 30 e 60 minutos ocasionará alterações no eritrograma e na bioquímica plasmática da irapuca.

## **CAPÍTULO 1**

### **PERFIL HEMATOLÓGICO DA IRAPUCA *Podocnemis erythrocephala* SPIX, 1824 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) DO MÉDIO RIO NEGRO, ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL**

**Perfil hematológico da irapuca *Podocnemis erythrocephala* Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae) do médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil**

Marcio Quara de Carvalho Santos<sup>1</sup>, Adriano Teixeira de Oliveira<sup>1</sup>, Jefferson Raphael Gonzaga Lemos<sup>1</sup>, Elizabeth Gusmão Affonso<sup>2</sup>, Jaydione Luiz Marcon<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM); <sup>2</sup>Coordenação de Pesquisas em Aquicultura, Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA); <sup>3</sup>Laboratório Fisiologia, Departamento de Ciências Biológicas, UFAM.

**RESUMO**

A determinação dos parâmetros sanguíneos e subsequente estabelecimento do intervalo de referência podem facilitar a avaliação do estado de saúde dos animais e contribuir para o manejo e restabelecimento de populações naturais. O objetivo deste trabalho foi determinar os parâmetros hematológicos de espécimes selvagens de *P. erythrocephala*, estabelecendo valores de referência (95% do intervalo de referência). Foram capturados 128 irapucas de ambos os sexos e em diferentes fases de crescimento (recém-eclodidos, imaturos e maduros). Dos parâmetros analisados, somente a hemoglobina (Hb) e o colesterol total variaram entre os sexos, com machos apresentando maior concentração de Hb e fêmeas com maiores níveis de colesterol total. A comparação entre as fases de crescimento revelou que o tamanho exerce grande influência no perfil hematológico. Animais recém-eclodidos apresentaram valores inferiores de hematócrito, Hb, contagem de eritrócitos, hemoglobina corpuscular média, proteínas totais, globulina, triglicerídeos e magnésio. Entretanto, a relação albumina/globulina (A/G), glicose, colesterol total e cloreto foram mais elevados nestes animais. Em função do efeito do sexo e da fase de crescimento nos parâmetros sanguíneos, foram estabelecidos intervalos de referência para cinco categorias: recém-eclodidos, machos imaturos, machos maduros, fêmeas imaturas e fêmeas maduras. Os resultados aqui obtidos são pioneiros para essa espécie amazônica e servirão de base para a avaliação do estado de saúde de irapucas selvagens, podendo ser utilizados para a identificação de distúrbios hematológicos e acompanhamento das adaptações fisiológicas dos animais frente às alterações ambientais.

**Palavras-chave:** bacia do Rio Negro, bioquímica plasmática, eritrograma, intervalo de referência, *Podocnemis erythrocephala*

## INTRODUÇÃO

A hematologia é considerada uma ferramenta importante na avaliação clínica de animais e humanos. Em répteis, a caracterização do estado de saúde é muitas vezes baseada no exame físico e na avaliação dos constituintes sanguíneos, utilizando os valores referências do hemograma e da bioquímica plasmática. No entanto, existem várias espécies de répteis em que os parâmetros de referência são desconhecidos ou imprecisos (Hidalgo-Vila et al., 2007).

Diversos fatores endógenos ou exógenos podem interferir nos parâmetros hematológicos tornando difícil o estabelecimento do intervalo sanguíneo de referência para uma determinada espécie. Entre os fatores endógenos, os mais importantes são a variação genética, sexo, idade, fase de vida e estado fisiológico, enquanto que, entre os exógenos, destacam-se a temperatura, o habitat e o hábito alimentar (Bolten e Bjorndal, 1992; Christopher et al., 1999; Oliveira-Júnior et al., 2009). Nesse sentido, para que os valores de referência possam ser utilizados como prognósticos do estado de saúde dos animais, os mesmos devem ser obtidos para diferentes gerações dentro de uma população, visando minimizar possíveis interferências sobre esses valores.

Nos quelônios, além do estabelecimento de valores de referência (Christopher et al., 1999; Hidalgo-Vila et al., 2007; Chung et al., 2009; Oliveira-Júnior et al., 2009), a hematologia também tem sido utilizada para avaliar as respostas adaptativas dos animais em seus ambientes naturais (Chaffin et al., 2008; Ferronato et al., 2009; Flint et al., 2010) ou em cativeiro (Tavares-Dias et al., 2009), bem como para comparar diferentes estágios de vida (Bolten e Bjorndal, 1992; Kakizoe et al., 2007; Labrada-Martagon et al., 2010) ou avaliar o estresse (Crocker et al., 1999).

Embora a hematologia seja uma ferramenta frequente em estudos com quelônios marinhos e de água doce, as informações sobre as características sanguíneas das espécies do gênero *Podocnemis* são escassas e com finalidades diferenciadas. Marcon et al. (2008) e Tavares-Dias et al. (2009) utilizaram os parâmetros hematológicos para diagnosticar o estado de saúde e o caráter nutricional de *Podocnemis expansa* submetida a diferentes métodos de criação em cativeiro, enquanto que Oliveira-Júnior et al. (2009) estabeleceram valores hematológicos de referência para espécimes de *P. expansa* provenientes de cativeiro. Por outro lado, Tavares-Dias et al. (2011) determinaram as propriedades do sangue de *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* de vida livre, em diferentes fases do crescimento.

Dentre os podocnemidídeos amazônicos, a irapuca é a menos conhecida do ponto de vista biológico. Segundo Viana et al. (2008), esta é a menor espécie do gênero sendo

facilmente distinguida de suas congêneres devido o seu pequeno porte, coloração que vai de marrom-escuro a preto, carapaça expandida na porção posterior, presença de um par de barbelos embaixo do queixo e uma faixa vermelha brilhante que se estende da parte de trás da cabeça até os tímpanos (Pritchard e Trebbau, 1984). Esta espécie apresenta distribuição restrita à bacia do Rio Negro e aos rios Tapajós e Trombetas (Hoogmed e Ávila-Pires, 1990).

A captura indiscriminada de ovos e indivíduos adultos de irapuca para utilização como fonte alimentar pelas populações tradicionais amazônicas tem levado ao declínio os estoques naturais desta espécie (Rebêlo e Pezutti, 2000). Essa grande pressão predatória aliada à sua distribuição restrita, bem como à escassez de projetos conservacionistas direcionados para esta espécie, contribuíram para que *P. erythrocephala* fosse classificada pela IUCN dentro da categoria vulnerável (IUCN, 2010) e que constasse no apêndice II do CITES (CITES, 2010).

Com intuito de aumentar o conhecimento sobre a biologia da irapuca, este trabalho teve como objetivo comparar os parâmetros hematológicos de espécimes selvagens de *P. erythrocephala* de ambos os sexos e diferentes fases do crescimento, bem como estabelecer intervalos de referência para a espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de estudo e captura dos animais**

O Arquipélago de Mariuá, situado na bacia do médio Rio Negro, nas proximidades do município de Barcelos, é considerado o maior conjunto de ilhas de água doce do mundo, com mais de 1.600 ilhas. Essa região abriga uma grande diversidade faunística, incluindo várias espécies da família Podocnemididae. Das quatro espécies de podocnemídeos amazônicos, três espécies ocorrem na bacia do Rio Negro: *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia), *P. unifilis* (tracajá) e *P. erythrocephala* (irapuca), sendo esta última a mais abundante e representando 85% dos quelônios capturados, seguido por *P. unifilis*, com 10% e por *P. expansa*, com 0,2% (Vogt, 2001).

Nesta região, foram realizadas três coletas, em novembro de 2009, março de 2010 e outubro de 2010, e capturados 128 espécimes de *P. erythrocephala* de ambos os sexos e em diferentes fases de crescimento, classificados aqui como recém-eclodidos, imaturos e maduros. Os espécimes imaturos e maduros de irapuca foram coletados com auxílio de rede de arrasto em lagos e igarapés, enquanto que os recém-eclodidos foram encontrados associados à raízes e troncos submersos.

## **Coleta sanguínea e classificação dos animais**

Imediatamente após a captura (< 3 minutos), os animais foram imobilizados através da revirada do corpo do animal, de forma que a carapaça ficasse voltada para baixo. As amostras de sangue foram coletadas através da punção da veia femoral utilizando seringas banhadas com heparina (5.000 UI) e destinadas à determinação das análises sanguíneas. Em seguida, foi realizada a biometria de todos os animais, com aferimento do peso corpóreo (g), com auxílio de balança portátil do tipo Pesola<sup>®</sup>, e mensuração do comprimento e largura do plastrão e carapaça (cm), com auxílio de fita métrica.

A determinação sexual foi feita por observação externa do formato da extremidade do plastrão (triangular nas fêmeas e arredondado nos machos) e do tamanho da cauda (curto nas fêmeas e comprido e volumoso nos machos). As fases de crescimento foram classificadas de acordo com as recomendações de Bernhard (2010), que estimou o grau de maturidade sexual a partir do comprimento da carapaça (CC): macho imaturo  $CC < 16,0$  cm; macho maduro  $CC \geq 16,0$  cm; fêmea imatura  $CC < 22,0$  cm e fêmea madura  $CC \geq 22$  cm. As irapucas de pequeno porte ( $CC < 11$  cm) e que não apresentaram sinais externos de dimorfismo sexual foram classificadas como recém-eclodidos. Após a determinação sexual, foram realizadas marcações no casco e, em seguida, todos os animais foram devolvidos à natureza.

## **Determinação dos parâmetros sanguíneos**

O hematócrito (Ht) foi determinado pelo método do microhematócrito utilizando tubo capilar heparinizado. A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando o reagente de Drabkin (1,4 g  $KH_2PO_4$ ; 2,0 g  $K_3Fe(CN)_6$ ; 0,5 g KCN para 1 L  $H_2O$ ). A contagem de eritrócitos (RBC) foi feita em câmara de Neubauer após a diluição do sangue em solução de formol-citrato. A partir dos valores de Ht, Hb e RBC de cada indivíduo, foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), seguindo as recomendações de Wintrobe (1934).

As concentrações de proteínas totais e albumina foram determinadas pelo método do biureto e do verde de bromocresol, respectivamente (Kit Labtest, MG). A concentração de globulina foi calculada a partir da subtração dos valores de proteínas totais e albumina. A partir dos valores de albumina e globulina, foi calculada a relação albumina/globulina. A glicose plasmática foi determinada pelo método da glicose oxidase, enquanto que os níveis de triglicerídeos e colesterol total foram determinados pelo método enzimático-colorimétrico (Kit Doles, GO). A uréia foi determinada pelo método da urease (Kit Doles, GO). Todas as



análises foram lidas em espectrofotômetro Bioplus modelo Bio 2000, em comprimentos de onda específicos para cada constituinte. As concentrações plasmáticas de cálcio, magnésio e potássio foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica (PerkinElmer, 1100D, EUA) enquanto que os níveis de sódio e cloreto foram determinados pelo método colorimétrico com auxílio de kits comerciais específicos (In Vitro, MG e Doles, GO, respectivamente).

### **Monitoramento da qualidade de água**

Os níveis de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica e potencial hidrogeniônico das áreas de captura das irapucas foram mensurados com auxílio de um medidor multi-paramétrico (Orion 5-Star Plus, Thermo Scientific, EUA). Amostras de água foram coletadas para posteriores análises de alcalinidade e dureza total, pelo método titulométrico segundo Boyd e Tucker (1992), bem como de amônia total e nitrito, pelos métodos espectrofotométricos de Verdouw et al. (1978), utilizando salicilato-hipoclorito, e de Boyd e Tucker (1992), respectivamente.

### **Análise estatística**

Os parâmetros sanguíneos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homocedasticidade de Levene. Os dados foram transformados, porém não atenderam às premissas para uma análise paramétrica. Valores com três intervalos interquartis entre os quartis inferior e superior de cada distribuição foram identificados como *outliers*, com auxílio do teste de *stem-and-leaf* e excluídos das análises (Horn et al., 2001).

A comparação entre os sexos foi realizada pelo teste t de Student, para os dados paramétricos e pelo teste de Mann-Whitney, para os dados não-paramétricos. A comparação entre as fases de desenvolvimento (recém-eclodidos, imaturos e maduros) foi realizada através da análise de variância (one way ANOVA), para os dados paramétricos, e do teste de Kruskal-Wallis (KW-ANOVA), para os dados não paramétricos.

Os parâmetros que apresentaram diferenças significativas na ANOVA e KW-ANOVA foram submetidos ao teste de Tukey e de Dunn, respectivamente. A interação entre o sexo e fase de crescimento, com exceção dos recém-eclodidos, foi analisada mediante ANOVA fatorial. Todas as análises foram realizadas a 5% de significância.

Os intervalos de referência dos parâmetros sanguíneos com distribuição normal e homocedástica foram expressos como 95% do intervalo de confiança, enquanto que os demais parâmetros foram expressos como 25°-75° percentis.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade da água dos locais de captura das irapucas (n=7; média  $\pm$  DP) apresentaram os seguintes valores: oxigênio dissolvido ( $4,7 \pm 0,3$  mg/L), temperatura ( $32,3 \pm 1,6$  °C), pH ( $5,2 \pm 0,2$ ), condutividade elétrica ( $10,5 \pm 1,3$   $\mu$ S/cm), amônia total ( $0,014 \pm 0,008$  mg/L), nitrito ( $0,006 \pm 0,001$  mg/L), alcalinidade ( $1,2 \pm 0,2$  mg CaCO<sub>3</sub>/L) e dureza total ( $1,9 \pm 0,6$  mg CaCO<sub>3</sub>/L). As variáveis físicas e químicas da água encontradas estão dentro do esperado visto que o Rio Negro é caracterizado com um rio de águas pretas, levemente ácido, com baixos teores de oxigênio dissolvido e de condutividade elétrica, o que reflete a baixa concentração de elementos alcalinos e alcalino-terrosos e em compostos nitrogenados (Chao et al., 2001; Horbe e Oliveira, 2008).

O número amostral e os dados biométricos dos recém-eclodidos, de machos e fêmeas imaturos e maduros estão presentes na Tabela 1. Similarmente aos demais podocnemidídeos, a irapuca também apresenta dimorfismo sexual, sendo que os machos são menores que as fêmeas (Pritchard e Trebbau, 1984; Vogt, 2001; Fachin-Teran e Vogt, 2004; Bernhard, 2010). Foi observada grande quantidade de machos (n= 68) em comparação às fêmeas (n= 35), considerando os três períodos de coleta. De acordo com Fachín-Téran e Vogt (2004), essa grande diferença na razão sexual pode ser resultado da influência de fatores ambientais, como baixas temperaturas durante o período crítico de determinação do sexo, o que masculiniza a população, ou devido à predação diferencial de fêmeas durante o período de nidificação e oviposição pelo homem. Resultados semelhantes foram encontrados por Fachín-Téran e Vogt (2004) para *P. unifilis* e por Fachín-Téran et al. (2003) para *P. sextuberculata*. Entretanto, Bernhard (2010) encontrou razão sexual em favor das fêmeas de *P. erythrocephala* coletadas no rio Ayuanã, município de Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas.

Tabela 1. Dados biométricos (média  $\pm$  DP) e número amostral (n) das classes de tamanho de *Podocnemis erythrocephala* coletada no Arquipélago de Mariuá, médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil.

Classe	n	Parâmetros biométricos				
		Comprimento do plastrão (cm)	Largura do plastrão (cm)	Comprimento da carapaça (cm)	Largura da carapaça (cm)	Peso (g)
Recém-eclodido	25	4,9 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 0,7	6,4 $\pm$ 0,8	6,2 $\pm$ 0,7	34,4 $\pm$ 12,1
Macho imaturo	5	11,0 $\pm$ 0,8	10,1 $\pm$ 1,6	13,5 $\pm$ 1,9	12,7 $\pm$ 1,9	216,6 $\pm$ 69,2
Macho maduro	63	15,8 $\pm$ 2,8	15,2 $\pm$ 2,1	20,5 $\pm$ 2,9	18,2 $\pm$ 2,2	664,1 $\pm$ 305,0
Fêmea imatura	25	13,6 $\pm$ 3,8	12,5 $\pm$ 3,1	16,2 $\pm$ 4,0	15,0 $\pm$ 3,4	400,0 $\pm$ 232,8
Fêmea madura	10	20,5 $\pm$ 1,5	19,6 $\pm$ 2,0	27,1 $\pm$ 2,7	22,2 $\pm$ 1,9	1338,0 $\pm$ 427,8

Os resultados das comparações dos parâmetros sanguíneos entre os sexos, fases de crescimento, bem como a interação entre estes dois fatores estão presentes na Tabela 2. Dos 19 parâmetros analisados neste trabalho, somente a concentração de hemoglobina e os níveis de colesterol total apresentaram diferenças entre os sexos.

Os machos de *P. erythrocephala* apresentaram valores significativamente maiores de hemoglobina em relação às fêmeas. De acordo com Ferrarezi (2006), a concentração de hemoglobina no organismo está associada ao grau de atividade dos animais, sendo maior naqueles com atividade metabólica mais intensa. Embora Bernhard (2010) tenha verificado que as fêmeas de *P. erythrocephala* percorram maiores distâncias que os machos, provavelmente em busca de locais para a oviposição, os níveis de hemoglobina sugerem que os machos sejam mais ativos metabolicamente, o que pode ser explicado pelo comportamento agressivo desses animais durante o forrageamento (Balensiefer, 2003). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os estudos de Anderson et al. (1997) e Christopher et al. (1999), os quais observaram valores de hemoglobina mais elevados em machos de *Elseya novaguineae* e *Gopherus agassizii*, respectivamente. Entretanto, em *Phrynops geoffroanus* (Ferronato et al., 2009), *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* (Tavares-Dias et al., 2011) não foram observados efeitos do sexo nos parâmetros sanguíneos analisados.

