

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PERFIL HEMATIMÉTRICO E IDENTIFICAÇÃO DA
HEMOGLOBINA DO BICHO PREGUIÇA
(Bradypus variegatus)

FRANCIMAR FERRARI RAMOS

RECIFE – PE

FRANCIMAR FERRARI RAMOS

**PERFIL HEMATIMÉTRICO E IDENTIFICAÇÃO DA
HEMOGLOBINA DO BICHO PREGUIÇA
(*Bradypus variegatus*)**

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração em Fisiologia, da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Peres da Costa

Co-orientadora:

Prof^a Dr^a Denia P. Fittipaldi Duarte

Recife - PE

2006

Ramos, Francimar Ferrari

Perfil hematimétrico e identificação da hemoglobina do bicho preguiça *Bradypus variegatus* / Francimar Ferrari Ramos. – Recife: O Autor, 2006.

82 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. *Bradypus* 2. Hematologia 3. Hemoglobina I. Título.

599 CDU (2.ed.)

UFPE

599 CDD (22.ed.)

CCB – 2007-080

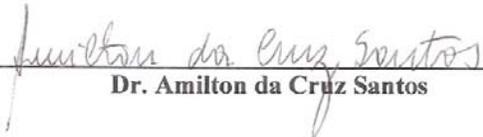
FRANCIMAR FERRARI RAMOS

**Perfil hematimétrico e identificação da hemoglobina
do bicho preguiça (*Bradypus variegatus*)**

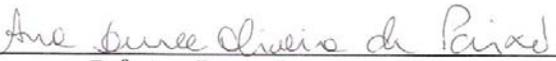
Data da defesa: 29 de dezembro de 2006

ORIENTADOR
Dr. Carlos Peres da Costa

BANCA EXAMINADORA:



Dr. Amilton da Cruz Santos



Dr.^a Ana Durce Oliveira da Paixão



Dr.^a Maria do Socorro Brasileiro Santos

“Na vida, nem sempre você pode fazer o que gosta, mas sempre deve gostar do que faz” .

Autor Desconhecido.

**Para minha linda e maravilhosa esposa, Livia, e a minha
filha, Luiza, minha maior fonte de inspiraçaõ e força.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Ao Prof^o Dr. Carlos Peres da Costa, pela confiança depositada ao me aceitar como seu orientando e pela oportunidade de conviver durante este período em seu laboratório. Algo que me fez crescer muito profissionalmente e pessoalmente.

A Prof^a Dr^a Dênia Fittipaldi Duarte, pela co-orientação, pelas preciosas sugestões, críticas e pela enorme disponibilidade e paciência com que revisou a minha tese. Peço desculpas pelas noites mal dormidas e por todos contratempos. A minha eterna gratidão e admiração.

A todos os professores do mestrado do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em particular, Márcio, por todas as orientações e apoio logístico.

Aos alunos de iniciação científica, Priscila Monteiro, Ana Carolina, Hudson e Daniela pelo apoio nos cuidados com os animais.

Aos meus colegas de Laboratório, Eduardo Magalhães (Edu), Helane e Daniela pelas provas de companheirismo e cumplicidade, principalmente nos momentos mais difíceis. Tenho a certeza que fiz três amigos grandes amigos.

Ao Instituto Nacional do Meio Ambiente (IBAMA), por liberar os animais e permitir a viabilidade desta pesquisa.

Aos colegas de turma: Érika Uchoa, Érica, Leonardo, Juliany, Priscila Passos, Ana Virgínia, Neciula, Thais e Fátima Daniela pelos bons momentos de convivência durante o curso.

Ao laboratório CERPE por ter viabilizado a realização das análises laboratoriais.

A Dr. Izabel Nascimento, Chefe do Laboratório do Laboratório Municipal de Saúde Pública (Prefeitura da Cidade do Recife), pelas orientações e apoio técnico.

A Prof^a Dr^a Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorin, do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelas orientações que foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os colegas da PULMOCARDIO Fisioterapia, companheiros de luta e aspirações, sempre solícitos e dispostos a ajudar, principalmente nas minhas ausências. O meu mais sincero agradecimento, pelo apoio e compreensão que tenho recebido ao longo de nossa convivência, em especial aos amigos para toda hora: Bertha Rizzo, Mário Wanderlay, Eduardo Ériko, Flávio Maciel e Valdecir Galindo,

Aos colegas e professores da Faculdade Integrada do Recife pelo agradável convívio e as constantes palavras de incentivo, em especial a querida amiga Anna Myrna, companheira de anos, o qual também me ajudou na análise estatística deste trabalho.

Aos meus pais (José Ramos e Renilde Ferrari), pela preocupação, apoio e incentivos constantes além do amor incondicional, que serviu e sempre me servirá de alicerce. A minha eterna gratidão.

Meu agradecimento todo especial a minha grande amiga Indianara Nascimento de Araújo. O que falar da Índia? A minha gratidão e apreço por você é tão grande, que eu teria que escrever uma outra dissertação para expressá-la. Você não é apenas uma grande amiga, ao longo do tempo ganhei mais uma irmã, ainda que não seja por cota sangüínea, mais importante, por afinidade. Obrigado pelas palavras de incentivo e até as discussões que não me deixaram desistir de dar mais este passo.

A você, Lívia Andrade, uma colega de trabalho e mestrado, uma referência, um lindo sorriso, uma amiga, uma paixão, uma cúmplice, uma adorável e dedicada esposa, a mãe mais linda que já vi e certamente a mulher da minha vida. O meu agradecimento maior pelos constantes momentos de felicidade. A sua compreensão, tolerância, carinho, seu sorriso, sua objetividade, seu amor e freqüentes palavras de incentivo foram determinantes para que pudesse seguir em frente. Tenho convicção que não teria terminado esta tese se não tivesse o privilégio de sua companhia todos os dias. Eu te amo!!!

RESUMO

O objetivo deste estudo foi, em preguiças *Bradypus variegatus*, estabelecer o perfil hematimétrico e identificar os tipos de hemoglobina (Hb), além de avaliar se existe influência do sexo sobre estes parâmetros. Estudou-se 10 preguiças (6 machos e 4 fêmeas), não anestesiadas, mantidas em cativeiro, pesando ($X \pm DP$) $3,6 \pm 0,79$ kg e com temperatura retal média de $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Coleta de sangue, através de punção da veia cefálica medial do membro anterior, foi obtida para realização da hematimetria, do esfregaço sanguíneo e da eletroforese e Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) da Hb. Os resultados ($X \pm DP$) foram demonstrados de forma descritiva e a avaliação estatística da influência do sexo, foi realizada através do teste de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$). O hematócrito ($30,4 \pm 4\%$), foi inferior ao encontrado em *B.tridactylus* e *Choloepus*; a contagem de hemácias ($3 \pm 0,3 \times 10^6/\text{mm}^3$) e teor de Hb ($11 \pm 1\text{g/dl}$) foram similares aos encontrados em outras espécies de preguiças, porém, inferiores a de alguns mamíferos de alto metabolismo. O Volume Corpuscular Médio, a Hemoglobina Corpuscular Média e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média apresentaram, respectivamente, os valores: $104 \pm 4\text{fl}$; $40 \pm 6\text{pg}$ e $38,4 \pm 5\%$. Estes foram semelhantes aos encontrados em *Choloepus* e superiores aos de outros mamíferos, evidenciando presença de eritrócitos grandes e com maior conteúdo de Hb. Influência do sexo foi encontrada apenas na contagem de hemácias, a qual se mostrou maior nos machos ($p < 0,05$). A eletroforese da Hb, baseada no padrão de referência de Hb's humanas, demonstrou presença destas na posição da HbA₁ (15%) e na posição da HbH (75%) e o HPLC mostrou 5 picos cromatográficos expressando a existência de 5 formas de Hb's no hemolisado. O perfil hematimétrico aliado à multiplicidade de Hb's, presentes no sangue de *B.variegatus*, poderiam estar relacionados às características comportamentais e fisiológicas destes animais tais como, sua vida sedentária, seu baixo metabolismo, sua reduzida temperatura corporal, além da capacidade de manter-se em apnéia, durante alguns minutos, sem repercussões fisiológicas.

Palavras Chave: 1. *Bradypus*; 2. Hematologia; 3. Hemoglobina

ABSTRACT

The objective of the present study was to carry out hematimetric profile and identify the types of hemoglobin (Hb) present in the blood of the sloth, *Bradypus variegatus*, evaluating the influence of sex over these parameters. The present study was carried out in ten sloths (6 male and 4 female), unanaesthetized, kept in a restricted area, weighting ($X \pm SD$) $3,6 \pm 0,8$ kg, and presenting a rectal temperature of $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Blood samples were drawn with a needle introduced in the medial cephalic vein of the forelimb for hematimetric studies, blood smear electrophoresis in alkaline medium, and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Results are presented in a descriptive manner, and to evaluate the influence of sex Mann-Whitney non-parametric test was employed ($p < 0,05$). The hematocrit ($30,4 \pm 4\%$) was lower than that found in *B.tridactylus* and *Choloepus*; the red cell count ($3 \pm 0,3 \times 10^6/\text{mm}^3$) and the quantity of hemoglobin ($11 \pm 1\text{g/dl}$) was similar to that found in other species of sloths, but, lower in regards to the some mammals with high metabolic rate. The mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean concentration of corpuscular hemoglobin (MCCH) were, respectively, $104 \pm 4\text{fl}$; $40 \pm 6\text{pg}$ e $38,4 \pm 5\%$. Similar to those found in *Choloepus* genus and higher when compared to other mammals, denoting the presence of a bigger size eritrocyte and a greater content of hemoglobin when compared to other mammals. Influence of sex was found only in red blood cell counting, which showed to be higher in males ($p < 0,05$). The Hb electrophoresis in alkaline medium, regarding human Hb as a pattern, showed the presence of Hb in position HbA1 (15%) and in position HbH (75%) and the HPLC showed five chromatographic peaks expressing the presence of five forms of Hb in the hemolysate. This hematimetric profile and the multiplicity of Hb in the blood of sloths, *B.variegatus*, could be related to behavioral and physiological characteristics of these animals such as sedentary lifestyle, low metabolic rate, temperature, oxygen partial pressure, besides the capacity of undergoing prolonged periods of apnea.

