

Bruno Carvalho da Silva Bergamini

VALORES HEMATOLÓGICOS EM
***Geochelone carbonária* (Jabuti)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, para obtenção do grau de médico veterinário

Preceptor: Prof. Adj. Raimundo Souza Lopes

Botucatu

2011

Bruno Carvalho da Silva Bergamini

VALORES HEMATOLÓGICOS EM
***Geochelone carbonária* (Jabuti)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP, para obtenção do grau de médico veterinário

Área de Concentração: Animais Selvagens/ Patologia Clínica

Preceptor: Prof. Adj. Raimundo Souza Lopes

Coordenador de Estágios: Profa. Dra. Jane Megid

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Bergamini, Bruno Carvalho da Silva.

Valores hematológicos em *Geochelone carbonária* (Jabuti) / Bruno Carvalho da Silva Bergamini. Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado – Medicina Veterinária) -
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Raimundo Souza Lopes

Capes: 20702027

1. Hematologia veterinária. 2. Animais selvagens.

Palavras Chave: Animais silvestres; *Geochelone carbonaria*; Hematologia.

SUMÁRIO

Resumo.....	5
Abstract.....	6
1.Introdução.....	7
2. Revisão de Literatura.....	9
2.1 Hemograma em Quelonios.....	9
2.2 Descrição da Parte Pratica - Materiais e Métodos.....	18
2.3 Resultados.....	20
2.4 Discussão.....	21
3. Conclusão.....	23
4. Referencias Bibliograficas.....	24

Resumo:

O exame hematológico tem grande importância na avaliação da saúde de dos animais, inclusive dos reptéis, pois auxilia no diagnóstico de algumas enfermidades e ajuda a acompanhar a evolução clínica do paciente, porém os trabalhos e artigos referentes a estes assuntos são escassos, mesmo com o crescente número de atendimentos destes animais nas clínicas veterinárias. Além disso, existe uma grande quantidade de fatores individuais e ambientais, que influenciam nos valores hematológicos, como a idade, sexo, níveis de estresse, níveis nutricionais e estação do ano em que se faz o exame, entre outros. Por estes motivos estudos que tem como objetivo avaliar os valores de referência em animais clinicamente normais, são fundamentais para aumentar o conhecimento e auxiliam a abordagem clínica. Este trabalho procurou determinar os padrões Hematológicos do Jabuti (*Geochelone carbonária*) visando maior conhecimento da clínica desta espécie e ampliação das possibilidades de diagnóstico, acompanhamento da avaliação do estado geral e tratamento.

Abstract:

Hematology has a great importance in assessing the health of all animals, including reptiles, since it aids in the diagnosis of certain diseases and help to monitor patient's clinical evolution, although studies and articles in this area are rare, even with the increasing number of calls of these animals in veterinary clinics. Moreover, there are a lot of environmental and individual factors, which influence the hematological values of this group, such as age, sex, stress levels, nutrient levels and season which the exam was made, among others. For these reasons studies that aimed to evaluate the reference values of some specie, are essential to increase the knowledge in the field and to assist on the clinical approach. This paper aim's to study the patterns of Hematology of Tortoise (*Geochelone carbonaria*) seeking the greater knowledge of clinical pathology of this species and increasing the possibilities for diagnosis, monitoring clinical outcome, and assessment of the general state and treatment.

1. Introdução:

Atualmente sabe-se muito pouco sobre os padrões hematológicos dos répteis, apesar da crescente importância destes dados para diagnóstico destas espécies, que aparecem com frequência relevante e crescente nos consultórios e laboratórios de medicina veterinária (PEREZ 2008).

Tais padrões tem alta variação de acordo com a idade, sexo, níveis de estresse, níveis nutricionais e estação do ano em que se dá o exame (PEREZ 2008). Por exemplo, na hibernação: Contagens de hemácias feitas no início deste período tendem a ser mais altas do que no término do mesmo (FELDMAN et.al. 2000). Segundo Gottdenker & Jacobson (1995), os resultados podem ainda variar a partir do local de punção para coleta das amostras de sangue, devido à contaminação com linfa em locais próximos a vasos linfáticos, como o plexo venoso dorsal pós-occipital.

Ainda, a própria manipulação, armazenamento e processamento das amostras, podem interferir no resultado (SANTOS et. al. 2009, FELDMAN et.al. 2000).

