

GISELE LUDWIG TESSEROLLI

**ANÁLISE HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA EM CÁGADOS  
PESCOÇO-DE-COBRA (*Hydromedusa tectifera*)  
MANTIDOS EM CATIVEIRO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - área de concentração em Patologia Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helena Cristina da Silva de Assis

CURITIBA

2004



## PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **GISELE LUDWIG TESSEROLLI** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Dissertação, intitulada “**ANÁLISE HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA EM CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRA (*Hydromedusa tectifera*) MANTIDOS EM CATIVEIRO**” foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03 – CEPE considerou a candidata APROVADA concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 16 de Abril de 2004.

  
Profa. Dra. HELENA CRISTINA DA SILVA DE ASSIS  
Presidente/Orientador

  
Prof. Dr. JÚLIO CESAR DE MOURA LEITE  
Membro

  
Profa. Dra. ROSÂNGELA LOCATELLI DITTRICH  
Membro

*"Aprender é a única  
coisa que a mente  
nunca tem medo,  
nunca se cansa,  
nunca se  
arrepende"*

Leonardo da Vinci

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** por sempre iluminar meu caminho.

À minha **família** pelo amor e incentivo em todas as horas.

À minha orientadora **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helena Cristina da Silva de Assis**, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Às professoras **Elizabeth Schmidt Popazoglo** e **Rosângela Locatelli Dittrich** e ao professor **Metry Bacila** pela orientação e amizade, agradecimento especial ao professor **Rogério Ribas Lange** que foi o idealizador do projeto de monitoramento de cágados pescoço-de-cobra,

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, em nome do Coordenador **Prof. Dr. José Luciano Andriguetto**.

Ao **CNPq** pela bolsa de pesquisa e à **PETROBRAS S.A.** pelo apoio financeiro dado a este trabalho.

Ao **Hospital Veterinário** e ao **Departamento de Farmacologia** da UFPR pelo empréstimo das dependências de seus laboratórios.

Às funcionárias **Nara** e **Vitória**, e à estagiária **Carla Yoko Tanikawa**, do Laboratório de Patologia Clínica da UFPR, pela companhia, amizade e contribuição dada para a realização deste trabalho.

Às bolsistas **Rossana Calegari dos Santos** e **Ana Paula Berger** do Departamento de Farmacologia, e ao professor **Aguinaldo José do Nascimento**, do Departamento de Bioquímica da UFPR, pela amizade e contribuição na realização deste trabalho.

Aos bolsistas do Curso de Medicina Veterinária: **Camile Lugarini**, **Carla Yoko Tanikawa**, **Eunice L. Chertenzen**, **Fábio C. Gouveia**, **Fabiola X. V. Domingos**, **Fernanda C. Kandalski**, **Fernão Diego de S. Lopes**, **Flávia Maia**, **Flávia de Mello Wolff**, **Gisele Sprea**, **Juliana B. Ferrari**, **Lais Fonseca**, **Larissa Dantas Roeder**, **Laerzio C. Neto**, **Luciano de S. Malanski**, **Márcia Tkacz**, **Michele K. Lenz**, **Petra C. Kirsten**, **Rafael B. Naleto** e **Rodrigo A. M. de Souza**, da UFPR.

**K. Lenz, Petra C. Kirsten, Rafael B. Noletto e Rodrigo A. M. de Souza**, da UFPR que participaram do projeto "Monitoramento de cágados pescoço-de-cobra expostos ao petróleo. Araucária-PR".

Ao biólogo **Dr. Júlio César de Moura Leite**, do Museu de História Natural (Curitiba-PR), pelas sugestões dadas para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Departamento de Estatística da UFPR, em especial ao professor **Fernando Perez** e ao aluno **Amaury de Moraes Castro**.

À **Andréa Cristine Franco Tesserolli**, pelo auxílio na correção do *abstract*,

Aos **queridos amigos** adquiridos ao longo desta caminhada, principalmente à **Priscila Paula de Carvalho**, com os quais pude dividir muitos momentos agradáveis.

À **Gustavo Henrique Ortenzi Peres** pela amizade, companheirismo e incentivo em todos os momentos.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE SIGLAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 COLHEITA DE SANGUE EM QUELÔNIOS.....	4
1.2 HEMATOLOGIA DE QUELÔNIOS.....	5
1.2.1 Descrição das Células Sangüíneas de Quelônios.....	7
1.2.1.1 Eritrócitos.....	7
1.2.1.2 Leucócitos.....	8
1.2.1.2.1 Heterófilos.....	8
1.2.1.2.2 Eosinófilos.....	9
1.2.1.2.3 Basófilos.....	10
1.2.1.2.4 Linfócitos.....	11
1.2.1.2.5 Monócitos.....	12
1.2.1.2.6 Azurófilos.....	12
1.2.1.3 Trombócitos.....	13
1.3 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DE QUELÔNIOS.....	14
1.3.1 Uréia.....	14
1.3.2 Creatinina.....	15
1.3.3 Fosfatase Alcalina.....	15
1.3.4 Ácido Úrico.....	15
1.3.5 Colinesterase Plasmática.....	16
1.4 ARSÊNICO E METAIS PESADOS.....	18
1.4.1 Chumbo.....	19
1.4.2 Mercúrio.....	20
1.4.3 Cádmio.....	21
1.4.4 Cobre.....	22
1.4.5 Arsênico.....	23
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 POPULAÇÃO ESTUDADA E BIOTÉRIO.....	25
2.2 DIMORFISMO SEXUAL (SEXAGEM).....	26
2.3 COLHEITA DE SANGUE.....	27
2.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	28
2.4.1 Hematócrito.....	28
2.4.2 Dosagem de Hemoglobina Total.....	28
2.4.3 Contagem de Eritrócitos Totais.....	29
2.4.4 Contagem de Leucócitos Totais.....	29
2.4.5 Diferencial das Células Sangüíneas.....	29
2.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	30

2.6	ATIVIDADE DA COLINESTERASE PLASMÁTICA.....	30
2.7	DOSAGEM DE ARSÊNICO E METAIS PESADOS.....	31
2.8	DADOS ESTATÍSTICOS.....	31
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
3.1	MORTALIDADE DOS CÁGADOS.....	33
3.2	DADOS BIOMÉTRICOS DOS CÁGADOS.....	33
3.3	TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE A COLHEITA DE SANGUE...	37
3.4	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	38
3.5	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	39
3.6	ARSÊNICO E METAIS PESADOS.....	40
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EXEMPLAR DE <i>Hydromedusa tectifera</i> (CÁGADO PESCOÇO-DE-COBRA).....	2
FIGURA 2 - RIO IGUAÇU. EXTENSÃO DO VAZAMENTO DE ÓLEO NA REGIÃO DE ARAUCÁRIA, ESTADO DO PARANÁ.....	3
FIGURA 3 - BIOTÉRIO INSTALADO NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFPR.....	25
FIGURA 4 - COLHEITA DE SANGUE REALIZADA POR PUNÇÃO DO SEIO SUPRA-OCCIPITAL EM <i>Hydromedusa tectifera</i> .....	27

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO E SEXO DOS CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO ACIDENTE, 2000 A 2002.....	34
TABELA 2 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO E SEXO DOS CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO REFERÊNCIA, 2000 A 2002. ....	35
TABELA 3 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO E SEXO DOS CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO MONTANTE, 2000 A 2002. ....	36
TABELA 4 - DATAS DE COLHEITA DE SANGUE DOS CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRA E TEMPERATURAS MÁXIMAS E MÍNIMAS REGISTRADAS, 2000 A 2002.....	37
TABELA 5 - MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO PONDERADOS DAS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS DOS GRUPOS ACIDENTE, MONTANTE E REFERÊNCIA.....	38
TABELA 6 - MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO PONDERADOS DA CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS DOS GRUPOS ACIDENTE, MONTANTE E REFERÊNCIA. ....	39
TABELA 7 - MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO PONDERADOS DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS (URÉIA, FOSFATASE ALCALINA, CREATININA, ÁCIDO ÚRICO E COLINESTERASE) DOS GRUPOS ACIDENTE, MONTANTE E REFERÊNCIA. ....	40
TABELA 8 - CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNICO E METAIS PESADOS NO SANGUE DE <i>Hydromedusa tectifera</i> , DEZEMBRO DE 2001.....	41
TABELA 9 - CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNICO E METAIS PESADOS NO SANGUE DE <i>Hydromedusa tectifera</i> , MAIO DE 2002.....	41
TABELA 10 - CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNICO E METAIS PESADOS NO MÚSCULO DE <i>Hydromedusa tectifera</i> , SETEMBRO DE 2001.....	42



## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO DOS CAGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO ACIDENTE, PETRÓLEO, RIO IGUAÇU, 2000 A 2002. ....	34
GRÁFICO 2 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO DOS CAGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO REFERÊNCIA, 2000 A 2002. ....	35
GRÁFICO 3 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO DOS CAGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO MONTANTE, 2000 A 2002. ....	36

## LISTA DE SIGLAS

ALT	- Alanina aminotransferase
ANOVA	- Análise de Variância
AST	- Aspartato aminotransferase
BSA	- Soro Albumina Bovina
DTNB	- 5,5-Ditio-Bis-2-Nitrobenzoato
LDH	- Lactato Desidrogenase
MANOVA	- Análise Multivariada
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UV	- Ultra-Violeta

## RESUMO

*Hydromedusa tectifera* (cágado pescoço-de-cobra) pertence a Família Chelidae, Ordem Testudines e Classe Reptilia. No Estado do Paraná, essa espécie é encontrada na bacia do Rio Iguaçu; são animais pouco estudados mas sabe-se que sofrem perturbações decorrentes da acentuada poluição, extração intensiva de areia e invasão urbana das várzeas. O cágado tornou-se alvo de estudos após ter sido encontrado no Rio Iguaçu devido ao segundo maior acidente ambiental brasileiro, ocorrido em Julho de 2000, decorrente do derramamento de quatro milhões de litros de óleo da refinaria da PETROBRÁS, no município de Araucária-PR. Dentre os 56 cágados resgatados no local do acidente ambiental, dez animais (grupo acidente) foram mantidos em um biotério instalado no Hospital Veterinário da UFPR, juntamente com 12 cágados capturados a montante do local do acidente (grupo montante) e 15 cágados capturados no Zoológico de Curitiba (grupo referência). O objetivo desse trabalho foi analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos e o nível de metais pesados e arsênico no sangue e músculo dos três grupos de cágados. No período compreendido entre os anos de 2000 e 2002, foram realizadas 16 colheitas de sangue de todos os cágados para avaliações hematológicas (eritrograma e leucograma) e bioquímicas (fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico e colinesterase). Três análises (sangue e músculo) foram realizadas em nove cágados para a dosagem de metais pesados e arsênico. Dentre os parâmetros hematológicos avaliados, houve diferença significativa na contagem total de eritrócitos para o grupo montante, na contagem total de leucócitos para o grupo acidente e na contagem diferencial de heterófilos e basófilos para o grupo acidente. Para as variáveis bioquímicas não houve diferença significativa entre os grupos. Na análise de metais pesados e arsênico observaram-se altos índices de alguns compostos no grupo acidente. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que poucos parâmetros sanguíneos foram alterados no grupo acidente, mas essas alterações correlacionam-se com o acidente ambiental. Por meio desta pesquisa foi possível estabelecer valores basais, hematológicos e bioquímicos para *H. tectifera* já que a literatura corrente não apresenta valores normais para essa espécie.

## ABSTRACT

*Hydromedusa tectifera* (side-necked turtle) belongs to Chelidae Family, Testudines Order and Reptilia Class. In Parana State, this species is found in Iguaçu River basin. It is poorly studied, but it is known that it is disturbed due to accentuate pollution, intensive extraction of sand and urban invasion. The purpose of the study of side-necked turtles was due to the second biggest Brazilian environmental accident, found in Iguaçu River, in July 2000, due to leakage of four million liters of cuseana oil from PETROBRAS refinery in Araucaria City, Parana State. Out of 56 freshwater turtles from accident place, ten animals (accident group) were kept in an animal house system of Veterinary Hospital (UFPR) together with twelve animals captured above the leakage of oil in Iguaçu River (up stream group) and fifteen animals captured in the Curitiba Zoo (reference group). The purpose of this study was to analyse not only hematological and biochemical parameters, but also arsenic and heavy metal levels in the blood and muscle of these freshwater turtle groups. In the period between the years 2000 and 2002, sixteen blood sampling were performed all animals for hematological (erytrogram and leukogram) and biochemical (alkaline phosphatase, urea, creatinine, uric acid and cholinesterase) analysis. Three other samplings (blood and muscle) were performed in nine animals to determine arsenic and heavy metal levels. Among the hematological parameters evaluated, the red blood cell count for up stream group; white blood cell count for accident group, basophils and heterophils diferencial count for accident group were statistical significant. The biochemical parameters did not show significant difference among the three groups. In the arsenic and heavy metal analysis it was observed high levels of some compounds in the accident group. The results obtained in the present study demonstrated that some hematological parameters were changed in accident group, but these alterations are related to the environmental accident. With this study it was possible to establish basal values for *H. tectifera*, although the current literature does not present normal values for this species.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Hydromedusa* é formado por animais que pertencem à Família Chelidae, Ordem Testudines (que compreende cerca de 300 espécies), da Classe Reptilia. As duas espécies conhecidas do gênero *Hydromedusa* são *H. tectifera* e *H. maximiliani*. São animais com hábito de vida aquático (exclusivamente água doce) e sua alimentação é baseada em algas e pequenos peixes e moluscos que habitam o fundo dos rios (JACKSON, 1991, p.230).

A Ordem Testudines é composta de répteis que possuem carapaça. É a ordem mais primitiva dentre os répteis vivos, e é aparentemente uma linhagem de répteis primitivos (como indicado pela sua carapaça não especializada). Os exemplares da Ordem Testudines estão presentes em todos os continentes, exceto na Antártica. As espécies marinhas ocorrem predominantemente nas águas tropicais dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico, mas muitas também ocorrem distantes dessas águas (ERNST e BARBOUR, 1989, p.4).

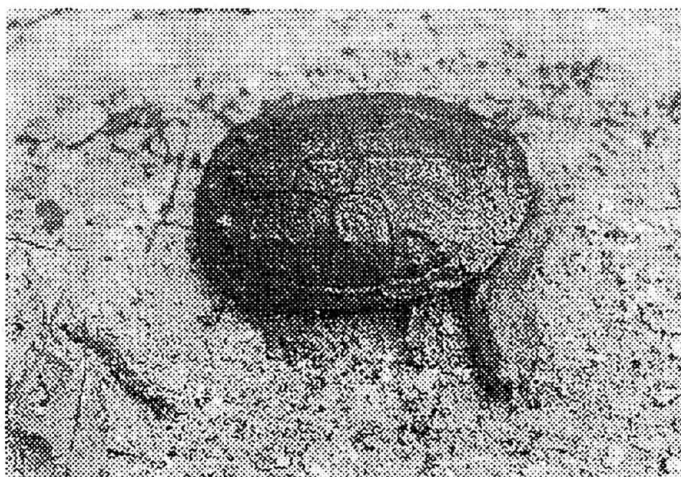
As espécies pertencentes à Família Chelidae, que se caracterizam pela presença de um longo pescoço lateralizado, estão confinadas às porções leste da América do Sul e Austrália; algumas espécies também ocorrem em Nova Guiné. A característica marcante desta família é a presença de articulações convexas no final da quinta e oitava vértebras cervicais. O pescoço pode ser tão longo quanto o comprimento da carapaça, característica que está presente em exemplares do gênero australiano *Chelodina* e nas espécies do gênero *Hydromedusa*, encontrado na América do Sul (ALDERTON, 1988, p.179).

Uma marcada tendência na Família Chelidae é a redução dos ossos neurais, os quais formam uma série completa somente nos gêneros *Chelus* e *Hydromedusa* (HARLESS e MORLOCK, 1979, p.35).

As duas espécies do gênero *Hydromedusa*, *H. maximiliani* e *H. tectifera* (figura 1) são reconhecidas por seu pescoço extremamente longo e pela posição única

do escudo nual, que é lateralmente expandido e está excluído do contato com a porção anterior da carapaça pelos escudos marginais (HARLESS e MORLOCK, 1979, p.40).

FIGURA 1 - EXEMPLAR DE *Hydromedusa tectifera* (CÁGADO PESCOÇO-DE-COBRA).



NOTA: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Rogério Ribas Lange, UFPR.