Words key: 1. Bradypus; 2. Hematology; 3. Hemoglobin

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Visão tridimensional da molécula de hemoglobina com a demonstração de sua estrutura primária, secundária, terciária e quaternária.....	17
Figura 2. Identificação dos tipos de hemoglobinas por eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino.....	25
Figura 3. Cromatogramas de hemoglobinas humanas por técnicas de cromatografia líquida de alta resolução com o VARIANT e programa β – Talassemia (VARIANT [®] da BIO-RAD) Neste são identificadas duas Hemoglobinas anormais (Hbs S e Hb C).....	26
Figura 4. Histograma representativo da classificação taxonômica da preguiça.....	28
Figura 5. Distribuição geográfica das espécies de Preguiças do gênero <i>Bradypus</i> na América do Sul.....	29
Figura 6. Preguiçário localizado nas vizinhanças do departamento de fisiologia e farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco.....	34
Figura 7. Procedimento de punção venosa da veia cefálica medial do membro anterior, para obtenção das amostras sanguíneas em <i>B. variegatus</i>	35
Figura 8. Padrão eletroforético do hemolisado da preguiça e humano após 20 minutos de corrida a 300V na cuba de eletroforese em acetato de celulose com pH alcalino.....	40
Figura 9. Comportamento cromatográfico típico em HPLC (Bio-Rad) do hemolisado obtido em preguiça (<i>Bradypus variegatus</i> , PG 05).....	42
Figura 10. Esfregação de sangue periférico de <i>B. variegatus</i>	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Identificação individual das preguiças (*B. variegatus*) estudadas quanto ao sexo e valores de peso e temperatura retal antes da coleta das amostras de sangue.....39

Tabela 2. Valores mínimo, máximo e a média com desvio padrão (médias±DP) das determinações hematimétricas obtidas em *Bradypus variegatus* fêmeas e machos.....39

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros hematimétricos obtidos em *Bradypus variegatus* segundo o sexo.....40

Tabela 4. Hemoglobinas identificadas pelo HPLC com os respectivos valores médios percentuais e tempo de retenção médio, mínimo e máximo para cada Hb identificada.....41

Tabela 5. Valores individuais de peso, temperatura e parâmetros hematimétricos em *Bradypus variegatus*.....72

ABREVIATURAS

ATP- adenosina trifosfato

CHCM- concentração de hemoglobina corpuscular média

CO₂- gás carbônico

dL- decilitros

DPG- difosfoglicerato

EDTA- dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético

fL- fenolitros

FC- frequência cardíaca

FR- frequência respiratória

Hb- hemoglobina

HbA₁- hemoglobina A₁

HbF- hemoglobina fetal

HbH- hemoglobina H

HbO₂- curva de dissociação da oxihemoglobina

HCM- hemoglobina corpuscular média

Hm- hemácias

HPLC- cromatografia líquida de alta performance

Ht- hematócrito

IBAMA – Instituto Nacional do Meio Ambiente

μm - micrômetros

O₂- oxigênio

PaCO₂- pressão parcial de gás carbônico arterial

pH- potencial de hidrogênio

pg- picogramas

PO₂- pressão parcial de oxigênio

RDW- Red blood cell Distribution Width

TC – Temperatura Corporal

VCM- volume corpuscular médio

SUMÁRIO

Folha de Pensamento	iii
Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
Índices de figuras.....	ix
Índices de tabelas	x
Abreviaturas	xi
SUMÁRIO	xii
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 O sangue.....	13
1.1.1 Função.....	13
1.1.2 Constituintes.....	14
1.1.3 Eritrócitos.....	15
1.1.4 Hemoglobina.....	16
1.1.4.1 Estrutura.....	16
1.1.4.2 Função.....	18
1.1.5 Hematimetria.....	19
1.1.5.1 Contagem de eritrócitos ou hemácias.....	20
1.1.5.2 Dosagem de hemoglobina.....	20
1.1.5.3 Determinação do hematócrito.....	21
1.1.5.4 Volume corpuscular médio.....	21
1.1.5.5 Hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média.....	22
1.1.5.6 Amplitude de distribuição dos eritrócitos.....	23
1.1.6 Método para identificação das hemoglobinas.....	24
1.1.6.1 Eletroforese.....	24
1.1.6.2 Cromatografia líquida de alta resolução.....	26
1.1.7 O bicho preguiça.....	26
2. OBJETIVO	
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33

3.1	Animais.....	33
3.2	Coleta das amostras sanguíneas.....	34
3.3	Análises laboratoriais.....	35
3.3.1	Hematimetria.....	35
3.3.1.2	Esfregaço sanguíneo.....	36
3.3.1.2.1	Preparação.....	36
3.3.1.2.2	Análise microscópica.....	36
3.3.2	Identificação da hemoglobina.....	37
3.3.2.1	Eletroforese em acetato celulose.....	37
3.3.2.2	Cromatografia líquida de alta resolução.....	38
3.4.	Análise estatística.....	38
4.	RESULTADOS	
4.1	Análises hematimétricas.....	39
4.2	Análise eletroforética da hemoglobina.....	39
4.3	Análise cromatográfica em HPLC.....	40
4.4	Análises do esfregaço sanguíneo.....	41
5.	DISCUSSÃO	42
6.	CONCLUSÕES	43
7.	REFERÊNCIAS	44
	Anexos	72

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1 – O sangue

1.1.1 - Função

O sangue é uma massa viscosa líquida contida num compartimento fechado, o aparelho circulatório. Este a mantém em movimento regular e unidirecional, devido essencialmente às contrações rítmicas do coração o que faz com seja o principal sistema de transporte no organismo. Assim, as funções do sangue mostram uma relação estreita com sistema circulatório, que se encarrega de criar mecanismo propicio para que ele circule, distribuía nutrientes e remova catabólitos por todo organismo (LORENZI e VERRASTRO, 1999).

Por sua característica transportadora, o sangue participa no organismo de forma direta e indireta exercendo várias funções: respiratória, transportando gases respiratórios, oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2); nutritiva: transportando os nutrientes necessários para a vida celular, obtidos no sistema digestivo ou nos órgão de reserva, transferindo-os ao líquido intersticial; excretora: transportando substâncias e resíduos metabólicos, que devem ser eliminadas do organismo, pelos órgãos de excreção; imunológica: através do transporte de hormônios que, a partir de seus locais de produção nas células endócrinas, devem chegar a outras células para influenciar suas ações; de regulação térmica: por sua rápida circulação, ao distribuir o calor e igualar as temperaturas das diferentes partes do corpo; além disso, quando necessário, contribui para a perda de calor a partir da respiração; tamponante do pH: o sangue possui importantes sistemas de tamponamento do pH que contribuem para manter constante a concentração de íons nos líquidos corporais e, por fim, uma importante função do sangue, mas freqüentemente esquecida, é a transmissão de força hidráulica, que é utilizada tanto em vertebrados quanto em invertebrados em muitos processos, tal como na ultrafiltração renal, locomoção da minhoca, rompimento da carapaça na muda dos

crustáceos, ereção peniana, etc. (WEISS 1976; REECE, 1996; SCHMIDT-NIELSEN 2002; SWERSON, 2006).

1.1.2 – Constituintes

O tecido sanguíneo é constituído por três tipos celulares principais, eritrócitos (glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos) e plaquetas (trombócitos), suspensas em uma fase líquida denominada plasma. Esta contém além das células, um amplo espectro de proteínas, substâncias orgânicas e inorgânicas, hormônios e outros componentes. Cerca de 95% do plasma é composto de água, o que facilita a circulação dos componentes do sangue (REECE, 1996).

Todas as classes e subclasses celulares sanguíneas apresentam três traços característicos: 1) as maiorias das células são maduras e, geralmente, muito diferenciadas; 2) a maioria das células maduras possui uma vida média curta, de semanas ou dias; 3) as células sanguíneas maduras são incapazes de realizar atividade proliferativa, ou seja, perderam a capacidade de efetuar mitose (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

A limitada vida média das células sanguíneas maduras e sua incapacidade de realizar mitose tornam necessária a existência de populações celulares cuja função é gerar células maduras de cada tipo de célula sanguínea. Essas populações celulares constituem as chamadas células geradoras ou poiéticas. As células eritropoiéticas são aquelas com capacidade proliferativa e maturativa para gerar eritrócitos maduros, enquanto que as células granulopoiéticas são aquelas que geram granulócitos. Todo o sistema de populações celulares que geram células sanguíneas recebe o nome de sistema de células hematopoiéticas ou sistema hematopoiético (MASPES, 1973; SWERSON, 2006)

1.1.3 - Eritrócitos

Os eritrócitos maduros circulantes e as células eritropoiéticas formam, em seu conjunto, o éritron, que pode ser considerado como um órgão que possui uma porção fixa (éritron fixo), constituídas pelas células eritropoiéticas relativamente fixas nos órgãos eritropoiéticos, e uma porção circulante (éritron circulante), representada pelos reticulócitos e pelos eritrócitos maduros do sangue (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

O éritron pode ser definido funcionalmente como uma unidade diferenciada para o transporte de O₂ e do CO₂ devido ao desenvolvimento de duas importantes proteínas, a hemoglobina e a anidrase carbônica (SWERSON, 2006).

As células do éritron podem ser divididas em quatro categorias: 1) células nucleadas ou blastos (proeritroblastos, eritroblastos), 2) reticulócitos medulares, 3) reticulócitos sanguíneos e 4) eritrócitos maduros (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

O eritrócito desenvolve-se a partir de uma célula grande e imatura, o proeritroblasto, que constitui a célula mais imatura do éritron fixo. Essa célula está geneticamente programada para efetuar 3 ou 4 divisões mitóticas e para sintetizar Hb até que cada uma de suas 8 ou 16 células-filhas contenha uma quantidade de moléculas do pigmento calculada em 300 milhões (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). Esse processo tem necessidades gerais, comuns a todas as células proliferativas, entre as quais se incluem todas as substâncias necessárias para a construção celular e necessidades especiais, ou seja, substâncias necessárias para a síntese e proteção da Hb (SWERSON, 2006).

A transformação do proeritroblasto em eritrócito implica uma série de modificações sucessivas, entre as quais merecem ser citadas a diminuição do tamanho celular, com contração e aumento da densidade do núcleo, a perda dos nucléolos, modificações citoplasmáticas associadas com síntese de Hb e, finalmente, a perda do núcleo (MASPES, 1973; REECE, 1996).

Os eritrócitos são as células mais numerosas no sangue, seu citoplasma é formado por 1/3 de Hb e 2/3 de água. Sua função é carrear hemoglobina, que por

sua vez, transporta O₂ dos pulmões para os tecidos e CO₂ dos tecidos para os pulmões (LORENZI e VERRASTRO, 1999).

Nos mamíferos os eritrócitos não têm núcleo e possuem formato de discos esféricos, ligeiramente bicôncavos, com exceção de todos os membros da família dos camelos, os quais possuem eritrócitos ovais. Já os glóbulos vermelhos de todos outros vertebrados (aves, répteis, anfíbios e peixes), possuem núcleos, são quase universalmente ovais e, freqüentemente, são muito maiores que os dos mamíferos (SWERSON, 2006). É desconhecido a importância funcional dos eritrócitos nucleados versus o não nucleado assim como a da diferença de tamanho dos mesmos entre as espécies (COLES, 1984; SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

1.1.4 – Hemoglobina

1.1.4.1 – Estrutura

A Hb é uma proteína conjugada que apresenta como principal função veicular o transporte de oxigênio para os tecidos. Cada molécula de Hb compõe-se de quatro grupos heme de estrutura porfirínica, cada um contendo um átomo de íon ferroso ligado à parte protéica da molécula, que é a globina. Esta, por sua vez, é constituída de quatro cadeias polipeptídicas. A fração heme é a parte corada da molécula, responsável pela cor vermelha do sangue, e a fração globínica é incolor (LORENZI e VERRASTRO, 1999).

A globina (parte protéica da molécula de hemoglobina) é composta por quatro cadeias polipeptídicas constituídas por ácidos aminados seqüenciados. Dependendo da seqüência de ácidos aminados, as cadeias polipeptídicas são denominadas em humanos α , β , δ e γ . As combinações de um par de cadeias α com um par de outras cadeias diferentes formam os três tipos de hemoglobinas normais em humanos, as Hbs A₁, A₂ e F(fetal). Na Hb A₁, temos dois pares de cadeia α ₂ e β ₂, na Hb F temos α ₂ e γ 2 e na hemoglobina A₂ temos α ₂ e δ ₂ (COSTANZO, 1999; LORENZI e VERRASTRO 1999).

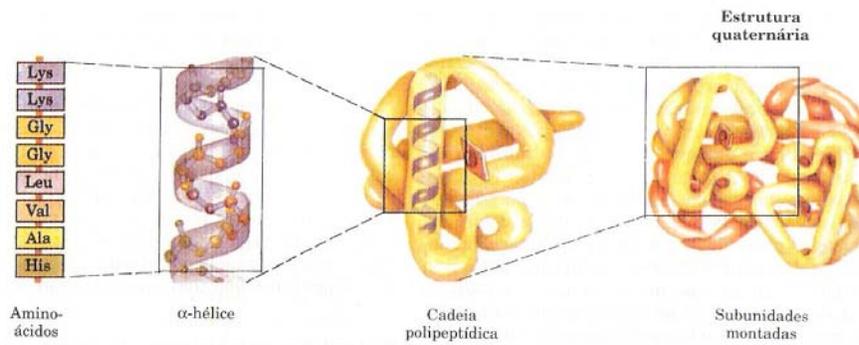


FIGURA. 1 – Visão tridimensional da molécula de hemoglobina com a demonstração de sua estrutura primária, secundária, terciária e quaternária (Hemoglobina A₁).