A Hematologia é recurso fundamental para avaliar as condições clínicas do animal: Variações no eritrograma podem indicar anemia ou policitemia, assim como variações no leucograma podem mostrar alterações no sistema imunológico tais como: a leucocitose – que indica processos infecciosos, entre outros –, ou a leucopenia – que pode ocorrer em doenças virais (FALCE 2009, MADER 1996).

O Hemograma completo é composto pela análise do Hematócrito, da Hemoglobina, da contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, e da contagem diferencial de leucócitos (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996).

Na análise de sangue dos répteis outra dificuldade encontrada é a limitação de métodos: O sangue não pode ser examinado completamente em contadores eletrônicos, já que estes são ajustados para análise de sangue de mamíferos e a presença de hemácias nucleadas e de trombócitos pode interferir na contagem de leucócitos. Porém, a contagem de eritrócitos totais pode ser feita por estes aparelhos (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, GOTTDENKER & JOCOBSON 1995). O número total de leucócitos e trombócitos só pode ser obtido com exatidão por métodos de contagem manual, utilizando as soluções de Natt e Harrick (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004) e de Azul de Toluidina (SCHALM et. al. 1986) (utilizada neste trabalho). Os dois últimos métodos requerem o uso da câmara de Neubauer para contagem de células, porém, nesta, pode ser difícil diferenciar pequenos leucócitos de trombócitos, aumentando assim a margem de erro dos exames (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996).

A contagem diferencial de leucócitos também pode ser trabalhosa devido à dificuldade de diferenciar certos grupos de células como os Heterófilos e Eosinófilos, já que na maioria das espécies de répteis estas células possuem a mesma coloração e núcleos parecidos: A diferenciação dos grupos de células nos répteis requer prática (FELDMAN et.al. 2000).

Considerando os vários fatores de variação do exame da classe e a quantidade limitada de estudos sobre este assunto (FELDMAN et.al. 2000), qualquer estudo que procure analisar tais padrões de uma certa espécie tem o seu valor, já que acrescenta dados para ajudar na sistematização dos mesmos. A determinação desses padrões ainda necessita de muita pesquisa e estudo, porém isso não diminui a importância da análise de sangue de um paciente réptil, já que o acompanhamento das mudanças dos resultados do exame pode ajudar na avaliação da sua evolução clínica e tratamento adequado (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

O presente trabalho tem por objetivo auxiliar na determinação de valores hematológicos de referência da espécie *Geochelone carbonaria*, obtidos de animais clinicamente saudáveis, procurando contribuir para um melhor atendimento desta espécie, no hospital veterinário da FMVZ da UNESP de Botucatu de um modo mais amplo.

2. Revisão da literatura:

2.1 Hemograma em Quelônios

A coleta de sangue em quelônios pode ser feita em vários locais, como: a veia jugular (esquerda ou direita), o seio venoso dorso coccigeal, a veia coccígea caudal, o coração, a veia escapular, a veia ou artéria braquial, seios orbitais e o plexo venoso pós occipital (FELDMAN et. al. 2000, MADER 1996, GOTTDENKER & JOCOBSON 1995, PEREZ 2008 THRALL et. al. 2004). Alguns destes locais, como o plexo venoso pós occipital, são próximos de vasos linfáticos: por isso, pode haver contaminação com linfa nestas amostras coletadas. A veia jugular é o local que garante a menor chance de contaminação com linfa, por causa de seu calibre e fácil visualização (GOTTDENKER & JOCOBSON 1995, THRALL et. al. 2004).

O sangue deve ser coletado em tubos contendo anticoagulantes, como a heparina lítica. Tubos com EDTA não podem ser usados, pois este anticoagulante causa lise de células do sangue em varias espécies de répteis, principalmente em quelônios. A heparina potássica pode ser usada como anticoagulante, porém causa alterações em valores bioquímicos (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004). Os esfregaços devem ser feitos sem a utilização de anticoagulante, pois permitem a melhor avaliação dos componentes sanguíneos: sendo assim, o ideal é fazer o esfregaço imediatamente após a coleta (MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

O Hemograma deve ser feito sempre com amostras frescas de sangue. Por isso, se possível, faz-se o processamento deste sangue logo depois da coleta para, assim, evitar a grande quantidade de erros (FELDMAN et.al. 2000, THRALL et. al. 2004).