Na América do Sul, as espécies de *Hydromedusa* podem ser encontradas no sudeste do Brasil, no Uruguai e no nordeste da Argentina. No Paraná, *H. tectifera* encontra-se principalmente na bacia do Rio Iguaçu, juntamente com o cágado-preto (*Acantochelys spixii*) e o cágado-rajado (*Phrynops williamsi*). Essas espécies são pobremente estudadas, porém sabe-se que sofrem perturbações decorrentes da acentuada poluição, extração intensiva de areia e invasão urbana das várzeas (ALDERTON, 1988, p.172).

*Hydromedusa tectifera* tornou-se alvo de estudos após ter sido encontrada no Rio Iguaçu (figura 2), durante o segundo maior acidente ambiental brasileiro, ocorrido em 16 de Julho de 2000, decorrente do derramamento de cerca de quatro milhões de litros de óleo da refinaria da PETROBRAS (Petróleo Brasileiro S.A.), município de Araucária, Estado do Paraná, Brasil.

Logo após o acidente foram resgatados, no Rio Iguaçu, 169 (59%) animais mortos e 113 (41%) vivos, deste total, 121 (44%) eram aves, sendo 35 (29%) vivas e 86 (71%) mortas; 86 (31%) répteis, sendo 72 (84%) vivos e 14 (16%) mortos; 8 (3%) mamíferos, sendo 4 (50%) vivos e 4 (50%) mortos; 5 (2%) anfíbios, sendo 2 (40%) vivos e 3 (60%) mortos e 53 (19%) peixes mortos.

Durante o período compreendido entre 18 de Julho e 23 de Agosto de 2000, os 113 animais resgatados vivos passaram por um processo de reabilitação (remoção do óleo, hidratação parenteral e aquecimento). A mortalidade durante o período de reabilitação foi de 97% para as aves, 8% para os répteis, 50% para os mamíferos e 50% para os anfíbios (LANGE et al., 2001, p.41).

Dentre os 72 répteis resgatados vivos, 56 eram cágados pescoço-de-cobra (*Hydromedusa tectifera*), que representou o maior número de sobreviventes desse acidente ambiental, logo seria considerada a principal espécie potencialmente bioindicadora da poluição do Rio Iguaçu.

FIGURA 2 - RIO IGUAÇU. EXTENSÃO DO VAZAMENTO DE ÓLEO NA REGIÃO DE ARAUCÁRIA, ESTADO DO PARANÁ.



FONTE: FABRINI, 2000.

A seguir, serão descritas as principais características hematológicas e bioquímicas de répteis, mais especificamente de quelônios.

## 1.1 COLHEITA DE SANGUE EM QUELÔNIOS

A avaliação do estado de saúde e diagnóstico de doenças em animais silvestres frequentemente requer a colheita de material biológico apropriado para investigação laboratorial (JACOBSON, 1993, p.144).

A quantidade total de sangue que pode ser seguramente colhida de um réptil depende do seu tamanho e do seu estado de saúde. O volume sanguíneo total em répteis varia conforme a espécie, mas geralmente representa de 5 a 8% do seu peso corporal total. Muitos répteis toleram a perda de cerca de 10% do seu volume sanguíneo total, sem nenhum efeito adverso à saúde (MADER, 2000, p.1126).

Locais para obtenção de amostras de sangue em quelônios são: coração, veia jugular, veia ou artéria braquial, veia coccígea ventral, seio orbital, veia escapular e pelo corte das unhas (JACOBSON, 1993, p.145).

A punção intracardiaca, embora não recomendada, tem sido usada em quelônios jovens antes da calcificação da carapaça, a agulha pode ser passada através do plastrão, até o coração. Em quelônios adultos, que têm a carapaça calcificada, a perfuração do plastrão para a punção cardíaca torna-se mais difícil (JACOBSON, 1992, p.51).

Em cágados e tartarugas, o seio orbital pode ser usado para obtenção de pequeno volume de sangue em tubos capilares. No entanto, deve-se evitar dano dos tecidos peri-oculares e possíveis traumas à córnea (JACOBSON, 1993, p.146).

Em quelônios, os vasos associados com os membros raramente podem ser visualizados através da pele. Em adição, os vasos linfáticos dos membros são bem desenvolvidos, então a obtenção de sangue desses vasos pode resultar em hemodiluição com linfa (JACOBSON, 1992, p.54).

Os locais mais utilizados para punção sangüínea em quelônios são a veia jugular e a artéria carótida. O maior problema encontrado para puncionar esses locais estão na extensão e controle do pescoço e cabeça do animal (JACOBSON, 1992, p.59). Quanto aos cágados do gênero *Hydromedusa*, que tem como característica um pescoço bastante longo, recomenda-se a punção da veia jugular (GARCIA-NAVARRO e PACHALY, 1994, p.126).

Muitas tartarugas, cágados e crocodilianos possuem grandes seios venosos pareados imediatamente caudais à região occipital, esses seios são locais onde pode ser feita a punção de um volume suficiente de sangue. Benett (1986) descreveu esta técnica em tartarugas marinhas e é considerada o método preferido para venopunção em quelônios e crocodilianos (FRYE, 1991, p.210).

Em geral, para estudos hematológicos, o sangue deve ser colhido em tubos contendo o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminoacético). No entanto, o EDTA causa hemólise em algumas espécies de répteis, especialmente em quelônios; então, o uso do anticoagulante heparina torna-se necessário. O plasma heparinizado pode ser usado para análises bioquímicas (CAMPBELL, 1996, p.248).

A heparina pode causar manchas azuladas no esfregaço sangüíneo e agrupamento de trombócitos e leucócitos em répteis (MADER, 2000, p.1129). Os esfregaços de sangue de répteis serão melhor avaliados se forem elaborados com sangue sem nenhum tipo de anticoagulante (CAMPBELL, 1996, p.248).

## 1.2 HEMATOLOGIA DE QUELÔNIOS

O principal local de produção das células sangüíneas de répteis e anfíbios é a medula óssea, mas alguns órgãos viscerais, como fígado e baço, por exemplo, também podem assumir essa função (CANFIELD, 1998, p.793).

A avaliação do hemograma e do esfregaço sangüíneo é uma importante ferramenta de diagnóstico para répteis. Dados hematológicos proporcionam indícios da



existência de condições que podem estar afetando os componentes celulares no sangue periférico desses animais. O hemograma pode ser usado para detectar anemia, inflamação, parasitemia, neoplasia hematopoiética e desordens de hemostasia. A avaliação do hemograma inclui análise dos eritrócitos, leucócitos e trombócitos no sangue periférico (CAMPBELL, 1996, p.248).

A morfologia das células sangüíneas varia consideravelmente entre grupos (por exemplo, répteis e aves) e entre diferentes espécies de répteis (por exemplo, iguanas e quelônios) (FRYE, 1991, p.221).

A avaliação laboratorial dos eritrócitos ou eritrograma de répteis inclui: hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos totais e observação dos eritrócitos em esfregaço sangüíneo corado (FRYE, 1991, p.221).

A técnica manual padrão para obtenção do hematócrito é por centrifugação de tubos capilares a 12.000 x g por cinco minutos. Valores normais de hematócrito para répteis estão entre 20 e 40% (CAMPBELL, 1996, p.248).

A concentração de hemoglobina pode ser determinada usando-se as mesmas técnicas para mamíferos, pelo método da Cianometahemoglobina. Valores médios normais para concentração de hemoglobina em répteis estão entre 6 e 12 miligramas por decilitro de sangue (CAMPBELL, 1996, p.249).

A contagem total de eritrócitos em répteis pode ser feita manualmente por meio de hemocitômetro (também chamado de câmara de Neubauer) ou por contadores eletrônicos de células, previamente calibrados para a espécie em questão (MADER, 2000, p.1127).

A avaliação dos leucócitos ou leucograma inclui o cálculo total de leucócitos, determinação da contagem diferencial de leucócitos e avaliação da morfologia das células em esfregaço sangüíneo corado. Os leucócitos granulócitos de répteis são classificados em: heterófilos, eosinófilos e basófilos, baseado na aparência da célula em esfregaços sangüíneos corados com corantes do tipo Romanowsky (por exemplo, corante de Wright). Os leucócitos mononucleares são representados pelos

linfócitos, monócitos e azurófilos (MADER, 2000, p.1128).

A contagem total de leucócitos no sangue de répteis pode ser determinada em hemocitômetro, em contadores eletrônicos de células ou por estimativa no esfregaço sangüíneo corado. Conta-se o número total de leucócitos no esfregaço em aumento de 40 vezes, em dez campos diferentes. A média desses dez campos deve ser multiplicada por 1000, para ter o número total de leucócitos por milímetro cúbico de sangue (JACOBSON, 1993, p.148).

### 1.2.1 Descrição das Células Sangüíneas de Quelônios

#### 1.2.1.1 Eritrócitos

A contagem total de eritrócitos em répteis pode variar de acordo com a estação do ano, temperatura ambiente, sexo (machos têm mais eritrócitos do que fêmeas em algumas espécies) e estado nutricional; no período pré-hibernação existem mais eritrócitos do que no período pós-hibernação (CAMPBELL, 1996, p.249).

Em répteis existe uma relação inversa entre o tamanho do eritrócito e o número total de eritrócitos circulantes. O tempo de vida médio de eritrócitos na circulação, para o cão e o gato, é de 68 e 115 dias, respectivamente, comparados ao intervalo de 600 a 800 dias em répteis. Suspeita-se que esse longo período de vida dos eritrócitos seja devido a baixa taxa metabólica de répteis comparados aos mamíferos (MADER, 2000, p.1128).

Os eritrócitos de répteis são elipsoidais, com um núcleo posicionado centralmente. Possui de 13 a 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro. O citoplasma cora-se em rosa-alaranjado e possui textura homogênea. O núcleo torna-se mais condensado conforme a célula fica mais velha (CAMPBELL, 1990, p.197).

Eritrócitos imaturos podem estar presentes no sangue periférico de repteis em casos de crescimento, ecdise e anemia regenerativa. Essas células são menores que

os eritrócitos maduros. possuem um núcleo grande e citoplasma basofílico (CANFIELD, 1998, p.796).

A policromatofilia é um bom indicador de anemia responsiva em répteis. Núcleo mitótico, binucleação e outras anormalidades nucleares são descobertas em répteis com anemias regenerativas, doenças inflamatórias e durante o período pós-hibernação. Anisocitose, policromatofilia e poiquilocitose são achados comuns no sangue de répteis normais, mas podem estar exagerados no doença (MADER, 2000, p.1128).

### 1.2.1.2 Leucócitos

#### 1.2.1.2.1 Heterófilos

O heterófilo é uma célula exclusiva de répteis, peixes, aves e alguns mamíferos, como o coelho, por exemplo. Possui de 16 a 19  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Essa célula torna a interpretação do hemograma difícil, pois sua morfologia varia entre grupos, gêneros e espécies de répteis. Funcionalmente, o heterófilo de répteis é similar ao neutrófilo de mamíferos. Essas células respondem à infecções e inflamações e sua função primária é a fagocitose. Em répteis saudáveis, os heterófilos correspondem de 30 a 45% do total de leucócitos (MADER, 2000, p.1129).

O aumento de heterófilos no sangue de répteis, denominado heterofilia, indica resposta a uma doença inflamatória (infecção ou injúria tecidual). Estresse, neoplasias e leucemia mielóide podem causar heterofilia. Em quelônios, os grânulos dos heterófilos são tão numerosos que deslocam o núcleo para a periferia da célula. O núcleo cora-se em azul claro e pode aparecer lobulado em algumas espécies de lagartos (MADER, 2000, p.1129).

Heterófilos imaturos não são comumente vistos no sangue periférico de répteis. A presença dessas células geralmente indica excessiva demanda de heterófilos

maduros, em casos de severas infecções. A presença de heterófilos anormais (vacuolizados, com basofilia citoplasmática, degranulação, etc) são indicações de infecção bacteriana ou doença inflamatória (CAMPBELL, 1996, p.250).

Os heterófilos são capazes de fazer a fagocitose de bactérias e debris celulares, também podem estar associados com reações imunes tais como alergias e imunidade a parasitas (CANFIELD, 1998, p.797).

O número de heterófilos no sangue periférico de répteis é influenciado pela estação do ano: um aumento de heterófilos ocorre no verão e uma diminuição durante o período de hibernação (CAMPBELL, 1996, p.250).

#### 1.2.1.2.2 Eosinófilos

O eosinófilo de répteis é diferente do de mamíferos. Em répteis, caracteriza-se por ser uma célula grande (10 a 14  $\mu\text{m}$  de diâmetro), com grânulos citoplasmáticos eosinofílicos esféricos, que reage positivamente a corantes à base de peroxidase. O núcleo pode ser simples ou lobulado e geralmente se apresenta no centro da célula (MADER, 2000, p.1130).

O tamanho dos eosinófilos varia conforme a espécie: cobras têm eosinófilos maiores, tartarugas e crocodilianos têm eosinófilos intermediários e lagartos têm eosinófilos pequenos (CAMPBELL, 1996, p.250).

A contagem total de eosinófilos no sangue de répteis saudáveis varia de 7 a 20%, mas ocorrem variações com a estação do ano, sendo que as menores contagens ocorrem no verão e as maiores no inverno. Lagartos, em geral, possuem baixo número de eosinófilos circulantes (FRYE, 1991, p.232).

Eosinofilia é também influenciada por estímulo parasitário ou outros estímulos antigênicos. Em répteis da Família Chelidae, os eosinófilos participam da resposta imune fagocitando complexos imunes (CAMPBELL, 1996, p.250).

É difícil distinguir eosinófilos e heterófilos em não-mamíferos. Em répteis é

comum não diferenciar essas células, então o número total de eosinófilos e heterófilos é representado como acidófilos. Essas duas células podem ser facilmente distinguidas por meio de corantes citoquímicos. Os grânulos do eosinófilo coram-se com benzidina peroxidase ao passo que os grânulos do heterófilo não se coram (ALLEMAN et al., 1992, p.1646).

#### 1.2.1.2.3 Basófilos

O basófilo de répteis é muito semelhante ao basófilo de mamíferos. São células pequenas, com grânulos citoplasmáticos que se coram em púrpura, e núcleo central não lobulado. O núcleo frequentemente está encoberto pelos grânulos citoplasmáticos (MADER, 2000, p.1130).

O tamanho dos basófilos varia, conforme a espécie, de 7 a 20  $\mu\text{m}$ . Lagartos têm basófilos pequenos e quelônios e crocodilianos têm basófilos maiores (CAMPBELL, 1996, p.250).

A função dos basófilos em répteis é muito semelhante a dos basófilos em mamíferos: estão envolvidos com o processamento de imunoglobulinas de superfície e liberação de histamina (MEAD, BORYSENKO e FINDLAY, 1983, p.335). Basofilia pode ocorrer na presença de parasitas sanguíneos (como *Haemogregarina* e *Trypanosoma*) e em infecções virais (CAMPBELL, 1996, p.251).

Diferentemente dos demais leucócitos de répteis, os basófilos não apresentam variação sazonal. Médias normais de basófilos no sangue estão entre 0 e 40%, dependendo da espécie de réptil. Quelônios têm um alto número de basófilos na circulação quando comparado a outras espécies, em alguns casos a contagem total de basófilos pode ultrapassar 50 ou 60%; esse alto número de basófilos no sangue de quelônios não está associado a patologias (CANFIELD, 1998, p.800).

O basófilo é comumente encontrado no sangue de répteis não-hibernantes. O número de basófilos diminui na circulação durante o período de hibernação (FRYE,

1991, p.242).

#### 1.2.1.2.4 Linfócitos

Assim como em mamíferos, os répteis também têm linfócitos pequenos (5 a 10  $\mu\text{m}$ ) e grandes (15  $\mu\text{m}$ ); os pequenos linfócitos são freqüentemente confundidos com trombócitos (ALLEMAN et al., 1992, p.1649).

O citoplasma dos linfócitos de répteis é basofílico, pode conter pequenos grânulos azurofílicos e projeções citoplasmáticas irregulares (CAMPBELL, 1990, p.198).

Os linfócitos de répteis originam-se do timo, medula óssea, baço e outros tecidos linfopoiéticos. As células B são responsáveis pela produção de algumas imunoglobulinas e as células T moderam a resposta imune (CAMPBELL, 1996, p.251).

Como em outras células sanguíneas de répteis, existe uma influência sazonal no número de linfócitos circulantes no sangue periférico; baixa contagem de linfócitos ocorre durante o inverno e no período de hibernação e alta contagem ocorre durante os meses quentes; isto sugere que a resposta imune de répteis seja menos eficiente durante os meses mais frios (FRYE, 1991, p.251).

Para a maioria dos répteis, os linfócitos são as células mais prevalentes na circulação, podendo ultrapassar 80% em algumas espécies. O número de linfócitos é menor em machos e também em animais desnutridos. Linfocitose pode ocorrer na presença de inflamação, doenças virais, cicatrização de feridas e em certas doenças parasitárias (CAMPBELL, 1996, p.250).