Tabela 2. Diferenças entre sexo, fase de crescimento (FC) e interação sexo e fase de crescimento dos parâmetros sanguíneos de *Podocnemis erythrocephala* coletada no Arquipélago de Mariuá, médio Rio Negro, Amazonas, Brasil.

Parâmetros sanguíneos	Diferença entre sexo			Diferença entre fase de crescimento				Sexo x FC <sup>#</sup>
	Macho (n=68)	Fêmea (n=35)	P	Recém-Eclodido (n=25)	Imaturo (n=30)	Maduro (n=73)	P	P
Ht (%)	21,55 ± 0,47	20,77 ± 0,38	0,402	15,36 ± 2,87 <sup>a</sup>	20,16 ± 3,21 <sup>b</sup>	21,75 ± 4,25 <sup>b</sup>	<0,001	0,564
Hb (g/dL)	6,30 ± 1,32 <sup>a</sup>	5,73 ± 1,11 <sup>b</sup>	0,041	4,71 ± 1,16 <sup>a</sup>	5,54 ± 0,98 <sup>b</sup>	6,33 ± 1,32 <sup>c</sup>	<0,001	0,545
RBC (milhões/ $\mu$ L)	0,44 ± 0,08	0,41 ± 0,08	0,160	0,38 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,44 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,025	0,661
VCM (fL)	485,54 ± 90,28	477,18 ± 117,79	0,693	433,78 ± 151,40	472,79 ± 117,70	486,73 ± 92,35	0,130	0,385
CHCM (g/dL)	29,11 ± 3,38	27,63 ± 3,60	0,054	28,58 ± 2,68	27,70 ± 3,17	28,97 ± 3,59	0,259	0,148
HCM (pg)	142,11 ± 26,57	130,46 ± 32,62	0,055	121,58 ± 39,73 <sup>a</sup>	129,69 ± 31,97 <sup>ab</sup>	141,62 ± 27,38 <sup>b</sup>	0,018	0,839
Proteínas totais (g/L)	20,84 ± 3,41	20,82 ± 4,28	0,982	14,67 ± 1,89 <sup>a</sup>	20,14 ± 4,53 <sup>b</sup>	21,11 ± 3,31 <sup>b</sup>	<0,001	0,425
Albumina (g/L)	9,59 ± 2,58	9,85 ± 2,79	0,659	10,04 ± 2,42	10,03 ± 3,01	9,54 ± 2,50	0,653	0,456
Globulina (g/L)	11,01 ± 3,90	10,65 ± 3,15	0,674	4,24 <sup>‡</sup> <sup>a</sup>	8,78 <sup>‡</sup> <sup>ab</sup>	11,12 <sup>‡</sup> <sup>b</sup>	<0,001 <sup>‡</sup>	0,844
Albumina/Globulina (g/L)	0,83 <sup>‡</sup>	0,81 <sup>‡</sup>	0,346 <sup>†</sup>	2,88 <sup>‡</sup> <sup>a</sup>	1,03 <sup>‡</sup> <sup>ab</sup>	0,76 <sup>‡</sup> <sup>b</sup>	0,001 <sup>‡</sup>	0,877
Glicose (mmol/L)	6,49 <sup>‡</sup>	6,53 <sup>‡</sup>	0,393 <sup>†</sup>	7,81 <sup>‡</sup> <sup>a</sup>	6,61 <sup>‡</sup> <sup>b</sup>	6,43 <sup>‡</sup> <sup>b</sup>	<0,001 <sup>‡</sup>	0,186
Colesterol total (mmol/L)	1,84 ± 0,53 <sup>a</sup>	2,09 ± 0,66 <sup>b</sup>	0,045	2,81 ± 0,83 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,48 <sup>b</sup>	1,92 ± 0,62 <sup>b</sup>	<0,001	<0,001
Triglicerídeos (mmol/L)	0,69 ± 0,17	0,77 ± 0,37	0,162	0,47 <sup>‡</sup> <sup>a</sup>	0,50 <sup>‡</sup> <sup>a</sup>	0,71 <sup>‡</sup> <sup>b</sup>	<0,001 <sup>‡</sup>	0,253
Uréia (mmol/L)	2,55 <sup>‡</sup>	2,26 <sup>‡</sup>	0,382 <sup>†</sup>	2,89 <sup>‡</sup>	2,68 <sup>‡</sup>	2,22 <sup>‡</sup>	0,435 <sup>‡</sup>	0,223
Cloreto (mmol/L)	88,49 <sup>‡</sup>	91,07 <sup>‡</sup>	0,115 <sup>†</sup>	107,12 ± 18,41 <sup>a</sup>	106,00 ± 22,32 <sup>a</sup>	86,95 ± 9,63 <sup>b</sup>	<0,001	0,655
Sódio (mmol/L)	133,32 ± 6,05	132,58 ± 6,31	0,586	133,9 ± 3,32	131,82 ± 6,59	133,52 ± 5,93	0,446	0,880
Potássio (mmol/L)	5,72 ± 1,64	5,16 ± 1,55	0,127	4,30 ± 0,70	5,27 ± 1,66	5,64 ± 1,62	0,053	0,839
Cálcio (mmol/L)	1,35 ± 0,24	1,31 ± 0,21	0,527	1,20 ± 0,13	1,26 ± 0,24	1,34 ± 0,19	0,076	0,416
Magnésio (mmol/L)	0,55 <sup>‡</sup>	0,53 <sup>‡</sup>	0,649 <sup>†</sup>	0,37 <sup>‡</sup> <sup>a</sup>	0,53 <sup>‡</sup> <sup>b</sup>	0,55 <sup>‡</sup> <sup>b</sup>	<0,001 <sup>‡</sup>	0,978

Letras diferentes significam diferenças significativas entre os sexos e entre as fases de crescimento ( $p < 0,05$ ). <sup>#</sup> Interação entre sexo (machos e fêmeas) e fase de crescimento (imaturos e maduros). <sup>‡</sup> Valores expressos em mediana, os demais valores são médias  $\pm$  DP. <sup>†</sup> Teste de Mann-Whitney. <sup>‡</sup> Teste de Kruskal-Wallis.

As fêmeas de *P. erythrocephala* apresentaram concentrações de colesterol total significativamente superior em comparação aos machos. Resultados semelhantes foram encontrados para fêmeas de *Chelonia mydas* (Bolten e Bjorndal, 1992), *Gopherus agassizii* (Christopher et al., 1999), *Mauremys leprosa* (Hidalgo-Vila et al., 2007), *Macrochelys temminckii* (Chaffin et al., 2008) e *Ocadia sinensis* (Chung et al., 2009). O aumento de colesterol no organismo das fêmeas está relacionado com o acúmulo de lipídeos para a produção de ovos e vitelo durante o período reprodutivo (Hamann et al., 2005), que em *P. erythrocephala*, ocorre durante a seca, iniciando-se no final de agosto e persistindo até o início de novembro no médio Rio Negro (Novelle, 2006). Esse incremento de colesterol total nas fêmeas para utilização durante o período reprodutivo foi comprovado a partir da análise da interação entre sexo e a fase de crescimento, onde foi observado que fêmeas maduras apresentaram valores significativamente maiores deste constituinte quando comparadas às fêmeas imaturas e aos machos imaturos e maduros.

Os demais parâmetros analisados não apresentaram diferenças significativas entre machos e fêmeas de *P. erythrocephala*, demonstrando que o sexo é um fator intrínseco que exerce pouca interferência no eritrograma e na bioquímica plasmática dessa e de outras espécies de podocnemídeos amazônicos, como *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* (Oliveira-Júnior et al., 2009; Tavares-Dias et al., 2011). Por outro lado, a comparação dos parâmetros hematológicos entre as fases de crescimento indicou diferenças significativas no hematócrito, hemoglobina, número de eritrócitos, hemoglobina corpuscular média, proteínas totais, globulina, razão albumina/globulina, glicose, colesterol total, triglicérides, cloreto e magnésio, demonstrando que o estágio de crescimento é um importante fator a ser considerado durante o estabelecimento de valores hematológicos de referência, bem como para a avaliação do estado de saúde destes animais.

Em quelônios, informações sobre o efeito da fase de vida nos parâmetros eritrocitários são escassas e pouco conclusivas, diferente da bioquímica plasmática que é melhor estudada neste grupo. Em *P. erythrocephala*, os valores de hematócrito foram menores nos indivíduos recém-eclodidos em comparação aos imaturos e maduros, enquanto que o RBC e HCM foram menores nos recém-eclodidos somente em comparação aos animais maduros. A concentração de hemoglobina variou significativamente em todas as fases de desenvolvimento, sendo maior nos animais maduros e menor nos recém-eclodidos. Em *P. expansa* e *P. sextuberculata*, os valores de hematócrito, RBC e hemoglobina foram superiores nos recém-eclodidos, ao contrário de *P. unifilis*, onde o hematócrito foi superior nos animais jovens e adultos (Tavares-Dias et al., 2011). Frair (1977), Wood e Ebanks (1984) e Bolten e Bjorndal (1992)

também encontraram valores de hematócrito mais elevados em exemplares adultos de *Malayemys spixii* e *C. mydas*.

De modo geral, os animais na fase inicial de vida possuem alta taxa metabólica, resultando na elevação dos parâmetros eritrocitários para maximização da obtenção de oxigênio e intensificação da produção energética (Schmidt-Nielsen, 2002). Na irapuca, assim como em outras espécies de quelônios relatadas na literatura (Frair, 1977; Wood e Ebanks, 1984; Bolten e Bjorndal, 1992), o eritrograma de recém-eclodidos foi inferior em comparação aos animais em fases de crescimento mais avançadas, o que poderia indicar uma reduzida demanda metabólica em recém-eclodidos. Entretanto, Wells e Baldwin (1994) verificaram, a partir da análise das propriedades funcionais de isolados de hemoglobina, que recém-eclodidos de *C. mydas* possuem maior afinidade por oxigênio que animais adultos, provavelmente em função da elevada concentração eritrocitária de fosfatos orgânicos moduladores da hemoglobina, como o ácido 2,3-difosfoglicérico e a adenosina trifosfato. Estas informações indicam que o uso apenas dos parâmetros eritrocitários clássicos como indicadores da atividade metabólica deve ser visto com cautela, pois animais em fases de crescimento distintas podem apresentar diferentes estratégias para a obtenção de oxigênio e produção de energia. De forma complementar, Wells e Baldwin (1994) ressaltam que o aumento dos parâmetros eritrocitários em tartarugas de maior porte corresponde a adaptações fisiológicas para aumentar o tempo de submersão que, em quelônios, parece ser proporcional ao tamanho dos animais (Mathie e Franklin, 2006).

Segundo Labrada-Martagon et al. (2010), o acompanhamento dos parâmetros bioquímicos plasmáticos é uma ferramenta importante para avaliação e monitoramento do estado fisiológico de animais selvagens, por ser de fácil análise e alta sensibilidade quanto às interferências de fatores endógenos e exógenos sobre o equilíbrio homeostático.

Na irapuca, os níveis de proteínas totais foram significativamente maiores nos animais imaturos e maduros, em comparação aos recém-eclodidos. Tavares-Dias et al. (2011), determinando as concentrações de proteínas totais de exemplares recém-eclodidos, jovens e adultos de três espécies de quelônios do gênero *Podocnemis*, verificaram que em *P. expansa* e *P. unifilis* as concentrações deste metabólito plasmático foram superiores em jovens e adultos, enquanto que em *P. sextuberculata* foram superiores nos recém-eclodidos. Chaffin et al. (2008) não observaram diferenças nos níveis de proteínas entre juvenis e adultos de *Macrochelys temminckii*. Entretanto, Hasbun et al. (1998), verificaram que espécimes de *C. mydas* de maior porte ( $CC \geq 89$  cm) apresentam concentração protéica mais elevada que os de pequeno porte ( $CC \leq 69$  cm). Bolten e Bjorndal (1992), estudando a mesma espécie,

encontraram correlação positiva entre o comprimento da carapaça e os níveis de proteínas totais. Resultados semelhantes também foram encontrados por Labrada-Martagon et al. (2010) para *C. mydas*, reforçando a hipótese de que a concentração protéica acompanha o tamanho e o grau de maturação sexual dos quelônios. De acordo com Kakizoe et al. (2007), nas fêmeas, o aumento das concentrações de proteínas totais está relacionada com o acúmulo de proteínas vitelínicas durante o processo de maturação, enquanto que nos machos esse aumento está associado à produção de proteínas anabólicas provocado pela elevação de testosterona no organismo.

Neste trabalho, os níveis de albumina não diferiram entre as fases de crescimento, ao contrário dos níveis de globulina que foram significativamente maiores nos animais maduros em comparação aos animais recém-eclodidos, enquanto que a relação A/G apresentou resultado inverso, sendo maior nos recém-eclodidos. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os estudos de Bolten et al. (1994), que encontraram correlação positiva entre o tamanho dos animais e os níveis de globulina em *C. caretta*, assim como correlação negativa para A/G. O aumento na concentração das globulinas pode ser explicado pelo acúmulo de anticorpos naturais, que são gama-globulinas, durante o desenvolvimento dos animais, visto que os quelônios apresentam correlação positiva entre o tamanho e a quantidade de anticorpos (Zimmerman et al., 2010).

As concentrações plasmáticas de glicose e colesterol total foram maiores nos recém-eclodidos de *P. erythrocephala* em relação aos animais das demais fases de crescimento, enquanto que os níveis de triglicerídeos apresentaram resultados contrários, sendo superiores nos animais maduros. Porém, recém-eclodidos de *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* apresentaram valores superiores de colesterol total e triglicerídeos, enquanto que a glicemia foi maior nos animais jovens e adultos (Tavares-Dias et al. 2011). Elevadas concentrações de colesterol total e glicose em recém-eclodidos provavelmente indicam alta demanda energética em função do metabolismo acelerado desses animais nessa fase de vida. Os altos níveis de colesterol total encontrados nos recém-eclodidos poderia ser reflexo da mobilização deste composto a partir dos resíduos vitelínicos. Segundo Booth (2003) e Venkatesan et al. (2005), os lipídeos são o segundo maior componente dos ovos, representando cerca de 28 a 35% do peso em matéria seca. Entretanto, Venkatesan et al. (2005) observaram que, durante o desenvolvimento embrionário, apenas uma pequena porção lipídica é convertida em energia, sendo o restante armazenado nos resíduos vitelínicos e utilizado pelos animais somente após a eclosão.

Diferentemente do colesterol total, as elevadas concentrações de glicose plasmática encontradas nos recém-eclodidos de *P. erythrocephala* não devem ter sido provenientes dos resíduos vitelínicos, pois os níveis de carboidratos são reduzidos no vitelo dos quelônios (Booth, 2003), sendo a glicose obtida basicamente através do consumo de glicogênio muscular e hepático (Mahmoud e Klicka, 1971). Já o acúmulo de triglicérides nos animais maduros provavelmente ocorreu em função do estímulo dos esteróides gonadais estradiol, progesterona e testosterona (Duggan e Callard, 2003). Nas fêmeas maduras, esse aumento reflete as alterações comportamentais e fisiológicas relacionadas à vitelogênese e ao desenvolvimento folicular (Hamann et al., 2005), enquanto que nos machos esta elevação está associada à mobilização de energia para o processo de corte, luta e acasalamento (Jessop et al., 2004).

Em relação aos íons plasmáticos de *P. erythrocephala*, somente o cloreto e o magnésio apresentaram diferenças significativas entre as fases de crescimento, sendo os menores níveis de cloreto registrados nos animais maduros, enquanto que o magnésio foi mais elevado nos exemplares imaturos e maduros. Bolten e Bjorndal (1992) e Hasbun et al., (1998) também observaram valores inferiores de cloreto em adultos de *C. mydas*, enquanto que os níveis de magnésio não apresentaram variação significativa nesta espécie (Hasbun et al., 1998). Essas alterações iônicas podem ser resultado das adaptações fisiológicas necessárias para o prolongamento da duração do mergulho nos animais de maior porte (Mathie e Franklin, 2006). Segundo Baeyens et al. (1989), a diminuição na concentração de cloreto plasmático parece estar relacionada com a atuação do hormônio peptídeo natriurético atrial. Este hormônio age no organismo promovendo a diurese e a redução dos níveis de cloreto, proporcionando aumento na osmolaridade e viscosidade do sangue, otimizando o transporte de oxigênio (Wells e Baldwin, 1994) e um aumento no tempo de duração do mergulho nos quelônios. De forma complementar, o aumento na concentração de magnésio plasmático parece estar relacionado com a manutenção do equilíbrio ácido-base a partir da liberação de carbonato de magnésio dos ossos e do casco dos quelônios para o tamponamento do lactato produzido pela ativação da via anaeróbica para geração de ATP durante o mergulho (Jackson et al., 2000; ver capítulo 3).

Os resultados deste trabalho culminaram no estabelecimento de intervalos de referência para a irapuça, sendo o primeiro estudo sobre os parâmetros sanguíneos da espécie. Em função do efeito do sexo e da fase de crescimento sobre o eritrograma e a bioquímica plasmática dessa espécie, foram estabelecidos intervalos de referência para cinco categorias



distintas: recém-eclodidos, machos imaturos, machos maduros, fêmeas imaturas e fêmeas maduras (Tabela 3).

Tabela 3. Intervalos de referência estabelecidos para o eritrograma e a bioquímica plasmática de recém-eclodidos e de machos e fêmeas imaturos e maduros de *Podocnemis erythrocephala* coletados no Arquipélago de Mariuá, médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil.