A quantidade de sangue coletada nunca pode passar de 10% do volume total de sangue do animal, por isso é importante saber o peso e o volume de sangue do paciente antes da coleta (FELDMAN et.al. 2000, MADER1995, THRALL et. al. 2004).

A análise das hemácias é feita a partir dos valores do hematócrito, da contagem total das mesmas e da concentração de hemoglobina (FELDMAN et.al. 2000, MADER1995).

O hematócrito pode ser obtido com a utilização de um tubo capilar de microhematócrito e a de uma centrífuga de microhematócrito. Esta é usada para girar a amostra do capilar a 12000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos para, assim, separar as células do plasma e conseguir obter o valor do hematócrito (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

A contagem total de hemácias pode ser feita utilizando-se um contador eletrônico ou por métodos manuais como a soluções de Natt e Harrick (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996 THRALL et. al. 2004) e a de Azul de Toluidina (SCHALM et. al. 1986) (usada neste trabalho). Para avaliação manual o sangue não coagulado deve ser diluído e colocado na câmara de Neubauer para contagem de células (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, SANTOS 2009, GOTTDENKER & JOCOBSON 1995, THRALL et. al. 2004). Usando-se os dois últimos métodos, também é possível obter o número total de leucócitos e trombócitos na mesma câmara. Porém, pode haver dificuldade de diferenciar pequenos leucócitos de trombócitos, pois neste caso apresentam aparência semelhante (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996).

A concentração de hemácias pode variar dependendo da estação do ano (antes da hibernação os valores são mais altos do que depois), da

temperatura ambiente, do sexo do animal (em algumas espécies os machos apresentam concentrações maiores do que as fêmeas) e de seu estado nutricional (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Répteis, em geral, têm menos eritrócitos circulantes do que os mamíferos ou aves. Existe também uma relação inversa entre o tamanho das hemácias e o número total de células na circulação. Por isso, os quelônios que possuem um volume corpuscular médio maior que os outros grupos de répteis apresentam um menor número de células circulantes (MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

A concentração de hemoglobina pode ser determinada utilizando métodos convencionais como o da cianometahemoglobina. Neste método usa-se um reagente para causar a lise das hemácias da amostra e depois coloca-se esta numa centrífuga para separar os componentes celulares do restante. Posteriormente, a amostra deve ser colocada em um espectrofotômetro para medir a concentração de hemoglobina (MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

A morfologia dos eritrócitos pode ser vista no esfregaço sanguíneo, a coloração mais usada para esse exame em répteis é a de Wright's, mas outras podem ser usadas: como Giemsa, Wright's-Giemsa, Wright's Leishman's e Romanowsky (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al.2004).

Os eritrócitos dos répteis normalmente são elípticos com citoplasma de laranja a rosa e uma textura homogênea. O núcleo é central e condensado em células maduras e, normalmente, vai se tornando mais condensado enquanto a célula amadurece (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Hemácias imaturas são menores, possuem um núcleo menos condensado e um citoplasma mais basofílico. Essas células normalmente estão presentes no esfregaço de animais jovens, em equidise ou com anemia (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

O tamanho variado das hemácias significa, portanto, a presença de células de diferentes idades no sangue: Este achado é chamado de anisocitose e normalmente é acompanhado de policromasia, que significa células coradas em diferentes intensidades. Este dois achados com discreta intensidade são comuns em animais saudáveis, porém, se forem exagerados, podem indicar doenças como a anemia regenerativa ou outras anormalidades eritrocitárias (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Os eritrócitos ainda podem apresentar anormalidades nucleares como mitose, binucleação, entre outras. Estas normalmente ocorrem em animais com anemia regenerativa, doenças inflamatórias ou em períodos pós-hibernação (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Ainda se usam valores corpusculares para avaliar a morfologia das hemácias. Estes são o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Estes valores utilizando as seguinte formulas:

- $VCM (fl) = \frac{\text{Hematócrito}(\%) \times 10}{\text{Numero de Hemácias} (/microlitro(\mu l) \times 10^6)}$
- $HCM(\text{gramas/ decilitro}(g/dl)) = \frac{\text{Concentração de Hemoglobina}(g/dl) \times 10}{\text{Contagem de Hemácias}(/\mu l \times 10^6)}$
- $CHCM(\%) = \frac{\text{Concentração de Hemoglobina} (g/dl) \times 100}{\text{Hematócrito}(\%)}$ (MADER 1996)

Apesar de existirem valores de referência para estes índices, estes são normalmente inválidos. Porém, estes podem ser usadas para avaliar algumas características dos eritrócitos: Valores altos de VCM significam que as células estão com um tamanho médio grande e valores baixos de CHCM significam que as hemácias estão, em média, hipocoradas. Estas duas características são comuns em animais anêmicos e se a progressão destes valores for acompanhada é possível determinar o grau de resposta do animal à anemia (MADER 1996).