Em casos de bacteremia, os linfócitos de répteis são freqüentemente observados com inclusões que contêm microorganismos. Sob condições de severo estresse ou neoplasia linforreticular, linfócitos jovens podem ser encontrados na

circulação periférica. Durante os períodos de ecdise (troca de pele) a contagem de linfócitos tende a diminuir discretamente (FRYE, 1991, p.257).

#### 1.2.1.2.5 Monócitos

Os monócitos de répteis são muito similares aos monócitos de mamíferos. São as maiores células sanguíneas (8 a 20  $\mu\text{m}$ ), apresentam citoplasma moderadamente granular, com ou sem vacúolos, com núcleo reniforme (CAMPBELL, 1990, p.198).

Normalmente os monócitos de répteis aparecem menos do que 10% do total de leucócitos. Em cobras, a contagem de monócitos chega a 15 ou 20% (MADER, 2000, p.1131).

Assim como os basófilos, os monócitos apresentam pouca variação sazonal. A contagem total de monócitos pode aumentar com estimulação antigênica e em doenças infecciosas, monocitose persistente sugere um processo infeccioso crônico. Os monócitos têm um importante papel na resposta inflamatória, em granulomas e na formação de células gigantes. Em répteis, os monócitos participam das interações antígeno-anticorpo, especialmente envolvendo IgM e IgY (CAMPBELL, 1996, p.251).

Os monócitos são precursores dos macrófagos. A transformação em macrófago ocorre principalmente nos tecidos, mas pode ocorrer na circulação sanguínea (CANFIELD, 1998, p.802).

Bactérias, debris celulares, vacúolos e outros materiais particulados podem ser descobertos no citoplasma de monócitos ativos de répteis (FRYE, 1991, p.269).

#### 1.2.1.2.6 Azurófilos

O termo azurófilo refere-se a uma forma celular semelhante aos monócitos, que contém numerosos grânulos citoplasmáticos que se coram em púrpura e com 10 a 17  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Essas células ocorrem em anfíbios e répteis (principalmente em

cobras) (CANFIELD, 1998, p.798).

O azurófilo foi descrito em répteis inicialmente por Frye em 1973 e denominado de neutrófilo azurófilo. Segundo FRYE (1991, p.220), répteis saudáveis possuem de 3 a 7% de azurófilos na contagem total de leucócitos e raramente excede 10%.

MOURA et al. (1999, p.46) descreveram o azurófilo no sangue do jacaré-do-pantanal (*Caiman crocodilus yacare*) como sendo uma célula com contorno irregular, citoplasma intensamente basofílico com grânulos citoplasmáticos fortemente azurófilos. O núcleo apresenta-se esférico, com contorno irregular e posição excêntrica.

ALLEMAN et al. (1992, p.1646) encontraram azurófilos no sangue do testudíneo terrestre *Gopherus agassizii*; a célula caracterizou-se pela presença de pequenos grânulos citoplasmáticos azurofílicos.

Segundo CAMPBELL (1996, p.251) os azurófilos ocorrem em grande número em muitas espécies de cobra, podendo chegar a 20% do total de leucócitos. SALAKIJ et al. (2002, p.37) encontraram azurófilos como o segundo leucócito mais observado (cerca de 36%) em cobras d'água (*Homalopsis buccata*); segundo esses autores, o azurófilo estaria relacionado com a fagocitose de trypanosomas.

Acredita-se que a contagem de células azurófilas tende a aumentar, em répteis, com estímulo antigênico e doenças infecciosas (MADER, 2000, p.1131).

### 1.2.1.3 Trombócitos

O trombócito de répteis é polimórfico; é comumente descoberto em agregados e tem características e funções similares às plaquetas dos mamíferos. Possui núcleo elipsoidal; núcleos polimórficos são associados a doenças inflamatórias. Seu tamanho varia de 8 a 16  $\mu\text{m}$  de diâmetro (CANFIELD, 1998, p.809).

Os trombócitos têm importante papel na coagulação do sangue, formação de



trombos e cicatrização de feridas (MADER, 2000, p.1128).

O número normal de trombócitos na circulação de répteis varia entre espécies e de acordo com alterações ambientais. Médias normais estão entre 25 e 250 trombócitos por 100 leucócitos (CAMPBELL, 1996, p.252).

A diferenciação entre trombócitos e linfócitos de répteis é difícil. Similarmente aos linfócitos, os trombócitos possuem núcleo basofílico, citoplasma claro e ocasionalmente podem apresentar grânulos azurofílicos, quando ativados o citoplasma pode apresentar vacuolização (ALLEMAN et al., 1992, p.1649).

### 1.3 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA DE QUELÔNIOS

#### 1.3.1 Uréia

Os répteis são uricotélicos, ou seja, não formam uréia como produto final do metabolismo de nitrogênio pois esse é direcionado à biossíntese de purinas, resultando em ácido úrico (TROIANO et al., 2001, p.16). Logo, os valores normais para uréia sanguínea são baixos (menores que 10 mg/dl) para a maioria dos répteis. No entanto, valores normais para alguns quelônios terrestres são mais altos do que para outros répteis, com valores entre 20 e 100 mg/dl (CAMPBELL, 1996, p.253).

Concentrações plasmáticas elevadas de uréia podem ocorrer em répteis que habitam áreas desérticas, especialmente algumas espécies de cágados (CAMPBELL, 1996, p.253).

A uréia plasmática age aumentando a osmolalidade plasmática, reduzindo a perda de água corporal. Elevações na uréia plasmática, em répteis, podem estar relacionadas com doença renal, azotemia pré-renal e grande quantidade de proteína na dieta (CAMPBELL, 1996, p.253).

### 1.3.2 Creatinina

A creatinina é filtrada livremente através dos glomérulos renais e aparece no filtrado glomerular na mesma concentração em que está no plasma (FINCO, 1997, p.471).

Valores normais de creatinina plasmática em répteis são geralmente muito baixos. A creatinina de répteis pode estar elevada em casos de severa desidratação e doença renal; no entanto, a mensuração da creatinina plasmática parece ser um teste insignificante para diagnosticar doenças renais e pré-renais em répteis (CAMPBELL, 1996, p.253).

### 1.3.3 Fosfatase Alcalina

A enzima fosfatase alcalina está amplamente distribuída no organismo de répteis; no entanto existem poucas informações em relação à interpretação de valores séricos elevados dessa enzima para esses animais. Em alguns répteis, a elevada atividade sérica da fosfatase alcalina pode estar relacionada com atividade osteoblástica aumentada ou doença hepatobiliar. Normalmente, atividade aumentada da fosfatase alcalina no soro ou plasma poderá ocorrer em répteis jovens quando comparado com adultos da mesma espécie. Valores de referência normais para fosfatase alcalina em répteis são muito variáveis e dependem da espécie em questão (CAMPBELL, 1996, p.253).

### 1.3.4 Ácido Úrico

O metabolismo uricotélico está associado ao desenvolvimento do ovo e o metabolismo ureotélico está associado à viviparidade. Em lugar da amônia, que é tóxica, o ovo elimina nitrogênio na forma de ácido úrico porque mesmo a uréia seria nociva em excesso. Esse fato condiciona o comportamento uricotélico preferencial de

répteis e aves, já que os mamíferos, que são vivíparos, não necessitam excretar nitrogênio como ácido úrico e o fazem principalmente como uréia, para detoxificação da amônia produzida (BACILA, 2003, p.485).

O ácido úrico é o produto final do catabolismo primário de proteínas, nitrogênio não protéico e purinas em répteis. Do total do nitrogênio excretado, 80 a 90% estão na forma de ácido úrico em répteis terrestres (TROIANO et al., 2001, p.18).

Valores normais para ácido úrico sanguíneo estão entre zero e 10 mg/dl, para a maioria dos répteis. Valores acima de 15 mg/dl são considerados elevados. Hiperuricemia pode estar associada com doença renal severa e gota úrica. Nefrocalcinose associada com altos níveis de cálcio na dieta ou hipervitaminose D podem resultar em hiperuricemia (CAMPBELL, 1996, p.253).

Bacteremias e septicemias severas, drogas nefrotóxicas (tais como aminoglicosídeos e sulfas) podem causar doença renal, que terá como consequência a elevação dos níveis sanguíneos do ácido úrico (CAMPBELL, 1996, p.253).

A dosagem do ácido úrico sanguíneo não é um teste sensitivo para doença renal em répteis, pois mais de dois terços dos rins devem estar afuncionais para que haja elevação na concentração do ácido úrico sanguíneo. Répteis carnívoros têm maiores concentrações de ácido úrico no sangue do que répteis herbívoros, já que dietas com altos teores de proteína e uréia podem aumentar a concentração do ácido úrico (CAMPBELL, 1996, p.253).

### 1.3.5 Colinesterase Plasmática

A colinesterase foi descoberta em 1906. Em 1943, descobriu-se que existem dois tipos de colinesterases: colinesterase verdadeira e pseudocolinesterases. A colinesterase verdadeira é chamada de acetilcolinesterase, e a propionilcolinesterase e a butirilcolinesterase são classificadas como pseudocolinesterases (KOZLOVSKAYA et al., 1993, p.117).

A função da butirilcolinesterase no organismo dos animais é ainda obscura. Acredita-se que essa enzima, assim como a acetilcolinesterase, esteja associada com o metabolismo da acetilcolina. Sabe-se que a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase diferem significativamente em propriedades cinéticas e especificidade a substratos (KOZLOVSKAYA et al., 1993, p.119).

A acetilcolinesterase está presente na medula espinhal, nas fibras pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, nas fibras motoras simpáticas e na membrana dos eritrócitos. é uma enzima essencial para a transmissão sináptica colinérgica nos sistemas nervosos central e autônomo e nas terminações nervosas dos músculos estriados (SPINOSA, GÓRNIAK e BERNARDI, 1999, p.62). A principal função da acetilcolinesterase é a hidrólise da acetilcolina, o mediador de sinapses colinérgicas no sistema nervoso. Existem dados que indicam a participação dos sistema acetilcolinesterase-acetilcolina na condutância neural ao longo do axônio (KOZLOVSKAYA et al., 1993, p.120).

A inibição da colinesterase plasmática tem sido utilizada como parâmetro indicativo de exposição a compostos organofosforados e carbamatos, porém já foram encontradas alterações nessa enzima por outros compostos, como metais pesados e organoclorados (BAATRUP, 1991, p.256). Detergentes e hidrocarbonetos são substâncias que podem conter inibidores da colinesterase plasmática. No entanto, pouco se sabe sobre a relação entre as propriedades cinéticas da colinesterase de organismos aquáticos e o efeito inibitório de poluentes com ação anticolinesterásica (MONSERRAT e BIANCHINI, 2001, p.63).

O peixe *Barbus conchoni*, após exposição a níveis agudamente tóxicos de cádmio, apresentou aumento da atividade da acetilcolinesterase no cérebro, músculos esqueléticos e fígado, mas a enzima se mostrou inibida nas brânquias (GILL, TEWARI e PANDE, 1991, p.503).

Em outras espécies aquáticas, principalmente cágados e tartarugas, não foram encontrados relatos sobre a influência que o contato com metais pesados pode

ter em relação à atividade da colinesterase plasmática.

#### 1.4 ARSÊNICO E METAIS PESADOS

O petróleo possui algumas substâncias tóxicas em sua composição, tais como: hidrocarbonetos aromáticos, arsênico e metais pesados (cobre, chumbo, mercúrio e cádmio) (CLARKE e CLARKE, 1978, p.29).

Sabe-se que os metais pesados, dentre outros poluentes químicos, prejudicam o sistema imune e provocam estresse em animais e no homem. O estresse mediado por poluentes químicos causa mudanças morfofisiológicas, como a proliferação celular (tumor de pele, por exemplo, que tem sido documentado em algumas espécies aquáticas) e uma maior predisposição a agentes infecciosos (AGUIRRE et al., 1994, p.110). Além disso, os metais pesados são capazes de levar a malformações tanto estruturais como funcionais no organismo dos animais e do homem (SPINOSA, GÓRNIAK e BERNARDI, 1999, p.63).

Pouco tem-se estudado sobre contaminantes ambientais em répteis, e somente alguns trabalhos têm sido publicados sobre metais pesados em quelônios (AGUIRRE et al., 1994, p.111).

Os metais pesados não podem ser destruídos e são altamente reativos do ponto de vista químico, o que explica a dificuldade de encontrá-los em estado puro na natureza. Normalmente apresentam-se em concentrações muito pequenas, associados a outros elementos químicos, formando minerais em rochas. Quando lançados na água, na forma de resíduos industriais, podem ser absorvidos pelos tecidos animais e vegetais. Os metais contidos nos tecidos dos organismos vivos também são depositados nos sedimentos, representando um estoque permanente de contaminação para fauna e flora aquáticas (ZAKRZEWSKI, 1991, p.207).

O chumbo, o mercúrio, o cádmio e o arsênico são elementos que não existem naturalmente em nenhum organismo, tampouco desempenham funções nutricionais ou

bioquímicas em microorganismos, plantas ou animais; ou seja, a presença desses metais em organismos vivos é prejudicial em determinadas concentrações (CLARKE e CLARKE, 1978, p.32).

#### 1.4.1 Chumbo

O chumbo é usado na indústria petrolífera na fase de adição do chumbo tetraetila à gasolina para aumentar seu poder antidetonante. Devido a presença desse elemento na gasolina, a vegetação próxima às rodovias pode ter até 500 ppm de chumbo (CLARKE e CLARKE, 1978, p.47).

Apesar da poluição por chumbo ser essencialmente um problema urbano, as terras agrícolas, lagos e rios têm sido freqüentemente afetados por esse metal pesado. O chumbo tem muitos efeitos tóxicos, incluindo inibição da formação de células vermelhas, danos renais e ao sistema nervoso. O mecanismo de toxicidade do chumbo ainda é pouco conhecido, mas sabe-se que ele inibe a ação de alguns sistemas enzimáticos (ZAKRZEWSKI, 1991, p.207).

Os sinais de intoxicação aguda por chumbo em bovinos e ovinos são: convulsões, espasmos musculares, tetania e óbito, que pode ocorrer após duas horas do início dos sinais clínicos; em intoxicações crônicas observam-se anorexia, constipação, danos renais, decúbito lateral e morte. Suínos são considerados mais resistentes à intoxicações por chumbo do que outros animais domésticos. A ingestão diária de seis a sete e de dois a quatro miligramas por quilograma de peso constituem doses letais para bovinos e eqüinos, respectivamente. Dose de dez miligramas por quilograma de peso por dia leva a óbito um cão em até sete semanas (CLARKE e CLARKE, 1978, p.62).

Segundo TURK e CASTEEL (1997, p.829) a intoxicação por chumbo interrompe a síntese do grupamento heme da hemoglobina a nível da formação da protoporfirina e causa o acúmulo do ácido delta-aminolevulínico. O aumento da excreção urinária deste metabólito é indicativo de intoxicação por chumbo.

Em cães intoxicados por chumbo observam-se anorexia, vômito, cólica, diarreia, salivação e convulsões epileptiformes. Em gatos, os sinais clínicos são semelhantes aos observados em cães (CLARKE e CLARKE, 1978, p.67).

Qualquer que seja a via de absorção, o chumbo vai ao fígado onde parte é excretado pela bile, outra parte é armazenada, e uma terceira fração atinge a circulação na forma de fosfato de chumbo, que será depositado nos ossos (95%), fígado, rins, baço, cérebro e músculos (CLARKE e CLARKE, 1978, p.71).

Poucos estudos são feitos em relação à ação do chumbo em quelônios, mas muitos trabalhos tratam do assunto em espécies de peixes. Segundo BAATRUP (1991, p.254) a presença de chumbo no organismo de peixes causa aumento dos níveis de histamina, serotonina, lipídeos, colesterol e proteínas séricas; mas causa a diminuição do GABA e da acetilcolinesterase.

A investigação histoquímica da ação do chumbo no organismo de peixes demonstrou que esse metal se acumula em ossos, brânquias, baço e fígado; esses animais também podem demonstrar anemia (GILL, TEWARI e PANDE, 1991, p.503).

#### 1.4.2 Mercúrio

O mercúrio, como muitos outros metais pesados, sofre o problema da bioacumulação, e escassas quantidades desse metal são concentradas por algumas espécies animais. A forma orgânica do mercúrio, o metilmercúrio, é altamente tóxica. A forma inorgânica também é tóxica, mas não é facilmente assimilada pelos organismos biológicos (ZAKREZWSKI, 1991, p.213).