Parâmetros sanguíneos	<i>Podocnemis erythrocephala</i>				
	Recém- eclodido	Macho imaturo	Macho maduro	Fêmea imaturo	Fêmea madura
Hematócrito (%)	14,1-16,5 (25)	18,5-22,6 (5)	20,5-22,7 (63)	18,6-21,5 (25)	20,1-24,8 (10)
Hemoglobina (g/dL)	4,22-5,20 (24)	4,65-6,18 (5)	6,03-6,72 (62)	5,09-6,06 (21)	5,23-6,92 (10)
RBC (milhões/ $\mu$ L)	0,33-0,43 (25)	0,29-0,55 (5)	0,42-0,46 (62)	0,38-0,45 (23)	0,36-0,46 (8)
VCM (fL)*	318,9-508,3 (25)	378,3-616,1 (5)	419,3-539,3 (62)	375,7-523,0 (24)	400,0-560,9 (10)
CHCM (g/dL)	27,3-29,8 (20)	23,3-30,6 (5)	28,4-30,2 (56)	26,4-29,3 (22)	23,9-30,2 (10)
HCM (pg)	103,9-139,2 (22)	91,8-175,6 (5)	136,1-149,4 (62)	115,5-142,2 (25)	109,4-159,3 (10)
Proteínas totais (g/L)*	13,7-15,9 (16)	17,7-22,7 (4)	18,4-23,3 (61)	15,5-21,7 (24)	21,9-23,9 (9)
Albumina (g/L)	8,5-11,5 (12)	6,2-15,5 (4)	8,8-10,1 (61)	8,4-11,2 (21)	8,1-11,4 (9)
Globulina (g/L)	3,8-9,1 (12)	3,2-13,5 (4)	10,1-12,2 (59)	8,1-11,0 (19)	11,0-14,7 (9)
Albumina/Globulina (g/L)*	0,86-3,49 (12)	1,03-1,31 (4)	0,52-1,12 (55)	0,64-1,52 (21)	0,63-0,91 (9)
Glicose (mmol/L)	7,48-8,37 (23)	6,15-6,58 (5)	6,63-7,22 (52)	5,80-6,84 (23)	5,03-6,95 (9)
Colesterol total (mmol/L)	2,39-3,24 (17)	1,43-2,99 (5)	1,68-1,94 (62)	1,67-2,06 (23)	2,01-3,19 (10)
Triglicerídeos (mmol/L)*	0,34-0,58 (24)	0,36-0,52 (4)	0,57-0,80 (53)	0,43-0,91 (24)	0,71-1,36 (10)
Uréia (mmol/L)*	2,41-3,84 (13)	2,49-4,06 (4)	1,51-4,56 (63)	1,76-4,26 (23)	1,08-1,96 (7)
Cloreto (mmol/L)*	92,0-120,5 (17)	110,6-114,1 (4)	82,4-93,0 (56)	86,2-128,9 (24)	75,9-90,2 (9)
Sódio (mmol/L)	131,3-136,4 (9)	122,7-140,4 (3)	131,8-134,9 (63)	128,6-135,0 (21)	131,0-137,5 (9)
Potássio (mmol/L)	3,76-4,84 (9)	3,95-7,83 (4)	5,27-6,14 (59)	4,34-5,96 (20)	4,31-6,04 (9)
Cálcio (mmol/L)	1,11-1,30 (10)	0,68-1,60 (4)	1,30-1,42 (62)	1,18-1,39 (22)	1,26-1,50 (9)
Magnésio (mmol/L)	0,33-0,39 (11)	0,38-0,69 (4)	0,54-0,60 (59)	0,49-0,60 (22)	0,54-0,63 (9)

\* Valores expressos como 25°-75° percentis, os demais valores são expressos como 95% do intervalo de confiança. Valores entre parênteses representam o número amostral.

Na literatura, valores do hemograma discordantes dos intervalos de referência têm sido utilizados para a identificação de animais doentes (Swimmer, 2000; Flint et al., 2010). Tavares-Dias et al. (2009) compararam espécimes de *P. expansa* mal-nutridos com animais alimentados regularmente e verificaram que as concentrações de hemoglobina e CHCM estavam abaixo do intervalo referencial da espécie (Oliveira-Júnior et al., 2009; Tavares-Dias et al., 2009). Enquanto que Flint et al. (2010), com auxílio dos intervalos hematológicos de referência, constataram que os espécimes imaturos de pequeno porte ( $CC < 65$  cm) e maduros de *C. mydas* são mais susceptíveis à contração de doenças que os imaturos de grande porte ( $CC \geq 65$  cm).

Os intervalos de referência determinados neste trabalho podem servir de base para a avaliação do estado de saúde das irapucas selvagens e para o acompanhamento dos ajustes fisiológicos dos animais, relacionados tanto às alterações ambientais, como àquelas provenientes dos sistemas de cativeiro.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) pela licença concedida para a coleta de material biológico (licença n°. 10441-1). Ao Laboratório Temático de Solos e Plantas (LTSP/INPA) pela realização da análise de íons. Ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 408795/2006-9) pelo suporte financeiro. O primeiro autor agradece à concessão da bolsa de Mestrado pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas (FAPEAM).

## **REFERÊNCIAS**

- Anderson, N.L.; Wack, R.F.; Hatcher, R. 1997. 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 of Zoo and Wildlife Medicine*, 28: 394–403.
- Baeyens, D.A.; Price, E.; Winters, C.J.; Vesely, D.L. 1989. Diving increases atrial natriuretic factor-like peptide in freshwater diving turtles. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 94: 515–518.

- Balensiefer, D.C. 2003. *Dieta de Podocnemis unifilis (Testudines, Pelomedusidae) no Período de Seca em uma Várzea do Médio Solimões, Amazonas*. Dissertação de mestrado (Ecologia), Universidade Federal do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 34p.
- Bernhard, R. 2010. *Dinâmica populacional de Podocnemis erythrocephala, no rio Ayuanã, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado (Ecologia), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 106p.
- Bolten, A.B.; Bjorndal, K.A. 1992. Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationships. *Journal of Wildlife Diseases*, 28: 407-413.
- Bolten, A.B.; Bjorndal, K.A.; Eliazar, P.J.; Gregory, L.F. 1994. *Seasonal abundance, size distribution, and blood biochemical values of loggerheads (Caretta caretta) in Port Canaveral Ship Channel, Florida*. Miami: NOAA. 39p.
- Booth, D.T. 2003. Composition and energy density of eggs from two species of freshwater turtle with twofold ranges in egg size. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 134: 129-137.
- Boyd, E.; Tucker, C.S. 1992. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn: Auburn University. 300p.
- Chaffin, K.; Norton, T.M.; Gilardi, K.; Poppenga, R.; Jensen, J.B.; Moler, P.; Cray, C.; Dierenfeld, E.S.; Chen, T.; Oliva, M.; Oraggi, F.C.; Gibbs, S.; Mazzaro, L.; Mazet, J. 2008. Health assessment of free-ranging alligator snapping turtles (*Macrochelys temminckii*) in Georgia and Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 44: 670-686.
- Chao, N.L.; Petry, P.; Prang, G.; Sonneschien, L.; Tlusty, M. 2001. *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Project Piaba*. EDUA, Manaus. 309p.
- Christopher, M.M.; Berry, K.H.; Wallis, I.R.; Nagy, K.A.; Henen, B.T.; Peterson, C.C. 1999. Reference intervals and physiologic alterations in hematologic and biochemical values of free-ranging desert tortoises in the mojave desert. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(2): 212-238.
- Chung, C.; Cheng, C.; Chin, S.; Lee, A.; Chi, C. 2009. Morphologic and cytochemical characteristics of asian yellow pond turtle (*Ocadia sinensis*) blood cells and their hematologic and plasma biochemical reference values. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40: 76-85.
- CITES, 2010. Appendices I, II and III. Disponível em: <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>. (válido a partir de 14 de Outubro de 2010).
- Crocker, C.E.; Ultsch, G.R.; Jacson, D.C. 1999. The physiology of diving in a north-temperate and three tropical turtle species. *Journal of Comparative Physiology B*, 169: 249-255.
- Duggan, A.E.; Callard, I.P. 2003. Lipids and lipid-transporting proteins in *Chrysemys picta*: role of gonadal steroids and growth hormone in intact and hypophysectomized turtles. *General and Comparative Endocrinology*, 131: 176-184.
- Fachin-Teran, A.; Vogt, R.C. 2004. Estrutura populacional, tamanho e razão sexual de *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) no rio Guaporé (RO), norte do Brasil. *Phyllomedusa*, 3: 29-42.

- Fachin-Teran, A.; Vogt, R.C.; Thorbjarnarson, E.J.B. 2003. Estrutura populacional, razão sexual e abundância de *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. *Phyllomedusa*, 2:43-63.
- Ferrarezi, A.L. 2006. *Estudos estruturais e funcionais das hemoglobinas de Phrynops geoffroanus (Schweigger, 1812)*. Dissertação de Mestrado (Biologia Animal), Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, SP. 140p.
- Ferronato, B.O.; Genoy-Puerto, A.; Piña, C.I.; Souza, F.L.; Verdade, L.M.; Matushima, L.M. 2009. Notes on the hematology of free-living *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in polluted rivers of Southeastern Brazil. *Zoologica*, 26: 795-798.
- Flint, M.; Morton, J.M.; Limpus, C.J.; Patterson-Kane, J.C.; Murray, P.J.; Mills, P.C. 2010. Development and application of biochemical and haematological reference intervals to identify unhealthy green sea turtles (*Chelonia mydas*). *The Veterinary Journal*, 185: 299–304.
- Frair, W. 1977. Sea turtle red blood cell parameters correlated with carapace lengths. *Comparative Biochemistry and Physiology A.*, 56: 467-472.
- Hamann, M.; Jessop, T.S.; Limpus, C.J.; Whittier, J.M. 2005. Regional and annual variation in plasma steroids and metabolic indicators in female green turtles, *Chelonia mydas*. *Marine Biology*, 148(2): 427-433.
- Hasbun, C.R.; Lawrence, A.J.; Naldo, J.; Samour, J.H.; Alghais, S.M. 1998. Normal blood chemistry of free-living green sea turtles, *Chelonia mydas*, from the United Arab Emirates. *Comparative Hematology International*, 8:174–177.
- Hidalgo-Vila, J.; Diaz-Paniagua, C.; Perez-Santigosa, N.; Plaza, A.; Camacho, I.; Recio, F. 2007. Hematologic and Biochemical Reference Intervals of Free-Living Mediterranean Pond Turtles (*Mauremys leprosa*). *Journal of Wildlife Diseases*, 43(4): 798–801.
- Hoogmoed, M.S.; Ávila-Pires, T.C. 1990. New distribution data for *Podocnemis erythrocephala* (Spix) with remarks on some other turtle taxa (Reptilia: Chelonia: Pelomedusidae). *Zoologische Mededelingen*, 64: 21-24.
- Horbe, A.M.C.; Oliveira, L.G.S. 2008. Química de igarapés de água preta do Nordeste do Amazonas - Brasil. *Acta Amazônica*, 38(4): 753-760.
- Horn, P.S.; Feng, L.; Li, Y.; Pesce, A.J. 2001. Effect of outliers and nonhealthy individuals on reference interval estimation. *Clinical Chemistry*, 47, 2137–2145.
- IUCN 2010. *IUCN Red List of Threatened Species*. Versão 2010.4. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 14 de Novembro de 2010.
- Jackson, D.C.; Crocker, C.E.; Ultsch, G.R. 2000. Bone and shell contribution to lactic acid buffering of submerged turtles *Chrysemys picta bellii* at 3°C. *American Journal of Physiology*: 278, 1564-1571.
- Jessop, T.S.; Hamann, M.; Limpus, C.J. 2004. Body condition and physiological changes in male green turtles during breeding. *Marine Ecology Progress Series*, 276: 281–288.
- Kakizoe, Y.; Sakaoka, K.; Kakizoe, F.; Yoshii, M.; Nakamura, H.; Kanou, Y.; Uchida, I. 2007. Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38(1): 77–84.

- Labrada-Martagon, V.; Mendez-Rodriguez, L.C.; Gardner, S.C.; Lopez-Castro, M.; Zenteno-Savin, T. 2010. Health Indices of the Green Turtle (*Chelonia mydas*) Along the Pacific Coast of Baja California Sur, Mexico. I. Blood Biochemistry Values. *Chelonian Conservation and Biology*, 9(2): 162–172.
- Mahmoud, I.Y.; Klicka, J. 1971. Post-hatching changes in glycogen concentration in tissues of fed and unfed snapping turtles. *American Midland Naturalist*, 86(1): 248-252.
- Marcon, J.L.; Silva, M.G.; Batista, G.S.; Farias, R.S.; Monteiro, L.B.B. 2008. Fisiologia e Bioquímica de quelônios e suas implicações para o manejo e a criação em cativeiro. In: Andrade, P.C.M. (Ed). *Criação e manejo de quelônios no Amazonas*. Manaus: Ibama, ProVárzea, p.193-221.
- Mathie, N.J.; Franklin, C.E. 2006. The influence of body size on the diving behaviour and physiology of the bimodally respiring turtle, *Elseya albagula*. *Journal of Comparative Physiology B*, 176(8): 739-747.
- Novelle, S.M.H. 2006. *Caracterização do micro-habitat dos ninhos e predação dos ovos de Podocnemis erythrocephala em áreas de desova no Rio Ayuanã, AM*. Dissertação de Mestrado (Ecologia). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 80p.
- Oliveira-Junior, A.A.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L. 2009. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Research in Veterinary Science*, 86: 146-151.
- Pritchard, P.C.H.; Trebbau, P. 1984. *Turtles of Venezuela*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Oxford. 403p.
- Rebêlo, G.; Pezzuti, J. 2000. Percepções sobre o consumo de quelônios na Amazônia. Sustentabilidade e alternativas ao manejo atual. *Ambiente & Sociedade*, 6/7: 85-105.
- Schmidt-Nielsen, K. 2002. *Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente*. Editora Santos: São Paulo, SP. 5ª ed. 600p.
- Swimmer, J.Y. 2000. Biochemical responses to fibropapilloma and captivity in the green turtle. *Journal Wildlife Disease*, 36(1):102–110.
- Tavares-Dias, M.; Oliveira-Junior, A.A.; Silva, M.G.; Marcon, J.L.; Barcellos, J.F.M. 2009. Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the Amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Veterinarski Arhiv*, 79: 601-610.
- Tavares-Dias, M.; Silva, M.G.; Oliveira, A.T.; Oliveira-Júnior, A.A.; Marcon, J.L. 2011 *in press*. Propriedades do sangue de três espécies de quelônios do gênero *Podocnemis* de vida livre na Reserva Biológica do Abufari, baixo Rio Purus, Amazonas, Brasil. In: Silva-Souza, A.T.; Lizama, M.A.P; Takemoto, R.M. *Patologia e sanidade de organismos aquáticos*. Abrapoa: São Paulo, SP.
- Venkatesan, S.; Kannan, P.; Rajagopalan, M.; Vivekanandan, E. 2005. Embryonic energetics in the egg of the green turtle *Chelonia mydas*. *Journal of the Marine Biological Association of India*, 47(2): 193-197.
- Verdouw, H.; Van Eched, C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Research*, 12: 397-402.
- Viana, M.N.S.; Farias, I.P.; Santos, R.C.; Sampaio, M.I.; Monjeló, L.A.S. 2008. Genética Molecular das Populações das Espécies de Quelônios do Gênero *Podocnemis* da Amazônia:

Resultados Preliminares. In: Andrade, P.C.M. (Ed). *Criação e manejo de quelônios no Amazonas*. Manaus: Ibama, ProVárzea, p.174-192.

Vogt, R.C. 2001. Turtles of the Rio Negro. In: Chao, N.L.P.; Prang, G.; Sonneschien, L.; Tlusty, M. (Eds.). *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Projeto Piaba*. Editora da Universidade Federal do Amazonas: Manaus. p.245-264.

Wells, R.M.G.; Baldwin, J. 1994. Oxygen transport in marine green turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings: blood viscosity and control of hemoglobin oxygen-affinity. *Journal of Experimental Biology*, 188: 103–114.

Wintrobe, M.M. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51: 32-49.

Wood, F.E.; Ebanks, C.K. 1984. Blood cytology and hematology of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Herpetologica*, 40: 331-336.

Zimmerman, L.M.; Paitz, R.T.; Vogel, L.A.; Bowden, R.M. 2010. Variation in the seasonal patterns of innate and adaptive immunity in the red-eared slider (*Trachemys scripta*). *The Journal of Experimental Biology*, 213: 1477-1483.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CITOQUÍMICA DAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DA IRAPUCA *Podocnemis erythrocephala* SPIX, 1824 (TESTUDINES, PODOCNEMIDIDAE) DO MÉDIO RIO NEGRO, ESTADO DO AMAZONAS, BRASIL**

**Caracterização morfológica e citoquímica das células sanguíneas da irapuca *Podocnemis erythrocephala* Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae) do médio rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil**

Marcio Quara de Carvalho Santos<sup>1</sup>, Adriano Teixeira de Oliveira<sup>1</sup>, Marcos Tavares-Dias<sup>2</sup>,  
Elizabeth Gusmão Affonso<sup>3</sup>, Jaydione Luiz Marcon<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM); <sup>2</sup>Laboratório de Aquicultura e Pesca, Embrapa Amapá; <sup>3</sup>Coordenação de Pesquisas em Aquicultura, Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA); <sup>4</sup>Laboratório Fisiologia, Departamento de Ciências Biológicas, UFAM.