A análise dos Leucócitos dos répteis é feita a partir da contagem total e diferencial de leucócitos. Métodos manuais devem ser usados para fazer a contagem de leucócitos, pois a presença de hemácias nucleadas e de trombócitos impede o uso de métodos eletrônicos, já que estas células interferem na contagem feita por este método. Os métodos normalmente utilizados são os mesmos que para avaliar a contagem total de hemácias, ou, se o animal possuir um elevado número de heterófilos, pode-se usar o método semidireto da phloxine B (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996).

Ainda, é possível estimar o número total de leucócitos a partir do esfregaço sanguíneo: nesse método usa-se um microscópio no aumento de 40x para contar o número total de leucócitos por campo por 10 campos e multiplica-se este número por 1000 (FELDMAN et.al. 2000).

A contagem diferencial dos leucócitos e a avaliação da sua morfologia podem ser feitas na mesma lâmina de esfregaço usada para avaliar a morfologia das hemácias. Os répteis, assim como aves e mamíferos, possuem duas famílias de células de defesa: os granulócitos – Heterófilos, Eosinófilos e Basófilos – e as células mononucleares – Linfócitos e Monócitos.

Os heterófilos são células exclusivas das aves e répteis. Sua função é semelhante ao neutrófilo dos mamíferos: reagem à inflamação e à infecção dos tecidos. Sua função primária é a fagocitose, participando da resposta imune contra infecções microbianas e parasitárias. Agem também na inflamação não específica (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996 THRALL et. al. 2004).

A morfologia e tamanho dos heterófilos muda entre grupos, entre os gêneros, entre as espécies e até entre as amostras de sangue de um mesmo animal dificultando, assim, a interpretação do leucograma (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996). Normalmente são células com grânulos fusiformes laranja claro ou laranja avermelhados (estes últimos

são muito numerosos nos quelônios). O núcleo da célula normalmente é excêntrico (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

A presença de heterófilos imaturos no esfregaço não é incomum (FELDMAN et.al. 2000). Estas células são pequenas, ovais e possuem grânulos grandes que tendem a ficar menores com a maturação da célula. Sua presença indica excessiva demanda de heterófilos, o que pode ocorrer em casos de infecção (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996).

Estas células também podem apresentar formas tóxicas, com vacuolização citoplasmática, basofilia, granulação anormal (grânulos azuis escuros ou roxos, com forma ou coloração anormal), degranulação (que também pode ser um artefato por causa da preparação) e lobulação nuclear em espécies onde o núcleo normalmente não é lobulado. A presença destas células tóxicas pode indicar reação contra uma doença (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Os heterófilos normalmente representam aproximadamente 40% do diferencial de leucócitos. O número de células circulantes é influenciado pela estação do ano: no verão é maior do que no inverno. O aumento significativo na porcentagem de heterófilos normalmente é associado a doenças inflamatórias, mas também pode ocorrer por outros motivos como em casos de estresse, neoplasias ou leucemias (MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Os eosinófilos dos répteis são células grandes e redondas, com grânulos esféricos e avermelhados na maioria das espécies; o núcleo pode ser simples ou lobado e é normalmente excêntrico (FELDMAN et.al. 2000, THRALL et. al. 2004). Os eosinófilos dos quelônios e crocodilianos são menores que os das serpentes e maiores que os dos lagartos (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004). Estas células representam de 7 a 20% do total de leucócitos no esfregaço. (FELDMAN et. al. 2000, MADER 1996)

O número total de eosinófilos no sangue é influenciado pela estação, onde os menores valores ocorrem no verão enquanto os maiores

ocorrem durante a hibernação. Normalmente representam até 20% do total de leucócitos. A eosinofilia é influenciada por estímulos parasitários ou estímulos não específicos. Em quelônios, os eosinófilos realizam a fagocitose de complexos imunes. (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004)