Os sinais de intoxicação são dependentes da quantidade e da periodicidade de exposição ao metal, e a longo prazo sua toxicidade ocorre principalmente aos sistemas nervoso e renal. Após absorção oral, o mercúrio distribui-se pela corrente sanguínea aos rins, fígado e músculos. O mercúrio possui efeito teratogênico e, no organismo animal, tem altas taxas de acumulação e baixas taxas de excreção

(ZAKREZWSKI, 1991, p.215).

Os sinais de intoxicação aguda em animais domésticos são: gastroenterite e diarreia, choque e nefrite aguda. Em bovinos óbito pode ocorrer rapidamente após cólica e hipertermia (CLARKE e CLARKE, 1978, p.85).

Segundo BAATRUP (1991, p.257) o mercúrio ataca fosfatos e cadeias de proteínas, causando alterações estruturais e inibição de enzimas pelo bloqueio de grupamentos sulfidrilicos; também liga-se e altera a configuração de purinas, pirimidinas e ácidos nucleicos, e interfere com a integridade estrutural e propriedades físicas das membranas das células.

O mercúrio é altamente tóxico para peixes; em concentrações subletais causa injúrias estruturais, fisiológicas e bioquímicas ao sistema nervoso desses animais (BAATRUP, 1991, p.257).

#### 1.4.3 Cádmio

O cádmio é um dos elementos químicos mais tóxicos. A nível bioquímico, esse metal pode afetar negativamente o DNA, o RNA, a síntese de ribosomos e também pode desativar uma série de sistemas enzimáticos. No organismo, o cádmio é conhecido por ser teratogênico e embriotóxico (RIE, LENDAS e CALLARD, 2001, p.20).

O principal sinal clínico de intoxicação por cádmio, em animais domésticos, é a incoordenação, no entanto pode-se encontrar anemia, ulceração de estômago e degeneração gordurosa de fígado e rins. Envenenamento experimental de ratos com 62 ppm de cádmio causou hipertrofia cardíaca, severa anemia e hiperplasia de medula óssea (CLARKE e CLARKE, 1978, p.90).

A exposição crônica ao cádmio pode causar disfunção renal, anemia e má formação óssea em seres humanos. Em coelhos, o envenenamento crônico pode causar anemia hiperocrômica microcítica. Em bovinos, cerca de 82% do cádmio



ingerido é excretado nas fezes e apenas 0,022% é excretado no leite. Os efeitos tóxicos do cádmio podem ser magnificados devido sua habilidade de bioacumulação em tecidos e sua baixa taxa de excreção (ZAKRZEWSKI, 1991, p.216).

As rotas primárias de exposição ao cádmio, para o homem, são: inalação, dieta e absorção cutânea. Dentre as espécies animais, as rotas de exposição podem ser similares, no entanto a distribuição em tecidos-alvo e bioacumulação podem variar. A distribuição orgânica do cádmio tem sido descrita em muitas espécies de anfíbios, tubarões, tartarugas e peixes (RIE, LENDAS e CALLARD, 2001, p.23).

O cádmio tem uma ação tóxica para peixes que varia de moderada a severa. Os efeitos de intoxicação por cádmio em organismos aquáticos são intensificados muitas vezes se há presença de outros metais, como cobre e zinco (GILL, TEWARI e PANDE, 1991, p.504).

#### 1.4.4 Cobre

O cobre é largamente difundido na natureza; é um metal essencial, sendo parte integral de muitas enzimas, no entanto, em níveis elevados torna-se um metal tóxico ao organismo do homem e dos animais (CLARKE e CLARKE, 1978, p.96).

Segundo BACILA (2003, p.101) o cobre faz parte da glicoproteína plasmática ceruloplasmina, que é a responsável pelo transporte de ferro através da membrana celular.

Nos animais domésticos, os sinais de intoxicação aguda por cobre são: náusea, vômito, salivação, dor abdominal, taquicardia, convulsão e morte. O exame *post mortem* mostra severa gastroenterite e congestão de baço, fígado e rins. Intoxicações crônicas podem acarretar síndrome hemolítico-hepato-renal. Poucos dados existem sobre os efeitos tóxicos desse metal em animais. Sabe-se que a dose tóxica de sulfato de cobre, via oral, é de 25 a 50 mg/kg em cordeiros, 130 mg/kg em ovelhas e 200 mg/kg em bovinos (CLARKE e CLARKE, 1978, p.99).

O cobre é altamente tóxico para peixes, algas e dáfias (GILL, TEWARI e PANDE, 1991, p.505). A toxicidade nesses organismos resulta da interação do metal com a membrana celular e devido a processos lipoperoxidativos. O aumento da formação de radicais livres e a peroxidação lipídica levam a um severo estresse celular (BAATRUP, 1991, p.257).

#### 1.4.5 Arsênico

O arsênico pode ser encontrado em duas formas: inorgânico (que permanece por um longo tempo retido nos tecidos) e orgânico (que é removido rapidamente dos tecidos) (ZAKRZEWSKI, 1991, p.218).

Após absorção oral de substâncias arsenicais, absorção pela pele ou inalação, o arsênico dirige-se ao fígado, rins, baço e pulmões; também pode ser depositado em pêlos, ossos e tecidos ricos em grupamentos sulfidrilas (CLARKE e CLARKE, 1978, p.101).

Em animais, a exposição oral aguda pode causar danos gastrointestinais e neurológicos. A exposição crônica ao arsênico provoca neurotoxicidade (afetando sistema nervoso central e periférico) e alterações vasculares periféricas que podem causar lesões cutâneas (CLARKE e CLARKE, 1978, p.104).

Estudos em animais de laboratório mostram que a instilação intratraqueal de substâncias arsenicais pode causar inflamação e hiperplasia pulmonar, e imunossupressão. Doses de 27 a 64 ppm de arsênico são consideradas letais para bovinos. Os sinais clínicos de intoxicação por arsênico, em animais domésticos, são: dor abdominal, colapso e paralisia (CLARKE e CLARKE, 1978, p.110).

Muitos trabalhos indicam as concentrações críticas e letais de compostos arsenicais para diferentes espécies de peixes; entre essas publicações existe uma grande diferença entre as concentrações letais, já que a concentração tóxica do arsênico depende diretamente da forma química em que se encontra (ácido arsênico,

arsenato ou arsenito) (GILL, TEWARI e PANDE, 1991, p.502).

Pouco se sabe sobre o gênero *Hydromedusa*, e mais especificamente sobre *Hydromedusa tectifera*, afinal não existem relatos que descrevam a biologia dessa espécie. A maioria das referências hematológicas e bioquímicas disponíveis para répteis citam valores genéricos para animais saudáveis de apenas alguns gêneros da Classe Reptilia, dificultando a avaliação clínica desses animais.

Os valores hematológicos fornecem informações básicas para controle e avaliação segura dos animais, permitindo a identificação de patologias. A bioquímica sangüínea tem papel fundamental e reconhecido na Medicina Veterinária dos animais domésticos, mas para a maioria das espécies selvagens, incluindo o cágado pescoço-de-cobra, há escassez de parâmetros de referência. A utilização desses parâmetros permite uma avaliação dos animais doentes, das condições e qualidade de seu habitat e do impacto ambiental sobre eles.

Este trabalho tem por finalidade principal a determinação dos parâmetros hematológicos (eritrograma e leucograma), bioquímicos plasmáticos (fosfatase alcalina, uréia, ácido úrico, creatinina e colinesterase plasmática) e análise de arsênico, cobre, chumbo, mercúrio e cádmio no sangue e músculo de cágados pescoço-de-cobra.; além de uma análise desta espécie como bioindicadora de poluição ambiental.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 POPULAÇÃO ESTUDADA E BIOTÉRIO

Após o acidente ambiental, em Julho de 2000, 56 cágados pescoço-de-cobra foram resgatados no Rio Iguaçu e levados ao Passeio Público (Prefeitura Municipal de Curitiba), Estado do Paraná, onde passaram por um processo de despetrolização (remoção do óleo) com sucessivos banhos com água aquecida a 40<sup>o</sup> C e detergente líquido neutro. Depois disso os animais foram secos com auxílio de toalhas, receberam fluidoterapia celomática e foram aquecidos por lâmpadas.

FIGURA 3 - BIOTÉRIO INSTALADO NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UFPR.



NOTA: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Rogério Ribas Lange, UFPR.

Dos 56 cágados resgatados no local do derrame de petróleo, dez foram levados a um biotério instalado no Hospital Veterinário da UFPR (figura 3). O biotério possui área coberta de 30 m<sup>2</sup>, com cinco metros de altura, provido de sistema de ventilação e algumas telhas transparentes que permitem a difusão da luz natural. Nesta sala também há 12 tanques de fibra de vidro (de capacidade de 1000 litros cada) com aproximadamente 23 centímetros de tanque preenchidos com água. A água dos

tanques era filtrada continuamente e sua temperatura era controlada por termostato a aproximadamente 25° C.

Os animais permaneceram em luz artificial fluorescente por 12 horas ao dia, e uma vez por semana, durante uma hora, cada animal recebeu luz ultra-violeta -UV- (super UV fluorescente - 3% UVB e 7% UVA). Cada tanque possuía duas caixas plásticas abertas bilateralmente (27cm x 44cm x 15cm), usadas de abrigo para os cágados.

Junto com os dez cágados do resgate, foram mantidos 27 cágados (no mesmo biotério e sob as mesmas condições) que formaram o grupo controle. Desses 27 animais, 15 pertenciam ao grupo referência (animais procedentes do Zoológico de Curitiba e recebidos de doação) e 12 pertenciam ao grupo montante (animais capturados no Rio Iguaçu, a montante do local do derrame de óleo). Todos esses animais foram subdivididos nos 12 tanques existentes no biotério. Cada cágado recebeu uma marcação numérica na carapaça. A marcação dos animais dos grupos montante e referência era precedida pela letra correspondente ao grupo que o animal pertencia (M = montante e R = referência).

Os cuidados diários com os cágados incluíam: inspeção visual de cada animal, limpeza manual da água do tanque para remoção de resíduos (sobras da alimentação, fezes e escamas cutâneas) com o auxílio de uma rede especial, e alimentação à base de peixe fresco. Semanalmente pesavam-se todos os animais. A água dos tanques era trocada a cada 15 dias, e durante esse processo os tanques eram limpos com escova e água.

## 2.2 DIMORFISMO SEXUAL (SEXAGEM)

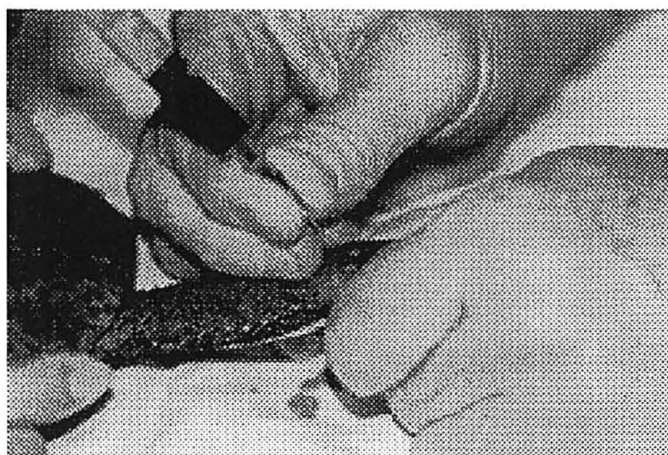
Segundo FRYE (1991, p.215) os cágados machos possuem uma concavidade no plastrão, característica ausente nas fêmeas. No entanto, os animais mais jovens não possuem dimorfismo sexual evidente por meio da observação do plastrão. A

diferenciação sexual pode ser feita também pela observação da cauda: os machos possuem uma cauda mais longa e larga do que as fêmeas e a cloaca dos machos é mais distal que a das fêmeas. Nesse trabalho, a diferenciação entre machos e fêmeas foi feita pela observação da presença ou ausência da concavidade no plastrão.

### 2.3 COLHEITA DE SANGUE

Um total de 16 colheitas de sangue de todos os cágados foram realizadas periodicamente, entre os anos de 2000 e 2002, para avaliações hematológicas e bioquímicas. Os resultados obtidos das colheitas realizadas em 2000 (nos meses de Outubro e Dezembro) não foram computados nesta pesquisa, pois tiveram como objetivo a padronização de técnicas hematológicas para *Hydromedusa tectifera*.

FIGURA 4 - COLHEITA DE SANGUE REALIZADA POR PUNÇÃO DO SEIO SUPRA-OCCIPITAL EM *Hydromedusa tectifera*.



NOTA: Foto gentilmente cedida pelo Prof. Rogério Ribas Lange, UFPR.

Inicialmente, durante o ano 2000, as colheitas de sangue dos cágados foram realizadas por punção da veia jugular; mas essa técnica exigia que os animais fossem previamente deixados por cerca de 20 minutos em água aquecida a 25° C, a fim de promover vasodilatação e facilitar a obtenção de sangue. Como essa técnica dispndia

muito tempo, passou-se então a colher o sangue dos cães por punção do seio supra occipital. O seio venoso supra occipital, localizado na articulação atlanto-occipital, permite uma punção rápida e de volume suficiente de sangue (figura 4).

Aproximadamente dois mililitros de sangue foram colhidos de cada cão, em cada colheita. Para a punção sangüínea utilizaram-se seringas descartáveis de três mililitros e agulhas descartáveis 13 x 4,5.

As lâminas para a contagem diferencial dos leucócitos foram confeccionadas com uma gota do sangue proveniente da agulha usada durante a colheita. O restante do sangue foi acondicionado em tubos heparinizados.

Todas as colheitas de sangue foram realizadas no biotério onde os animais estavam instalados, no Hospital Veterinário da UFPR.

## 2.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

As análises hematológicas descritas a seguir foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFPR.

### 2.4.1 Hematócrito

Para determinação do hematócrito foi utilizado o método do microhematócrito. Utilizou-se tubos heparinizados, que foram centrifugados a 2000 x g por cinco minutos, em microcentrífuga. A proporção entre o volume de elementos figurados foi estimada em porcentagem, com auxílio de uma escala padronizada.

### 2.4.2 Dosagem de Hemoglobina Total

A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, que mede todos os tipos de hemoglobinas circulantes. Esse método consiste em adicionar 20 microlitros de sangue total em cinco mililitros de

solução reagente de cor, que tem ferricianeto e cianeto de potássio. O ferricianeto de potássio transforma o ferro da hemoglobina do estado ferroso para o férrico, formando a metahemoglobina que, por sua vez, combina com o cianeto de potássio formando um pigmento estável, denominado cianometahemoglobina. A intensidade de cor obtida é então determinada em espectrofotômetro a 540 nm.

#### 2.4.3 Contagem de Eritrócitos Totais

Utilizou-se sangue total heparinizado diluído 1:100 em solução de Azul de Toluidina a 0,01%, que foi colocado em câmara de Neubauer. Após alguns minutos os elementos celulares depositaram-se no fundo da câmara e a contagem foi efetuada sob microscopia óptica, contando-se o número de eritrócitos de cinco quadrados diagonais do quadrado central (área de contagem de eritrócitos) do retículo da câmara. O número de eritrócitos obtido foi multiplicado por 4000, para obtenção do número total de eritrócitos por microlitro de sangue (ZINKL, 1986, p.257).

#### 2.4.4 Contagem de Leucócitos Totais

Para a contagem total do número de leucócitos foi utilizada a mesma diluição que permitiu a contagem de eritrócitos totais. Os leucócitos foram contados em todos os quadrados, da área de contagem de eritrócitos, do retículo da câmara de Neubauer. O número obtido foi multiplicado por 1000 para obtenção do número total de leucócitos por microlitro de sangue (ZINKL, 1986, p.258).

#### 2.4.5 Diferencial das Células Sangüíneas

A contagem diferencial dos leucócitos foi obtida mediante leitura dos esfregaços sangüíneos corados com corante hematológico de Wright. De cada lâmina obteve-se a média de 200 células contadas. Os leucócitos foram diferenciados em:



heterófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos e azurófilos. A leitura foi efetuada sob microscopia óptica em objetiva de imersão (100x).

## 2.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

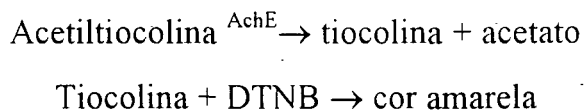
Fosfatase alcalina, uréia, creatinina e ácido úrico foram determinadas no plasma heparinizado dos cães com auxílio de kits bioquímicos comerciais (Bioclim®) e leitura em espectrofotômetro (*Metrolab 330*). O plasma foi obtido após centrifugação do sangue total a 2000 x g por cinco minutos.

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFPR.

## 2.6 ATIVIDADE DA COLINESTERASE PLASMÁTICA

Para medir a atividade da enzima colinesterase utilizou-se o método de ELLMAN et al. (1961, p.90), modificado para microplaca por STURM et al. (1999, p.5). Trata-se de um método fotolorimétrico que permite quantificar a atividade da enzima em amostras de plasma.