A HbA₁ é o tipo predominante entre as Hb's normais, apresentando peso molecular de 64.458 dáltons e 574 aminoácidos, uma vez que as cadeias de globina tipo α possuem 141 aminoácidos, e as do tipo β totalizam 146 aminoácidos (COSTANZO, 1999). Os pesos moleculares da Hb da maioria das espécies são citados como variando de 66.000 a 69.000 dáltons e as diferenças nas moléculas de globina, nas diferentes espécies, provavelmente, concorrem para as ligeiras diferenças em seus pesos moleculares (BUNN, 1981).

A seqüência dos ácidos aminados das cadeias polipeptídicas encontra-se sob controle genético e, é esta seqüência que determina o comportamento eletroforético e/ou outras propriedades físico-químicas de cada Hb, permitindo assim a sua identificação. Os diferentes tipos de Hb's refletem comportamentos diferentes na sua função de transportador da molécula de oxigênio, aumentando ou diminuindo sua afinidade ao oxigênio. A HbF possui maior afinidade ao oxigênio que a HbA₁, já a HbH, uma hemoglobina instável, constituída por quatro globinas β , tem afinidade pelo oxigênio 12 vezes maior do que a HbA₁ (WIMBERLEY, BURNETT, COVINGTON, 1990).

1.1.4.2 - Função

A Hb é um pigmento respiratório essencial à vida animal e embora todas as proteínas que constituem um organismo sejam de importância fundamental, a hemoglobina, pela função que realiza, pode ser considerada como a mais conhecida do meio animal (BUNN, 1981).

Nos organismos multicelulares, para que a respiração celular ocorra, é necessário que a oferta de oxigênio (O_2) seja adequada para suprir a demanda metabólica dos tecidos. Nos mamíferos, o O_2 é transportado pelo sangue sob duas formas: dissolvido no plasma e ligado à Hb. No entanto, a quantidade de O_2 dissolvido é insuficiente para atender às necessidades metabólicas dos tecidos. Desse modo, é necessária uma segunda forma de transporte de oxigênio, combinada com a Hb, de modo que 98% do conteúdo total de O_2 no sangue fazem ligação reversível com a Hb dentro das hemácias (COSTANZO, 1999; LORENZI e VERRASTRO 1999).

Há diversas variantes da molécula de Hb que, por sua vez, apresentam diferença quanto a sua afinidade ao O_2 . Em seres humanos já foram identificadas mais de 600 hemoglobinas mutantes e cada Hb apresenta uma estrutura química peculiar o que oferece a essas Hb's diferenças na sua função de transportadora de O_2 (PAPADEA e CATE, 1996).

A curva de dissociação da oxihemoglobina (HbO_2) é uma importante ferramenta para estudar a função da Hb através do conhecimento de como o O_2 é carregado no sangue e entregue aos tecidos (WIMBERLEY, BURNETT e COVINGTON, 1990). Especificamente, a curva de dissociação da HbO_2 relaciona o oxigênio saturado na Hb e a pressão parcial (P) de O_2 no sangue (PO_2). A curva de dissociação da HbO_2 pode ser desviada para direita ou para a esquerda. O desvio para a direita representa diminuição da afinidade da Hb pelo O_2 e, para esquerda, aumento da afinidade. O desvio para a direita ocorre com diminuição do pH, aumento da $PaCO_2$, na hipertemia e no aumento na concentração dos fosfatos orgânicos hemáticos como o ATP e o 2,3 difosfoglicerato (2,3DPG), enquanto que, o aumento do pH e a diminuição da temperatura corporal, da

PaCO₂ e dos níveis de fosfatos orgânicos, desviam a curva para esquerda (WIMBERLEY, BURNETT e COVINGTON, 1990; LORENZI e VERRASTRO 1999)

A curva de dissociação da HbO₂ não é a mesma para todos os animais, uma vez que adaptações na estrutura química e na função da molécula da Hb ocorrem nos diversos animais em função de seu metabolismo e das condições ambientais em que vivem (WITHERS, 1992; GIARDINA, MOSCA e De ROSA, 2004).

1.1.5 - Hematimetria

A hematimetria ou eritrograma é à parte do hemograma que avalia o éritron, órgão constituído pela massa eritróide circulante (reticulócitos e eritrócitos maduros) e o tecido eritroblástico da medula óssea, que lhe dá origem. Como a principal função do eritrócito maduro, o transporte de O₂ dos pulmões para os tecidos, é exercida pela massa hemoglobínica. A hematimetria consiste de uma avaliação quantitativa da massa de eritrócitos e hemoglobina no sangue circulante e também nos oferece informações sobre a morfologia e conteúdo de Hb do eritrócito. A mesma é composta pelas seguintes análises (FAILACE, 2003):

- Contagem de eritrócitos ou hemácias (Hm), expressa em $Hm \times 10^6/mm^3$
- Dosagem de hemoglobina (Hb), expressa em gramas decilitros (g/dl);
- Determinação do hematócrito (Ht), que consiste na proporção da porção celular do sangue total, expresso em porcentagem (%).
- Determinação do Volume Corpuscular Médio (VCM), expresso em fenolitros (fL)
- Determinação da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), expressa em picogramas (pg)
- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), expressa em percentual (%)
- Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos (RDW – *Red blood cell Distribution Width*).

1.1.5.1 - Contagem de eritrócitos ou hemácias

A contagem total de Hm é um método simples para a determinação do estado funcional do éritron, entretanto, ela reflete apenas o número total de Hm no sangue circulante, não indicando a capacidade de transporte de O₂ ou quantidade de Hb existente. Nos mamíferos, esta contagem sofre variação com o sexo, idade, raça e altitude (COLES, 1984; SCHMIDT-NIELSEN, 2002; SWERSON, 2006).

A diminuição do número de Hm chama-se eritrocitopenia, mas o termo é pouco usado, sendo substituído por anemia, relativo à baixa concomitante da Hb. Eritrocitose designa o aumento do número de Hm acima dos valores de referência. Quando a eritrocitose acompanha-se de aumento do teor de Hb e do Ht, diz-se haver poliglobulia; no caso de microcitoses (quando os eritrócitos apresentam-se menores que o normal) significativas, pode haver eritrocitose sem poliglobulia e, até, com anemia (COLES, 1984; FAILACE, 2003).

1.1.5.2 - Dosagem da Hemoglobina

A quantidade de pigmento presente em 1dL de sangue recebe o nome de concentração de Hb. Seu valor médio normal mostra diferença em humanos de acordo com o sexo e idade, já que é de 15,4g/dL (14,5 a 16,7g/dL) no homem adulto e de 13,8g/dL (12,2 a 15g/dL) na mulher adulta. Em crianças a concentração varia de 11g/dL com um ano de vida a 13g/dL aos 10 anos e não se observa diferença sexual. Os valores adultos são alcançados ao redor dos 20 anos de vida pós-natal (FAILACE, 2003). Os valores de hemoglobina na maioria dos mamíferos estão entre 13 e 15g/dl, sendo comum se obter valores maiores que 15g/dl em alguns animais (WEISS, 1976; COLES, 1984; REECE, 1996).

Atualmente, a dosagem de Hb é feita por espectrofotometria, após conversão da Hb em cianometá-hemoglobina de cor estável, num canal contador eletrônico que compartilha com os leucócitos. A exatidão é excelente, com coeficiente de variação de aproximadamente 2%. A Hb é o dado básico da hematimetria, pois a anemia é sua deficiência abaixo dos limites de referência

para a população. A dosagem da Hb e contagem de Hm não são necessariamente paralelas: quando as Hm são maiores que o normal (macrocitose), a hemoglobina costuma ser desproporcionalmente alta em relação à contagem de Hm; quando menores, ocorre o inverso (FAILACE, 2003).

1.1.5.3 Determinação do hematócrito (Ht)

O hematócrito é o índice hematimétrico que indica o volume da massa eritróide de uma amostra de sangue, expressa em percentagem (ou fração decimal) do volume desta o qual, sofre na maioria dos mamíferos, variação de acordo com o ambiente, sexo, raça, etc. (COLES, 1984; REECE, 1996). No homem o hematócrito normal é de 42% a 49% (média 47%) e nas mulheres está entre 38 e 45% (média 42%). A diminuição no hematócrito ou oligocitemia serve como indicativo dos processos anêmicos, porém não sendo conclusivo, devendo sempre estar associado a outras medições. O seu aumento, denomina-se policitemia e ao contrário da contagem de hemácias, o Ht varia de modo rigorosamente paralelo ao teor de Hb (FAILACE, 2003).

O Ht é atualmente calculado com exatidão através dos modernos contadores eletrônicos que mensuram, com precisão o número de Hm e o volume corpuscular médio (VCM) destas. O Ht é resultante do produto dos mesmos ($Ht = Hm \times VCM$). Este avanço tecnológico transformou a obtenção deste parâmetro através da centrifugação do sangue e posterior leitura do seu valor através de uma coluna de eritrócitos com régua apropriada em uma redundância inútil e não, mas realizada nos grandes laboratórios (FAILACE, 2003).

1.1.5.4 - Volume Corpuscular Médio (VCM)

O Volume Corpuscular Médio (VCM) expressa o volume médio das Hm circulantes em micrômetros cúbicos (μm^3), sendo quantificado em fL (femolitros). Esta medida foi idealizada por M.Wintrobe, nos anos 30, pela divisão do Ht pela contagem de Hm ($VCM = Ht \div Hm$), e permite mostrar, numericamente, a

existência de anemias caracterizadas por eritrócitos maiores ou menores que o normal, como a observação microscópica por vezes sugere, porém sem a precisão e reprodutibilidade dos métodos atuais (FAILACE, 2003).

Os contadores atuais, pelo princípio de Coulter (alguns por laser scatter), contam e medem, simultaneamente, as Hm; os volumes corpusculares individuais, os quais são integrados, gerando um VCM, notavelmente reprodutível. Em humanos, o VCM é igual em homens e mulheres: $VCM=89\pm 9fL$. Valores dentro desta faixa expressam células com tamanhos normais ou normociticas. Quando o VCM está acima de $98fL$, diz-se haver macrocitose; quando abaixo de $82fL$, microcitose (FAILACE, 2003; MOREIRA, NOVAIS e NASCIMENTO, 2005).

1.1.5.5 - Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

A HCM constitui em unidades absolutas, o peso médio da Hb contida em uma Hm, ou seja, é uma medida do conteúdo médio de Hb nas Hm expresso em picogramas (pg). Pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$HCM = \text{Concentração de Hb} / \text{Concentração de Hm}$$

As hemácias normais em humanos contêm 29 ± 2 picogramas (pg) de hemoglobina. Tomando como exemplo, os valores médios de referência em homens:

$$HCM = 15,5g/dL \div 5,3 M/\mu L = 29,2pg$$

Em humanos, valores de HCM abaixo de 24pg expressam hipocromia e acima de 33pg hiperchromia. No entanto para alguns autores, esta afirmação é um erro: hipocromia e hiperchromia devem ser definidas como baixa ou como aumento da concentração, não da quantidade, da Hb nas Hm (NASCIMENTO *et al*, 2004; FAILACE, 2003). Enquanto a HCM representa o peso médio da Hb em cada eritrócito, a Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM) expressa a concentração média de Hb em cada célula podendo ser calculada aplicando-se a seguinte equação:

$$\text{CHCM} = \text{HCM} \div \text{VCM}$$

Como $\text{HCM} = \text{Hb} \div \text{Hm}$ e $\text{VCM} = \text{Ht} \div \text{Hm}$,

$$\blacktriangleright \text{CHCM} = \text{Hb} \div \text{Ht},$$

O resultado se expressa como percentagem. As Hm maduras normais em humanos contêm $34 \pm 2\%$ de Hb. O aumento real da CHCM, entre 36 e 38% é definido como hiper Cromia e a diminuição da CHCM abaixo de 31%, isto é, a insaturação hemoglobínica das hemácias, denomina-se hipocromia (FAILACE, 2003).