Os basófilos dos répteis possuem grânulos roxos escuros e metacromáticos, que podem às vezes obscurecer o núcleo – excêntrico e não lobado (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Os quelônios e crocodilianos possuem os maiores basófilos entre os répteis, enquanto os lagartos possuem os menores (MADER 1996, THRALL et. al. 2004). Estas células podem representar de 0 a 40% do total de leucócitos, porém os quelônios, em alguns casos, podem apresentar uma porcentagem de 50 a 60% aparentemente sem a presença de qualquer alteração. Não se sabe o porquê destes números altos, porém não parece haver relação com nenhuma patologia. Diferente de outros leucócitos, os basófilos aparentemente sofrem pouca ou nenhuma variação sazonal (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Estudos indicam que os basófilos dos répteis são similares aos dos mamíferos. Por esse motivo, é provável que eles também estejam envolvidos no processamento de imunoglobulinas de superfície e na liberação de histamina (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

O aumento do número de basófilos pode ocorrer na presença de hemoparasitas, como a hemogregarina e o tripanossoma (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996).

Os linfócitos dos répteis são semelhantes aos dos mamíferos em sua forma e função. São células redondas e mononucleares e seu citoplasma é tipicamente basofílico podendo conter grânulos azurófilos. É comum apresentarem alta relação núcleo:citoplasma. Possuem variação de tamanho: os maiores podem medir até 15 μm , enquanto os menores

medem de 5 a 10 μm , podendo ser confundidos com trombócitos no esfregaço sanguíneo, ou na câmara de Neubauer (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Estas células se originam do timo, da medula óssea, do baço e de outros tecidos linfopoiéticos. Estudos sugerem que existem mais do que duas populações (linfócitos T e B) de linfócitos nos répteis. Porém, assim como nos mamíferos os linfócitos B são responsáveis por produzir certas imunoglobulinas, enquanto os linfócitos T moderam a resposta imune (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

O número de linfócitos circulantes também sofre variação sazonal, tendendo a ser menor nos meses de inverno ou durante a hibernação. Isso ocorre principalmente em espécies de clima temperado, em que pode haver ausência de linfócitos em tecidos hematopoiéticos e no sangue periférico nestas épocas. No verão, o número de linfócitos tende a ser maior: espécies de clima temperado demonstram proliferação destas células logo após a hibernação. Estes números sugerem que a reposta imune durante os meses quentes será maior que a mesma em meses frios (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

A variação no número de linfócitos também é influenciada por outros fatores como: sexo (em algumas espécies fêmeas possuem um número maior de linfócitos do que os machos), nutrição (a má nutrição pode diminuir o número de linfócitos) e doença (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

A linfocitose pode ocorrer durante a inflamação, a cicatrização, certas infecções parasitárias e doenças virais. Os linfócitos normalmente são os mais prevalentes no diferencial, podendo chegar a 80% dos leucócitos em algumas espécies de répteis. (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004)

Os plasmócitos são raros no esfregaço sanguíneo na maioria dos répteis: normalmente chegam no máximo a 0,5% dos leucócitos no diferencial. Porém, esta porcentagem pode aumentar durante a infecção

ou inflamação. São células com citoplasma basofílico, núcleo excêntrico com cromatina densa e possuem um halo perinuclear (Golgi) proeminente que tem um terço do tamanho do núcleo (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Linfócitos reativos são mais comuns que os plasmócitos e sua presença sugere estimulação antigênica. Estas células possuem um citoplasma mais abundante e basofílico e núcleo com cromatina menos densa que o linfócito maduro e não reativo (MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Linfoblastos e promielócitos também são raros na circulação periférica: estas células possuem proporcionalmente mais citoplasma que os linfócitos maduros e os linfoblastos têm nucléolo evidente (MADER 1996).