A atividade da enzima é medida de acordo com o aumento da coloração amarela produzida pela tiocolina quando reage com o íon 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoato (DTNB) de acordo com o acoplamento das seguintes reações:



A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (*Sunrise, Tecan*) em 412 nm.

A concentração protéica das amostras foi determinada segundo BRADFORD (1976, p.250). Para isso utilizou-se dez microlitros de amostra de plasma diluído 1:40

e 250 microlitros do reagente de Bradford diluído 1:5. Para a curva padrão foi utilizado BSA (soro albumina bovina). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (*Sunrise, Tecan*) em 610 nm.

A determinação da atividade da colinesterase plasmática foi realizada no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Farmacologia da UFPR.

## 2.7 DOSAGEM DE ARSÊNICO E METAIS PESADOS

Foram realizadas três dosagens de metais pesados (cádmio, chumbo, cobre e mercúrio) e arsênico. As análises foram feitas em amostras de sangue heparinizadas e no músculo de animais de cada grupo (acidente, referência e montante).

Em Setembro de 2001 foram analisadas as concentrações de metais pesados e arsênico em fragmentos de músculo das patas posteriores de alguns cágados que haviam morrido. As patas dos animais estavam congeladas e haviam sido separadas durante necrópsia realizada logo após o óbito dos animais.

Em Dezembro de 2001 e em Maio de 2002 foram analisadas as concentrações de metais pesados e arsênico no sangue dos animais. Apenas os três animais do grupo acidente foram os mesmos nas duas análises realizadas.

As análises (sangue e músculo) foram realizadas em laboratório particular (Laboratório Frischmann Aisengart, Curitiba-PR) e a metodologia empregada foi ICP/MS - espectrômetro de massa acoplado a plasma induzido.

## 2.8 DADOS ESTATÍSTICOS

A análise estatística realizada teve por finalidade estabelecer possíveis diferenças entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos, e níveis de metais pesados e arsênico para os três grupos de cágados pescoço-de-cobra (acidente, referência e montante). Para esse estudo foi utilizado como ferramenta computacional o Pacote Estatístico R.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estudar se o fator "local de coleta", ou seja, local de procedência dos animais (grupo referência, grupo acidente e grupo montante) teve efeito sobre as variáveis das análises hematológicas (eritrócitos totais, hematócrito, hemoglobina, leucócitos totais, heterófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos, basófilos e azurófilos) e bioquímicas (uréia, fosfatase alcalina, creatinina e ácido úrico e colinesterase).

Também fez-se uma análise multivariada (MANOVA) para avaliar as variáveis em conjunto. Como complementação, aplicou-se um pós-teste paramétrico (teste de Tukey).

Como nem todas as variáveis foram analisadas o mesmo número de vezes para cada animal, as análises estatísticas foram feitas com base nas médias ponderadas. As 13 colheitas de sangue realizadas no ano de 2001 foram subdivididas em três períodos (obtendo-se três médias para cada grupo):

- 1ª média: colheitas realizadas entre Abril de 2001 e Julho de 2001,
- 2ª média: colheitas realizadas entre Agosto de 2001 e Dezembro de 2001,
- 3ª média: colheitas realizadas entre Janeiro de 2002 e Abril de 2002.

Também foi calculada uma média ponderada geral para cada grupo (acidente, montante e referência) referente a todas as colheitas realizadas em 2001 e 2002.

Para a análise estatística de metais pesados e arsênico, foram determinados apenas a média e o desvio padrão para cada variável e para cada grupo de cágados (acidente, montante e referência). Isto ocorreu devido ao pequeno número de animais submetidos à análise das variáveis supracitadas.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Departamento de Estatística da UFPR.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 MORTALIDADE DOS CÁGADOS

Durante o projeto de monitoramento de cágados pescoço-de-cobra (Outubro de 2000 a Junho de 2002), ocorreu mortalidade nos três grupos de cágados estudados, sendo de 9 óbitos (90%) no grupo acidente, 8 óbitos (67%) no grupo montante e 6 óbitos (40%) no grupo referência.

Todos os cágados pescoço-de-cobra que vieram a óbito foram submetidos à necrópsia (Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da UFPR). Foi encontrada grande quantidade de fibrina na cavidade celomática dos animais, em consequência ao procedimento de fluidoterapia realizado sob condições mínimas de higiene e conservação dos fluidos, durante o processo de despetrolização realizado no Passeio Público (Prefeitura Municipal de Curitiba-PR). O processo de fluidoterapia celomática foi realizado apenas nos animais do grupo acidente.

#### 3.2 DADOS BIOMÉTRICOS DOS CÁGADOS

Dos 37 cágados mantidos no biotério durante a pesquisa, 15 (41%) eram machos, 16 (43%) eram fêmeas e seis (16%) eram animais jovens, sendo que nesses últimos não foi possível fazer a sexagem.

Nas tabelas 1, 2 e 3 estão apresentadas as amplitudes de variação no peso (peso inicial, que corresponde a primeira pesagem e peso final, que corresponde a última pesagem antes da soltura ou óbito do animal) e o sexo dos cágados pescoço-de-cobra que fizeram parte do estudo. Para uma melhor visualização, os valores referentes aos pesos inicial e final estão representados graficamente (gráficos 1, 2 e 3).

TABELA 1 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO E SEXO DOS CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO ACIDENTE, 2000 A 2002.

Identificação do animal	Sexo	Data da 1ª pesagem	Peso inicial (kg)	Data da última pesagem	Peso final (kg)
70	Macho	21/09/2000	1,350	**09/05/2001	1,342
105	Fêmea	21/09/2000	1,320	**11/07/2001	1,275
65	*	21/09/2000	0,560	**18/04/2001	0,697
143	Fêmea	21/09/2000	1,345	**26/09/2001	1,337
225	Fêmea	21/09/2000	1,475	**31/10/2001	1,639
92	Macho	21/09/2000	1,635	**23/05/2001	1,721
169	Fêmea	21/09/2000	2,765	21/06/2002	2,881
252	Macho	21/09/2000	2,200	**09/05/2001	2,376
76	Macho	21/09/2000	1,490	**02/05/2001	1,597
181	Fêmea	21/09/2000	1,710	**18/04/2001	1,976

NOTA: \* Indica animal jovem, no qual não foi possível fazer a sexagem.

\*\* Indica última pesagem antes do óbito.

GRÁFICO 1 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO DOS CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO ACIDENTE, PETRÓLEO, RIO IGUAÇU, 2000 A 2002.

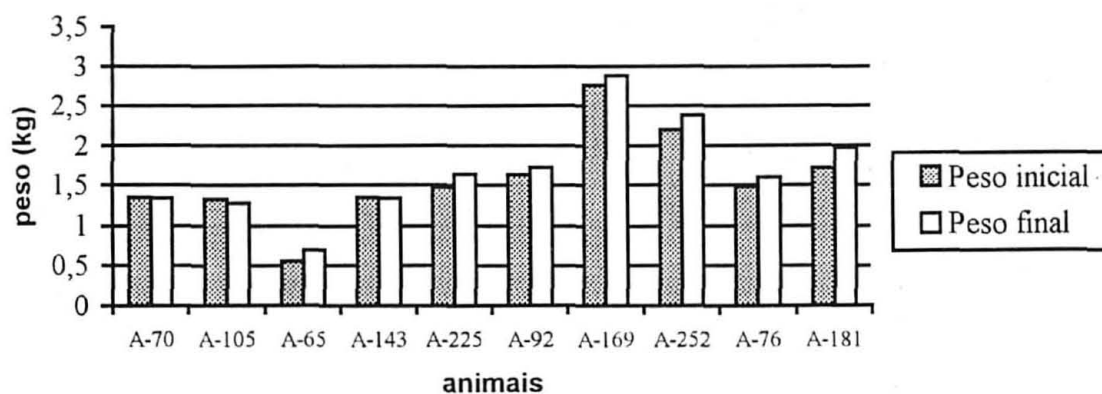


TABELA 2 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO E SEXO DOS CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO REFERÊNCIA, 2000 A 2002.

Identificação do animal	Sexo	Data da 1ª pesagem	Peso inicial (kg)	Data da última pesagem	Peso final (kg)
R10	Macho	21/09/2000	1,125	21/06/2002	1,633
R9	Macho	21/09/2000	2,625	21/06/2002	2,5
R21	Fêmea	03/10/2000	0,475	21/06/2002	1,294
R11	Macho	21/09/2000	2,060	**06/12/2001	2,395
R2	Fêmea	11/01/2001	1,099	**29/08/2001	1,278
R3	Fêmea	25/09/2000	1,885	**09/05/2001	1,840
R5	Fêmea	25/09/2000	1,310	**02/05/2001	1,160
R1	Macho	21/09/2000	1,135	**11/07/2001	1,284
R8	Fêmea	21/09/2000	1,165	**14/02/2001	1,589
R15	Fêmea	06/12/2001	1,072	---	---
R16	*	06/12/2001	0,614	---	---
R17	Fêmea	06/12/2001	1,519	---	---
R20	Macho	17/01/2002	1,829	21/06/2002	2,188
R19	Macho	17/01/2002	1,796	21/06/2002	1,981
R4	*	17/01/2001	0,672	21/06/2002	0,741

NOTA: \* Indica animal jovem, no qual não foi possível fazer a sexagem.

\*\* Indica última pesagem antes do óbito. Os animais R15, R16 e R17 foram pesados apenas uma vez (depois foram soltos no Zoológico Municipal de Curitiba, PR).

GRÁFICO 2 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO DOS CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO REFERÊNCIA, 2000 A 2002.

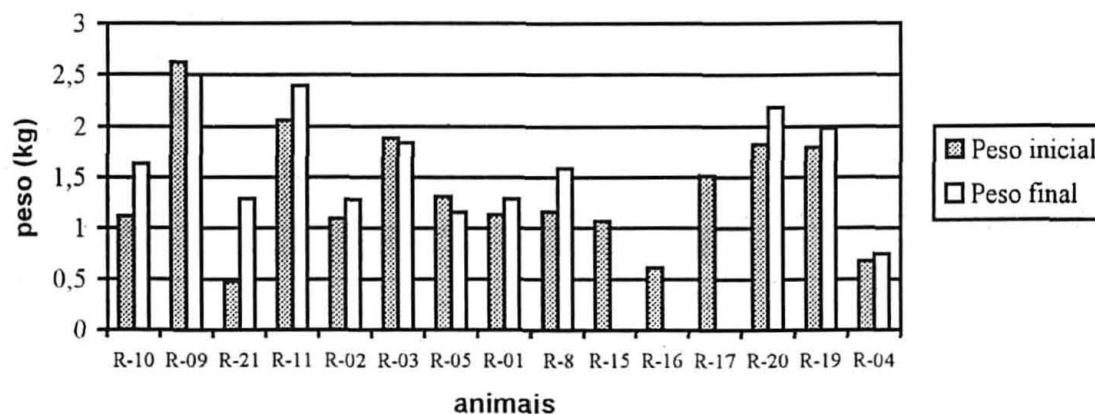


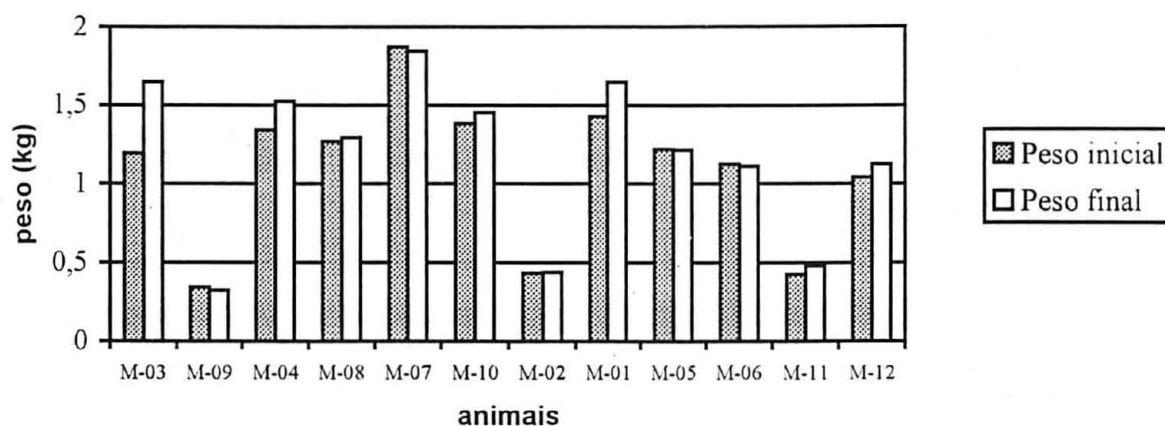
TABELA 3 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO E SEXO DOS CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO MONTANTE, 2000 A 2002.

Identificação do animal	Sexo	Data da 1ª pesagem	Peso inicial (kg)	Data da última pesagem	Peso final (kg)
M3	Fêmea	25/09/2000	1,193	21/06/2002	1,645
M9	*	14/03/2001	0,343	**28/03/2002	0,324
M4	Macho	15/08/2001	1,343	**31/01/2002	1,523
M8	Macho	24/10/2001	1,270	21/06/2002	1,294
M7	Macho	24/10/2001	1,872	21/06/2002	1,842
M10	Fêmea	24/10/2001	1,386	21/06/2002	1,454
M2	*	25/09/2000	0,432	**09/05/2001	0,437
M1	Macho	25/09/2000	1,429	**01/08/2001	1,645
M5	Macho	25/09/2000	1,221	**09/05/2001	1,214
M6	Fêmea	25/09/2000	1,123	**09/05/2001	1,113
M11	*	17/01/2002	0,427	**28/03/2002	0,458
M12	Fêmea	24/01/2002	1,043	**31/01/2002	1,125

NOTA: \* Indica animal jovem, no qual não foi possível fazer a sexagem.

\*\* Indica última pesagem antes do óbito.

GRÁFICO 3 - AMPLITUDES DE VARIAÇÃO NO PESO DOS CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRA, REFERENTES AO GRUPO MONTANTE, 2000 A 2002.



A amplitude de variação de peso observada nos diferentes grupos mostra que nos animais do grupo acidente houve um menor ganho de peso e três animais tiveram diminuição do peso durante o período que permaneceram em cativeiro. Observou-se

redução de peso em quatro animais do grupo montante e em três animais do grupo referência.

### 3.3 TEMPERATURA AMBIENTE DURANTE A COLHEITA DE SANGUE

Um total de 16 colheitas de sangue foram realizadas entre os anos de 2000 a 2002. Na tabela 4 estão apresentadas as datas e as temperaturas máxima e mínima registradas no biotério no dia da colheita de sangue. O sangue foi colhido de todos os cágados pescoço-de-cobra que estavam no biotério no dia da colheita.

TABELA 4 - DATAS DE COLHEITA DE SANGUE DOS CÁGADOS PESCOÇO-DE-COBRAS E TEMPERATURAS MÁXIMAS E MÍNIMAS REGISTRADAS, 2000 A 2002.

Data da colheita de sangue	Temperatura mínima (°C)	Temperatura máxima (°C)
11/08/2000	*	*
24/11/2000	24	25
14/12/2000	24	25
19/04/2001	22	23
03/05/2001	22	23
21/06/2001	16	18,5
05/07/2001	19	21
09/08/2001	19	21
20/09/2001	20	22
11/10/2001	22	23
08/11/2001	21	26
31/01/2002	22	24
28/03/2002	24,5	25
18/04/2002	23	24
12/06/2002	20	21
02/07/2002	19	21
<b>MÉDIA</b>	<b>21,17</b>	<b>22,84</b>

NOTA: \* Indica colheita de sangue realizada no Passeio Público (Prefeitura Municipal de Curitiba).



### 3.4 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os valores dos parâmetros hematológicos de *Hydromedusa tectifera*, dos grupos acidente, montante e referência são mostrados na tabela 5. Foi observada diferença significativa na contagem total de eritrócitos entre os grupos montante e referência (na segunda média), e na contagem total de leucócitos entre os grupos acidente e referência (na segunda média).

TABELA 5 - MÉDIAS E DESVIO-PADRÃO PONDERADOS DAS VARIÁVEIS HEMATOLÓGICAS DOS GRUPOS ACIDENTE, MONTANTE E REFERÊNCIA.