**RESUMO**

Na literatura existem diversos estudos sobre as células sanguíneas de quelônios, entretanto essas informações são inexistentes para a irapuca, *Podocnemis erythrocephala*. O objetivo deste trabalho foi caracterizar morfológicamente e citoquimicamente as células sanguíneas de *P. erythrocephala*, fornecendo informações sobre o papel funcional dos tipos celulares. O sangue dos animais (n=15) foi coletado por punção da veia femoral utilizando seringas heparinizadas e destinado à confecção de extensões sanguíneas. Para a descrição morfológica, as extensões foram coradas com corante do tipo Romanovski, enquanto que para as reações citoquímicas foram utilizados corantes específicos para cada constituinte. No sangue da irapuca foram identificados eritrócitos, trombócitos, linfócitos, azurófilos, heterófilos, eosinófilos e basófilos. As características morfológicas foram semelhantes às descritas para outros podocnemidídeos. Os eritrócitos apresentaram reação positiva somente para reticulócitos. A coloração de proteínas básicas foi positiva em heterófilos e basófilos e positiva-fracas em eosinófilos. Com exceção dos basófilos e eritrócitos, todas as células sanguíneas apresentaram grânulos de glicogênio, variando apenas na intensidade. Sudanofilia foi observada em heterófilos, eosinófilos, basófilos e azurófilos. Heterófilos e eosinófilos apresentaram marcação positiva-forte para peroxidase, enquanto que os basófilos e azurófilos apresentaram reação positiva e positiva-fracas, respectivamente. A reação de metacromasia foi observada nos grânulos de basófilos. Os constituintes citoquímicos indicam que os heterófilos, eosinófilos e basófilos são as células mais ativas do sistema imunológico da irapuca, sendo responsáveis principalmente pela atividade fagocítica.

**Palavras-chave:** citoquímica, eritrócitos, leucócitos, morfologia, *Podocnemis erythrocephala*, trombócitos



## INTRODUÇÃO

O acompanhamento das características qualitativas e quantitativas das células sanguíneas constitui uma das maneiras mais elementares para avaliar o estado de saúde dos animais (Tavares-Dias e Moraes, 2007). Em mamíferos, as células do sangue possuem funções bem definidas e são facilmente identificadas com base em suas diferenças morfológicas (Pistol et al., 2007). Contudo, nos répteis, os papéis funcionais e a identificação destas células são ainda controversos (Work et al., 1998).

Em vertebrados não-mamíferos, os eritrócitos são nucleados e possuem função semelhante às hemácias dos mamíferos (Canfield, 1998). Nos répteis, estas células apresentam variações no tamanho e no formato celular e nuclear entre as ordens Squamata, Testudines, Crocrodilia e Rhynchocephalia (Claver e Quaglia, 2009). Estágios imaturos dos eritrócitos como rubrícitos, metarubrícitos e reticulócitos, além de eritrócitos anisocíticos e policromáticos, também são eventualmente encontrados na corrente sanguínea, podendo ser facilmente identificados como leucócitos imaturos, linfócitos ou trombócitos (Satake et al., 2009; Stacy et al., 2011).

Diferentemente dos eritrócitos, os trombócitos possuem características morfológicas semelhantes entre os répteis. Entretanto, em função do pequeno tamanho e do citoplasma escasso, estas células podem ser erroneamente identificadas como linfócitos (Alleman et al., 1992; Claver e Quaglia, 2009). Seu papel funcional não está totalmente elucidado para a maioria das espécies, pois estudos têm demonstrado que, além de exercer função análoga às plaquetas dos mamíferos participando do processo de hemostasia (Canfield, 1998), os trombócitos apresentam capacidade fagocitária em alguns répteis (McDaniel et al., 1987; Pelizzon e Lunardi, 2000).

Outro grupo de células com identificação e caracterização bastante contraditória são as células que possuem função de defesa contra patógenos. Embora Canfield (1998) tenha definido que os répteis apresentam cinco tipos de leucócitos (linfócitos, azurófilos, heterófilos, eosinófilos e basófilos), informações divergentes podem ser encontradas na literatura demonstrando que os tipos celulares, as características morfológicas e o número destas células na corrente sanguínea podem variar até mesmo entre espécies de um mesmo gênero (Stacy et al., 2011). Exemplos de informações contraditórias podem ser encontrados na literatura em relação os leucócitos granulócitos, as quais afirmam que os quelônios possuem duas formas de eosinófilos, uma madura, eosinófilo tipo 1, e outra imatura,

eosinófilo tipo 2 (Kelényi e Németh, 1969). Entretanto, Azevedo e Lunardi (2003) e Pistol et al. (2007) demonstraram que estas células correspondem a eosinófilos e heterófilos.

A inconsistência na classificação das células sanguíneas ocorre em função das diferentes metodologias e colorações utilizadas e, principalmente, pela falta de conhecimento sobre as linhagens celulares desses animais (Work et al., 1998). Devido à grande variação morfológica das células sanguíneas dos répteis, torna-se difícil caracterizá-las apenas com base na morfologia (Pistol et al., 2007; Chung et al., 2009). Nesse sentido, a demonstração dos constituintes químico-enzimáticos, por meio das reações citoquímicas, pode auxiliar na identificação e caracterização funcional dessas células (Work et al., 1998; Tavares-Dias, 2006a,b; Hulme-Moir e Clark, 2010).

As técnicas citoquímicas consistem basicamente na utilização de reagentes colorimétricos que, em contato com os componentes químico-enzimáticos presentes no interior das células, formam precipitados com colorações específicas para cada reação (Shigdar et al., 2009). Atualmente, essa ferramenta tem sido amplamente utilizada em estudos hematológicos, pois possibilita a diferenciação e identificação mais precisa dos tipos celulares, bem como a determinação das contribuições de cada célula para o organismo (Hulme-Moir e Clark, 2010). Em humanos, a citoquímica é utilizada para a identificação de células sanguíneas neoplásicas e para a classificação de leucemias (McManus, 2005). Além da aplicabilidade na medicina, as técnicas citoquímicas vêm sendo aplicadas para a determinação da composição dos constituintes celulares em vários animais como marsupiais (Hulme-Moir e Clark, 2010), aves (Salakij et al., 2003), peixes (Ueda et al., 2001; Tavares-Dias e Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006a,b; Tavares-Dias e Moraes, 2007) e répteis (Moura et al., 1999; Azevedo e Lunardi, 2003; Chung et al., 2009).

Apesar dos diversos trabalhos na literatura investigando os aspectos morfológicos e citoquímicos das células sanguíneas de quelônios (Work et al., 1998; Knotková et al., 2002; Azevedo e Lunardi, 2003; Casal e Oros, 2007; Pistol et al., 2007; Metin et al., 2008; Chung et al., 2009), essas informações são escassas para as espécies amazônicas da família Podocnemididae (Oliveira-Junior et al., 2009; Oliveira et al., 2011) e inexistentes para a irapuca, *Podocnemis erythrocephala*. Esta espécie encontra-se distribuída pelo sul da Colômbia, sudoeste da Venezuela e pela região Norte do Brasil, habitando preferencialmente pequenos rios e lagos de água preta da bacia do Rio Negro, podendo ser encontrada também em ambientes de água clara (Mittermeier e Wilson, 1974). De acordo com Vogt (2001), das três espécies de *Podocnemis* que ocorrem na bacia do Rio Negro, *P. erythrocephala* é a mais abundante, representando 85% dos quelônios capturados. Entretanto, dentre os

podocnemidídeos amazônicos, esta é a espécie menos conhecida do ponto de vista biológico, contribuindo para que fosse classificada pela IUCN como uma espécie vulnerável à extinção (IUCN, 2010).

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a morfologia e citoquímica das células sanguíneas de *Podocnemis erythrocephala*, fornecendo informações sobre o papel funcional destes diferentes tipos celulares.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção e aclimação dos animais**

Foram capturados 15 espécimes de irapuca, de ambos os sexos, com peso (média  $\pm$  DP) de  $442,9 \pm 31,5$  g e comprimento da carapaça de  $17,8 \pm 0,4$  cm. Os animais foram coletados com auxílio de rede de arrasto em lagos e igarapés do Arquipélago de Mariuá, médio Rio Negro, Amazonas. Em seguida, foram transportados até a Estação de Piscicultura da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ/INPA), onde permaneceram em aclimação em tanques de fibra de vidro por um período de 45 dias. Durante a aclimação, os animais foram alimentados duas vezes ao dia com vegetais (alface e couve) e com ração para peixe com 32% de proteína bruta, correspondendo a cerca de 5% do peso total dos animais.

### **Coleta sanguínea e análise morfológica das células**

Ao final da aclimação, os animais foram retirados da água e imobilizados através da revirada do corpo do animal. Após total imobilização, a amostra de sangue foi coletada através da punção da veia femoral utilizando seringas banhadas com heparina 5.000 UI e destinada à confecção de extensões sanguíneas.

As análises morfológicas das células do sangue foram feitas em extensões sanguíneas confeccionadas em lâminas de vidro previamente limpas com solução de etanol-éter. Em seguida, as extensões foram coradas com May Grunwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias e Moraes, 2003). Todas as extensões sanguíneas foram analisadas em microscópio óptico Olympus BX51 com câmera acoplada Olympus modelo DP72. Os eritrócitos, trombócitos e leucócitos tiveram o maior e menor diâmetro, bem como a área celular, mensurados com auxílio do programa de análise de imagens Cell<sup>D</sup>. Todas as células foram analisadas quanto

aos padrões de forma, tamanho e afinidade tintorial. As identificações e descrições morfológicas foram realizadas com base nos estudos de Claver e Quaglia (2009), Oliveira et al. (2011) e Stacy et al. (2011).

### **Determinação das reações citoquímicas das células sanguíneas**

As análises citoquímicas das células sanguíneas foram feitas em extensões sanguíneas submetidas a processos de coloração específicos para cada reação. A identificação das proteínas básicas foi realizada pelo método do azul de bromofenol de acordo com as recomendações de Mazia et al. (1953). A demonstração do glicogênio foi determinada pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS), de acordo com McManus (1946), utilizando amilase salivar para controle da especificidade (Lison, 1960). Os lipídeos foram identificados pelo teste de Sudan Black B, de acordo com Lison (1960). A peroxidase foi determinada pelo método da orto-toluidina-peróxido de hidrogênio, de acordo com as recomendações de Jacobs (1958). A metacromasia foi determinada pelo método de azul de toluidina (Tavares-Dias, 2006a) e os reticulócitos foram identificados com azul brilhante de cresil (Tavares-Dias, 2006b) e, posteriormente, corados com May Grunwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias e Moraes, 2003).

Todas as extensões sanguíneas foram analisadas em microscópio óptico Olympus, modelo BX51, em aumento de 1.000x. As reações citoquímicas foram classificadas de acordo com a intensidade da coloração em negativa (-), positiva-fraca (+/-), positiva (+) e positiva-forte (++)

## **RESULTADOS**

Nas extensões sanguíneas de *P. erythrocephala* coradas com May Grunwald-Giemsa-Wright (MGGW) foram identificados sete tipos celulares: eritrócitos, trombócitos, linfócitos, azurófilos, heterófilos, eosinófilos e basófilos. As medidas das células sanguíneas estão presentes na Tabela 1, enquanto que os resultados das reações citoquímicas das diferentes células presentes no sangue da irapuca estão presentes na Tabela 2.

Tabela 1. Diâmetro maior, diâmetro menor e área (média  $\pm$  desvio padrão) das células sanguíneas de *Podocnemis erythrocephala* do médio Rio Negro, Brasil. N = número total de células analisadas.

Células	N	Medições		
		Diâmetro maior ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro menor ( $\mu\text{m}$ )	Área ( $\mu\text{m}^2$ )
Eritrócitos	200	18,89 $\pm$ 1,50	11,29 $\pm$ 1,07	167,75 $\pm$ 23,03
Trombócitos	150	15,14 $\pm$ 2,47	6,69 $\pm$ 0,83	72,11 $\pm$ 14,30
Linfócitos	150	12,90 $\pm$ 1,79	10,21 $\pm$ 1,14	98,43 $\pm$ 14,89
Heterófilos	150	15,76 $\pm$ 1,68	14,31 $\pm$ 1,44	171,54 $\pm$ 30,85
Eosinófilos	100	14,84 $\pm$ 2,03	12,30 $\pm$ 2,02	139,07 $\pm$ 36,37
Basófilos	80	12,62 $\pm$ 1,86	11,89 $\pm$ 1,86	113,14 $\pm$ 33,06
Azurófilos	50	11,01 $\pm$ 1,43	9,37 $\pm$ 1,14	78,43 $\pm$ 18,36

Tabela 2. Intensidade das reações citoquímicas obtidas para as células sanguíneas de *Podocnemis erythrocephala* do médio Rio Negro, Brasil.

Reações citoquímica	Eritrócitos	Trombócitos	Leucócitos				
			Linfócitos	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos	Azurófilos
Proteínas básicas	-	-	-	+	+/-	+	-
Glicogênio	-	+	+	+	+	-	+/-
Lipídeos	-	-	-	+	+	+	+
Peroxidase	-	-	-	++	++	+	+/-
Metacromasia	-	-	-	-	-	+	-
Reticulócitos	+	-	-	-	-	-	-

- : reação negativa; +/- : reação positiva-fraca; + : reação positiva; ++: reação positiva-forte.

Os eritrócitos (Figura 1-A) maduros apresentaram tamanho, forma e coloração homogênea, não sendo observadas células irregulares ou com indícios de poiquilocitose. O formato da célula foi tipicamente oval apresentando área de 167,75  $\pm$  23,03  $\mu\text{m}^2$  (Tabela 1). O núcleo foi central e alongado, apresentando pólos arredondados ou irregulares. O maior

diâmetro do núcleo foi posicionado paralelamente ao maior diâmetro da célula. No interior do núcleo dos eritrócitos foi observada cromatina densa e com coloração variando do azul ao roxo escuro. Eventualmente foram encontrados eritrócitos infectados por gametócitos de um hemoparasita intraeritrocitário da família Haemogregarinidae, com o núcleo deslocado lateralmente (Figura 1-A). O citoplasma foi abundante e acidofílico com coloração variando do alaranjado ao rosa.

Os eritrócitos apresentaram reação negativa para as reações citoquímicas de proteínas básicas, glicogênio, lipídeos e peroxidase. A coloração de azul brilhante de cresil revelou uma grande quantidade de filamentos basofílicos de ribonucleoproteínas no citoplasma de algumas células, característica de eritrócitos imaturos, denominados de reticulócitos (Figura 2-L).

Os trombócitos (Figura 1-B) apresentaram área celular inferior às demais células (Tabela 1) e formato variando de elipsóide a circular. O citoplasma foi escasso, sem presença de grânulos e levemente acidofílico com coloração hialina ou rosa claro. O núcleo, disposto no centro da célula, geralmente acompanhou o formato da célula, podendo ser oval ou circular e com cromatina densa e de coloração azul clara a roxa. Os trombócitos apresentaram reação positiva para glicogênio (Figura 2-I) e negativa para as demais reações citoquímicas.

Os linfócitos (Figura 1-C) apresentaram tamanho inferior aos eritrócitos (Tabela 1). O formato variou de circular a amorfo, com citoplasma escasso e basofílico de coloração azul claro, circundando um núcleo largo posicionado centralmente na célula. Os linfócitos apresentaram reação positiva para glicogênio e negativa para as demais reações citoquímicas.

Os azurófilos (Figura 1-D) apresentaram tamanhos e formatos variados com área média de  $78,43 \pm 18,36 \mu\text{m}^2$  (Tabela 1). O citoplasma apresentou bordas distintas com coloração característica variando de azul claro a escuro. Foi observada a presença de finos grânulos azurofílicos. O núcleo apresentou tamanho grande, formato redondo ou oval e posição excêntrica. Os azurófilos apresentaram reação positiva para lipídeos (Figura 2-E) e positiva-fracamente para peroxidase e glicogênio. As colorações de proteínas básicas e metacromasia foram negativas.

Os heterófilos (Figura 1-E) são células de grande porte, podendo ser maior que os eritrócitos e com área média de  $171,54 \pm 30,85 \mu\text{m}^2$  (Tabela 1). O formato foi predominantemente circular, com citoplasma preenchido por grânulos fusiformes brilhantes de coloração variando de alaranjado a rosa. O núcleo apresentou coloração azul clara, disposição excêntrica e formato redondo ou oval, podendo ocasionalmente ser segmentado. Estas células apresentaram reação positiva para proteínas básicas (Figura 2-B) e glicogênio

(Figura 2-H), bem como reação positiva-forte para peroxidase (Figura 2-J) e positiva-fraca para lipídeos (Figura 2-G). As demais colorações foram negativas.

Os eosinófilos (Figura 1-E) apresentaram tamanhos variados, mas relativamente menores aos heterófilos, com área média de  $139,07 \pm 36,37 \mu\text{m}^2$  (Tabela 1). As células apresentaram formato variando de circular a oval. O citoplasma foi abundante e preenchido por grânulos circulares acidofílicos com coloração variando de alaranjado a rosa. O núcleo apresentou coloração azul clara, disposição excêntrica e formato variando de circular a oval, podendo raramente ser segmentado. Citoquimicamente, os eosinófilos apresentaram reação positiva-forte para peroxidase (Figura 2-J), reação positiva para proteínas básicas (Figura 2-B) e glicogênio (Figura 2-H) e reação positiva-fraca para lipídeos (Figura 2-D). As demais colorações foram negativas.

Os basófilos (Figura 1-F) apresentaram tamanhos variados, com área média de  $113,14 \pm 33,06 \mu\text{m}^2$ , sendo encontradas células menores aos eritrócitos e de porte semelhante aos heterófilos (Tabela 1). O formato foi predominantemente esférico e raramente oval. O citoplasma foi abundante e preenchido com grânulos esféricos basofílicos de coloração roxa e tamanhos variados. O núcleo circular e excêntrico geralmente foi coberto pelos grânulos citoplasmáticos, dificultando a visualização. Os basófilos apresentaram reação positiva para proteínas básicas (Figura 2-A), lipídeos (Figura 2-F), peroxidase (Figura 2-K) e metacromasia (Figura 2-C). Embora os basófilos corados com PAS tenham apresentado grânulos (Figura 2-I), a marcação de glicogênio foi considerada negativa, pois nas extensões sanguíneas tratadas com amilase salivar, onde o glicogênio foi inteiramente absorvido, também foi observada reação positiva para o PAS neste tipo celular.