1.1.5.6 - Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos (RDW – *Red Blood cell Distribution Width*)

O RDW representa o coeficiente de variação do VCM, é calculado a partir do desvio padrão (DP) do VCM, que informa quanto o VCM da Hm se afastou da média, quanto maior este desvio maior será o coeficiente de variação. Se o RDW está elevado significa que o DP está aumentado e que as hemácias (em tamanho) estão variando muito a partir da média. Laboratorialmente, um RDW aumentado significa que existe uma variação no tamanho das hemácias, ou seja, quanto maior o RDW, mais intensa será a anisocitose (heterogeneidade volumétrica excessiva na população de Hm) e mais heterogênea é a população eritrocitária. Assim, o VCM indica a média do tamanho das Hm (normocíticos, macrocíticos ou microcíticos) e o RDW informa se a população de Hm é homogênea ou não (FAILACE, 2003).

Esse novo parâmetro, derivado da tecnologia eletrônica, teve seu uso consagrado e tornou-se componente rotineiro do eritrograma. O RDW normal, nos aparelhos da linha Coulter, está entre 11 e 14,5; no Cell-Dyn 4000, entre 12 e 15. Mesmo sendo calculado como percentagem da média, é um coeficiente; logo, não deve ser seguida do símbolo % (FAILACE, 2003).

Valores mais baixos indicam população eritróide mais homogênea que a usual, o que parece ser apenas um extremo da normalidade. Valores mais altos expressão a presença de anisocitose, que é observada ao microscópio óptico pela

variação do diâmetro, não propriamente do volume. O RDW supera amplamente o olho humano, ou seja, a anisocitose visual ao microscópio, é subjetiva e sempre foi de duvidosa valorização e, portanto deve ser substituída pelo RDW, que é um parâmetro objetivo, matemático e estatisticamente correto (FAILACE, 2003).

Apesar do exposto, a análise da morfologia eritrocitária, pela microscopia óptica associada à avaliação dos parâmetros hematimétricos (eritrograma), ainda persiste insubstituível, uma vez que algumas alterações na morfologia celular não são percebidas pelas máquinas (FAILACE, 2003)

1.1.6 - Métodos para identificação das hemoglobinas

A técnica mais utilizada para identificar Hb's é a eletroforese, principalmente as técnicas realizadas em pH alcalino. No entanto, o grande desenvolvimento tecnológico para o estudo das proteínas, em particular das hemoglobinas, verificado na década de 90, tem permitido a realização de diagnósticos laboratoriais cada vez mais sensíveis como a focalização isoelétrica, eletroforese de cadeias polipeptídicas, o HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) e o sequenciamento de aminoácidos por tecnologia biomolecular (PAPADEA e CATE, 1996).

1.1.6.1 – Eletroforese

A eletroforese da Hb baseia-se no fato de que esta molécula tem carga negativa em meio alcalino, migrando no sistema eletroforético, para o pólo positivo. A velocidade de migração é proporcional à sua carga, a qual depende da composição das cadeias polipeptídicas da globina. Portanto, as Hb's, em geral são identificadas pela velocidade de migração, ou melhor, pela mobilidade eletroforética (MARENGO, 1975).

Há diversos métodos eletroforéticos em uso para identificar os vários tipos de Hb. Entre eles, os mais utilizados empregam o papel de filtro, o acetato de celulose, o gel de agar, o gel amido, o bloco de amido ou o gel de acrilamida (VELLA, 1968).

Em linhas gerais, a técnica consiste em preparar o hemolisado de glóbulos do paciente e depositar pequena quantidade no meio de suspensão empregada (papel de filtro) no lado do polo negativo. Em seguida, coloca-se o meio em suspensão na cuba do aparelho, contendo solução tampão, entre os pólos negativo e positivo e liga-se em corrente elétrica contínua por determinado tempo. Durante este tempo, as moléculas de Hb migram para o pólo positivo, por causa de sua carga negativa. Em virtude das variações na composição dos ácidos aminados das diferentes Hb, as cargas negativas de cada tipo de hemoglobina, em determinado pH, diferem uma da outra. Esta diferença na carga da molécula hemoglobínica determina sua mobilidade no sistema eletroforético, manifestando-se com a velocidade com que a mesma se desloca para o pólo positivo. Comparando-se à distância percorrida pelas hemoglobinas desconhecidas com a de padrões de hemoglobinas conhecidas, submetidos à prova ao mesmo tempo, identificam-se os diferentes tipos. Os detalhes técnicos variam de acordo com o método e aparelho usados (MARENGO, 1975).

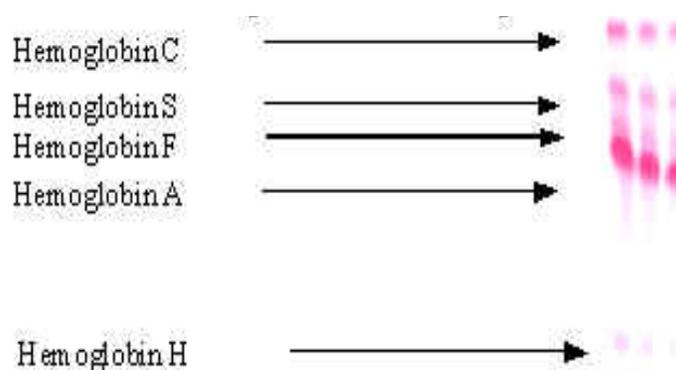


FIGURA. 2 – Identificação de alguns tipos de hemoglobinas humanas por eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino (MARENGO, 1975).

A eletroforese pode ser falha em identificar Hbs com estrutura química e funcional diferentes, porém com co-migração eletroforética. A utilização de metodologias mais sensíveis, como a isoeletrofocalização, eletroforese de cadeias polipeptídicas e o HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) utilizando o equipamento VARIANT da BIO-RAD com kit diagnóstico betatalassemia heterozigota, também são utilizadas para identificar hemoglobinas (PAPADEA e CATE, 1996).

1.1.6.2 - Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

A HPLC é uma das mais sensíveis formas de fracionamento cromatográfico. O VARIANT (Bio Rad) é um sistema automatizado para análise, separação e determinação da percentagem das áreas das hemoglobinas conhecidas e também auxilia na identificação de Hb's desconhecidas. Este equipamento utiliza os princípios da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) associada à cromatografia de troca iônica para identificar as Hb's. O programa Beta-talassemia, usado no equipamento, é dirigido para realiza a separação e determinação das porcentagens relativas de Hbs específicas em amostras de sangue total. O programa substitui o método manual de eletroforese por um simples e automatizado (LOREY, CUNNINGHAM e SHAFER, 1994; PAPADEA e CATE, 1996) Os resultados são apresentados em cromatogramas conforme mostra a figura 3.

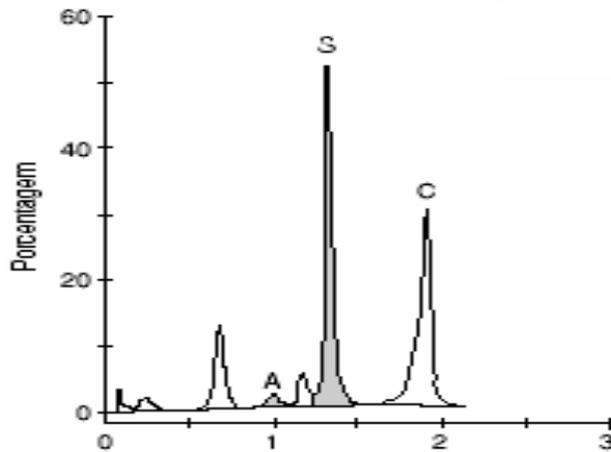


FIGURA. 3 – Cromatograma de hemoglobinas humanas por técnicas de cromatografia líquida de alta resolução com o VARIANT e programa β – Talassemia (VARIANT[®] da BIO-RAD). Neste são identificadas duas Hemoglobinas anormais (Hbs S e Hb C).

1.1.7 – O bicho preguiça

As preguiças são mamíferos placentários que apresentam características comportamentais bastante peculiares, tendo como destaque movimentos lentos,

vida sedentária e uma postura curiosa, mantendo-se sentada em forquilha ou suspensos em galhos de árvores (GOFART, 1971).

Estes animais, assim como o tamanduá (*Myrmecophaga tridactyla*) e o tatu (*Armadillo – Dasypus novemcinctus*), pertencem à ordem dos Xenarthra, sendo classificados em duas famílias: a família *Megalonychidae*, composta pelas preguiças de dois dedos, compreendendo o gênero *Choloepus*; e a família *Bradypodidae*, pela preguiça de três dedos, compreendendo o gênero *Bradypus* (WETZEL, 1985).

O gênero *Bradypus* possui três espécies que podem ser identificadas através da coloração da pelagem e aspectos faciais: a *Bradypus tridactylus* – possui pescoço branco ou amarelo e com coloração pálida na testa; a *Bradypus torquatus* – apresenta pelagem uniformemente marrom no corpo e na cabeça, exceto um colar de pelos pretos na base do pescoço projetando-se até os ombros, por esta razão é conhecida como “preguiça de coleira” e a *Bradypus variegatus* cujos lados da face e a pelagem do pescoço são marrons em continuidade com a cor dos ombros. Já o gênero *Choloepus* possui duas espécies: *C. hoffmanni* e *C. didactylus* (GOFFART, 1971). Conforme apresentado no histograma da figura 4.

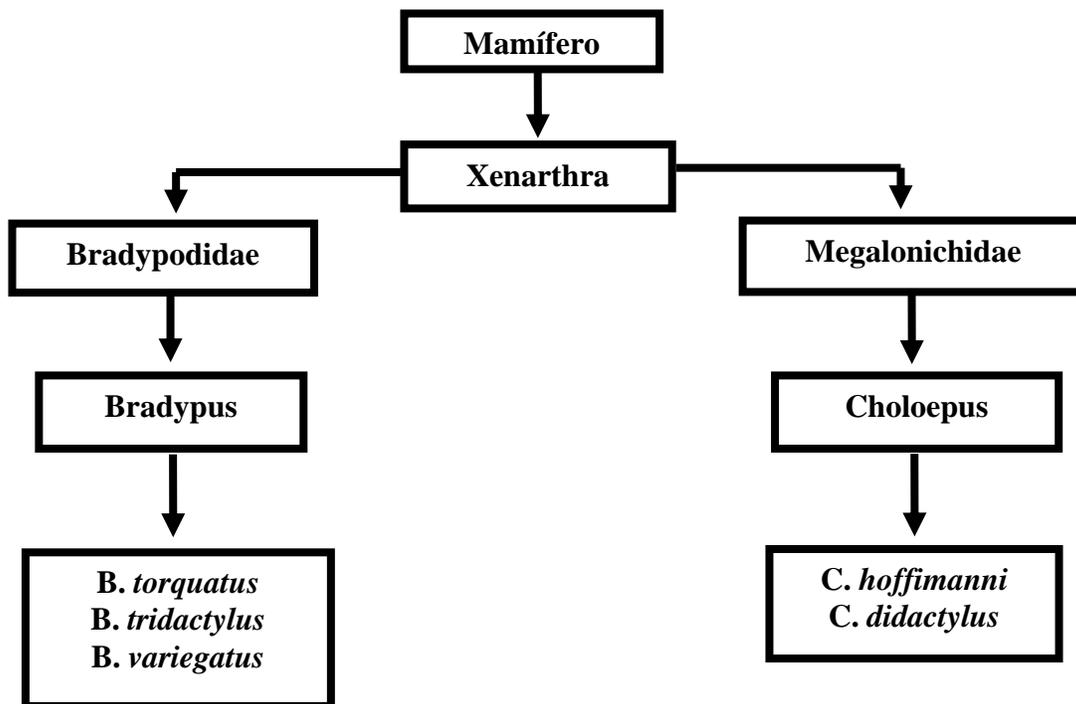


FIGURA. 4 - Histograma representativo da classificação taxonômica da preguiça.