Grupo	Médias	Eritrócitos totais / $\mu$ l	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	Leucócitos totais / $\mu$ l
<b>Acidente</b> (N=10)	1 <sup>a</sup>	481.600 $\pm$ 109.957,3	22 $\pm$ 4,13	8,2 $\pm$ 2,32	43.050 $\pm$ 23.677,61
	2 <sup>a</sup>	566.267 $\pm$ 159.478,6	23 $\pm$ 5,17	6,3 $\pm$ 1,44	20.733 $\pm$ 8.250,87
	3 <sup>a</sup>	540.000 $\pm$ 67.016,42	25 $\pm$ 3,27	7,0 $\pm$ 1,16	13.330 $\pm$ 1.505,55
<b>Média Geral</b>		<b>453.650<math>\pm</math>104.174,32</b>	<b>22,22<math>\pm</math>4,47</b>	<b>7,19<math>\pm</math>1,74</b>	<b>31.862,5<math>\pm</math>15.513,6*</b>
<b>Montante</b> (N=12)	1 <sup>a</sup>	392.000 $\pm$ 136.496,5	20,3 $\pm$ 4,76	8,33 $\pm$ 3,08	19.250 $\pm$ 9.020,96
	2 <sup>a</sup>	635.550 $\pm$ 221.128,9	23,1 $\pm$ 4,72	7,31 $\pm$ 1,77	24.500 $\pm$ 5.621,38
	3 <sup>a</sup>	499.500 $\pm$ 144.012,1	21,7 $\pm$ 6,02	7,95 $\pm$ 2,59	14.8753.015,11
<b>Média Geral</b>		<b>560.800<math>\pm</math>408.568,38*</b>	<b>22<math>\pm</math>7,81</b>	<b>7,47<math>\pm</math>1,02</b>	<b>21.997,98<math>\pm</math>5.484,8</b>
<b>Referência</b> (N=15)	1 <sup>a</sup>	386.625 $\pm$ 109.280,6	21,3 $\pm$ 3,91	7,16 $\pm$ 2,09	16.125 $\pm$ 3.304,04
	2 <sup>a</sup>	475.851,9 $\pm$ 105,50	22,9 $\pm$ 3,86	7,25 $\pm$ 1,53	22.963 $\pm$ 8.518,58
	3 <sup>a</sup>	481.333,3 $\pm$ 74.766,6	23,8 $\pm$ 3,88	7,4 $\pm$ 1,58	13.250 $\pm$ 4.473,38
<b>Média Geral</b>		<b>432.020,51<math>\pm</math>73.883,4*</b>	<b>21,93<math>\pm</math>3,12</b>	<b>7,12<math>\pm</math>1,40</b>	<b>18.635,9<math>\pm</math>9.215,8*</b>

NOTA: \*Indica diferença significativa (95% de confiança,  $p < 0,05$ , Teste de Tukey).

1<sup>a</sup> média: colheitas realizadas entre Abril de 2001 e Julho de 2001,

2<sup>a</sup> média: colheitas realizadas entre Agosto de 2001 e Dezembro de 2001,

3<sup>a</sup> média: colheitas realizadas entre Janeiro de 2002 e Abril de 2002.

Os valores referentes a contagem diferencial dos leucócitos de *Hydromedusa tectifera* para os grupos acidente, montante e referência são mostrados na tabela 6.

No diferencial de leucócitos observou-se alta contagem de heterófilos no grupo acidente (15.329 $\pm$ 2.845,3/ $\mu$ l), quando comparado ao grupo referência (8.047 $\pm$ 2.543,8/ $\mu$ l). Dentre as três médias do grupo acidente observou-se uma maior contagem de heterófilos na primeira média, com diminuição progressiva até a terceira

média.

Também observou-se diferença significativa para a contagem diferencial de basófilos entre as médias gerais dos grupos acidente ( $8.447 \pm 1.902,2/\mu\text{l}$ ) e referência ( $4.853 \pm 1.433,1/\mu\text{l}$ ). Dentre as três médias do grupo acidente observou-se diminuição considerável no número de basófilos da primeira para a terceira média.

TABELA 6 - MÉDIAS PONDERADAS DA CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS DOS GRUPOS ACIDENTE, MONTANTE E REFERÊNCIA.

Grupo	Médias	Heterófilo ( $\mu\text{l}$ )	Linfócito ( $\mu\text{l}$ )	Eosinófilo ( $\mu\text{l}$ )	Monócito ( $\mu\text{l}$ )	Azurófilo ( $\mu\text{l}$ )	Basófilo ( $\mu\text{l}$ )
Acidente (N=10)	1 <sup>a</sup>	21.675,67 $\pm$ 389,5	1.140,83 $\pm$ 19	7.512,23 $\pm$ 118,1	387,45 $\pm$ 5,30	559,65 $\pm$ 5,17	11.774,18 $\pm$ 193
	2 <sup>a</sup>	9.709,89 $\pm$ 348,3	947,49 $\pm$ 20,2	3.924,76 $\pm$ 94,55	801,54 $\pm$ 13,15	228,06 $\pm$ 3,05	5.121,05 $\pm$ 162,4
	3 <sup>a</sup>	7.108,89 $\pm$ 468,6	377,24 $\pm$ 7,53	2.819,29 $\pm$ 112,8	177,29 $\pm$ 11,51	381,24 $\pm$ 7,25	2.421,66 $\pm$ 247,5
Média Geral		<b>15.329<math>\pm</math>2.845,3*</b>	<b>1.198<math>\pm</math>643,6</b>	<b>5.745<math>\pm</math>1.277,7</b>	<b>691,42<math>\pm</math>411,03</b>	<b>452,45<math>\pm</math>267,65</b>	<b>8.447<math>\pm</math>1.902,2*</b>
Montante (N=12)	1 <sup>a</sup>	7.555,63 $\pm$ 395,8	1.540 $\pm$ 19,64	2.117,5 $\pm$ 204,84	1.010,63 $\pm$ 19,25	625,63 $\pm$ 8,56	6.410,2 $\pm$ 330,8
	2 <sup>a</sup>	12.413,4 $\pm$ 409,1	803,6 $\pm$ 7,82	3.354,05 $\pm$ 246,3	1.033,9 $\pm$ 31,01	448,35 $\pm$ 8,55	6.443,5 $\pm$ 286,3
	3 <sup>a</sup>	9.091,6 $\pm$ 278,35	526,58 $\pm$ 6,88	1.655,59 $\pm$ 197,8	395,68 $\pm$ 24,96	303,45 $\pm$ 12,22	2.915,5 $\pm$ 191,4
Média Geral		<b>11.481<math>\pm</math>2.509,9</b>	<b>912,9<math>\pm</math>376,2</b>	<b>2.576<math>\pm</math>2.054,61</b>	<b>893,1<math>\pm</math>653,34</b>	<b>499,35<math>\pm</math>415,76</b>	<b>5.636<math>\pm</math>2.094,2</b>
Referência (N=15)	1 <sup>a</sup>	5.814,68 $\pm$ 41,93	735,3 $\pm$ 9,59	3.919,98 $\pm$ 275,1	543,41 $\pm$ 19,25	614,36 $\pm$ 11,51	4.495,65 $\pm$ 112,6
	2 <sup>a</sup>	11.098 $\pm$ 298,6	620 $\pm$ 4,27	3.605,19 $\pm$ 304,5	1.572,97 $\pm$ 31,01	636,07 $\pm$ 6,16	5.425,93 $\pm$ 141,8
	3 <sup>a</sup>	7.606,83 $\pm$ 496,5	341,85 $\pm$ 8,27	2.265,75 $\pm$ 271,8	231,88 $\pm$ 24,96	121,37 $\pm$ 3,75	2.683,13 $\pm$ 179,6
Média Geral		<b>8.047<math>\pm</math>2.543,8*</b>	<b>620,6<math>\pm</math>339,1</b>	<b>3.906<math>\pm</math>2.089,1</b>	<b>713,7<math>\pm</math>687,66</b>	<b>495,71<math>\pm</math>326,13</b>	<b>4.853<math>\pm</math>1.433,1*</b>

NOTA: \*Indica diferença significativa (95% de confiança,  $p < 0,05$ , Teste de Tukey).

1<sup>a</sup> média: colheitas realizadas entre Abril de 2001 e Julho de 2001,

2<sup>a</sup> média: colheitas realizadas entre Agosto de 2001 e Dezembro de 2001,

3<sup>a</sup> média: colheitas realizadas entre Janeiro de 2002 e Abril de 2002.

### 3.5 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os valores dos parâmetros bioquímicos de *Hydromedusa tectifera* dos grupos acidente, montante e referência são mostrados na tabela 7. Não foram observadas diferenças significativas nas variáveis bioquímicas entre os três grupos de cágados estudados.

TABELA 7 - MÉDIAS PONDERADAS DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS (URÉIA, FOSFATASE ALCALINA, CREATININA, ÁCIDO ÚRICO E COLINESTERASE) DOS GRUPOS ACIDENTE, MONTANTE E REFERÊNCIA.

Grupo	Médias	Uréia (mg/dl)	Fosfatase Alcalina (UI/l)	Creatinina (mg/dl)	Ácido Úrico (mmol/l)	Colinesterase (nmol.min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> .proteína)
Acidente (N=5-10)	1 <sup>a</sup>	30,51±18,38	38±11,44	0,30±0,09	---	4,17±2,16
	2 <sup>a</sup>	22,68±20,27	21,21±10,06	0,25±0,08	1,46±0,73	6,52±2,97
	3 <sup>a</sup>	34,8±10,99	16,21±7,35	0,46±0,33	1,87±1,04	5,4±0,08
<b>Média Geral</b>		<b>31,30±14,51</b>	<b>28,85±13,47</b>	<b>0,28±0,03</b>	<b>1,62±0,47</b>	<b>6,13±1,42</b>
Montante (N=8-12)	1 <sup>a</sup>	29,2±27,26	28,75±10,20	0,31±0,09	---	---
	2 <sup>a</sup>	22,86±9,11	23,35±9,92	0,28±0,15	1,89±0,79	4,75±2,53
	3 <sup>a</sup>	40,82±23,63	28,82±16,59	0,33±0,18	0,51±0,13	7,11±3,19
<b>Média Geral</b>		<b>27,72±17,49</b>	<b>26,33±13,59</b>	<b>0,28±0,10</b>	<b>1,76±0,75</b>	<b>5,82±1,43</b>
Referência (N=8-15)	1 <sup>a</sup>	30,51±11,17	33,44±7,89	0,38±0,09	---	6,17±3,28
	2 <sup>a</sup>	13,66±22,36	26,48±12,52	0,29±0,11	1,64±0,53	8,24±3,93
	3 <sup>a</sup>	35,11±28,61	19,57±9,94	0,42±0,14	1,16±1,25	8,89±4,49
<b>Média Geral</b>		<b>26,94±19,28</b>	<b>28,05±10,77</b>	<b>0,33±0,12</b>	<b>1,49±0,48</b>	<b>6,64±4,04</b>

NOTA: (---) indica que a variável não foi analisada no período.

1<sup>a</sup> média: colheitas realizadas entre Abril de 2001 e Julho de 2001,

2<sup>a</sup> média: colheitas realizadas entre Agosto de 2001 e Dezembro de 2001,

3<sup>a</sup> média: colheitas realizadas entre Janeiro de 2002 e Abril de 2002.

### 3.6 ARSÊNICO E METAIS PESADOS

As concentrações de arsênico e metais pesados, medidos no sangue de *Hydromedusa tectifera* (três animais de cada grupo), referentes aos meses de Dezembro de 2001 e Maio de 2002, são mostradas nas tabelas 8 e 9.

TABELA 8 - CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNICO E METAIS PESADOS NO SANGUE DE *Hydromedusa tectifera*, DEZEMBRO DE 2001.

GRUPOS	ANIMAL	ELEMENTOS ANALISADOS					( $\mu\text{g/l}$ )
		Arsênico	Cádmio	Chumbo	Cobre	Mercúrio	
Acidente	092	109,48	5,05	33,10	541	122,64	
	181	132,92	0,69	36,80	466	107,40	
	169	157,54	4,53	37,30	824	85,91	
	<b>Média</b>	<b>133,31</b>	<b>3,42</b>	<b>35,73</b>	<b>610,33</b>	<b>105,32</b>	
	<b>Desvio-padrão</b>	<b>24,03</b>	<b>2,38</b>	<b>2,29</b>	<b>188,80</b>	<b>18,45</b>	
Referência	R15	12,47	0,77	83,60	576	30,63	
	R16	51,41	1,60	27,10	878	35,24	
	R17	11,08	0,57	202,30	686	73,94	
	<b>Média</b>	<b>24,98</b>	<b>0,98</b>	<b>104,33</b>	<b>713,33</b>	<b>46,60</b>	
	<b>Desvio-padrão</b>	<b>22,89</b>	<b>0,55</b>	<b>89,42</b>	<b>152,84</b>	<b>23,79</b>	
Montante	M10	107,47	2,25	41,30	750	46,62	
	M11	44,94	2,38	37	972	34,76	
	M12	49,29	1,34	22,70	918	71,89	
	<b>Média</b>	<b>67,23</b>	<b>1,99</b>	<b>33,67</b>	<b>880</b>	<b>51,09</b>	
	<b>Desvio-padrão</b>	<b>34,91</b>	<b>0,57</b>	<b>9,74</b>	<b>115,76</b>	<b>18,96</b>	

TABELA 9 - CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNICO E METAIS PESADOS NO SANGUE DE *Hydromedusa tectifera*, MAIO DE 2002.

GRUPOS	ANIMAL	ELEMENTOS ANALISADOS					( $\mu\text{g/l}$ )
		Arsênico	Cádmio	Chumbo	Cobre	Mercúrio	
Acidente	092	141,51	5,20	27,02	345,88	84	
	181	37,47	0,60	37,06	393,77	77,98	
	169	87,98	2,29	30,65	464,76	46,11	
	<b>Média</b>	<b>88,99</b>	<b>2,69</b>	<b>31,58</b>	<b>401,47</b>	<b>69,36</b>	
	<b>Desvio-padrão</b>	<b>52,0273</b>	<b>2,32</b>	<b>5,08</b>	<b>59,81</b>	<b>20,36</b>	
Referência	R08	162,17	1,35	43,98	457,37	68,32	
	R09	283,02	0,78	89,72	272,32	38,58	
	R10	162,93	0,86	60,24	255,62	62,88	
	<b>Média</b>	<b>202,71</b>	<b>0,99</b>	<b>64,65</b>	<b>328,44</b>	<b>56,59</b>	
	<b>Desvio-padrão</b>	<b>69,55</b>	<b>0,49</b>	<b>23,19</b>	<b>111,97</b>	<b>15,84</b>	
Montante	M01	13,78	3,92	33,15	249,98	21,82	
	M03	483,59	1,33	101,38	462,25	47,93	
	M08	51,28	2,66	74,24	454,32	43,71	
	<b>Média</b>	<b>182,88</b>	<b>2,64</b>	<b>69,59</b>	<b>388,85</b>	<b>37,82</b>	
	<b>Desvio-padrão</b>	<b>261,09</b>	<b>1,29</b>	<b>34,35</b>	<b>120,33</b>	<b>14,02</b>	

As concentrações de arsênico e metais pesados, medidos no músculo de *Hydromedusa tectifera* (três animais de cada grupo), referentes a alguns animais que vieram a óbito até o mês de Setembro de 2001, são mostradas na tabela 10.

TABELA 10 - CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNICO E METAIS PESADOS NO MÚSCULO DE *Hydromedusa tectifera*, SETEMBRO DE 2001.

GRUPOS	ANIMAL	ELEMENTOS ANALISADOS (µg/g)				
		Arsênico	Cádmio	Chumbo	Cobre	Mercúrio
<b>Acidente</b>	065	0,47	56,53	13382,15	316,63	1760,38
	076	2,56	19,50	4351,80	506,54	1611,24
	252	1,97	18,68	4779,41	680,25	2384,15
	<b>Média</b>	<b>1,67</b>	<b>31,57</b>	<b>7504,45</b>	<b>501,14</b>	<b>1918,59</b>
	<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,07</b>	<b>21,62</b>	<b>5094,72</b>	<b>181,87</b>	<b>410,02</b>
<b>Referência</b>	R01	2,19	7,34	225,99	378,50	1988,68
	R03	0,50	23,17	153,80	260,71	646,36
	R04	3,93	11,59	353,32	504,66	3175,43
	<b>Média</b>	<b>2,20</b>	<b>14,03</b>	<b>244,37</b>	<b>381,29</b>	<b>1936,82</b>
	<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,72</b>	<b>8,19</b>	<b>101,02</b>	<b>121,99</b>	<b>1265,33</b>
<b>Montante</b>	M02	0,59	4,22	2052,55	380,17	363,82
	M04	2,34	14,87	648,94	294,61	535,22
	M07	2,72	8,15	1462,48	391,02	266,02
	<b>Média</b>	<b>1,88</b>	<b>9,08</b>	<b>1388,00</b>	<b>355,27</b>	<b>388,35</b>
	<b>Desvio-padrão</b>	<b>1,14</b>	<b>5,38</b>	<b>704,74</b>	<b>52,81</b>	<b>136,27</b>

Na primeira colheita de sangue realizada para dosagem de metais pesados e arsênico (em Dezembro de 2001), observou-se médias superiores para o grupo acidente, de arsênico, cádmio e mercúrio. Pode-se observar que a concentração desses elementos diminuiu significativamente na segunda colheita de sangue (Maio de 2002). A análise de arsênico e metais pesados no músculo (Setembro de 2001) mostrou altos níveis de cádmio, chumbo e cobre no grupo acidente. A mais alta concentração de mercúrio foi observada em fragmento de músculo de um animal do grupo referência. O nível de arsênico muscular foi similar para os três grupos estudados.