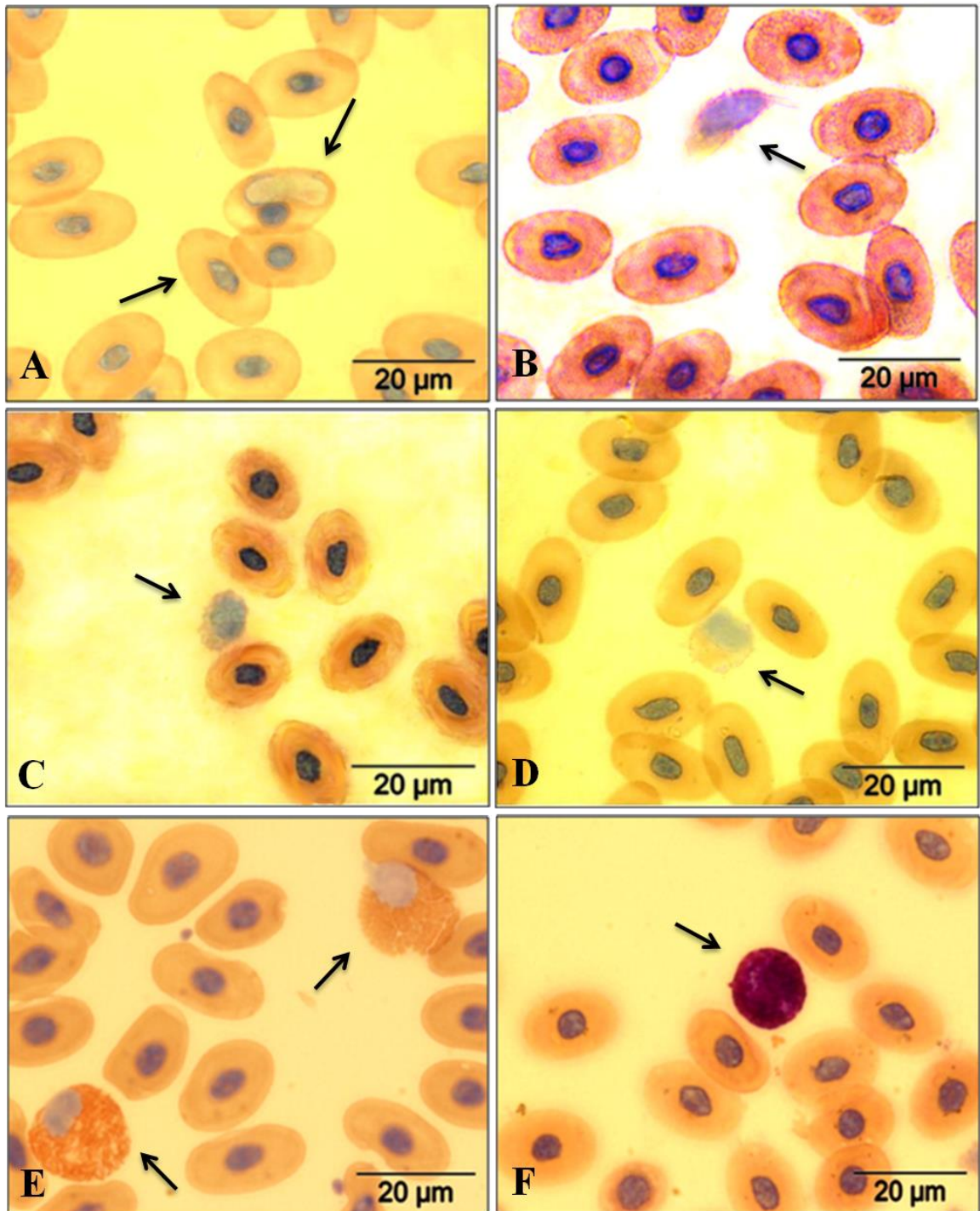


Figura 1. Fotomicrografias das células sanguíneas de *Podocnemis erythrocephala* coradas com MGGW. Eritrócito (A, seta inferior), eritrócito com núcleo deslocado pela presença de hemoparasita (A, seta superior), trombócito (B), linfócito (C), azurófilo (D), heterófilo (E, seta inferior), eosinófilo (E, seta superior) e basófilo (F).



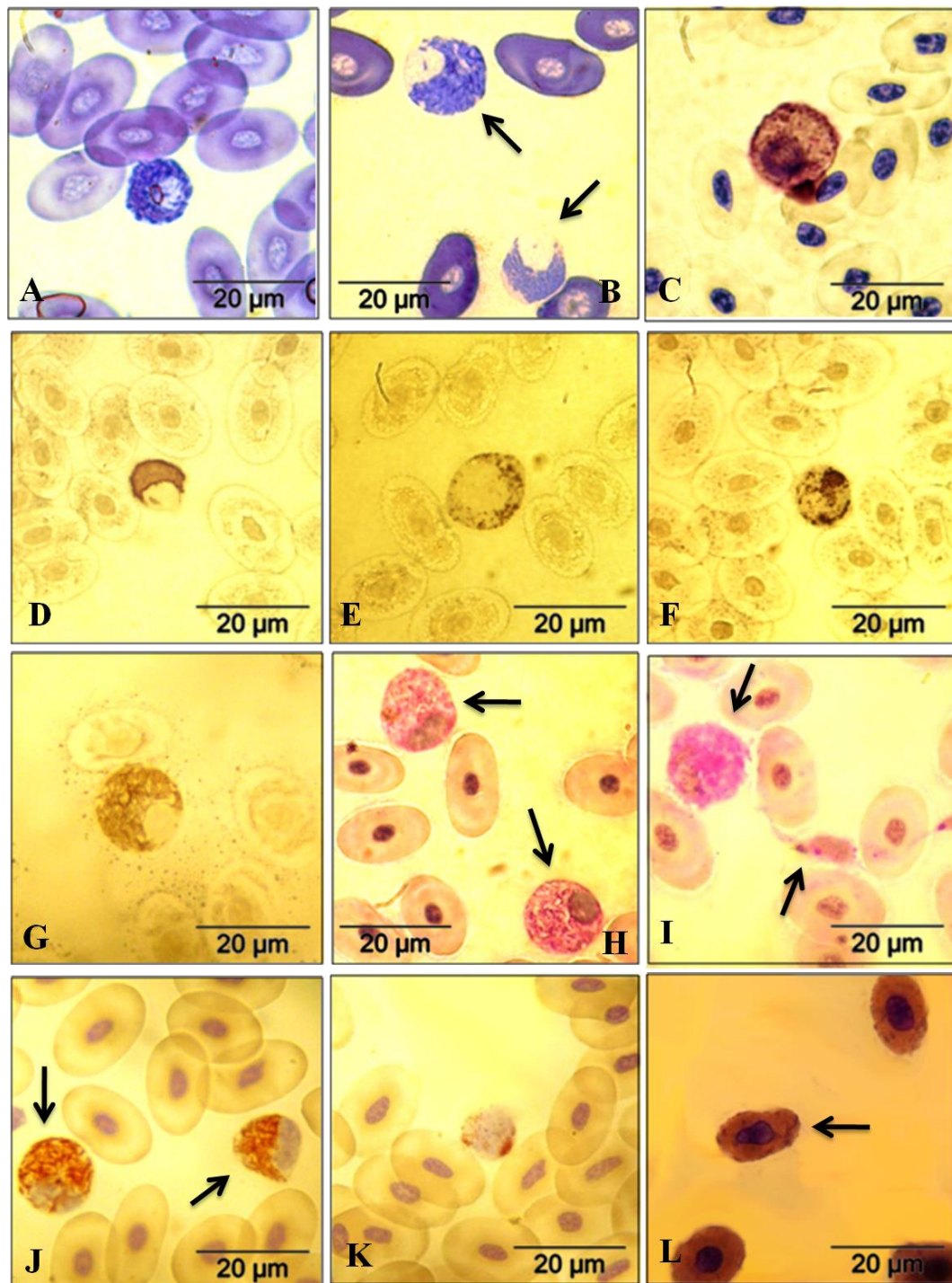


Figura 2. Fotomicrografias das reações citoquímicas das células sanguíneas de *Podocnemis erythrocephala*. Basófilo (A), eosinófilo (B, seta inferior) e heterófilo (B, seta superior) corados com azul de bromofenol; basófilo (C) corado com azul de toluidina; eosinófilo (D), azurófilo (E), basófilo (F) e heterófilo (G) corados com Sudan Black B; eosinófilo (H, seta superior), heterófilo (H, seta inferior), basófilo com marcação falso-positiva (I, seta superior) e trombócito (I, seta inferior) corados com PAS; heterófilo (J, seta esquerda), eosinófilo (J, seta direita) e basófilo (K) corados com orto-toluidina-peróxido de hidrogênio; reticulócito (L) corado com azul brilhante de cresil (seta).

## DISCUSSÃO

Oliveira-Júnior et al. (2009) estudando o sangue de adultos de *Podocnemis expansa*, identificaram e caracterizaram sete tipos celulares: eritrócitos, trombócitos, linfócitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e azurófilos. Oliveira et al. (2011), estudando os aspectos morfológicos e citoquímicos das células sanguíneas de recém-eclodidos de *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata*, também encontraram os mesmos tipos celulares nas três espécies. As características morfológicas das células sanguíneas de *P. erythrocephala* foram semelhantes às descritas para as demais espécies de podocnemídeos e sugerem que os animais do gênero *Podocnemis* apresentam um padrão conservativo em relação aos aspectos morfológicos de suas células sanguíneas.

Com exceção dos azurófilos, os demais tipos celulares também foram identificados em outras espécies de quelônios, tais como *Caretta caretta* (Casal e Oros, 2007), *Mauremys caspica* e *M. rivulata* (Metin et al., 2008) e *Ocadia sinensis* (Chung et al., 2009). Segundo Stacy et al. (2011), os azurófilos são variações dos monócitos, existindo apenas em répteis e sendo frequentemente encontrados em squamatas e crocodilianos e, ocasionalmente, em quelônios. A presença de azurófilos e monócitos foi relatada no sangue de *Gorpherus agassizii* (Alleman et al., 1992) e *Agrionemys horsfieldi* (Knotkova et al., 2002), enquanto que os demais quelônios geralmente apresentam apenas um dos tipos celulares, sejam os azurófilos (Oliveira-Júnior, 2009; Tavares-Dias et al., 2009; Oliveira et al., 2011) ou monócitos (Casal e Oros, 2007; Metin et al., 2008; Chung et al., 2009).

Em relação aos leucócitos granulócitos, a presença de eosinófilos, heterófilos e basófilos foi relatada em várias espécies (Knotkova et al., 2002; Azevedo e Lunardi, 2003; Casal e Oros, 2007; Metin et al., 2008; Chung et al., 2009; Oliveira-Júnior et al., 2009 e Oliveira et al., 2011). Entretanto, Wood e Ebanks (1984), Cannon (1992) e Pistol et al. (2007) relataram a presença de eosinófilos, basófilos e neutrófilos no sangue de *Chelonia mydas*, *Lepidochelys kempi* e *Phrynops hilarii*, respectivamente. Segundo Canfield (1998), Claver e Quaglia (2009) e Stacy et al. (2011), os répteis não possuem neutrófilos na corrente sanguínea, sendo os heterófilos funcionalmente análogos aos neutrófilos dos mamíferos. Work et al. (1998) considera a presença dos neutrófilos nas extensões sanguíneas como artefato e suspeita que os neutrófilos descritos por Wood e Ebanks (1984) sejam, na verdade, eosinófilos degranulados. Oliveira et al. (2011) complementam afirmando que a classificação dos neutrófilos está incorreta caso haja a presença de grânulos heterofílicos no interior celular.

Tendo em vista as informações imprecisas existentes na literatura, a citoquímica é considerada uma ferramenta de grande utilidade para a identificação e descrição morfológica das células, elucidando as discrepâncias existentes na literatura quanto às classificações celulares baseadas somente na microscopia de luz (Ueda et al., 2001).

Citoquimicamente, os eritrócitos de irapuca apresentaram reações negativas para todas as colorações, com exceção da coloração com azul brilhante de cresil, que cora reticulócitos. A análise de reticulócitos revelou a presença de filamentos no citoplasma, que consistem em resíduos de RNA ribossomal, distribuídos em bandas estreitas ou compactados de maneira densa. De acordo com Lee et al. (1999), a quantidade de retículos e o grau de maturidade celular são inversamente proporcionais, sendo observadas grandes quantidades de retículos nas células mais jovens ou imaturas. Em condições nas quais haja uma redução da concentração de hemoglobina ou de eritrócitos, os reticulócitos tendem a ser liberados precocemente na corrente sanguínea (Lee et al., 1999) e, nesse sentido, o acompanhamento do número de reticulócitos circulantes pode fornecer informações sobre a atividade eritropoiética e, conseqüentemente, sobre o estado de saúde dos animais. Em humanos, a reticulocitose e reticulopenia têm sido utilizadas para a identificação de anemias regenerativas ou não-regenerativas (Pierre, 2002), assim como para a identificação de doenças hemolíticas, auto-imunes, mieloproliferativas e linfoproliferativas (Simmons, 1997). Entretanto, em outros vertebrados, esta análise ainda tem sido utilizada de forma incipiente (Tavares-Dias, 2006b).

A reação do ácido periódico de Schiff (PAS) é um indicador da presença de carboidratos na célula, principalmente glicogênio, mucoproteínas e glicolipídeos (Hulme-Moir e Clark, 2010; Shigdar et al., 2009). De acordo com Ueda et al. (2001) e Tavares-Dias et al. (2006b), esses polissacarídeos são utilizados como fonte energética endógena durante o processo de fagocitose. Este fato foi comprovado por Lamas et al. (1994), na truta *Oncorhynchus mykiss*, onde os neutrófilos dos animais infectados com *Vibrio anguillarum* apresentaram coloração positiva para o PAS durante o processo fagocítico, ao contrário dos neutrófilos dos animais não infectados. No presente trabalho, os linfócitos, heterófilos, eosinófilos e trombócitos apresentaram reação PAS-positiva, enquanto que os azurófilos apresentaram reação positiva-fracas. O controle de especificidade com amilase salivar comprovou que os basófilos apresentaram reação PAS falso-positiva, que provavelmente foi induzida pela presença de ácidos glicosaminoglicanos e de fosfolipídeos no interior celular (Lorenzi, 1999). Oliveira et al. (2011) observaram reação PAS-positiva em linfócitos, heterófilos, basófilos, trombócitos e azurófilos de recém-eclodidos de *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata*, entretanto, em *P. unifilis* os heterófilos apresentaram reação PAS positiva-

fraca. Coloração PAS-positiva também foi observada em eosinófilos e linfócitos de *Lepidochelys kempi* (Cannon, 1992), em monócitos, trombócitos, heterófilos e eosinófilos de *Chelonia mydas* (Work et al., 1998), em eosinófilos e trombócitos de *Caretta caretta* (Casal e Oros, 2007), assim como em trombócitos de *Ocadia sinensis* (Chung et al., 2009). A marcação PAS-positiva em leucócitos se justifica pela necessidade energética para a realização das ações de defesa que estas células desempenham no organismo. Por outro lado, os trombócitos também apresentaram glicogênio armazenado em seu interior, indicando que, além da função de coagulação, essas células possuem um potencial fagocítico, fato este comprovado em *Phrynopys hilarii* (Pellizzon e Lunardi, 2000).

A reação de azul de bromofenol é utilizada para a coloração de proteínas básicas que, em *P. erythrocephala* apresentou reação positiva em heterófilos e basófilos e positiva-fraca nos eosinófilos. Marcações positivas de proteínas também foram encontradas em heterófilos, eosinófilos e basófilos de recém-eclodidos de *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* (Oliveira et al., 2011) e em heterófilos e eosinófilos de *Chrysemys dorbignih* (Azevedo e Lunardi, 2003). As proteínas básicas presentes nos grânulos leucocitários possuem função enzimática de defesa contra microorganismos (Moura et al., 1999), sendo os grânulos eosinofílicos constituídos pela proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica, peroxidase eosinofílica e neurotoxina derivada do eosinófilo (Azevedo e Lunardi, 2003), enquanto que os heterófilos possuem as proteínas de aumento de permeabilidade/bactericida (Azevedo e Lunardi, 2003) e os basófilos contêm as histaminas e proteoglicanos (Winqvist, 1960).

A coloração de Sudan Black B possui alta afinidade por lipídeos, corando os glicerídeos, esteróis e fosfolipídeos presentes no interior das células e nas membranas dos grânulos citoplasmáticos (Shigdar et al., 2009). Segundo Lorenzi (1999), os leucócitos fagocíticos utilizam os lipídeos, bem como o glicogênio, como fonte energética, através da atuação das enzimas citoplasmáticas. Sudanofilia foi observada em heterófilos, eosinófilos, basófilos e azurófilos de *P. erythrocephala*, bem como em heterófilos e eosinófilos de recém-eclodidos de *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* (Oliveira et al., 2011) e de *C. caretta* (Casal e Oros, 2007), assim como em eosinófilos de *L. kempi* (Cannon, 1992). Por outro lado, todas as células sanguíneas de *G. agassizii* (Alleman et al., 1992) e de *C. mydas* (Work et al., 1998) apresentaram reação negativa para lipídeos.

A peroxidase é uma enzima lisossômica com importante função na resposta imune inata dos organismos, participando da digestão intracelular, modulação da atividade fagocítica e atuação no mecanismo de defesa contra infecções bacterianas (Ueda et al., 2001; Tavares-

Dias e Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006b; Araújo et al., 2009). Segundo Abreu (2007), a peroxidase tem um importante papel durante a fagocitose, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) a partir da transformação de peróxido de hidrogênio em hipoclorito e da produção de cloraminas. Todas estas EROs são altamente oxidantes aos microorganismos e contribuem ativamente para a sua destruição.