A sua distribuição geográfica no Brasil difere entre os dois gêneros, sendo o gênero *Choloepus* restrito à Região Amazônica, enquanto que a do gênero *Bradypus* ocorre em quase toda região brasileira; a espécie *B.tridactylus* ocorre apenas na região amazônica, a *B. torquatus* limita-se às florestas remanescentes nos estados da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, sendo também a mais ameaçada de extinção, enquanto a *B. variegatus* é a espécie de maior distribuição geográfica, pois habita quase todas as regiões do país, sendo encontrada com maior frequência, nas regiões do Norte e Nordeste (WENTZEL, 1985), encontrando-se livre da ameaça de extinção. Embora este fato esteja relacionado às possibilidades de preservação de seu *habitat* e da própria espécie (Figura. 5).

Estudos realizados para determinação da mastofauna do estado de Pernambuco, registraram que *B. variegatus* ocorre, no entanto, até a zona da Mata (CABRAL e LIMA, 2000).



FIGURA 5. Distribuição geográfica das espécies de Preguiças do gênero *Bradypus* na América do Sul (Desenho modificado de Wetzels, 1985).

As preguiças são animais herbívoros, tendo como principal alimento folhas

de embaúba (*Cecropia sp*), árvore encontrada nas florestas brasileiras. Estudos realizados por Montgomery e Sunquist (1978) indicam que, em condições de liberdade, a preguiça pode se alimentar de outras espécies de árvores existentes nas florestas tropicais, porém, em cativeiro, esses animais apenas aceitam folhas de embaúba.

Vários pesquisadores têm demonstrado grande interesse pela anatomia, fisiologia e comportamento das preguiças (HOCHSTETTER, 1898; WISLOCKI, 1928; BRITON, 1941; GRASSÉ, 1955; GRANDALL, 1964; GOFART, 1971; MERITT, 1972; MONTGORMERY, 1978; FELIX *et al*, 1987; GILMORE, 2000; DUARTE *et al.*, 2003; AMORIM *et al.*, 2003).

Múltiplos estudos da sua fisiologia cardiovascular (CHAVES *et al.*, 1960; OLIVEIRA, COSTA, HUGGINS, 1980; CABRAL, COSTA, HUGGINS, 1980; DUARTE *et al.*, 1982; VALENTINUZZI *et al.*, 1984; DUARTE, COSTA e HUGGINS 1986; DUARTE *et al.*, 1987; DUARTE *et al.*, 1989a; DUARTE *et al.*, 1989b; DUARTE *et al.*, 2003), respiratória (FELIX *et al*, 1987; SANTOS, 2000; PEDROSA *et al.*, 2002) e endócrina (GILMORE *et al.*, 1991; GILMORE *et al.*, 1994; GILMORE e COSTA, 1995), já foram realizados.

As preguiças não apresentam artérias braquial e ilíaca nos seus membros. Estas estruturas são vascularizadas por plexos artério-venosos, dispostos em feixes vasculares, constituindo a *rete mirabile* (GOFFART, 1971). Sugere-se que a *rete mirabile* tem diversas funções, tais como: reservatório sanguíneo; um sistema de contra-corrente, que parece representar um mecanismo periférico de conservação de calor ou um sistema facilitador do retorno de sangue para o coração (SCHOLANDER e KROG, 1957).

Estes animais apresentam baixa temperatura corporal (32°C), baixa taxa metabólica, reduzida massa muscular, inabilidade em sustentar movimentos rápidos e coração de tamanho pequeno, quando comparado com outros mamíferos de porte atléticos e de mesma área corpórea tais como gatos e cães (GOFFART, 1971 e GILMORE, 2000).

Felix *et al.*, (1987), estudando parâmetros respiratórios em preguiças *Bradypus variegatus* anestesiadas, observou que presença de baixa frequência

respiratória (FR), longo tempo expiratório e grande volume corrente, quando estes foram comparados a outros mamíferos. Pedrosa *et al.*, (2002), verificaram que *B. variegatus* apresentam FR e pressão parcial de O₂ (PaO₂) significativamente menores, quando comparadas com gatos. Observaram também que a FR aumentava com a atividade alimentar sem acarretar, contudo, repercussões na gasometria arterial.

Irving, Scholander e Grinnell (1942), em condições experimentais, mantiveram preguiças do gênero *Bradypus* em apnéia por mais de 20 minutos e não observaram aumentos significativos no conteúdo de CO₂, no consumo de O₂, na frequência cardíaca (FC) e no metabolismo. Barbosa (2004), estudando parâmetros hematológicos em *B. variegatus*, encontrou um menor número de eritrócitos e menor teor de Hb, quando comparado com outros mamíferos, tais como gatos e cães.

Embora já tenham sido realizados muitos estudos, a fisiologia do bicho preguiça ainda é pouco conhecida. Assim, a obtenção de informações sobre os parâmetros hematológicos desses animais serão importantes por fornecerem subsídios e conhecimento de alguns aspectos de sua Biologia as quais são vitais para sua preservação. Além disso, servirão também para avaliar, caso existam, alterações fisiopatológicas nestes animais.

Alguns estudos relatam algumas características hematológicas das preguiças, tanto no gênero *Choloepus* (BRITTON *et al.*, 1939; MARVIN e SHOOK, 1963; TOOLE, 1972; BUSH, GILROY, 1979; MERITT, 1985; WALLACE e OPPENHEIM, 1996; VOGEL *et al.*, 1999) quanto no *Bradypus* (HOEHNE e ROSENFELD, 1954; JOHANSEN, MARTIN e SAWAYA, 1966; BOZZINI, HENRRIQUEZ e LADOSKY, 1978; MEDEIROS *et al.*, 1993 e BARBOSA, 2004).

No entanto, os trabalhos realizados com gênero *Bradypus*, em especial a espécie *B. variegatus* foram realizados com limitado número de animais, além de terem utilizado técnicas de avaliação hematológicas hoje consideradas inexatas e ultrapassadas, acarretando divergências nos valores obtidos para um mesmo gênero (HOEHNE e ROSENFELD, 1954; JOHANSEN, MARTIN e SAWAYA, 1966; BOZZINI, HENRRIQUEZ e LADOSKY, 1978; MEDEIROS *et al.*, 1993 e

BARBOSA, 2004). Tais divergências, encontradas na literatura, ressaltam a necessidade da realização de estudos mais amplos visando à determinação dos valores hematológicos destes animais levando-se em consideração os fatores que podem influenciá-los tais como: idade, uso de anestesia, técnica de coleta, estado nutricional, estado fisiológico assim como a metodologia empregada na análise hematológica.

A existência de características fisiológicas e hematológicas particulares encontradas em preguiças aliada a existência de divergências de resultados nos estudos já realizados sobre a hematologia destes, nos motivou a realizar o presente trabalho. Assim, esta pesquisa teve como propósito realizar uma avaliação hematológica mais aprofundada sobre parâmetros sanguíneos com o estabelecimento de parâmetros hematimétricos e da identificação de sua hemoglobina visando contribuir para o estudo da Fisiologia Comparada de mamíferos, especificamente do bicho preguiça (*Bradypus variegatus*).

2.0 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Determinar o perfil hematimétrico e identificar a hemoglobina do bicho-preguiça em animais anestesiados (*Bradypus variegatus*).

2.2 - Objetivos Específicos

Os objetivos específicos visam, em preguiças (*B. variegatus*):

2.2.1 - Traçar o perfil hematimétrico pela determinação do(a):

- ⇒ Hematócrito
- ⇒ Contagem de hemácias
- ⇒ Teor de hemoglobinas
- ⇒ Volume Corpuscular Médio (VCM)
- ⇒ Hemoglobina corpuscular média (HCM)
- ⇒ Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).
- ⇒ RDW Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos (*Red blood cell Distribution Width*).

2.2.2 – Identificar a Hemoglobina pela determinação do:

- ⇒ Padrão eletroforético.
- ⇒ Padrão cromatográfico.

2.2.3 - Verificar se existe influência do sexo sobre os parâmetros hematimétricos determinados.

3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizadas dez preguiças (*Bradypus variegatus*), sendo seis machos e quatro fêmeas. Os experimentos foram realizados no período compreendido entre setembro de 2004 a dezembro de 2005, mediante autorização do IBAMA (Protocolo nº 02019), que nos cedeu os animais apreendidos na Região Metropolitana do Recife/PE. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da UFPE (Protocolo nº 23076.004460/2005-41).

Inicialmente, os animais foram trazidos ao Laboratório de Fisiologia Cardiopulmonar e mantidos em cativeiro no biotério de preguiças, preguiçário, (Figura 6), construído nas vizinhanças do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE para aclimatização às condições de cativeiro. Isolado do acesso de terceiros por uma cerca de *nylon*, o preguiçário compreende uma área de 4m², com estrutura em alvenaria e tela, proporcionando adequadas condições de ventilação e iluminação. O piso, coberto de areia, possui, afixado no centro, um tronco de madeira com galhos onde os animais poderiam permanecer sentados ou suspensos. Diariamente, foi oferecida alimentação (folhas frescas de embaúba, *Cecropia sp*) e água *ad libitum*.

Os animais foram avaliados diariamente quanto ao seu estado de higidez. Essas avaliações constavam da pesagem e tomada da temperatura retal diariamente, além da observação do comportamento alimentar e da atividade motora. Foram consideradas boas condições de saúde: perda não inferior a 10% do peso inicial, temperatura retal mantida entre 28 e 32°C, ingesta alimentar satisfatória e bom deslocamento no biotério. Foram submetidos ao protocolo experimental apenas os animais que apresentaram boas condições de saúde e sinais de boa adaptação ao biotério (tomada de alimentação regular, manutenção de padrão comportamental, etc).



FIGURA. 6 - Preguiçário localizado nas vizinhanças do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco.

3.2 Coleta das amostras sanguíneas

Após a semana de permanência no preguiçário, as preguiças foram trazidas ao Laboratório de Fisiologia Cardiopulmonar para realização da coleta das amostras sanguíneas. As mesmas foram contidas e, sem uso de anestésico, tiveram o membro torácico tricotomizado, assepsiado com álcool a 70% e, sob garroteamento e utilizando seringa plástica, estéril e descartável, foram puncionados dois mililitros de sangue, através de punção direta da veia cefálica localizada na região antero-medial do membro (Figura 7).

A amostra de sangue foi evasada em tubo de polipropileno (Vacutainer, Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA) com EDTA (dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético) e o restante da amostra foi utilizado para confecção do esfregaço sangüíneo. O material coletado, após homogeneização, foi condicionado em um reservatório térmico a uma temperatura média de 10°C e levado, imediatamente, ao Laboratório CERPE, onde foram realizadas as análises laboratoriais. As coletas das amostras foram sempre realizadas entre as onze horas da manhã e uma hora da tarde a fim de se evitar influência circadiana nas determinações hematimétricas.



FIGURA. 7 – Procedimento de punção venosa da veia cefálica do membro torácico, para obtenção das amostras sanguíneas em *B. variegatus*.