#### 4 DISCUSSÃO

Os répteis são denominados de ectotérmicos devido a sua dependência de fontes externas de aquecimento, que são mais importantes do que a produção de calor pelo seu próprio organismo, para elevar sua temperatura corpórea. Diferentemente de mamíferos e aves, a produção de calor pelo metabolismo orgânico em répteis é insuficiente para elevar a temperatura corpórea de maneira significativa (LILLYWHITE e GATTEN Jr, 1995, p.6).

Dada a importância que a temperatura ambiente tem para répteis, os cágados do presente estudo permaneceram em biotério com temperatura controlada, que variou de 21,17 a 22,84° C. Segundo BOYER e BOYER (1996, p.76), a temperatura ambiente adequada para cágados é de 24 a 29° C, embora possa ser admitida temperatura mínima de 21° C. Segundo FRYE (1990, p.211) a faixa de temperatura ideal para cágados mantidos em cativeiro deve estar entre 22 e 31° C. Os animais do presente estudo foram mantidos em uma faixa de temperatura menor, pois a maioria dos cágados eram provenientes da região do Rio Iguaçu; logo já estavam acostumados a temperaturas menores, típicas dessa região.

Os animais dos grupos acidente e montante, além de apresentarem as menores amplitudes de variação no peso, também tiveram os maiores índices de óbito em cativeiro (90 e 67%, respectivamente). Esses fatos refletem a não adaptação desses animais ao biotério, ou esses cágados já apresentavam-se debilitados devido às condições em que se encontravam no Rio Iguaçu.

A análise dos parâmetros sanguíneos em animais silvestres pode ser um indicador das condições de saúde e de seu habitat, além de fornecer informações necessárias para avaliação de impacto ambiental sobre esses animais. A realização de hemograma em répteis pode indicar anormalidades patológicas antes mesmo da manifestação de alterações clínicas. Os vários componentes do hemograma podem fornecer informações importantes sobre as condições do animal, como bacteremias,

parasitemias ou viremias, processos anêmicos severos e presença de hemoparasitas (MADER, 2000, p.1127).

Na análise hematológica dos três grupos de cágados do presente estudo, foi observada diferença entre a média geral de leucócitos do grupo acidente ( $31.862,5 \pm 15.513,59 /\mu\text{l}$ ) e a média geral do grupo referência ( $18.635,9 \pm 9.215,8 /\mu\text{l}$ ). Dentre as três médias do grupo acidente é possível notar que o número de leucócitos é mais pronunciado na primeira média (Abril a Julho/2001) com 43.050 leucócitos/ $\mu\text{l}$ . Isso indica que a heterofilia pode ter ocorrido em consequência ao estresse do acidente ambiental e à captura; A diminuição do número total de leucócitos durante a permanência em cativeiro confirma esses fatos.

Os leucócitos são as células responsáveis pela defesa do organismo e um aumento na contagem total dessas células na circulação pode indicar, principalmente, processos inflamatórios ou estresse (JAÏN, 1993, p.297).

JACOBSON (1992, p.53) cita como intervalo normal de leucócitos, para quelônios saudáveis, de 6.000 a 48.000/ $\mu\text{l}$ . No presente estudo, é difícil avaliar que condição levou ao aumento do número de leucócitos. Apesar dos cágados terem sido mantidos em biotério com condições estáveis, esses animais podem ter sofrido com o estresse de captura e de cativeiro e, no caso dos animais do grupo acidente, ainda houve o estresse do acidente ambiental.

No diferencial de leucócitos observou-se alta contagem de heterófilos e basófilos no grupo acidente, em relação ao grupo referência.

Segundo MADER (2000, p.1129), a leucocitose em répteis é indicativa de um processo inflamatório, sendo heterófilos e basófilos as células mais responsivas às condições inflamatórias. Em um processo inflamatório agudo, os heterófilos aumentam em número por primeiro, quando a condição torna-se crônica, há uma elevação considerável no número de basófilos circulantes (ROSSKOPF, 1982, p.86).

A basofilia é um achado comum no sangue de quelônios saudáveis, embora, em alguns casos, possa estar associada com a presença de parasitas sanguíneos.

No diferencial das células sangüíneas, observou-se uma alta contagem de eosinófilos para os três grupos estudados, quando comparados com valores citados por MARKS e CITINO (1990, p.343); ROSSKOPF (1982, p.87) e TAYLOR e JACOBSON (1982, p.426) para quelônios terrestres. Segundo ROSSKOPF (1982, p.86), a eosinofilia em quelônios é comum em casos de parasitismo intestinal e a contagem de eosinófilos tende a diminuir após a desverminação. Segundo FRYE (1991, p.261), a eosinofilia pode ocorrer em répteis sob condições de estímulo antigênico constante.

Nas necrópsias (realizadas no laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da UFPR) foram encontrados parasitas hematófagos classificados como Pentastomídeos; a forma adulta do parasita foi encontrada nos pulmões e a forma larvar no trato intestinal dos cágados (LANGE et al, 2002, p.70). Esses parasitas foram encontrados nos três grupos de cágados estudados, podendo estar relacionado com a eosinofilia.

Para as demais células verificadas no diferencial de leucócitos (monócitos e azurófilos) os valores encontrados para os três grupos de *Hydromedusa tectifera* estão muito acima dos citados por MADER (2000, p.1131), ROSSKOPF (1982, p.87) e CAMPBELL (1996, p.251) para quelônios. Segundo MADER (2000, p.1131) e CAMPBELL (1996, p.251) uma alta contagem de monócitos e azurófilos está relacionada com estímulo antigênico e doenças infecciosas.

Os valores encontrados para linfócitos variaram de  $620,6 \pm 339,1$  a  $1.198 \pm 643,6/\mu\text{l}$  entre os três grupos de cágados estudados; esses valores estão muito abaixo dos citados por MADER (2000, p.1131), TAYLOR e JACOBSON (1982, p.426), e CAMPBELL (1996, p.252) para répteis saudáveis. A linfopenia pode ser observada em répteis subnutridos e doentes ou pode estar vinculada ao sexo (machos de algumas espécies têm menos linfócitos circulantes); o estresse também é um dos responsáveis por linfopenia (CAMPBELL, 1996, p.251).

A linfopenia observada nos três grupos de cágados ocorreu em consequência



ao estresse de captura e de cativeiro, afinal os animais foram mantidos por mais de dois anos no biotério instalado na UFPR.

A contagem total de eritrócitos mostrou-se mais elevada na média geral do grupo montante ( $560.800 \pm 408.568,38/\mu\text{l}$ ). Segundo MARKS e CITINO (1990, p.343) o número de eritrócitos considerado normal para o jabuti *Testudo radiata* pertence ao intervalo de 350.000 a 670.000/ $\mu\text{l}$ . Para o jabuti *Gopherus agassizi*, ROSSKOPF (1982, p.85) considera normal o intervalo de 1.2 a 3 milhões/ $\mu\text{l}$ .

Segundo FRYE (1991, p.276) *Chelydra serpentina* (tartaruga-de-carapaça-mole), que é classificada taxonomicamente na mesma ordem que *H. tectifera*, possui como parâmetro normal o número de eritrócitos compreendidos entre 154.000 e 530.000 / $\mu\text{l}$ . Pode-se observar que existe um grande intervalo para uma mesma espécie, tornando difícil concluir se os resultados obtidos para *H. tectifera* diferem mesmo entre si ou se estão dentro de um intervalo considerado normal, pois não existem valores de referência citados para a espécie estudada.

Alterações no número de eritrócitos circulantes, em répteis, podem ocorrer em função de diversos fatores, tais como: idade do animal, sexo, sazonalidade, temperatura ambiente, além de fatores patológicos e nutricionais. Geralmente há um aumento no número de eritrócitos circulantes em répteis que se encontram no período de pré-hibernação (MADER, 2000, p.1131). Na presente pesquisa, os cágados pertencentes aos três grupos foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e alimentação; no entanto eram provenientes de lugares distintos. Logo, as diferenças observadas podem estar ligadas ao sexo e à idade dos animais ou ao local de procedência.

Para os demais parâmetros hematológicos (hematócrito e hemoglobina), os valores encontrados para os três grupos de cágados pescoço-de-cobra estão dentro dos intervalos descritos por MADER (2000, p.1131), ROSSKOPF (1982, p.87) e CAMPBELL (1996, p.250).

Dentre os parâmetros bioquímicos avaliados, não foi observada diferença

significativa entre os três grupos de cágados. Os valores encontrados para uréia e creatinina são similares aos encontrados por ROSSKOPF (1982, p.86) para jabutis *Gopherus agassizi*; no entanto, os valores encontrados para fosfatase alcalina são muito inferiores dos encontrados para o jabuti *Testudo radiata* ( $92,7 \pm 14,37$  UI/l), por MARKS e CITINO (1990, p.344). A enzima fosfatase alcalina é produzida pelo tecido hepatobiliar e também pelo tecido ósseo. Aumentos na concentração da enzima revelam distúrbios hepáticos ou ósseos, com exceção de animais em crescimento, que apresentam metabolismo ósseo elevado (TENNANT, 1997, p.339).

STEIN (1996, p.479) encontrou como intervalo normal de creatinina de 0,1 a 0,3 mg/dl para o jabuti *Malacochersus tornieri*; esses valores são muito próximos aos encontrados para os três grupos de *Hydromedusa tectifera*.

No presente estudo, devido às condições de estresse de captura, manejo nutricional e ambiente artificial, e devido à ausência de pleno conhecimento da origem dos animais referência, não se pode afirmar que os resultados obtidos sejam efetivos como valores basais para *Hydromedusa tectifera*.

A concentração do ácido úrico plasmático variou de  $1,49 \pm 0,48$  a  $1,76 \pm 0,75$  mmol/l entre os três grupos de cágados estudados. MARKS e CITINO (1990, p.343) encontraram  $0,0073 \pm 0,005$  mmol/l para o cágado *Testudo radiata*. JACOBSON (1992, p.59) considera como intervalo normal, para quelônios, 0,134 a 1,075 mmol de ácido úrico/l. CAMPBELL (1996, p.253) considera hiperuricêmicos répteis com concentração de ácido úrico acima de 0,4 mmol/l.

Comparando-se os valores obtidos para *H. tectifera* com os citados na literatura para outros répteis, observa-se que o ácido úrico plasmático é maior na espécie alvo desse estudo. A hiperuricemia pode ocorrer conseqüente a uma doença renal severa; no entanto, répteis carnívoros (é o caso de *H. tectifera*) tendem a ter valores mais elevados de ácido úrico sanguíneo do que répteis herbívoros (JACOBSON, 1992, p.59).

A concentração de uréia plasmática variou de  $27,72 \pm 17,49$  a  $31,30 \pm 14,51$

mg/dl entre os três grupos de cágados estudados. JACOBSON (1992, p.55) coloca o intervalo de 7,7 a 615,4 mg/dl como índice normal de uréia plasmática para quelônios. ROSSKOPF (1982, p.87) encontrou o intervalo de 1 a 30 mg/dl de uréia plasmática para o cágado *Gopherus agassizii*.

A concentração da uréia plasmática é influenciada pela ingestão de proteínas, pela taxa de excreção renal e pelo estado do fígado, que é o órgão responsável pela sua síntese (que pode diminuir a quantidade de uréia circulante) através do ciclo da uréia (TENNANT, 1997, p.340).

Segundo MARKS e CITINO (1990, p.344), as concentrações de muitos constituintes sanguíneos de répteis variam em maior grau do que o esperado, baseando-se em conhecimentos gerais sobre a fisiologia de mamíferos. Importantes alterações nos níveis de enzimas e metabólitos podem ocorrer devido a alimentação, mudanças na temperatura, disponibilidade de água, ciclo reprodutivo e condições patológicas.

Foi possível perceber que *H. tectifera* apresenta baixa atividade colinesterásica ( $6,64 \pm 4,04 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína}$ , para o grupo referência) no plasma quando comparada com outros grupos animais como peixes e mamíferos. Sabe-se que a diminuição da atividade da colinesterase está correlacionada à exposição a compostos organofosforados e carbamatos; mas também já foram observadas alterações nesta enzima causados por outros compostos como metais pesados e organoclorados (NAQVI e VAISHNAVI, 1993, p.348).

A atividade da colinesterase plasmática dos cágados é similar a de moluscos, provavelmente devido ao fato desses animais terem baixo metabolismo. Normalmente a atividade da colinesterase plasmática é mais alta em espécies de vertebrados do que em invertebrados (BOCQUENÉ, GALGANI e TRUQUET, 1990, p.86).

Segundo KOZLOVSKAYA et al. (1993, p.140), a atividade colinesterásica medida no cérebro dos peixes-ósseos *Rutilus rutilus* e *Acerina cernua* são respectivamente  $49,33 \pm 3,67$  e  $14,17 \pm 1,17 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína}$ .

Para a espécie de peixe marinho *Scomber scomber*, a atividade da colinesterase plasmática encontrada foi de  $93,95 \pm 1,29 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína}$  (BOCQUENÉ, GALGANI e TRUQUET, 1990, p.87). No lagarto *Gallotia galloti*, SANCHEZ-HERNANDEZ e WALKER (2000, p.3) encontraram para atividade da colinesterase plasmática sangüínea  $4,3 \pm 1,1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{proteína}$ : isso comprova que répteis têm menor atividade da colinesterase plasmática quando comparado com mamíferos e peixes.

Observando os valores da atividade da colinesterase em outras espécies aquáticas pode-se perceber que a colinesterase dos cágados pescoço-de-cobra possui baixa atividade, o que provavelmente é próprio dessa espécie, já que a atividade da enzima mostrou-se baixa nos três grupos de cágados que fizeram parte do experimento.

Para a quantificação de metais pesados e arsênico no sangue dos cágados foram realizadas duas colheitas de sangue (Dezembro de 2001 e Maio de 2002) de três animais de cada grupo, totalizando nove animais; também foi feita a quantificação de arsênico e metais pesados em amostras de músculo de *H. tectifera*, em Setembro de 2001. Entretanto, o tamanho das amostras foi pequeno para concluir se realmente há diferença estatística entre os grupos de cágados. Apenas os animais do grupo acidente foram reamostrados nas duas colheitas de sangue.

Segundo AGUIRRE et al. (1994, p.112), os efeitos dos metais pesados no organismo de tartarugas-marinhas são desconhecidos devido a ausência de pesquisa desses elementos em répteis aquáticos. Torna-se, então, difícil de interpretar a significância dos valores encontrados para *H. tectifera* devido à falta de pesquisas em relação aos níveis de arsênico e metais pesados nesses animais e também devido à ausência de informações sobre a procedência dos animais do grupo referência.

AGUIRRE et al. (1994, p.113) encontraram para tartarugas marinhas *Chelonia mydas*  $36,50 \mu\text{g}$  de arsênico e  $86,58 \mu\text{g}$  de cádmio por grama de tecido hepático; no entanto, em *H. tectifera* as análises foram feitas no sangue e em

fragmentos de músculo, tornando difícil a comparação.

Segundo DAVENPORT e WRENCH (1990, p.40) a concentração de arsênico em répteis aquáticos mostrou-se superior no tecido adiposo em comparação com sua concentração no sangue e tecidos hepático e renal. Isso ocorre porque o arsênico tende a associar-se com lipídios polares em organismos de níveis tróficos inferiores (como o fitoplâncton, por exemplo), e serão subsequentemente transferidos para organismo de níveis tróficos superiores na forma de complexos arsenolipídicos.

No peixe *Barbus conchoniuss*, submetido a intoxicação experimental por cádmio, observou-se diminuição da atividade da acetilcolinesterase nas brânquias e um aumento de sua atividade nos músculos e cérebro, *in vivo*. O cádmio também inibiu a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no tecido hepático *in vivo*. A lactato desidrogenase (LDH) foi significativamente estimulada no músculo cardíaco dos peixes (GILL, TEWARI e PANDE, 1991, p.505).