Em *P. erythrocephala*, a coloração de orto-toluidina-peróxido de hidrogênio apresentou marcação positiva-forte em heterófilos e eosinófilos, reação positiva em basófilos, bem como fraco-positiva em azurófilos. Estes resultados comprovam que os heterófilos e eosinófilos são as principais células de defesa contra bactérias na irapuça e que os basófilos e azurófilos exercem ação complementar nesta atividade. Oliveira et al (2011) encontraram reações positivas para a peroxidase em heterófilos, eosinófilos e azurófilos de recém-eclodidos de *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata*, sendo que em *P. expansa* a marcação nos eosinófilos foi positiva-forte. Marcações positivas também foram encontradas em heterófilos e eosinófilos de *C. dorbignih* (Azevedo e Lunardi, 2003), assim como em heterófilos de *C. caretta* (Casal e Oros, 2007) e em eosinófilos de *G. agassizii* (Alleman et al., 1992) e de *L. kempfi* (Cannon, 1992). Chung et al. (2009) encontraram reação positiva-forte em eosinófilos e basófilos e positiva-fraca em heretófilos de *O. sinensis*. Por outro lado, as células sanguíneas de *C. mydas* apresentaram reação negativa para este constituinte citoquímico (Work et al., 1998).

A coloração de azul de toluidina tem sido utilizada para identificação e quantificação de basófilos no sangue de vários animais (Tavares-Dias, 2006a; Oliveira et al. 2011). Este corante reage com os ácidos glicosaminoglicanos presentes no interior dos basófilos sofrendo uma reação metacromática, com formação de grânulos avermelhados. Os basófilos de *P. erythrocephala* apresentaram reação positiva em contato com o azul de toluidina. Resultados semelhantes foram encontrados em basófilos de exemplares recém-eclodidos de *P. expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* (Oliveira et al., 2011), de *C. mydas* (Work et al., 1998), de *C. caretta* (Casal e Oros, 2007) e de *G. agassizii* (Alleman et al., 1992).

Em conclusão, os resultados deste trabalho indicam que os animais do gênero *Podocnemis* apresentam um padrão conservativo quanto à linhagem, morfologia e citoquímica de suas células sanguíneas. As análises citoquímicas possibilitaram a elucidação do papel funcional dos tipos celulares de *P. erythrocephala*, demonstrando que os heterófilos, eosinófilos e basófilos são as células mais ativas do sistema imunológico, estando diretamente relacionados com a atividade fagocítica. Os azurófilos também apresentaram indícios de atividade fagocítica, entretanto, de forma complementar aos leucócitos granulócitos. A

presença de grânulos de glicogênio nos trombócitos sugere uma possível função fagocítica na irapuca, entretanto, mais estudos são necessários para a confirmação desse tipo de função.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ/INPA) pela estrutura oferecida para a manutenção das irapucas. Ao Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos (LCIA/INPA) pela disponibilidade durante a obtenção das fotomicrografias das células. Ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 408795/2006-9) pelo suporte financeiro deste projeto. O primeiro autor agradece a concessão da bolsa de Mestrado pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas (FAPEAM).

## REFERÊNCIAS

- Abreu, J.S. 2007. *Suplementação alimentar de pacu (Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887) com  $\beta$  1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura*. Tese de Doutorado (Aquicultura), Universidade Estadual Paulista. 123p.
- Alleman, A.R.; Jacobson, E.R.; Raskin, R.E. 1992. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *American Journal of Veterinary Research*, 53: 1645-1651.
- Araújo, C.S.O.; Tavares-Dias, M.; Gomes, A.L.S.; Andrade, S.M.S.; Lemos, J.R.G.; Oliveira, A.T.; Cruz, W.R.; Affonso, E.G. 2009. Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimatidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: Tavares-Dias, M (Org) *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*, vol 1. Embrapa Amapá Macapá, pp 389-424.
- Azevedo, A.; Lunardi, L.O. 2003. Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of the turtle (*Chrysemys dorbignii*). *Acta Histochemica*, 105: 99-105.
- Canfield, P.J. 1998. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Australian Veterinary Journal*, 76: 793-800.
- Cannon, M.S. 1992. The morphology and cytochemistry of the blood leukocytes of Kemps Ridley Sea turtle (*Lepidochelys kempi*). *Canadian Journal of Zoology*, 70: 1336-1340.

- Casal, A.B.; Oros, J. 2006. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells of juvenile loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Research in Veterinary Science*, 82:158-165.
- Chung, C.; Cheng, C.; Chin, S.; Lee, A.; Chi, C. 2009. Morphologic and cytochemical characteristics of asian yellow pond turtle (*Ocadia sinensis*) blood cells and their hematologic and plasma biochemical reference values. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40: 76–85.
- Claver, J.A.; Quaglia, A.I.E. 2009. Comparative morphology, development and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(2): 87-97.
- Hulme-Moir, K.L.; Clark, P. 2010. Cytochemistry of leukocytes from the family Macropodidae. *Comparative Clinical Pathology*, in press.
- IUCN 2010. *IUCN Red List of Threatened Species*. Versão 2010.4. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acessado em 14 de Novembro de 2010.
- Jacobs, A. 1958. Staining for leucocyte peroxidase. *Lancet*, 1: 697.
- Kelényi, G.; Németh, A. 1969. Comparative histochemistry and electron microscopy of the eosinophil leukocytes of vertebrates. A study of avian, reptile, amphibian and fish leukocytes. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 20: 405-422.
- Knotkova, K.; Doubek, J.; Knotek, Z.; Hajkova, P. 2002. Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agrionemys horsfieldi*). *Acta Veterinaria Brno*, 71: 191-198.
- Lamas, J.; Santos, Y.; Bruno, D.W.; Toranzo, A.E.; Anadon, R. 1994. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its e intracellular products (ECPs). *Journal of Fish Biology*, 45(5): 839-854.
- Lee, G.R.; Foerster, J.; Lukons, J.; Paraskevar, F.; Greer, J.P.; Rodgers, G.M. 1999. *Wintrobe's Clinical Haematology*, 10 ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 2764p.
- Lison, L. 1960. Lipides et lipoproteines. In: Lison, L (Ed.). *Histochemie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. GauthirVillars, Paris, França. p. 449-530.
- Lorenzi, T.F. 1999. *Manual de hematologia propedêutica e clínica*. São Paulo: MDSI. 641p.
- Mazia, D.; Brewer, P.A.; Alfert, M. 1953. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. *Biological Bulletin*, 104: 57-67.
- McDaniel, R.C.; Grunow, W.A.; Daly, J.J.; Plummer, M.V. 1987. Thrombocyte phagocytosis in a Yellow-Bellied Water Snake (*Nerodia erythrogaster flavigaster*). *Transactions of the American Microscopical Society*, 106(3): 273-276.
- McManus, J.F.A. 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 158: 202.
- McManus, P.M. 2005. Classification of myeloid neoplasms: a comparative review. *Veterinary Clinical Pathology*, 34: 189-212.

- Metin, K.; Basimoglu Koca, Y.; Kargin Kiral, F.; Koca, S. 2008. Blood cell morphology and plasma biochemistry of captive *Mauremys caspica* (Gmelin, 1774) and *Mauremys rivulata* (Valenciennes, 1833). *Acta Veterinaria Brno*, 77: 163-174.
- Mittermeier, R.A.; Wilson, R.A. 1974. Redescription of *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824), an Amazonian Pelomedusid turtle. *Papeis Avulsos de Zoologia*: 28: 147-162.
- Moura, W.L.; Matushima, E.R.; Oliveira, L.W.; Egami, M.I. 1999. Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sanguíneos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodylia). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 36(1): 45-50.
- Oliveira, A.T.; Cruz, W.R.; Lima, J.P.; Araújo, S.B.; Araújo, M.L.G.; Marcon, J.L.; Tavares-Dias, M.T. 2011. Morphological and cytochemical characterization of thrombocytes and leukocytes in hatchlings of three species of Amazonian freshwater turtles. *Veterinarski arhiv*, in press.
- Oliveira-Junior, A.A.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L. 2009. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Research in Veterinary Science*, 86: 146-151.
- Pellizzon, C.H.; Lunardi, L.O. 2000. Endocytic activity in the thrombocytes of the turtle *Phrynops hilarii* (freshwater South American species). *Journal of Submicroscopic, Cytology, and Pathology*, 32: 651-656.
- Pierre, R.V. 2002. Reticulocytes: their usefulness and measurement in peripheral blood. *Clinics in Laboratory Medicine*, 22(1): 63-79.
- Pistol, D.L.; Issa, J.P.M.; Caetano, F.H.; Lunardi, L.O. 2007. Morphological characterization of the leukocytes in circulating blood of the turtle (*Phrynops hilarii*). *International Journal of Morphology*, 25: 677-682.
- Salakij, C.; Salakij, J.; Narkkong, N.A. 2003. Hematology and ultrastructure of blood cells in banded krait (*Bungarus fasciatus*). *Journal of Electron Microscopy Society of Thailand*, 17: 55-60.
- Satake, F.; Pádua, S.B.; Ishikawa, M.M. 2009. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: Tavares-Dias, M (Org) *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*, vol 1. Embrapa Amapá Macapá, pp 330-345.
- Shigdar, S.; Harford, A.; Ward, A.C. 2009. Cytochemical characterisation of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*, Mitchell). *Fish & Shellfish Immunology*, 26(5): 731-736.
- Simmons, A. 1997. *Hematology: A combined theoretical and technical approach*, 2. ed., EUA: Butterworth-Heinemann. 507p.
- Stacy, N.I.; Alleman, R.; Sayler, K.A. 2011. Diagnostic hematology of reptiles. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31(1): 87-108.



- Tavares-Dias, M. 2006a. Cytochemical method for staining fish basophils. *Journal of Fish Biology*, 69: 312-317.
- Tavares-Dias, M. 2006b. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 68, 1822-1833.
- Tavares-Dias, M.; Barcellos, J.F.M. 2005. Peripheral blood cells of the armored Catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: A morphological and cytochemical study. *Brazilian journal of morphological sciences*, 26: 157-162.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2003. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal*, 19: 103-110.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Veterinary Clinical Pathology* 36, 49-54.
- Tavares-Dias, M.; Oliveira-Junior, A.A.; Silva, M.G.; Marcon, J.L.; Barcellos, J.F.M. 2009. Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the Amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Veterinarski Arhiv*, 79: 601-610.
- Ueda, I.K.; Egami, M.I.; Sasso, W.S.; Matushima, E.R. 2001. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei). Part II. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38: 273-277.
- Vogt, R.C. 2001. Turtles of the Rio Negro. In: Chao, N.L.P.; Prang, G.; Sonneschien, L.; Tlustý, M. (Eds.). *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Projeto Piaba*. Editora da Universidade Federal do Amazonas: Manaus. p.245-264.
- Winqvist, G. 1960. The ultrastructure of the granules of the basophil granulocyte. *Cell and Tissue Research*, 52(4): 475-481.
- Wood, F.E.; Ebanks, G.K. 1984. Blood cytology and hematology of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. *Herpetologica*, 40: 331-336.
- Work, T.M.; Raskin, R.E.; Balazs, G.H.; Whittaker, S.D. 1998. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells from Hawaiian green turtles. *American Journal of Veterinary Research*, 59: 1252-1257.

### **CAPÍTULO 3**

#### **EFEITO DO Mergulho Forçado sobre os Parâmetros Hematológicos da Irapuca *Podocnemis erythrocephala* Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae)**

**Efeito do mergulho forçado sobre os parâmetros hematológicos da irapuca *Podocnemis erythrocephala* Spix, 1824 (Testudines, Podocnemididae)**

Marcio Quara de Carvalho Santos<sup>1</sup>, Adriano Teixeira de Oliveira<sup>1</sup>, Jefferson Raphael Gonzaga Lemos<sup>1</sup>, Elizabeth Gusmão Affonso<sup>2</sup>, Jaydione Luiz Marcon<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM); <sup>2</sup>Coordenação de Pesquisas em Aquicultura, Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA); <sup>3</sup>Laboratório Fisiologia, Departamento de Ciências Biológicas, UFAM.

**RESUMO**

Embora os quelônios sejam reconhecidos pela notável habilidade de realizar mergulhos prolongados, estes animais apresentam altas taxas de mortalidade devido ao emaranhamento nas redes de pesca, impedindo-os de emergir à superfície para a captação de oxigênio. Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil hematológico de *Podocnemis erythrocephala* em resposta a diferentes tempos de mergulho forçado. Os animais foram submetidos a dois períodos de submersão forçada: 30 e 60 minutos. Após o término da submersão, foram coletadas amostras sanguíneas, enquanto que no grupo controle, o sangue foi coletado imediatamente após a captura dos animais. Não foram observadas alterações significativas ( $p < 0,05$ ) no hematócrito, hemoglobina, número de eritrócitos, índices hematimétricos e as concentrações plasmáticas de proteínas totais, glicose, sódio e potássio em função dos diferentes tempos de mergulho forçado. O lactato plasmático apresentou níveis crescentes ao longo do tempo de submersão, sendo observados valores aproximadamente 4 vezes mais elevados nos animais submergidos por 60 minutos em relação aos animais em normóxia. As concentrações de colesterol total, ácido úrico, uréia, cloreto, cálcio e magnésio apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) após 30 e 60 minutos de submersão, enquanto que os níveis de triglicerídeos diminuíram nestes mesmos animais, em comparação ao grupo controle. A aparente manutenção do equilíbrio ácido-base e a ausência de mortalidade demonstram que a irapuca é uma espécie tolerante a 60 minutos de submersão forçada. No entanto, os resultados indicam que períodos superiores podem ocasionar acidose metabólica e exaustão dos substratos energéticos, comprometendo a homeostasia e, conseqüentemente, a sobrevivência quando em submergência forçada.

**Palavras-chave:** anóxia, bioquímica plasmática, hematologia, *Podocnemis erythrocephala*, submersão

## INTRODUÇÃO

Os quelônios são animais reconhecidos pela notável habilidade de realizar mergulhos prolongados, sendo que o tempo de tolerância à anóxia pode variar entre as espécies, o tamanho e a temperatura da água (Crocker et al., 1999; Mathie e Franklin et al., 2006; Clark et al., 2008; Jackson e Ultsch, 2010). Em estudos laboratoriais, foi documentada a sobrevivência de *Chrysemys picta* em submersão em água livre de oxigênio em baixas temperaturas por até 6 meses (Jackson e Ultsch, 1982; Ultsch, 1985; 1989; Ultsch e Jackson, 1995), enquanto que em 20°C, o tempo de tolerância máxima à anóxia foi reduzido para 12 horas (Herbert e Jackson, 1985). Mathie e Franklin (2006) observaram que adultos de *Elseya albagula* apresentam maior tempo médio de duração do mergulho em águas com baixas concentrações de oxigênio, em comparação aos recém-eclodidos e juvenis. Clark et al. (2008) estudaram o efeito do tamanho dos animais sobre a duração média do mergulho em espécies de tartarugas de água doce e verificaram que recém-eclodidos de *Emydura signata*, *Elseya latisternum* e *Elusor macrurus* apresentaram menor tempo na duração do mergulho, ao contrário de *Elseya albagula*, em que o tempo de mergulho foi menor nos juvenis.

Essa tolerância dos quelônios à hipóxia ou anóxia é resultado da combinação de características cardiovasculares e ventilatórias que garantem uma oxigenação adequada, aliadas à ajustes metabólicos, como a diminuição da demanda de oxigênio pelos tecidos e acionamento do metabolismo anaeróbico e do hipometabolismo (Bickler e Buck, 2007). De acordo López-Mendilaharsu e Rocha (2009), a tartaruga marinha *Dermochelys coriacea*, realiza ajustes no fluxo sanguíneo, na atividade cardíaca e no acúmulo de oxigênio nos músculos e no sangue para realizar mergulhos profundos e prolongados. Algumas espécies de água doce, como *Rheodytes leukops* e *E. albagula*, possuem a capacidade de utilizar a respiração aquática para permanecer em aerobiose durante a submersão, aumentando significativamente a duração do mergulho (Gordos et al., 2004; Mathie e Franklin, 2006). Já as espécies de águas temperadas *C. picta* e *Trachemys scripta* entram em hibernação, permanecendo submersas em condições de anóxia durante meses (Crocker et al., 1999).

Embora os quelônios apresentem extraordinária tolerância à anóxia, diversos trabalhos têm relatado que o uso inapropriado de redes de pesca tem gerado altas taxas de mortalidade desses animais por afogamento (Snoddy et al., 2009). De acordo com Gearhart (2001) e Price (2005), as interações com redes de pesca têm sido uma das principais causas de mortalidade de *Caretta caretta*, *Lepidochelys kempii* e *Chelonia mydas*, contribuindo para o declínio

populacional destas espécies no litoral da Carolina do Norte (EUA). Ao ficarem presos nas redes, os quelônios são submetidos à uma submersão forçada e, diferentemente dos ajustes realizados durante o mergulho voluntário, nestas situações as respostas fisiológicas adaptativas são diferenciadas. Essas diferenças ocorrem principalmente em função do comportamento agressivo que esses animais apresentam na tentativa de se libertarem das redes, acelerando o metabolismo e consumindo rapidamente as reservas de oxigênio do organismo, resultando em um baixo tempo de tolerância à anóxia. De forma complementar, Ware (1993) observou que durante o mergulho voluntário a taxa de batimento cardíaco de *T. scripta elegans* reduziu imediatamente após a submersão, enquanto que nos animais forçadamente submersos, essa redução ocorreu somente após 30 minutos de mergulho.