3.3 -Análises Laboratoriais

3.3.1 - Hematimetria

No Laboratório, as amostras foram identificadas, numeradas e, após cerca de quinze minutos, para retorno à temperatura ambiente, foram novamente homogeneizadas. Em seguida, após cadastro dos dados do animal a ser estudado (data, número de identificação e sexo), cerca de 250µl da amostra do tubo foi aspirada pelo Contador Celular Eletrônico Cell-dyn 4000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA) para determinação dos parâmetros que constituem o Hemograma. Os resultados foram impressos e transferidos para tabela específica. As seguintes análises hematimétricas foram registradas:

1. Contagem de eritrócitos ou hemácias (Hm)
2. Dosagem de hemoglobina (Hb)
3. Hematócrito (Hct)
4. Volume Corpuscular Médio (VCM)
5. Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)

6. Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)
7. Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos (RDW – *Red blood cell Distribution Width*).

3.3.1.2 - Esfregaço sangüíneo

3.3.1.2.1 - Preparação

Uma gota da amostra de sangue foi colocada sobre uma lâmina de microscopia óptica, quimicamente limpa e desengordurada, em uma de suas extremidades. Próximo à gota colocou-se uma lâmina auxiliar, posicionada de modo a que a gota se disseminasse por capilaridade até suas bordas. Mantendo uma inclinação de 45°, a lâmina auxiliar foi deslizada sobre a primeira, com movimento firme e delicado. Após secagem ao ar, a lâmina com o esfregaço, foi identificada com os dados do animal.

O esfregaço foi então fixado e corado com o kit para coloração rápida em hematologia, Instant Prov (Newprov, Pinhais, Paraná, Brasil). Os corantes Instant Prov I, II e III foram colocados separadamente em cubas apropriadas e, em seguida, as lâminas a serem coradas foram submersas na cuba contendo o corante Instant Prov I, deixando-o agir por um segundo, repetiu-se esta operação por cinco vezes, deixando-se escorrer bem. O procedimento foi repetido nas cubas contendo os corantes Instant Prov II e Instant Prov III, respectivamente. Logo após, as lâminas foram lavadas com água corrente e postas para secar ao ar, antes de se efetuar a leitura.

3.3.1.2.2 - Análise Microscópica

A análise microscópica convencional foi realizada como uma forma de avaliação complementar a realizada com sistema automatizado. O esfregaço foi colocado com uma gota de óleo de imersão, num microscópio óptico biológico (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). A lâmina foi observada em sua região medial, onde as células sangüíneas apenas se tocam, através de lentes objetivas

com aumento de 40 e 100 vezes, e descritas as informações a respeito da morfologia das células sanguíneas.

3.3.2 – Identificação da Hemoglobina (Hb)

3.3.2.1 - Eletroforese em Acetato de Celulose (pH 8,5)

Foram utilizados os seguintes materiais:

- 1 – Cuba de eletroforese
- 2 – Tiras de acetato de celulose
- 3 – Papel absorvente
- 4 – Aplicador de amostras

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- Solução tampão: Tris-EDTA-borato 0,025M pH 8,5 (TEB pH 8,5)
- Tris-hidroximetil-aminometano -----10,2g
- Ácido etileno-diamino-tetracético ----- 0,6g
- Ácido bórico ----- 3,2g
- Água destilada q.s.p -----1000ml

O procedimento de eletroforese obedeceu a seguinte seqüência:

- 1 – Foi colocada igual quantidade de solução tampão em cada compartimento eletrolítico da cuba de eletroforese;
- 2 – Embebemos a folha de acetato de celulose na solução tampão, previamente colocada numa vasilha, pelo menos durante 15 minutos;
- 3 – Enxugamos o acetato de celulose entre duas folhas de papel absorvente para remover o excesso de solução tampão;
- 4 – Ajustamos as tiras de acetato de celulose na cuba de eletroforese, deixando-as esticadas, utilizando-se perfex ou papel de filtro para fazer a ponte da corrente elétrica na fita;

- 5 – Aplicamos amostras nas tiras de acetato celulose (hemolizado com saponina 1%, ou solução de hemoglobina) a 2 cm do compartimento do pólo negativo;
- 6 – Passamos a uma corrente de 300 volts por 20 minutos
- 7 – Por fim, consultamos o mapa de disposição de hemoglobinas em eletroforese alcalina.

3.3.2.2 - Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)

A cromatografia foi realizada através do aparelho VARIANT™ da Bio Rad. A preparação das amostras consistiu em diluir 5µl de sangue total com 1ml de reativo hemolizante e o tempo de análise por amostra foi de 6,5 minutos. Após a análise, o resultado foi expresso como cromatogramas (absorbância *versus* tempo) e impresso automaticamente.

3.4 - Análise Estatística

Foi realizada uma análise descritiva para expor os parâmetros hematimétricos, eletroforéticos e cromatográficos além dos valores de sexo, temperatura e peso corporal. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de: média (X) ± desvio padrão (DP).

Para comparar diferenças nos parâmetros hematológicos com relação ao sexo dos animais, foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitey*, sendo considerado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os *softwares* utilizados foram o R versão (2.1.1) e o Excel 2000.

4.0 - RESULTADOS

A tabela 1 demonstra os dados individuais de identificação dos animais utilizados neste estudo, apresentando o sexo, os valores médios do peso e temperatura corporais, obtidos antes da realização das coletas. Estes animais apresentaram peso médio de $3,5 \pm 0,79$ Kg, com temperatura corporal média de $30 \pm 1,6^\circ\text{C}$.

TABELA 1 - Identificação individual das preguiças (*B.variegatus*) estudadas quanto ao sexo valores de peso e temperatura retal antes da coleta das amostras de sangue.

PREGUIÇAS (PG)	SEXO	PESO (Kg)	TEMPERATURA RETAL ($^\circ\text{C}$)
PG 1	♀	1,9	30
PG 2	♀	3,7	29
PG 3	♀	4	30
PG 4	♀	2,6	30
PG 5	♀	3,4	30
PG 6	♀	3,8	32
PG 7	♀	3,7	32
PG 8	♀	4,7	29
PG 9	♀	4	29
PG 10	♀	4	29
Média±DP	4♀/6♂	3,5±0,79	30±1,6

4.1 Análises Hematimétricas

A Tabela 2 demonstra os valores hematimétricos obtidas em preguiças (*Bradypus variegatus*) com os seus valores mínimos, máximos, médios e respectivos desvios padrões (DP).

TABELA 2 – Valores mínimo, máximo e a média com desvio padrão (médias±DP) das determinações hematimétricas obtidas em *Bradypus variegatus* fêmeas e machos.

PARÂMETROS (n=10)	MÍNIMO	MÉDIA±DP	MÁXIMO
HEMATIMETRIA HEMÁCIAS ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	2,6	$3 \pm 0,3$	3,34
HEMOGLOBINA (g/dl)	8,9	$11,1 \pm 1$	13,3
HEMATÓCRITO (%)	23,5	30 ± 4	34,6
VCM (fl)	93,3	$104 \pm 4,$	107,1
HCM (pg)	34	40 ± 6	49,9
CHCM (%)	33,9	$38,4 \pm 5$	46,8
RDW	13,3	$15,1 \pm 2$	19,1

n = número de animais estudados

Os valores hematimétricos médios com os respectivos desvios padrões (DP) obtidos em *Bradypus variegatus* separados por sexo estão apresentados na Tabela 3. Observa-se que apenas a contagem de hemácias demonstrou diferença significativa entre os sexos, sendo a mesma maior nos machos.

TABELA 3 – Valores médios dos parâmetros hematimétricos obtidos em *Bradypus variegatus* segundo o sexo.

PARÂMETROS		Fêmeas (n = 4)	Machos (n = 6)
HEMATIMATRIA	HEMÁCIAS ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	2,7 \pm 0,3	3 \pm 0,2 *
	HEMOGLOBINA (g/dl)	11 \pm 2	11,1 \pm 0,6
	HEMATÓCRITO (%)	27,5 \pm 3	30,8 \pm 4
	VCM (fl)	102,3 \pm 6	104,5 \pm 2
	HCM (pg)	42 \pm 7	38,3 \pm 6
	CHCM (%)	34 \pm 1,1	35,2 \pm 4,4
	RDW	15,8 \pm 2,7	14,7 \pm 2,1

Os valores são médias \pm DP

n = número de animais estudados

* = p<0,05

4.2. Análise Eletroforética da Hb

O padrão eletroforético apresentado pelo hemolisado de todas preguiças estudadas demonstrou a presença de hemoglobinas na posição da Hb A₁ (15%) e na posição da Hb H (75%) em relação ao padrão de referência humano como demonstrado na figura 8.

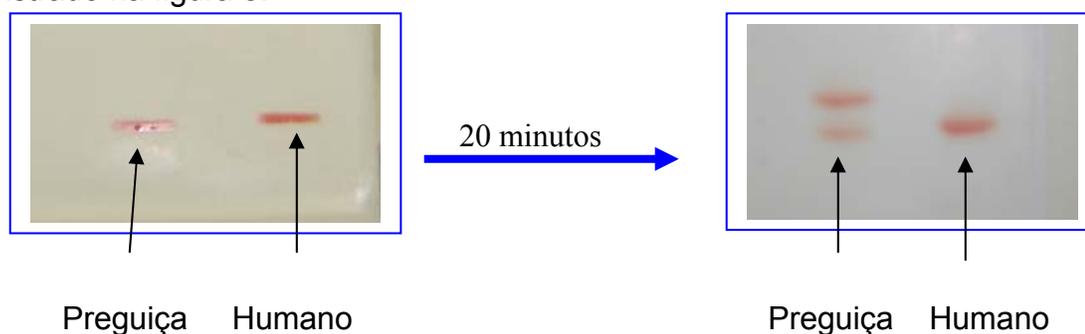


FIGURA. 8 - Padrão eletroforético do hemolisado da preguiça e humano após 20 minutos de corrida a 300V na cuba de eletroforese em acetato de celulose com pH alcalino (pH=8,5).

4.3 Análise Cromatográfica em HPLC (Variante – Bio rad)

A Tabela 4 demonstra as hemoglobinas identificadas na Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) com os seus valores quantitativos percentuais médios±DP. Nela, também é mostrado o tempo de retenção médio, mínimo e máximo, para cada hemoglobina identificada (média±DP).

TABELA. 4 - Hemoglobinas identificadas pelo HPLC com os respectivos valores médios percentuais e tempo de retenção médio, mínimo e máximo para cada Hb identificada(X±DP).

Hemoglobinas Identificadas (HPLC)	Análise Quantitativa (%)	Tempo de Retenção (s)		
		Mínimo	Média±DP	Máximo
Hb 1	4,14±0,75	0,98	1,075±0,09	1,22
Hb 2	5,28±0,70	1,02	1,152±0,08	1,22
Hb3	75,67±2,76	1,67	1,738±0,03	1,78
Hb4	11,81±2,43	3,02	3,091±00	3,22
Hb5	2,97±1,06	3,44	3,525±0,05	3,62

A Figura 9 mostra o comportamento cromatográfico típico em HPLC (Bio-Rad) do hemolisado obtido da preguiça (*Bradypus variegatus*, PG 05). Os cromatogramas de todos animais estão no **ANEXO B**. Na região superior da figura são demonstradas as hemoglobinas identificadas, seguidas do seu percentual quantitativo, o pico de absorbância no tempo de retenção e sua área total.