RIE, LENDAS e CALLARD (2001, p.28) observaram, após intoxicação experimental com cádmio em *Chrysemys picta* (tartaruga-pintada), que o local de maior concentração do metal foi o fígado, seguido de rins, pâncreas e intestinos. Os autores também comprovaram que há eliminação de cádmio via bile, urina e trato gastrointestinal devido à presença do metal na água do tanque onde estavam as tartarugas; cálculos baseados no acúmulo de cádmio na água do tanque permitiram concluir que a meia vida desse metal no organismo das tartarugas era de aproximadamente 8,5 dias.

Na presente pesquisa, o maior e o menor valor encontrados para o cobre foram, respectivamente:  $880 \pm 115,78 \mu\text{g/l}$  de sangue (grupo montante) e  $610,33 \pm 188,80 \mu\text{g/l}$  de sangue (grupo acidente). Esses valores são muito próximos dos encontrados por AGUIRRE et al. (1994, p.114) para tartarugas-marinhas *Chelonia mydas*:  $876,08 \mu\text{g}$  de cobre por grama de tecido hepático. Isso indica que os organismos aquáticos possuem concentrações significativas desse metal, não só pelo

contato direto com resíduos industriais liberados em rios e mares, mas também pela transferência do metal pela cadeia alimentar (DAVENPORT e WRENCH, 1990, P.40). No entanto, não se sabe qual o nível normal de cobre existente no organismo desses animais, afinal esse metal pesado é um dos únicos que existe normalmente no organismo, fazendo parte de alguns sistemas enzimáticos (SMITH, 1997, p.227).

A mais alta concentração de mercúrio, no sangue, foi observada no grupo acidente (105,31 µg/l em Dezembro de 2001) e a maior concentração de mercúrio no músculo foi observada no grupo referência (3.175,43 µg/g em Setembro de 2001). BAATRUP (1991, p.254), pesquisando por microscopia o efeito do mercúrio no organismo de peixes, percebeu que ocorre intensa deposição desse metal no axônio dos nervos olfatórios, o que resulta em uma depressão dos receptores olfatórios. Na tilápia (*Tilapia mossambica*) observou-se déficit visual após intoxicação experimental com mercúrio.

Para os cágados pescoço-de-cobra, a mais alta concentração média de chumbo no sangue foi observada no grupo referência (104,33 µg/l em Dezembro de 2001) e a menor concentração ocorreu no grupo acidente (31,58 µg/l em Maio de 2002). Na análise de chumbo no músculo de *H. tectifera* observou-se uma maior concentração em um animal do grupo acidente (13.382,15 µg de chumbo por grama de tecido muscular), sendo esse valor muito superior ao encontrado por DAVENPORT e WRENCH (1990, p.41) na tartaruga-marinha *Dermochelys coriacea*:  $0,31 \pm 0,03$  µg de chumbo por grama de tecido muscular peitoral

Segundo CLARKE e CLARKE (1978, p.71) após absorção o chumbo é transportado via sangüínea para os ossos, músculos e outros tecidos. Isso pode explicar a alta concentração desse metal no tecido muscular dos animais do presente estudo.

Segundo TURK e CASTEEL (1997, p.829) a intoxicação por chumbo interrompe a síntese do grupamento heme da hemoglobina; clinicamente isto seria demonstrado por anemia microcítica hipocrômica. Na maioria dos esfegaços sangüíneos corados dos animais dos três grupos de cágados observou-se

policromatofilia, anisocitose e hipocromia. A menor contagem de eritrócitos totais foi observada no grupo referência ( $432.020,51 \pm 73.883,36/\mu\text{l}$ ) que foi o que teve a maior dosagem de metal pesado no sangue.

SCHÄPERCLAUS (1992, p.1067), investigando a ação do chumbo em trutas *Oncorhynchus mykiss*, percebeu que o metal acumula-se nas costelas, vértebras, brânquias, fígado, baço e rins. Observou-se também anemia nos animais que tinham altas concentrações do metal.

Em peixes expostos a baixos teores de chumbo na água, observou-se efeitos subletais a  $7 \mu\text{g/l}$  e inibição da atividade de enzimas hematopoiéticas a  $10 \mu\text{g/l}$  (PAIN, 1995, p.382).

Segundo COSTA (2001, p.119), após intoxicação experimental com chumbo em duas concentrações ( $100$  e  $300 \mu\text{g/l}$ ) em peixes de água doce (*Oreochromis niloticus*), observou-se que o metal acumulou-se no sangue após 96 horas de exposição, no entanto não houve diferença significativa na concentração de hemoglobina nos peixes submetidos à intoxicação.

Segundo SCHÄPERCLAUS (1992, p.1070) as maiores concentrações de metais pesados que podem ser encontradas na água, para trutas (*Oncorhynchus mykiss*) e carpas (*Cyprinus carpio*), são:  $0,29 \mu\text{g/l}$  (mercúrio),  $15$  a  $25 \mu\text{g/l}$  (cobre),  $1$  a  $2 \mu\text{g/L}$  (cádmio),  $140 \mu\text{g/l}$  (zinco) e  $4$  a  $18 \mu\text{g/l}$  (chumbo).

Na literatura não foram encontrados níveis permissíveis de metais pesados e arsênico para quelônios. Comparando com as concentrações máximas permitidas para trutas e carpas, podemos perceber que os cágados do presente estudo encontravam-se em habitat com altos teores de metais pesados e arsênico. Esses elementos podem ter sido absorvidos pelo organismo dos cágados pelo contato direto com o petróleo (grupo acidente) e por meio da cadeia trófica (grupos acidente, montante e referência).

Os valores encontrados para hemograma, bioquímica plasmática e análise dos níveis de arsênico e metais pesados no sangue e músculo de *Hydromedusa tectifera* podem servir de referência, contribuindo para uma avaliação clínica segura

desses animais. É necessário ressaltar que não se sabe a real procedência dos animais do grupo referência do presente estudo, tornando difícil estabelecer valores basais para *Hydromedusa tectifera*.

Os animais dos grupos montante e acidente já se encontravam em condições bastante precárias no seu habitat natural (Rio Iguaçu), devido a acentuada poluição decorrente de resíduos industriais liberados no rio. Todos esses fatores permitem concluir que a espécie alvo desse estudo é resistente a condições ambientais impactantes, mas pouco resistente às condições de cativeiro.

Então, para a interpretação correta desses valores, faz-se necessário o conhecimento das condições de seu habitat natural, condições de cativeiro e impacto ambiental sobre os animais; só assim esses valores poderão contribuir para o conhecimento e conservação da espécie.



## 5 CONCLUSÕES

Dentre os parâmetros hematológicos, observou-se diferença para o grupo acidente na contagem de leucócitos totais e na contagem diferencial de heterófilos e basófilos.

Dentre os parâmetros bioquímicos não se observou diferença entre os três grupos de cágados, e a maioria dos valores encontrados para *Hydromedusa tectifera* são condizentes aos valores encontrados para outras espécies de cágados e tartarugas.

A atividade da colinesterase plasmática de *Hydromedusa tectifera* mostrou-se baixa quando comparada a espécies de peixes e mamíferos.

Observou-se elevação da concentração de metais pesados no sangue e músculo dos diferentes grupos, sendo o arsênico, o cádmio e o mercúrio mais elevados no sangue do grupo acidente e cádmio, chumbo e cobre mais elevados no músculo dos animais do grupo acidente.

*Hydromedusa tectifera* mostrou-se um importante bioindicador de poluição ambiental, principalmente para o monitoramento do Rio Iguaçu, afinal foi a única espécie sobrevivente ao acidente. No entanto, apesar da resistência às condições adversas do Rio Iguaçu, mostrou-se uma espécie pouco adaptável ao cativeiro. Isto pôde ser observado pela alta mortalidade que ocorreu nos três grupos de cágados estudados.

As alterações observadas no grupo acidente (leucocitose e altas concentrações de arsênico e alguns metais pesados no sangue e músculo) podem estar relacionadas ao acidente ambiental; já as alterações que ocorreram nos grupos referência e montante podem indicar que esses animais já estavam em ambiente alterado pela presença de poluentes e/ou resíduos industriais, ou tratam-se de valores normais para a espécie, pois não foram encontrados valores de referência para *Hydromedusa tectifera*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE et al. Organic contaminants and trace metals in the tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) afflicted with fibropapillomas in the Hawaiian Islands. **Mar. Poll. Bull.**, v.28, n.2, February, 1994. p.109-114.
- ALDERTON, D. The chelonian families. In: \_\_\_\_\_. **Turtles and turtoises of the world**. New York, 1988. p.167-183.
- ALLEMAN, A.R. et al. Morphologic and citochemical characteristics of blood cells from desert tortoise (*Gopherus agassizi*). **Am. J. Vet. Res.**, v.53, n.9, September, 1992. p.1645-1651.
- BAATRUP, E. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.100C, n.1/2, 1991. p. 253-257.
- BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**. São Paulo: Robe Editorial, 2 ed, 2003. 583p.
- BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F.; TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AchE activity from several marine species in pollution monitoring. **Mar. Environ. Res.**, n.30, 1990. p. 75-89.
- BOYER, T.H.; BOYER, D.M. Turtles, tortoises and terrapins. In: In: MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. London: W.B.Saunders Co., 1996. p.473-483.
- BRADFORD, M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, 1976. p. 248-254.
- CAMPBELL, T.W. Hematology of birds, reptiles and fish. **Vet. Tech. Coll.**, v.11, n.8, September, 1990. p.196-199.
- CAMPBELL, T.W. Clinical pathology. In: MADER, D.R. **Reptile medicine and surgery**. London: W.B.Saunders Co., 1996. p. 248-257.
- CANFIELD, P.J. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. **Aust. Vet. J.**, v.76, n.12, 1998. p.793-800.
- CLARKE, E.G.C.; CLARKE, M.L. Mineral or inorganic substances. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary Toxicology**. London, 1978. p.27-108.
- COSTA, J.R.M.A. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus***. Curitiba, 2001. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- DAVENPORT, J.; WRENCH, J. Metals levels in a leatherback turtle. **Mar. Poll. Bull.**, v.21, n.1, January, 1990. p.40-41.
- ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v.7, 1961. p.88-95.

ERNST, C.H.; BARBOUR, R.W. Order Testudines - the turtles. In: \_\_\_\_\_. **Turtles of the world**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1989. p.3-10.

FABRINI, L.G. **Acidente ambiental tira sossego de moradores**. Disponível em: <<http://www.milenio.com.br/Corvo/redeverde07-2000.html>> Acesso em: 27 jul. 2000.

FINCO, D.R. Kidney function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic Press, 5 ed, 1997. p.441-484.

FRYE, F.I. Hematology as applied to clinical reptile medicine. In: \_\_\_\_\_. **Reptile care: na atlas of diseases and treatments**. Neptune city: T.F.H. Publications, v.1, 1991. p.209-279.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. Hematologia dos répteis. In: \_\_\_\_\_. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Varela, 1 ed, 1994. p.125-132.

GILL, T.S.; TEWARI, H.; PANDE, J. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoniis* ham (Rosy barb). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.100C. n.3, 1991. p.501-505.

HARLESS, M.; MORLOCK, H. Taxonomy, evolution and zoogeography. In: \_\_\_\_\_. **Turtles - perspectives and research**. USA: Willy Interscience, 1979. p.30-42.

JACKSON, O.F. Reptiles part one: chelonians. In: COOPER, J.E.; BEYNON, P.H. **Manual of exotic pets**. British Small Animal Veterinary Association, new edition, 1991. p.221-243.

JACOBSON, E.R. Laboratory investigations. In: BEYNON, P.H.; LAWTON, M.P.C.; COOPER, J.E. **Manual of reptiles**. British Small Animal Veterinary Association, 1992. p.50-62.

JACOBSON, E.R. Blood collection techniques in reptiles: laboratory investigations. In: FOWLER, M.E. **Zoo & wild animal medicine**. Denver, Colorado: W.B. Saunders Co., 3 ed, 1993. p.144-152.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

KOZLOVSKAYA, V.I. et al. Cholinesterases of aquatic animals. **Rev. Environ. Contamin. and Toxicol.**, v.132, 1993. p.117-142.

LANGE, R.R. et al. Rescue of the fauna from a petroleum environmental accident at Iguazu River - Araucária - Paraná State - Brazil. **Arch. Vet. Sci.**, v.6, n.1, 2001. p. 41.

LANGE, R.R. et al. Pentastomíase em *Hydromedusa tectifera* (COPE, 1870). **Congresso Brasileiro de Especialidades em Medicina Veterinária**. Maio de 2002, p. 70.

LILLYWHITE, H.B.; GATTEN Jr, R.E. Physiology and functional anatomy. In: WARWICK, C.; FRYE, F.L.; MURPHY, J.B. **Health and welfare of captive reptiles**. Chapman & Hall, 1995. p. 4-30.

MADER, D.R. Normal hematology of reptiles. In: FELDMAN, B.F.; ZINKE, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Lippincott Williams & Wilkins, 5 ed, 2000. p.1126-1132.

MARKS, S.K.; CITINO, S.B. Hematology and serum chemistry of the radiated tortoise (*Testudo radiata*). **J. Zoo and Wildl. Med.**, v.21, n.3, 1990. p.342-344.

- MEAD, K.F.; BORYSENKO, M.; FINDLAY, S.R. Naturally abundant basophils in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*, possess cytophilic surface antibody with reaginic function. **J. Immunol.**, v.130, n.1, January, 1983. p.334-340.
- MONSERRAT, J.M.; BIANCHINI, A. Anticholinesterase effect of eserine (physostigmine) in fish and crustacean species. **Braz. Arch. of Biol. and Techn.**, v.44, n.1. March, 2001. p.63-68.
- MOURA, W.L. et al. Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sanguíneos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodylia). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** São Paulo, v.36, n.1, 1999. p. 45-50.
- NAQVI, S.M.; VAISHNAVI, C. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.3, 1993. p.347-361.
- PAIN, D.J. Lead in the environment. In: HOFFMAN, D.J. et al. **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: LEWIS, 1995. p.356-391.
- RIE, M.T.; LENDAS, K.A.; CALLARD, I.P. Cadmium: tissue distribution and binding protein induction in the painted turtle, *Chrysemys picta*. **Comp. Biochem. Physiol.**, available on line in August, 2001. p.20-29.
- ROSSKOPF, W.J. Normal hemogram and blood chemistry values for California desert tortoises. **Vet. Med. / Small Anim. Clin.**, v.77, January, 1982. p.85-87.
- SALAKIJ, C et al. Hematology, morphology and ultrastructure of blood cells and blood parasites from puff-faced Watersnakes (*Homalopsis buccata*). **Nat. Sci.**, v.36, 2002. p. 35-43.
- SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C.; WALKER, C.H. *In vitro* and *in vivo* cholinesterase inhibition in *Lacertides* by phosphonate- and phosphorothioate-type organophosphates. **Pest. Biochem. and Physiol.**, v.67, 2000. p.1-12.
- SCHÄPERCLAUS, W. Diseases not caused by pathogens. In: \_\_\_\_\_. **Fish diseases**. Rotterdam: A.A. Balkema, 1992. p.926-1071.
- SKOCH, E.J. Heavy metals in marine mammals: presence and analytical methods. In: DIERAUF, L.A. **Handbook of marine mammal medicine: health, diseases and rehabilitation**. Washington D.C.: C.R.C. Press, 1990. p.127-137.
- SMITH, J.E. Iron metabolism and its disorders. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic Press, 5 ed, 1997. p.223-239.
- SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2 ed, 1999. p.62-63.
- STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environ. Research**, v.47, 1999. p.1-10.
- TAYLOR, R.W.; JACOBSON, E.R. Hematology and serum chemistry of the gopher tortoise, *Gopherus polyphemus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.72A, n.2, 1982. p.425-428.
- TENNANT, B.C. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic Press, 5 ed, 1997. p.327-352.

TROIANO, J.C. et al. Blood biochemical profile of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in captivity. **J. Venom. Anim. Toxins**, v.7, n.2, Botucatu, December, 2001. p.15-21.

TURK, J.R.; CASTEEL, S.W. Clinical biochemistry in toxicology. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic Press, 5 ed, 1997. p.829-843.

WITKOWSKI, S.A.; FRAZIER, J.G. Heavy metals in sea turtles. **Mar. Poll. Bull.**, v.13, n.7, 1982. p.254-255.

ZAKRZEWSKI, S.F. Occupational toxicology. In: \_\_\_\_\_. **Principles of environmental toxicology**. Washington D.C.: A.C.S. Professional Reference Book, 1991. p.205-218.

ZINKL, J.G. Avian hematology. In: JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 4 ed, 1986. p. 256-273.