Os monócitos normalmente, são as maiores células observadas no esfregaço sanguíneo de répteis: possuem um citoplasma cinza azulado, com ou sem vacúolos e um núcleo em forma de “U”, com cromatina granular. Em alguns casos, podem apresentar citoplasmas azurofílico, sendo chamados de azurófilos (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

A quantidade de monócitos no esfregaço sanguíneo é normalmente baixa, podendo variar entre 0 a 10% dos leucócitos. Estas células apresentam pouca variação sazonal: sua quantidade pode aumentar por causa do estímulo antigênico, durante doenças infecciosas (já que interagem com imunoglobulinas como a IgM) e na inflamação. Também participam da formação de células gigantes e de granulomas, durante a infecção bacteriana e na presença de trematóides (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Os trombócitos dos répteis são polimórficos, podem variar entre formas elípticas e fusiformes e possuem um núcleo central e citoplasma claro, que ocasionalmente pode apresentar grânulos azurofílicos. Porém, raramente aparecem na sua forma normal, pois tendem a sofrer danos

durante a manipulação da amostra sanguínea. Por isso, normalmente podem ser vistos sem citoplasmas ou com margem irregular. Frequentemente são observados agregados trombocitários no esfregaço sanguíneo: nestes as células permanecem unidas por filamentos de fibrina (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Os trombócitos podem apresentar um núcleo polimórfico associado a doenças inflamatórias. Quando estão ativos podem apresentar vacúolos no citoplasma. Possuem a mesma função que as plaquetas dos mamíferos e participam da coagulação sanguínea, da formação de trombos e da cicatrização (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

O número de trombócitos varia entre grupos e por causa de mudanças ambientais. Normalmente existem de 25 a 350 trombócitos para cada 100 leucócitos (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

2.2. Descrição da Parte Prática - Materiais e Métodos

Durante os meses de Janeiro e Junho de 2011, foram coletadas 6 amostras de sangue de 3 animais da espécie *Geochelone carbonária* residentes do Cempas(Centro de Medicina e Patologia de Animais Selvagens) da Fmvz da Unesp de Botucatu. No primeiro mês, coletou-se amostras de três animais diferentes e clinicamente saudáveis; no segundo mês, as coletas foram repetidas nos mesmos animais. Assim foi possível avaliar os valores hematológicos destes animais em duas estações do ano (verão e inverno); além disso, comparando-se os dois exames foi possível constatar qual foi a variação sazonal entre um período e outro.

No mês de janeiro, após a contenção adequada do animal e desinfecção do local de punção com álcool iodado; foram coletados 2

militros(ml) de sangue da veia jugular, com uma seringa de 5 ml e uma agulha de 0,70 x 30mm. O sangue foi colocado em um tubo de enpendorf descartável contendo 1 gota de heparina lítica. A partir de uma gota de sangue da própria seringa foram feitos dois esfregaços sanguíneos para cada amostra.

No mês de junho o mesmo procedimento foi repetido com os mesmos animais de janeiro, porém nesta ocasião em dois animais a amostra de sangue teve que ser coletada a partir do seio subcarapacial, pois ambos indivíduos, encontravam-se em estado de hibernação por causa da baixa temperatura no dia da coleta. A coleta do terceiro animal foi feita em outro dia, depois que o mesmo foi deixado numa caixa de contenção próximo a um aquecedor por aproximadamente 4 horas(para que saísse do estado de hibernação). Depois deste procedimento foi possível coletar o sangue deste individuo a partir da veia jugular.

Em ambos os períodos o processamento e a análise das amostras de sangue foram realizados da seguinte maneira:

A determinação do hematócrito foi feita por centrifugação de tubos capilares a 12000 rpm por 5 minutos numa centrífuga de microhematócrito. A leitura foi feita em escala própria e a partir do plasma do mesmo capilar, foram mesuradas as proteínas plasmáticas totais, utilizando-se a técnica da refratometria. (Refratômetro ATAGO. CO)

As contagens totais de eritrócitos, leucócitos e trombócitos foram feitas na câmara de Neubauer utilizando-se diluição de 1:100 com solução de Azul de Toluidina a 0.01%. Como neste método é difícil diferenciar leucócitos de trombócitos na câmara de Neubauer, os dois tipos celulares foram contados juntos e seu total foi obtido posteriormente através da proporção entre leucócitos e trombócitos no esfregaço.

A dosagem de hemoglobina foi realizada pelo método da cianometahemoglobina, reagindo-se 20 µl de sangue com 5 ml do reagente Drabkin (cianometahemoglobina); homogeneizando-se e esperando-se por 5 minutos para causar hemólise. Depois as amostras

foram colocadas em uma centrífuga por 5 minutos a 1500 rpm para separação dos núcleos dos eritrócitos do resto da solução. Para a mensuração da hemoglobina, a solução foi analisada pela técnica de espectrofotometria.(Espectrofotômetro Celm. SB 190 leitura em 540 nanômetros)

Os valores de volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem total de hemácias, a partir das fórmulas descritas anteriormente.