Hemoglobinas identificadas	% quantitativo	Tempo do pico de absorvância	AREA
Hb. 1 (Unknown 1)	4,6	1,04	92698
Hb. 2 (F- fetal)	4,9	1,23	106113
Hb. 3 (P3)	78,9	1,78	1603148
Hb. 4 (Unknown 2)	9,4	3,3	191398
Hb. 5 (A2 -Hb. A ₂)	2,0	3,61	33817

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
Unknown 1	4.6	1.04	92698
F	4.9	1.23	106113
P3	78.9	1.78	1603148
Unknown 2	9.4	3.30	191398
A2	2.0	3.61	33817
TOTAL AREA			2027174
F	4.9%	A2	2.0%

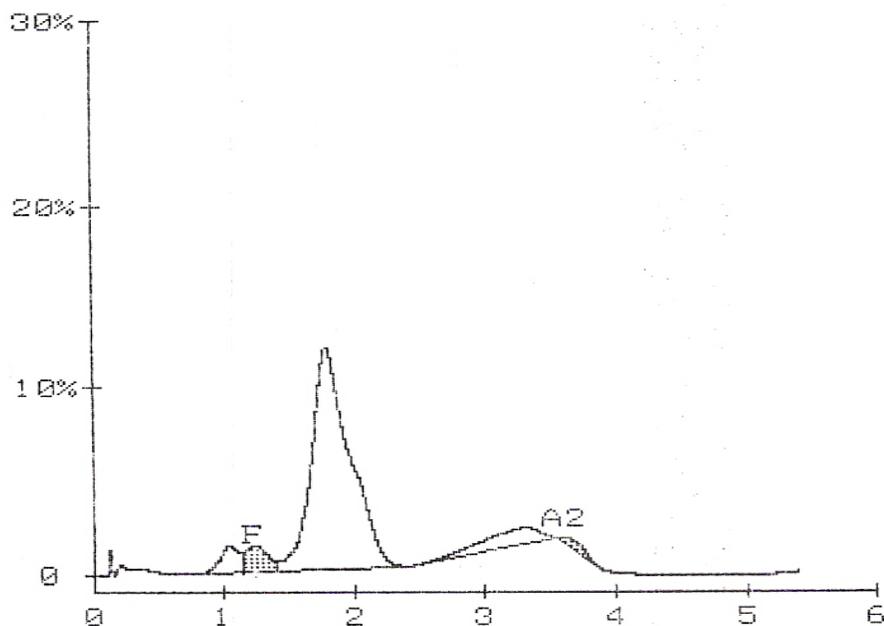


FIGURA. 9 – Comportamento cromatográfico típico em HPLC (Bio-Rad) do hemolisado obtido em preguiça (*Bradypus variegatus*, PG 05). O gráfico demonstra no eixo X o tempo de retenção e no eixo Y o pico de absorvância.

4.4 Análises do Esfregaço Sangüíneo

A Figura 10 mostra aspectos morfológicos das células sangüíneas encontradas no esfregaço de sangue periférico de *B. variegatus*. Observa-se que as hemácias não exibiram, em sua totalidade, alterações de forma e apresentaram-se como discos bicôncavos anucleados. As mesmas demonstram-se normocrômicas. Existe presença de anisocitose, principalmente, pela presença de micrócitos (círculo vermelho); é possível também observar presença de macrócitos (círculo preto), cujo padrão foi encontrado na grande maioria dos animais.

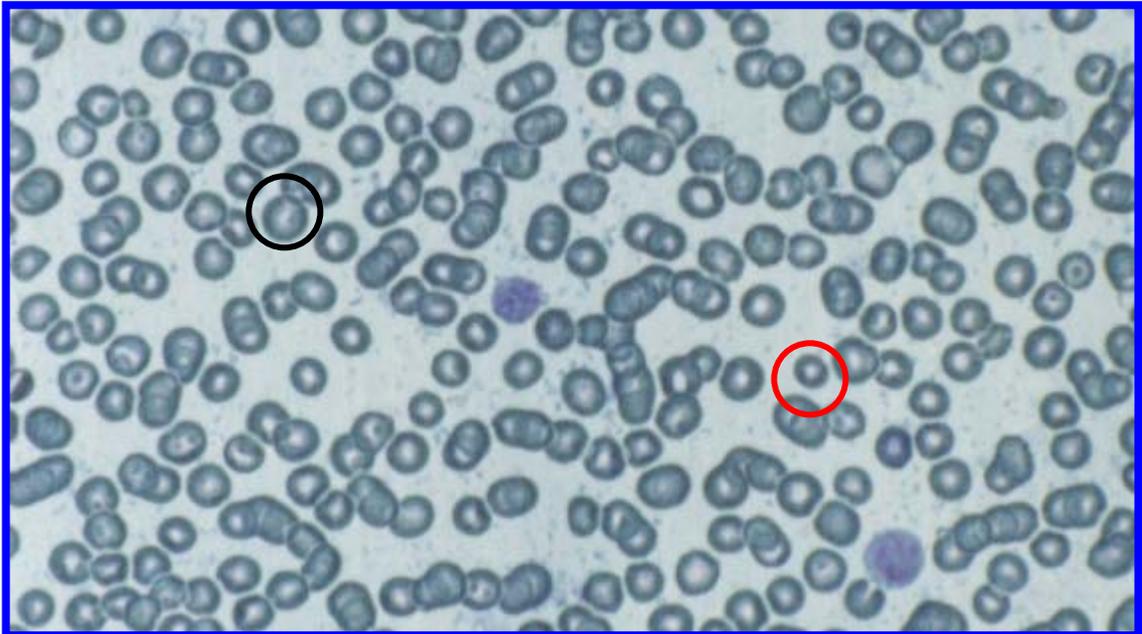


Figura 10 – Esfregaço de sangue periférico de *B. variegatus*. Visto com objetiva de 40x.

5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, o interesse pelo desenvolvimento de pesquisas no campo da hematologia animal tem-se acentuado de maneira considerável principalmente devido ao aperfeiçoamento das técnicas empregadas e também, à utilização de respaldo laboratorial, na busca de soluções relativas aos problemas clínicos pertinentes às diferentes espécies (CORNELL *et al*, 1988; AUROCA *et al.*, 2000; AYRES, 2001; DIAS JUNIOR *et al.*, 2006).

A hematologia dos animais silvestres, especialmente, os da fauna brasileira, ainda é um campo de trabalho científico pouco explorado, sendo necessário a realização de estudos para que se possa determinar e compreender as suas particularidades (BONELLO, CIARLINI e AZEVEDO, 2002; MADELLA *et al.*, 2006).

Pesquisas utilizando animais silvestres sob condições de cativeiro, exigem do pesquisador especial atenção e alguns cuidados no seu manejo, além de conhecimentos sobre seus hábitos comportamentais no seu habitat. Desta forma, é necessário que o cativeiro reproduza condições similares àquelas existentes no seu habitat, a fim de possibilitar ao animal o mínimo de distúrbio e assim, a obtenção de resultados fidedignos. Para tanto, o contato do pesquisador com animal deve ser o mais reduzido possível, diminuindo o estresse da vida cativa, uma vez que a presença deste pode falsear os resultados, modificando os parâmetros fisiológicos coletados (COUBROUGH, 1985).

Em alguns animais domésticos, em especial os cavalos e os gatos, o estresse gerado com a coleta das amostras promove liberação de adrenalina, contração esplênica com conseqüente aumento do número de eritrócitos circulantes (JAIN, 1993). Este efeito indesejável pode ser atenuado mediante a sedação do animal (LOOMIS, HENRICKSON e ADERSON, 1980).

Para uma avaliação adequada dos valores hematimétricos é importante que a amostra seja colhida e manuseada corretamente, pois caso contrário os resultados podem ser alterados. Além disso, o local de punção varia de acordo com a espécie estudada, com a quantidade de sangue a ser colhida e com a

finalidade dos testes que a amostra será submetida laboratorialmente (NAVARRO e PACHALY, 1994)

Neste estudo, a dificuldade inicial para obtenção das amostras sanguíneas consistiu neste procedimento em virtude de que pretendíamos realizar as coletas em animais não anestesiados. Pelo fato das preguiças apresentarem a “*rete mirabile*” nos seus membros, o acesso a um vaso periférico torná-se-ia praticamente inacessível, salvo fizéssemos estudo minucioso da anatomia do sistema circulatório deste animal. Trabalhos anteriores, com dados de hematologia, já foram realizados com as amostras de sangue coletadas, nesses animais, mediante anestesia e sedação do animal (VOGEL *et al.*, 1999; WALLACE e OPPENHEIM, 1996), ou através de procedimento cirúrgico de canulação de vasos (veia jugular interna ou artéria carótida comum, sob anestesia local com xilocaína), procedimento este que, certamente poderia induzir estresse nos mesmos (MEDEIROS *et al.*, 1993; PEDROSA *et al.*, 2002). Assim, a inexistência de vasos superficiais, nos quais se possa fazer punção para a coleta de sangue, foi durante muito tempo um dos fatores limitantes para o estudo dos caracteres hematológicos das preguiças.

Pensando-se em gerar o menor estresse possível e obter maior número de amostras, estudamos a disposição anatômica do sistema circulatório da preguiça. Desta forma, optamos por puncionarmos, sem o uso de anestésicos, a veia cefálica localizada na região ântero-medial do membro torácico do animal. Este procedimento nos possibilitou a obtenção de amostras a partir da contenção circunstancial do animal sem submetê-lo ao estresse cirúrgico, tornado a coleta um procedimento simples e objetivo (Figura. 7).

Variações de valores hematimétricos são comuns entre indivíduos saudáveis e com bom estado fisiológico, sendo as mesmas justificadas pela idade, pelo sexo e por fatores genéticos. Estes aspectos devem ser considerados quando se tenta estabelecer valores “normais”, os quais invariavelmente devem ser representados por uma faixa de variação e não por um valor único (BUSH, 1982).

Madella *et al.*, (2006), estudando valores hematológicos de quatorze capivaras (*Hydrochoerus Hydrochaeris*) de vida livre na região de Campinas-SP, verificaram a existência de diferentes valores hematimétricos nestes animais em relação às capivaras criadas em cativeiro. As alterações encontradas nos parâmetros hematimétricos foram atribuídas a vários fatores como: metodologia da análise laboratorial, fatores ambientais (altitude e clima), estresse pela captura, tipo de criação (intensiva e extensiva), alimentação e a presença de animais parasitados com carrapatos. Portanto, além da excitação causada pelo estresse de cativeiro e pela técnica de coleta da amostra de sangue, outros fatores como temperatura ambiente, altitude, nutrição, gestação, puerpério, lactação, balanço hídrico, podem influenciar diretamente nos parâmetros hematológicos em animais selvagens (LUMSDEN, MULLEN e ROWE, 1980).

O biotério utilizado em nosso estudo (“Preguiçário”) se enquadrava nos requisitos propostos pela Instrução Normativa 001/89-P do IBAMA, 19 de outubro de 1989 (Figura. 6) e oferecia condições adequadas de iluminação e ventilação além de possuir um bom espaço físico, o qual tinha presença de um tronco de madeira com galhos onde os animais poderiam permanecer sentados ou suspensos. Os animais foram supridos diariamente de folhas frescas de embaúba, (*Cecropia sp*) e água *ad libitum* de modo que as condições ambientais e nutricionais fossem similares àquelas existentes no seu habitat.

Dos dez animais utilizados nessa pesquisa (Tabela. 1), apenas um, segundo critérios de peso corporal, não estava na idade adulta (PG. 1), uma vez que Wetzel e Ávila Pires (1985) consideram animais adultos, aqueles que apresentam peso superior a 2,5Kg. Os demais foram considerados adultos, saudáveis e adaptados ao cativeiro, já que demonstraram boas condições de saúde, apresentando no biotério: perda de peso não superior a 10% do peso inicial; temperatura retal mantida entre 28 e 32°C (GOFFART, 1971), ingestão alimentar satisfatória e padrão de deslocamento regular. Todos estes cuidados foram necessários para garantir condições de higiene dos animais de modo a assegurar confiabilidade nos parâmetros hematológicos determinados.