Na região Amazônica, o uso de redes de pesca para a captura de peixes comerciais é tradicionalmente utilizado pelas populações locais. Embora não existam informações na literatura sobre as taxas de mortalidade de quelônios amazônicos devido ao emaranhamento nas redes, foi observado, a partir de acompanhamentos sistemáticos e de relatos de pescadores, que esse valor pode ser elevado. Na bacia do médio Rio Negro, a irapuca, *Podocnemis erythrocephala*, é a principal vítima do emaranhamento nas redes de pesca, seja de forma acidental ou intencional. Além disso, os indivíduos adultos e os ovos dessa espécie constituem uma importante e tradicional fonte alimentar para as populações ribeirinhas da região amazônica, sendo capturados indiscriminadamente durante todo o ano. De acordo com Bernhard (2010), o uso de redes de arrasto e de técnicas de mergulho propiciou um aumento na captura de irapucas para o consumo e para a venda no mercado clandestino e, embora não existam registros quantitativos sobre o declínio de suas populações, pescadores locais relatam que tais práticas tem ocasionado uma diminuição no número de irapucas nos últimos anos.

Essa redução nos estoques naturais da irapuca, bem como sua distribuição restrita aos pequenos rios e lagos da bacia do Rio Negro e aos rios Tapajós e Trombetas (Mittermeier e Wilson, 1974; Hoogmed e Ávila-Pires, 1990), reforçam a importância de estudos sobre a biologia da espécie, visando a geração de informações que possam ser utilizadas durante a elaboração de planos de manejo e conservação. Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil hematológico de *P. erythrocephala* em resposta a diferentes tempos de mergulho forçado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Desenho experimental**

Os espécimes de irapuca (n=39) foram capturados durante a estação de seca em igarapés do Arquipélago de Mariuá, bacia do médio Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil. Os animais foram distribuídos em três grupos (n=13) e submetidos a diferentes períodos de mergulho forçado: 0 (controle), 30 e 60 minutos. O tempo 0 consistiu na coleta sanguínea imediatamente após a captura dos animais. Ao término de 30 e 60 minutos de mergulho forçado foram realizadas coletas sanguíneas por punção da veia femoral utilizando seringas contendo heparina (5.000 UI). Em seguida, foi feita a biometria de todos os animais, com aferimento do peso corpóreo (g), com auxílio de balança portátil do tipo Pesola<sup>®</sup>, e mensuração do comprimento e largura do plastrão e carapaça (cm), com auxílio de fita métrica.

Os tempos de 30 e 60 minutos foram selecionados com base nos resultados de Tavares-Dias et al. (2011) para *Podocnemis sextuberculata*, que é a espécie dentre os podocnemídeos amazônicos que possui porte próximo ao da irapuca.

Para garantir a manutenção das irapucas em submersão e evitar o contato dos animais com o ar atmosférico foi feito um pequeno furo na extremidade posterior da carapaça, no qual foi inserido um fio de nylon de 1 metro de comprimento que prendeu o animal a estruturas de ferro colocadas no fundo do igarapé com aproximadamente 1,5 metros de profundidade. Esse mecanismo garantiu a total submersão e possibilitou a locomoção dos animais dentro da coluna de água. Os animais foram submergidos próximos aos locais de captura, visando evitar possíveis interferências das variáveis físicas e químicas da água sobre os parâmetros sanguíneos.

### **Determinação dos parâmetros sanguíneos**

O hematócrito (Ht) foi determinado pelo método do microhematócrito utilizando tubo capilar heparinizado. A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando o reagente de Drabkin. A contagem de eritrócitos (RBC) foi feita em câmara de Neubauer, após a diluição do sangue em solução de formol-citrato. A partir dos valores de Ht, Hb e RBC de cada indivíduo, foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), seguindo as recomendações de Wintrobe (1934).

As concentrações de proteínas totais e glicose foram determinadas pelo método do biureto e da glicose oxidase, respectivamente (Kit Doles, GO). Triglicerídeos e colesterol total foram determinados pelo método enzimático-colorimétrico (Kit Doles, GO). Os níveis de lactato foram dosados pelo método da lactato oxidase (Kit Labtest, MG). A uréia foi determinada pelo método da urease (Kit Doles, GO), enquanto que o ácido úrico foi determinado pelo método da uricase (Kit Labtest, MG). Todas as análises foram lidas em espectrofotômetro Bioplus modelo Bio 2000, em comprimentos de onda específicos para cada constituinte. As concentrações plasmáticas de cálcio, magnésio e potássio foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica (PerkinElmer, 1100D, EUA), enquanto que os níveis de sódio e cloreto foram determinados pelo método colorimétrico (Kit In Vitro, MG e Doles, GO, respectivamente).

### **Monitoramento da qualidade de água**

Os níveis de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica e potencial hidrogeniônico das áreas de captura das irapucas foram mensurados com auxílio de um medidor multi-paramétrico (Orion 5-Star Plus, Thermo Scientific, EUA). Amostras de água foram coletadas para posteriores análises de alcalinidade e dureza total, pelo método titulométrico segundo Boyd e Tucker (1992), bem como de amônia total e nitrito, pelos métodos espectrofotométricos de Verdouw et al. (1978) utilizando salicilato-hipoclorito e de Boyd e Tucker (1992), respectivamente.

### **Análise estatística**

Inicialmente todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homocedasticidade de Levene. As comparações entre os diferentes tempos de mergulho forçado foram realizadas mediante a análise de variância (one-way ANOVA), para os dados paramétricos, e pelo teste de Kruskal-Wallis (KW-ANOVA), para os dados não paramétricos. Os parâmetros que apresentaram diferenças significativas na ANOVA e KW-ANOVA foram submetidos ao teste de Tukey e de Dunn, respectivamente. Todas as análises foram realizadas ao nível de 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade da água dos locais de submersão forçada das irapucas apresentaram os seguintes valores (n=4; média  $\pm$  DP): oxigênio dissolvido ( $5,1 \pm 0,6$  mg/L), temperatura ( $32,5 \pm 0,7$  °C), pH ( $5,2 \pm 0,1$ ), condutividade elétrica ( $11,9 \pm 1,7$   $\mu$ S/cm), amônia total ( $0,024 \pm 0,013$  mg/L), nitrito ( $0,013 \pm 0,002$  mg/L), alcalinidade ( $1,4 \pm 0,3$  mg CaCO<sub>3</sub>/L) e dureza total ( $2,0 \pm 0,6$  mg CaCO<sub>3</sub>/L). Os valores das variáveis físicas e químicas da água estão dentro do esperado visto que os rios de água preta, como o Rio Negro, são caracterizados como levemente ácidos, com baixa quantidade de sedimentos orgânicos em suspensão e de íons dissolvidos na água (Duncan e Fernandes, 2011).

Os dados biométricos dos exemplares de irapuca submetidos a diferentes tempos de submersão forçada são apresentados na Tabela 1. Para evitar a interferência do tamanho sobre os parâmetros hematológicos, visto que animais em diferentes fases de desenvolvimento apresentam respostas adaptativas diferenciadas à submersão (Mathie e Franklin, 2006; Clark et al., 2008), o tamanho das irapucas utilizadas foi padronizado entre os três grupos experimentais.

Tabela 1. Dados biométricos dos exemplares de *Podocnemis erythrocephala* submetidos a diferentes tempos de submersão forçada. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Dados biométricos	Tempo de submersão forçada (minutos)		
	0	30	60
Comprimento do plastrão (cm)	$16,1 \pm 1,7$	$15,7 \pm 1,6$	$16,7 \pm 1,9$
Largura do plastrão (cm)	$15,9 \pm 1,2$	$15,3 \pm 1,7$	$16,2 \pm 1,7$
Comprimento da carapaça (cm)	$21,4 \pm 1,7$	$20,7 \pm 2,2$	$22,1 \pm 2,3$
Largura da carapaça (cm)	$18,8 \pm 1,3$	$18,7 \pm 1,7$	$19,8 \pm 1,6$
Peso (g)	$720,0 \pm 182,8$	$623,1 \pm 217,1$	$731,7 \pm 107,7$

Os resultados dos parâmetros eritrocitários da irapuca submetida a diferentes tempos de submersão forçada estão presentes na Tabela 2. O hematócrito, hemoglobina, número de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) não sofreram alterações significativas em função dos diferentes tempos de mergulho forçado. Resultados semelhantes foram encontrados por Tavares-Dias et al. (2011) para juvenis de *P. expansa*



submetidos à 60 e 120 minutos de mergulho forçado. Entretanto, estes mesmos autores encontraram diferenças significativas no eritrograma de *P. sextuberculata*, onde foi verificado que as concentrações de hemoglobina apresentaram aumento contínuo após 30 e 60 minutos, assim como a CHCM, que foi superior após 60 minutos de mergulho forçado. Clark et al. (2008) submeteram juvenis de *Elusor macrurus*, *E. albagula*, *Elseya latisternum* e *Emydura signata* à 24 horas de submersão forçada em 23°C e observaram aumento significativo na concentração de hemoglobina somente em *E. macrurus*, enquanto que *R. leukops* apresentou aumento nos níveis de hemoglobina e hematócrito somente após 72 horas de submersão. Por outro lado, Jackson et al. (2000) não encontraram diferenças significativas no hematócrito de *Apalone spinifera*, submetidas a 48 horas de mergulho forçado, assim como em *C. picta bellii*, mantida durante 72, 144 e 216 horas de submersão.

A elevação nos valores do eritrograma refletem, segundo Clark et al. (2008) e Gordos et al. (2004), aumento na capacidade de transporte de oxigênio, conferindo uma vantagem adaptativa para sua absorção diretamente do ambiente aquático. No entanto, de acordo com estes mesmos autores, alterações no eritrograma ocorrem preferencialmente em quelônios com respiração bimodal, visto que, nesses animais, o aumento no eritrograma resulta em uma maior captação de oxigênio dissolvido na água, seja por difusão através da pele ou por ventilação ativa da região buco-faríngea e/ou bolsa cloacal (Stone et al., 1992; King e Heatwole, 1994). Por outro lado, alterações nos parâmetros eritrocitários não conferem vantagem adaptativa para quelônios com respiração estritamente aérea, uma vez que, durante a submersão a via aeróbica é interrompida devido a ausência de oxigênio, sendo ativada a via anaeróbica para produção de energia.

A ausência de alterações eritrocitárias em *P. erythrocephala*, assim como em *P. expansa* (Tavares-Dias et al., 2011), sugere que a respiração dessas espécies seja essencialmente aérea. Entretanto, os elevados níveis de hemoglobina e de CHCM encontrados por Tavares-Dias et al. (2011) em *P. sextuberculata* geram questionamentos quanto à uma possível habilidade de obtenção de oxigênio diretamente da água durante a submersão. Nesse sentido, fazem-se necessários estudos mais específicos sobre a capacidade respiratória dos podocnemidídeos, visando a elucidação do comportamento e das adaptações fisiológicas desses animais durante o mergulho.

Tabela 2. Parâmetros eritrocitários de *Podocnemis erythrocephala* submetida a diferentes tempos de submersão forçada. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Parâmetros eritrocitários	Tempo de submersão forçada (minutos)		
	0	30	60
Hematócrito (%)	23,6 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	23,5 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	22,0 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	6,67 $\pm$ 1,04 <sup>a</sup>	6,78 $\pm$ 1,78 <sup>a</sup>	5,99 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>
RBC (milhões/ $\mu$ L)	0,49 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,48 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
VCM (fL)	456,2 $\pm$ 67,8 <sup>a</sup>	506,6 $\pm$ 100,9 <sup>a</sup>	507,6 $\pm$ 101,6 <sup>a</sup>
CHCM (g/dL)	27,6 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	29,1 $\pm$ 7,3 <sup>a</sup>	28,1 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>
HCM (pg)	134,4 $\pm$ 23,2 <sup>a</sup>	143,5 $\pm$ 32,0 <sup>a</sup>	146,4 $\pm$ 25,0 <sup>a</sup>

Letras diferentes significam diferenças significativas entre os tempos de submersão forçada ( $p < 0,05$ )

As concentrações dos parâmetros bioquímicos plasmáticos de irapuça submetidas a diferentes tempos de mergulho forçado estão apresentadas na Tabela 3. Foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos níveis de colesterol total, triglicerídeos, lactato, ácido úrico, uréia, cloreto, cálcio e magnésio. Os níveis plasmáticos de lactato apresentaram valores crescentes em função do tempo de submersão, sendo observados valores aproximadamente 4 vezes maiores nos animais submergidos por 60 minutos em relação aos animais mantidos em normóxia (Figura 1). As concentrações de colesterol total, ácido úrico, uréia, cloreto e magnésio apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) após 30 e 60 minutos de submersão, enquanto que os triglicerídeos diminuíram nestes mesmos animais, em comparação ao grupo controle.

As alterações nos parâmetros bioquímicos refletem ajustes fisiológicos relacionados à depressão da taxa metabólica, ativação do metabolismo anaeróbico e da tentativa de manutenção do equilíbrio ácido-base dos animais durante a submergência. Quando a tartaruga é submersa sob condições anóxicas, o oxigênio disponível é limitado ao que foi armazenado nos pulmões e à quantidade adicional deste gás presente nos sítios de ligação da hemoglobina (Fuster et al., 1997). Durante o mergulho voluntário, a tartaruga retorna rotineiramente à superfície para restabelecer as reservas de oxigênio antes que estas atinjam níveis criticamente baixos (Gatten, 1981). No entanto, quando o acesso à superfície não é possível, seja em função de eventos naturais, como a formação de camadas de gelo na superfície da água durante o inverno, ou induzidas pelo homem como o uso inapropriado de redes de pesca, as reservas de oxigênio desses animais podem se esgotar, ocasionando uma redução no

metabolismo oxidativo e um incremento concomitante da glicólise anaeróbica (Jackson, 2000a).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de *Podocnemis erythrocephala* submetida a diferentes tempos de submersão forçada. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

Parâmetros bioquímicos	Tempo de submersão forçada (minutos)		
	0	30	60
Proteínas totais (g/L)	21,5 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	23,7 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>	24,5 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>
Glicose (mmol/L)*	6,54 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	6,25 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	6,48 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
Colesterol total (mmol/L)*	1,49 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	2,12 $\pm$ 0,69 <sup>b</sup>
Triglicerídeos (mmol/L)	0,96 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	0,59 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>	0,55 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>
Cloreto (mmol/L)*	80,8 $\pm$ 7,3 <sup>a</sup>	105,8 $\pm$ 24,6 <sup>b</sup>	93,2 $\pm$ 7,5 <sup>b</sup>
Sódio (mmol/L)	132,9 $\pm$ 5,4 <sup>a</sup>	133,1 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>	136,4 $\pm$ 5,3 <sup>a</sup>
Potássio (mmol/L)	5,46 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup>	5,99 $\pm$ 1,19 <sup>a</sup>	4,71 $\pm$ 2,33 <sup>a</sup>
Cálcio (mmol/L)*	1,28 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,74 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	2,07 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>
Magnésio (mmol/L)*	0,53 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,80 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	0,99 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>
Ácido úrico ( $\mu$ mol/L)*	85,8 $\pm$ 12,2 <sup>a</sup>	232,9 $\pm$ 46,6 <sup>b</sup>	226,4 $\pm$ 59,0 <sup>b</sup>
Uréia (mmol/L)*	1,65 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	4,12 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>	4,33 $\pm$ 1,34 <sup>b</sup>

Letras diferentes significam diferenças significativas entre os tempos de submersão forçada ( $p < 0,05$ )

\* Teste de Kruskal-Wallis

As altas concentrações de lactato encontradas no plasma de *P. erythrocephala* submetidas a 30 e 60 minutos de mergulho forçado estão associadas à produção energética na ausência de oxigênio. O lactato é produzido a partir da redução de piruvato, por ação da enzima lactato desidrogenase, para geração de  $\text{NAD}^+$  e sustentação da via glicolítica anaeróbica (Withers, 1992; Hill et al., 2004). Durante a glicólise, a hidrólise de ATP gera a liberação de prótons  $\text{H}^+$  que, em associação ao lactato, formam ácido láctico como produto final do metabolismo anaeróbico (Hochachka e Mommsen, 1983). O aumento na quantidade de ácido láctico na corrente sanguínea pode ocasionar uma acidose metabólica, afetando o equilíbrio ácido-base e ocasionando a mortalidade dos animais (Stabenau e Voetti, 2003).

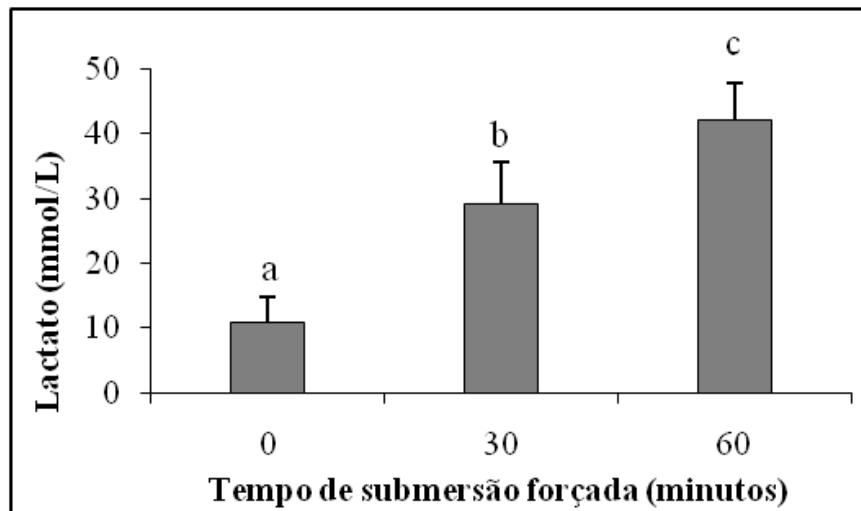


Figura 1. Níveis de lactato no plasma de *Podocnemis erythrocephala* submetida a diferentes tempos de submersão forçada. Letras diferentes significam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Média  $\pm$  desvio padrão. N = 13 para cada tratamento.