Os esfregaços foram corado pelo método e de Wright. Para cada amostra dois esfregaços foram feitos e cada um foi corado utilizando-se um método diferente. Os esfregaços obtidos pelos dois métodos foram comparados e aquele que apresentou melhor qualidade foi utilizado para a avaliação morfológica das células, para a contagem diferencial de leucócitos e, para obtenção da proporção entre leucócitos e trombócitos.

Todos os resultados foram anotados e comparados utilizando-se o Microsoft Excel a partir a media das amostras e seu desvio padrão.

2.3. Resultados:

A média dos resultados de janeiro, de junho e a média dos dois períodos de análise estão listadas na tabela 1. Nas lâminas de esfregaço não foi observada alguma alteração relevante.

Tabela 1: Resultados dos Exames Hematológicos dos animais Pesquisados

Parâmetros/ Animal	Média Janeiro	Desv. Pad. Janeiro	Média Julho	Desv. Pad. Junho	Média Total	Desv. Pad. Total	Referência (I.S.I.S. 1999)
Hemácias (x 10 ⁶ /μl)	0,47	0,15	0,48	0,13	0,48	0,12	0,47-6,3
Hemoglobina (g/dl)	10,97	1,80	4,80	0,95	7,88	3,62	7.0-7,9
Hematocrito (%)	27,00	3,46	20,67	6,66	23,83	5,88	18-47
VCM (fL)	615,93	208,61	422,30	39,28	519,12	171,09	71,4-468,1
CHCM (%)	40,50	1,71	24,09	3,42	32,30	9,31	29,3-31,8
PT(plasma) (g/dl)	4,87	0,42	3,67	0,70	4,27	0,84	3,3-7,4
Leucócitos (/μl)	6511,00	2627,75	3582,67	242,27	5046,83	2314,75	2200-13400
Heterófilos (/μl)	2763,67	1579,72	1517,67	123,14	2140,67	1212,45	88-6350
Linfócitos (/μl)	2543,33	2090,03	1543,67	198,22	2043,50	1436,25	225-6050
Eosinófilos (/μl)	239,00	280,38	340,33	127,84	289,67	202,64	22-2328
Basófilos (/μl)	324,00	206,36	84,00	53,84	204,00	188,34	50-5494
Monócitos (/μl)	416,00	179,31	97,33	49,08	256,67	210,45	44-666
Trombócitos (/μl)	5520,33	1836,00	3908,00	1160,95	4714,17	1633,21	

2.4. Discussão:

Analisando-se a tabela 1 é possível notar que a maioria dos resultados ficou dentro do padrão normal para espécie, o que era esperado já que se tratavam de animais saudáveis. Porém, os valores da média total dos resultados de Volume Corpuscular Médio (VCM) e Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), estão levemente maiores do que os valores normais para esta espécie.

O provável motivo para estas discrepâncias seria a existência de vários fatores que influenciam os valores hematológicos, como sexo, estação do ano e outros listados anteriormente; além disso o baixo número de animais analisados contribui para o aumento da variação entre os resultados.

Outro ponto que vale ressaltar é que estes resultados só estão um pouco fora do intervalo normal e todos os resultados de Contagem Total

de Hemácias, Concentração de Hemoglobina e Hematócrito, os quais são usados para conseguir os valores de VCM e CHCM , estão dentro do intervalo de referência, o que diminui a relevância destas discrepâncias para o estudo

Pode-se observar pela tabela 1 que o desvio padrão para a maioria dos resultados é consideravelmente alta; principalmente para os parâmetros avaliados manualmente (como Contagem total de Leucócitos). O provável motivo para tal variação seria a baixa precisão dos métodos de avaliação. É possível que o baixo número de animais estudados também tenha contribuído para esta alta variação

As médias dos resultados de Hemoglobina e Hematocrito do mês de junho são bem menores do que a do mês de janeiro. Isso é um indicio que pode ter havido contaminação, destas amostras com linfa, já que foram coletadas a partir do seio sub-carapacial, pois já é conhecido que neste local de coleta as contaminações com linfa são freqüentes (GOTTDENKER & JOCOBSON 1995). Isso só reforça que o melhor local de coleta é a veia jugular (FELDMAN et.al. 2000, MADER 1996, THRALL et. al. 2004).

Como esperado o número médio de heterófilos e hinfócitos foi maior no mês de janeiro do que no mês de junho, o que confirma os dados da literatura que informam que o numero médio destas células é maior no verão do que no inverno. O número médio de eosinófilos foi maior no mês de junho, o que também condiz com as fontes consultadas, que afirmam que este valor é mais alto no inverno. Porém, diferente do que a literatura destaca, houve considerável variação nos valores médios de basófilos e monócitos entre os dois meses de coleta. Mas a literatura também afirma que pode haver um alto valor de Basófilos em quelônios sem que isso esteja relacionado a qualquer patologia. Portanto, é aceitável que haja variação no número destas células entre dois momentos de estudo. Já a variação no número médio de monócitos

pode ser associada aos vários fatores que influenciam na análise de sangue dos répteis.

3. Conclusão

Este Trabalho teve como objeto de estudo analisar padrões hematológicos do sangue dos jabutis.

Durante a realização do mesmo pode-se constatar:

Grande variação sazonal, ou seja de acordo com a época do ano, as células sanguíneas desta espécie variam na concentração das mesmas no sangue;

Existem muitos fatores que influenciam os valores hematológicos de répteis saudáveis além do sazonal, pois tanta variação nos resultados, sugere outros fatores intercorrentes;

Algumas alterações hematológicas constatadas no hemograma não puderam ser explicadas ou compreendidas (por exemplo, o media total do VCM acima do valor de referência, apesar dos valores de concentração de hemácias e hematócrito normais). Para tanto seria necessário um maior numero de amostras e mais fontes de pesquisa, o que fica como sugestão pra estudos futuros..

Com o incentivo dos núcleos de estudos e pesquisas poderíamos conseguir chegar a determinar valores de referência mais confiáveis e melhor avaliação clinica; não só para a espécie estudada, mas para todos os répteis.

A medicina veterinária tem um grande papel na conservação de todas as espécies e conseqüentemente no seu habitat e no meio ambiente.

Estudos nesta área são cada vez mais necessários para impedir que grandes tesouros de nossa fauna continuem a desaparecer e com eles o conseqüente empobrecimento do meio ambiente e da vida selvagem como um todo.

4 Referências Bibliográficas:

1. THRALL M. A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry** 1. ed. Fort Collins Lippincott Willan & Wikins 2004 582p
2. FELDMAN V. B. ; ZINKL J.G.; JAIN N.C. **Scham's Veterinary Hematology** 5 ed. Philadelphia Lippincott Williams & Wikins 2000 1344p
3. MADER D. R. Reptile Medicine and Surgery 1 ed. Philadelphia W. B. Sawnders 1996 512p
4. SCHALM O. W.; JAIN N. C. ; CARROLL E. J. **Scham's Veterinary Hematology** 4 ed. Philadelphia Lca & Febiger 1986 1344p
5. GOTTDENKER N.L.; JOCOBSON E.R. Effect of Venipuncture Sites on Hematologic and Clinical Biochemical Values in Desert Tortoises (*Gopherus agassizii*) am J Vet Res, Vol 56, No. 1, January p. 19-21 1995
6. SANTOS M. R. D. ; FERREIRA L. S.; BATISTOTE C. ; GROSSMAN A.; BELLINI C. Valores hematológicos de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) juvenis selvagens do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, **Brasil Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 46, n. 6, p. 491-499, 2009
7. PÉREZ M. A.C. **Valores hematológicos de la tortuga motelo (Geochelone denticulata), mantenidos en cautiverio en la ciudad de Iquitos-Perú** 2008 51p. Tese (Titulo Profissional de Medico Veterinário) Facultad de Medicina Veterinaria E. A. P. de Medicina Veterinaria, Lima- Peru
8. FALCE M. C. L. B. **Hematologia de Repteis- Revisão Bibliografica** 2009 53p. Tese(Graduação em Medicina Veterinaria) Universidade Castelo Branco, Campinas

9. **INTERNACIONAL SPECIES INFORMATION SYSTEM, 1999**
Conventional U.S.A. Units "GEOCHELONE CARBONARIA
SOUTH AMERICAN RED-FOOTED TORTOISE"