Para evitar a acidose, provocada durante a anóxia, os quelônios desenvolveram várias estratégias para neutralização dos prótons e do lactato usando tampões endógenos. De acordo com Jackson (2000a,b), Warren e Jackson (2007) e Jackson e Ultsch (2010), os principais tampões em quelônios são os bicarbonatos, presentes em grandes quantidades nos fluidos peritoneais e pericárdicos, mas que, dependendo da concentração de lactato na corrente sanguínea, podem ser rapidamente exauridos. Nessas situações, os quelônios liberam na corrente sanguínea, carbonatos de cálcio e de magnésio provenientes dos ossos e do casco para tamponar o ácido láctico (Jackson et al., 1999; Jackson, 2000b; Jackson et al., 2000; Warren e Jackson, 2007). Uma vez no sangue, os carbonatos se dissociam formando novos íons bicarbonato, enquanto que os cátions  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  podem permanecer livres no sangue ou se associar ao lactato formando  $\text{Ca-lactato}^+$  e  $\text{Mg-lactato}^+$  (Jackson e Heisler, 1982; Jackson, 2000b). Os resultados do presente trabalho demonstram que *P. erythrocephala* utiliza esta estratégia para o tamponamento do lactato, visto que os níveis plasmáticos de cálcio e magnésio aumentaram significativamente após 30 e 60 minutos de submersão forçada. Resultados semelhantes também foram encontrados em *C. picta bellii* (Jackson e Heisler, 1982; Jackson, 1997; Jackson, 2000b), *Pelomedusa subrufa*, *Elseya novaeguineae*, *Emydura subglobosa* (Cocker et al., 1999).

Os níveis de cloreto plasmático de *P. erythrocephala* aumentaram nos animais submetidos ao mergulho forçado. Este aumento pode estar associado ao mecanismo de transporte de  $\text{CO}_2$  no sangue dos animais, visto que o  $\text{CO}_2$  liberado pelos tecidos é difundido

para os eritrócitos e convertido pela enzima anidrase carbônica em  $H^+$  e íons bicarbonato ( $HCO_3^-$ ). O  $H^+$  é tamponado pela hemoglobina, enquanto que o  $HCO_3^-$  é lançado para fora dos eritrócitos por um trocador  $Cl^-/HCO_3^-$ , processo conhecido como desvio de cloretos. Na superfície respiratória, ocorre o desvio reverso de cloretos, que consiste na entrada de  $HCO_3^-$  no eritrócito e liberação de  $Cl^-$  no plasma. No interior da célula, o  $HCO_3^-$  se liga ao  $H^+$  produzindo ácido carbônico que é enzimaticamente convertido em água e  $CO_2$ , permitindo assim a difusão do gás para fora do organismo (Stabenau e Heminh, 1999). Durante a anóxia, esse mecanismo cíclico do desvio de cloretos tende a ser interrompido, em função da reduzida produção de  $CO_2$  e, conseqüentemente, de  $HCO_3^-$ , resultando no acúmulo de  $Cl^-$  extracelular.

Neste trabalho, as concentrações plasmáticas de glicose de *P. erythrocephala* não sofreram alterações significativas ( $p > 0,05$ ) em função do mergulho forçado, apesar do aumento crescente dos níveis de lactato. Resultados semelhantes foram encontrados por Stabenau e Vietti (2003) para *C. caretta* submetida a 10, 42 e 180 minutos de submersão forçada e por Tavares-Dias et al. (2011) para *P. sextuberculata* submersa por 30 e 60 minutos. Entretanto, em *P. expansa*, os níveis de glicose plasmática aumentaram nos animais submetidos a 60 e 120 minutos de mergulho forçado, indicando que a espécie mobiliza os estoques de glicogênio hepático para a manutenção do metabolismo anaeróbico (Tavares-Dias et al., 2011). Hiperglicemia também foi relatada por Warren e Jackson (2007) em *T. scripta* submetidos a 7 dias de anóxia à 5°C, 24 horas à 15°C e apenas 4 horas à 25°C.

É provável que a glicemia tenha se mantido constante ao longo do mergulho forçado devido a dois fatores. O primeiro está relacionado com o acionamento do hipometabolismo resultando na redução da demanda de oxigênio tissular e, conseqüentemente, na redução no consumo de glicogênio hepático (Bickler e Buck, 2007). O segundo está relacionado com a ativação do ciclo de Cori também conhecido como via glicose-lactato-glicose que consiste na utilização de lactato, produzido pela glicólise em tecidos extra hepáticos (como os músculos e eritrócitos), como fonte de carbono para a gliconeogênese hepática. Desta forma, o fígado pode reconverter o lactato em glicose para reutilização nos tecidos não-hepáticos (Withers, 1992), mantendo estável a concentração desse substrato na corrente sanguínea.

Embora o ciclo de Cori resulte em uma maior produção de glicose, o custo energético é alto, sendo necessário o investimento de 6 moléculas de ATP, resultando no saldo negativo de 4 ATP, visto que durante a glicólise anaeróbica são produzidas 2 ATP (Withers, 1992). Este saldo negativo demonstra que a glicólise anaeróbica não sustenta a produção de ATP para a manutenção do ciclo de Cori, sendo necessária a ativação de outras vias metabólicas. Em *P. erythrocephala*, as alterações nos níveis de colesterol e triglicerídeos, indicam a ativação

do catabolismo lipídico para a produção de ATP. Enquanto que os níveis de colesterol plasmático da irapuca aumentaram em função da submergência, o que pode ser um reflexo da mobilização deste esteróide a partir dos tecidos adiposos, as concentrações de triglicerídeos reduziram, indicando uma provável mobilização dos estoques deste substrato. O catabolismo lipídico também parece ter sido utilizado em *P. sextuberculata* após 60 minutos de submersão, enquanto que, em *P. expansa* submetida à 60 e 120 minutos de mergulho forçado, os níveis de colesterol total e triglicerídeos não sofreram alterações, diferentemente das concentrações de proteínas totais que reduziram nos animais submersos (Tavares-Dias et al., 2011). Estes resultados demonstram que os podocnemídeos podem ativar diferentes vias metabólicas para viabilizar a produção de energia em situações de anóxia.

As concentrações de ácido úrico e uréia aumentaram em *P. erythrocephala* após 30 e 60 minutos de submersão. Tavares-Dias et al. (2011) também encontraram aumento significativo de uréia em *P. expansa* após 60 minutos, seguida de uma redução após 120 minutos de submersão. De acordo com Campbell (1995), os quelônios podem utilizar o ácido úrico e/ou uréia como principal produto para a excreção dos compostos nitrogenados. Entretanto, durante o hipometabolismo, a excreção destes compostos nitrogenados pelos quelônios é interrompida, em função da grande quantidade de ATP gasta nesse processo, resultando no aumento das concentrações plasmáticas de ácido úrico e uréia (Jackson, 2000b).

Este estudo demonstrou que a irapuca é uma espécie tolerante a 60 minutos de submersão forçada, visto que não foi observada mortalidade durante a condução do experimento. Além disso, os elevados níveis de lactato, associados à elevação nas concentrações de magnésio e cálcio plasmáticos, indicam ajustes fisiológicos para a manutenção do equilíbrio ácido-base. Entretanto, os resultados advertem que tempos superiores aos testados neste trabalho podem ocasionar uma perda excessiva de cálcio e magnésio dos ossos e do casco, causando deformidades ósseas, além de uma acidose metabólica e a exaustão dos substratos energéticos, com potencial risco de mortalidade.

Além das informações geradas sobre as respostas adaptativas de *P. erythrocephala* em situações de mergulho forçado, estes resultados também podem contribuir para o desenvolvimento de projetos de manejo, a partir da conscientização dos pescadores sobre a importância de revisões inferiores a 60 minutos nas redes de pesca distribuídas nos locais de ocorrência da irapuca, evitando a mortalidade dos animais por afogamento e contribuindo para sua conservação.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 408795/2006-9) pelo suporte financeiro deste projeto. O primeiro autor agradece a concessão da bolsa de mestrado pela Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas (FAPEAM).

## REFERÊNCIAS

Bernhard, R. 2010. *Dinâmica populacional de Podocnemis erythrocephala, no rio Ayuanã, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado (Ecologia), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 106p.

Bickler, P.E.; Buck, L.T. 2007. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annual Review of Physiology*, 69:145-170.

Boyd, E.; Tucker, C.S. 1992. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn: Auburn University. 300p.

Campbell, J.W. 1995. Excretory nitrogen metabolism in reptiles and birds. In: Walsh, P.J.; Wright, P.A. *Nitrogen Metabolism and Excretion*. Boca Raton: CRC Press, Boca Raton. p. 147-178.

Clark, N.J.; Gordos, M.A.; Franklin, C.E. 2008. Diving behaviour, aquatic respiration and blood respiratory properties: a comparison of hatchling and juvenile Australian turtles. *Journal of Zoology*, 275: 399–406.

Crocker, C.E.; Ultsch, G.R.; Jacson, D.C. 1999. The physiology of diving in a north-temperate and three tropical turtle species. *Journal of Comparative Physiology B*, 169: 249-255.

Duncan, W.P.; Fernandes, M.N. 2011. Physicochemical characterization of the white, black, and clearwater rivers of the Amazon Basin and its implications on the distribution of freshwater stingrays (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, no prelo.

Fuster, J.F.; Pages, T.; Palacios, L. 1997. Effect of temperature on oxygen stores during aerobic diving in the freshwater turtle, *Mauremys caspica leprosa*. *Physiological Zoology*, 70: 7-18.

Gatten, R.E. 1981. Anaerobic metabolism in freely-diving painted turtles (*Chrysemys picta*). *Journal of Experimental Zoology*, 216: 377-385.

Gearhart, J. 2001. *Sea turtle bycatch monitoring of the 2000 fall flounder gillnet fishery of southeastern Pamlico Sound, North Carolina*. North Carolina Department of Environment and Natural Resources, Division of Marine Fisheries, Morehead City, USA.

- Gordos, M.A.; Franklin, C.E.; Limpus, C.J.; Wilson, G. 2004. Blood-respiratory and acid-base changes during extended diving in the bimodally respiring freshwater turtle *Rheodytes leukops*. *Journal of Comparative Physiology B*, 174: 347-354.
- Herbert, C.V.; Jackson, D.C. 1985. Temperature effects on the responses to prolonged submergence in the turtle *Chrysemys picta bellii*. I. Blood acid-base and ionic changes during and following anoxic submergence. *Physiological Zoology*, 58: 665-669.
- Hill, R.W.; Wyse, G.A.; Anderson, M. 2004. *Animal physiology*. Massachusetts: Sinauer Associates. 770p.
- Hochachka, P.W.; Mommsen, T.P. 1983. Protons and anaerobiosis. *Science*, 219: 1391-1397.
- Hoogmoed, M.S.; Ávila-Pires, T.C. 1990. New distribution data for *Podocnemis erythrocephala* (Spix) with remarks on some other turtle taxa (Reptilia: Chelonia: Pelomedusidae). *Zoologische Mededelingen*, 64: 21-24.
- Jackson, D.C. 1997. Lactate accumulation in the shell of the turtle, *Chrysemys picta bellii*, during anoxia at 3 and 10°C. *Journal of Experimental Biology*, 200: 2295-2300.
- Jackson, D.C. 2000 a. Living without oxygen: lessons from the freshwater turtle. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 125: 299-315.
- Jackson, D.C. 2000 b. How a turtle's shell helps it survive prolonged anoxic acidosis. *News in Physiological Sciences*, 15: 181-185.
- Jackson, D.C.; Heisler, N. 1982. Plasma ion balance of submerged anoxic turtles at 3°C: the role of calcium lactate formation. *Respiratory Physiology*, 49: 159-174.
- Jackson, D.C.; Ultsch, G.R. 1982. Long-term submergence at 31°C of the turtle, *Chrysemys picta bellii*, in normoxic and severely hypoxic water. II. Extracellular ionic responses to extreme lactic acidosis. *Journal of Experimental Zoology*, 96: 29-43.
- Jackson, D.C.; Ultsch, G.R. 2010. Physiology of hibernation under the ice by turtles and frogs. *Journal of Experimental Zoology*, 313: 311-327.
- Jackson, D.C.; Goldberger, Z.; Visuri, S.; Armstrong, R.N. 1999. Ionic exchanges of turtle shell in vitro and their relevance to shell function in the anoxic turtle. *Journal of Experimental Zoology*, 202 :513-520.
- Jackson, D.C.; Ramsey, A.L.; Paulson, J.M.; Crocker, C.E.; Ultsch, G.R. 2000. Lactic acid buffering by bone and shell in anoxic softshell and painted turtles. *Physiological and Biochemical Zoology*, 73: 290-297.
- King P.; Heatwole, H. 1994. Non-pulmonary respiratory surfaces of the chelid turtle *Elseya latisternum*. *Herpetologica*, 50: 262-265.
- López-Mendilaharsu, M.; Rocha, C.F.D. 2009. Comportamento de movimentação horizontal e vertical da tartaruga-de-couro *Dermochelys coriacea*. *Oecologia Brasiliensis*, 13: 99-114.
- Mathie, N.J.; Franklin, C.E. 2006. The influence of body size on the diving behaviour and physiology of the bimodally respiring turtle, *Elseya albagula*. *Journal of Comparative Physiology B*, 176: 739-747.



- Mittermeier, R.A.; Wilson, R.A. 1974. Redescription of *Podocnemis erythrocephala* (Spix, 1824), an Amazonian Pelomedusid turtle. *Papeis Avulsos de Zoologia*: 28, 147-162.
- Price, B. 2005. *Sea turtle bycatch monitoring of the 2004 fall gillnet fisheries in southeastern Pamlico Sound, North Carolina*. North Carolina Department of Environment and Natural Resources, Division of Marine Fisheries, Morehead City, USA.
- Snoddy, J.R.; Landon, M.; Blanvillain, G.; Southwood, A. 2009. Blood biochemistry of sea turtles captured in gillnets in the lower Cape Fear River, North Carolina, USA. *Journal of Wildlife Management*, 73(8): 1394-1401.
- Stabenau, E.K.; Heming, T.A. 1999. CO<sub>2</sub> excretion and postcapillary pH equilibration in bloodperfused turtle lungs. *The Journal of Experimental Biology*, 202, 965-975.
- Stabenau, E.K.; Vietti, K.R.N. 2003. The physiological effects of multiple forced submergences in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Fishery Bulletin*, 101(4): 889–899.
- Stone, P.A.; Dobie, J.L.; Henry, R.P. 1992. Cutaneous surface-area and bimodal respiration in soft-shelled (*Trionyx spiniferus*), stinkpot (*Sternotherus odoratus*), and mud turtles (*Kinosternon subrubrum*). *Physiological Zoology*, 65: 311–330.
- Tavares-Dias, M.; Silva, M.G.; Oliveira, A.T.; Oliveira-Júnior, A.A.; Marcon, J.L. 2011 *in press*. Propriedades do sangue de três espécies de quelônios do gênero *Podocnemis* de vida livre na Reserva Biológica do Abufari, baixo Rio Purus, Amazonas, Brasil. In: Silva-Souza, A.T.; Lizama, M.A.P.; Takemoto, R.M. *Patologia e sanidade de organismos aquáticos*. Abrapoa: São Paulo, SP.
- Ultsch, G.R. 1985. The viability of nearctic freshwater turtles submerged in anoxia and normoxia at 3 and 101C. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 81: 607–611.
- Ultsch, G.R. 1989. Ecology and physiology of hibernation and overwintering among freshwater fishes, turtles and snakes. *Biological Reviews*, 64: 435–516.
- Ultsch, G.R.; Jackson, D.C. 1995. Acid-base and ionic balance during simulated hibernation in freshwater turtles from the northern portions of their ranges. *Journal of Experimental Zoology*, 273: 482-493.
- Verdouw, H.; Van Eched, C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Research*, 12: 397-402.
- Ware, S.K. 1993. Cardiac responses of the turtle (*Trachemys scripta elegans*) to voluntary diving and to forced submersion. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 105(4): 751-755.
- Warren, D.E.; Jackson, D.C. 2007. Effects of temperature on anoxic submergence: skeletal buffering, lactate distribution, and glycogen utilization in the turtle, *Trachemys scripta*. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293: 458-467.
- Wintrobe, M.M. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51: 32-49.
- Withers, P.C. 1992. *Comparative animal physiology*, 1<sup>a</sup> ed. Flórida: Saunders College Publishing. 949p.

## CONCLUSÕES GERAIS

O sexo exerceu menor influência sobre o eritrograma e a bioquímica plasmática de *Podocnemis erythrocephala*, diferentemente do que foi observado entre as classes de crescimento, demonstrando que apesar da irapuca possuir pequeno porte, os animais de diferentes tamanhos apresentam um perfil hematológico diferenciado.

O estudo das células sanguíneas de irapuca demonstrou que os podocnemídeos Amazônicos apresentam um padrão conservativo quanto aos tipos celulares e às características morfológicas. As reações citoquímicas evidenciaram que os heterófilos, eosinófilos e basófilos são as células mais ativas do sistema imunológico da irapuca, estando diretamente relacionados com a atividade fagocítica.

A irapuca demonstrou ser uma espécie tolerante a 60 minutos de submersão forçada, realizando ajustes fisiológicos para manutenção do equilíbrio ácido-base em situações de anóxia. Os resultados indicaram a ativação do catabolismo lipídico para produção de energia de forma complementar à glicólise anaeróbica. Entretanto, tempos superiores aos testados neste trabalho podem ocasionar distúrbios eletrolíticos marcantes, além de acidose metabólica e exaustão dos substratos energéticos, podendo afetar a homeostasia dos animais.