As preguiças apresentam lentidão dos movimentos, baixa temperatura corporal, reduzidos metabolismo e consumo de O₂. Diferentemente de outros mamíferos homeotérmicos, as preguiças são animais sensíveis a alterações da temperatura ambiente e só conseguem se manter aquecidas nos trópicos (GOFFART, 1971). Apresentam temperatura retal média de 32°C, a qual sofre variação direta com as mudanças ambientais, labilidade esta, que parece ser uma estratégia para conservação de energia (GOFFART, 1971; GILMORE *et al.*, 2000).

Em concordância com os relatos da literatura, a temperatura retal média das dez preguiças (*B.variegatus*) estudadas foi de 30,0 ±16°C. De acordo com McNab (1985), essa baixa temperatura corporal associada à redução na taxa metabólica basal, está diretamente relacionada à massa muscular reduzida que esses animais apresentam, refletindo, em parte, adaptações para uma vida sedentária nas árvores e incapacidade de produzir calor suficiente para manutenção de sua temperatura corporal.

Atualmente, as medidas dos parâmetros hematimétricos: Hm, Ht, Hb, VCM, HCM, CHCM e RDW são realizadas através de contadores eletrônicos computadorizados que, de forma automatizada, aspiram e diluem o sangue e executam todas as determinações com exatidão. Contudo, a despeito da excelência da atual tecnologia, a microscopia persiste necessária para confirmação dos parâmetros morfológicos eritrocitários (FAILACE, 2003).

De acordo Turner (1876) e Britton (1941), as células sanguíneas de preguiças não são notavelmente diferentes daquelas encontradas em outros mamíferos. A hemácia é de tamanho maior que na espécie humana, possuindo, por vezes, formas elípticas ou distorcidas em manchas, mas que, na maioria das vezes, apresentam o mesmo formato de disco bicôncavo.

Na análise microscópica do esfregaço sanguíneo de nossos animais, foi possível observar que as hemácias não exibiram, em sua totalidade, alterações de forma, isto é, apresentavam-se como discos bicôncavos anucleados. No entanto, em relação ao seu tamanho, foi observada, em três animais, presença de anisocitose com células microcíticas e macrocíticas. Padrão de macrocitose foi

encontrado na maioria das lâminas analisadas e as hemácias exibiram um padrão de coloração uniforme, isto é, normocromia (Figura 10).

Segundo Marvin e Shook (1963), a sobrevivência máxima dos eritrócitos das preguiças é 130-135 dias. O tempo de vida dos eritrócitos dos galináceos e patos é de apenas 20 a 40 dias. Este fato pode ser justificado pela alta temperatura corporal e acelerada taxa metabólica destas aves. (LUMEIJ, 1997). Estas características são totalmente contrárias às encontradas nas preguiças.

Na literatura, os valores do Ht de preguiças mostram divergências quando comparado aos encontrados pelos diversos autores: Johansen, Martin e Sawaya (1966), estudando três *Bradypus tridactylus*, encontraram Ht de 46%; Bozzini, Henriques e Ladosky (1978), trabalhando também com três animais da mesma espécie, constataram um Ht de 35,7%; Marvin e Shook (1963) e Bush e Gilroy (1979), em *Choloepus didactylus* determinaram Ht de 51% e 43%, respectivamente; em *Choloepus hoffmanni*, Meritt (1985) e, posteriormente, Wallace e Oppenheim (1996) e Vogel *et al.*, (1999), encontraram valores médios de 35%, 39% e 35,7%, respectivamente.

No presente estudo, encontramos Ht médio de $30 \pm 4\%$ (23,5 a 34,6%, Tabela 2), portanto, inferior à espécie *B. tridactylus* e ao gênero *Choloepus*. Barbosa (2004), estudando quatorze preguiças *Bradypus variegatus*, encontrou um Ht de $30,36 \pm 3,78\%$ (24 a 35%), valor, portanto, igual ao encontrado no presente estudo.

Ainda no mesmo estudo, Barbosa (2004), encontrou valor médio na contagem de hemácias de $3,26 \pm 0,58 \times 10^6 / \text{mm}^3$ de sangue, também similar aos nossos resultados ($3,0 \pm 0,25 \times 10^6 / \text{mm}^3$ de sangue, Tabela 2).

Quando comparamos o valor médio das hemácias do presente estudo com os determinados em outros mamíferos, tais como cães ($5,5-8,5 \times 10^6 / \text{mm}^3$, DO NASCIMENTO, 1998; HAWKEY e DENNET, 1989; SCHALM *et al.*, 1975; WEISS, 1976), gatos ($5-10 \times 10^6 / \text{mm}^3$, DO NASCIMENTO, 1998; HAWKEY & DENNET, 1989; SCHALM *et al.*, 1975; WEISS, 1976), caprinos ($8-18 \times 10^6 / \text{mm}^3$, DO NASCIMENTO, 1998; HAWKEY e DENNET, 1989; SCHALM *et al.*, 1975), macacos ($4,8 - 8,3 \times 10^6 / \text{mm}^3$, HAWKEY & DENNET, 1989) e ratos (7 - 10

$\times 10^6/\text{mm}^3$, HAWKEY e DENNET, 1989) observamos que o número de hemácias em *Bradypus variegatus* se mostra inferior a estes.

Contudo, ao compararmos os valores encontrados neste estudo com os de outras espécies de preguiças, os mesmos mostraram-se semelhantes: em *C.hoffmanni* ($3,1 \times 10^6/\text{mm}^3$ sangue, WALLACE e OPPENHEIM, 1996); em *C.didactylus* ($2,6 \pm 0,1 \times 10^6/\text{mm}^3$ de sangue, VOGEL *et al.*, 1999), e em *B.tridactylus* ($3,3 \times 10^6/\text{mm}^3$ sangue, HOEHNE e ROSENFELD, 1954). Estes achados nos oferecem respaldo para afirmar que o bicho-preguiça, independente da espécie estudada, apresenta valores médios de hemácias no sangue menor que o de outros mamíferos.

No nosso estudo, determinamos que o teor médio de Hb em *B.variegatus* foi de $11,09 \pm 1,14 \text{g/dl}$ ($8,9-13,3 \text{g/dl}$, Tabela. 2). Valores semelhantes foram encontrados em *B.variegatus* por Medeiros *et al.*, (1993) e Barbosa (2004) de $11,06 \pm 0,45 \text{dl}$ e $10,55 \pm 0,85 \text{g/dl}$, respectivamente.

Bush e Gilroy (1979), em *Choloepus hoffmanni*, mostraram valores de Hb maiores ($15,3 \text{g/dl}$), que o encontrado em *Bradypus*. Em *Choloepus*, Meritti (1985), determinou um valor médio de $13,125 \pm 0,95 \text{g/dl}$, portanto, superior ao do nosso estudo. Entretanto Wallace e Oppenheim., (1997) e Vogel *et al.*, (1999), em preguiças do gênero *Choloepus*, encontraram, respectivamente, valores de Hb de $12,8 \text{g/dl}$ e $11,5 \pm 0,4 \text{g/dl}$, semelhantes ao valor médio encontrado em nosso trabalho.

Comparando os valores médios de Hb, determinados neste estudo, verificamos que os níveis de Hb de *B.variegatus* encontram-se abaixo dos encontrados em alguns mamíferos, tais como caninos (15g/dl , DO NASCIMENTO, 1998; HAWKEY e DENNET, 1989; SCHALM, JAIN e CARROL 1975; WEISS, 1976 SWERSON, 2006), ratos ($13,5 \text{g/dl}$, SCHALM, JAIN e CARROL 1975; HAWKEY e DENNET 1989; SWERSON, 2006) e suínos (13g/dl , SCHALM, JAIN e CARROL 1975; HAWKEY e DENNET 1989; SWERSON, 2006), porém semelhantes a outros mamíferos, como os caprinos ($11,0 \text{g/dl}$, HAWKEY & DENNET, 1989; SWERSON, 2006) e macacos ($11,5 \text{g/dl}$, SCHALM, JAIN e CARROL 1975; HAWKEY e DENNET 1989).

Em síntese, podemos verificar que as determinações hematimétricas do Ht, da contagem das hemácias e do teor de Hb, obtidas de *B.variegatus*, foram menores que as encontradas em outros mamíferos.

Ao analisarmos os VCM, HCM, CHCM e RDW, os quais nos fornecem avaliação morfológica dos eritrócitos, pela determinação de suas dimensões e do conteúdo de Hb, encontramos resultados conflitantes, quando estes foram comparados com a literatura em preguiças *Bradypus*. Este fato pode estar associado às técnicas utilizadas neste trabalho que dispõem de automação hematológica com contadores eletrônicos atuais e tecnologia bem mais precisa, exata e reprodutível. (FAILACE, 2003).

O diâmetro dos eritrócitos tem sido avaliado freqüentemente em estudos de hematologia animal comparada. Sua determinação, realizada em esfregaços secos, mostra uma grande variedade de resultados entre os diversos mamíferos, sendo: 4 μ m nos caprinos; 4,5 μ m ovinos; 6 μ m em gatos, suínos e bovinos; 7 μ m em cães e 7,5 μ m em humanos (JAIN, 1993; SWENSON, 2006), e 8,5 μ m em capivaras e 9 μ m em elefantes (AUROCA *et al.*, 2000). Em preguiças (*B.tridactylus*), Hoehne e Rosenfield (1954), verificaram que o VCM e o diâmetro dos eritrócitos são maiores que o da espécie humana. Pelo exposto, podemos observar que os ovinos e os caprinos são mamíferos que apresentam menores diâmetros nos eritrócitos, o que tem sido sugerido por Swenson, (2006), ser uma resposta adaptativa desses animais, uma vez que, mesmo tendo hemácias de tamanho menor, com VCM médio de 20fl, estes animais apresentam um maior número de hemácias de 16x10⁶/mm³, quando comparado a outros mamíferos (HAWKEY e DENNET, 1989; JAIN, 1993; SWENSON, 2006). Em geral, estes animais, por viverem em regiões de grandes altitudes, com menores concentrações de O₂ ambiental, teriam uma maior disponibilidade de sua Hb em função do elevado número de pequenas hemácias, o que acarretaria assim, uma maior área de superfície disponível para difusão (WITHERS, 1992; SCHIMIDT-NIELSEN, 2002).

Neste trabalho, não realizamos a medição do diâmetro das hemácias pelo esfregaço, em virtude da imprecisão que esta técnica acarreta. Ao utilizar as células no esfregaço seco às mesmas tornam-se menores que no estado úmido;

muito poucas células são medidas e a profundidade ou a terceira dimensão da célula não pode ser mensurada (SWENSON, 2006). Por tais razões, a medição do diâmetro das hemácias é menos importante que a medida de seu volume cúbico, que deve ser o “padrão ouro” para medir as células (FAILACE, 2003).

O VCM médio das preguiças (*B.variegatus*) determinado neste estudo foi de $103,63 \pm 4$ fl (93,3–107,1, Tabela 2). Este valor foi maior que os encontrados em dois estudos utilizando *B.variegatus*, por Medeiros *et al.*, (1993), e Barbosa (2004), que verificaram que o VCM médio foi $83,02 \pm 0,05$ fl e $93,93 \pm 10,9$ fl respectivamente. Entretanto, estes estudos, apesar de recentes, foram realizados com contagens de glóbulos ao microscópio, centrifugação do hematócrito e utilização de colorímetro para dosagem de Hb, tecnologia que, nos dias atuais, apresentam grande margem de erro e pouca praticidade.

Estudos realizados com o gênero *Choloepus* identificaram VCM's maiores que os encontrados em nosso estudo: 113,65 fl (MARVIN e SHOOK, 1963); 124,8 fl (WALLACE e OPPENHEIM, 1996) e $135,9 \pm 2,5$ fl (VOGEL *et al.*, 1999), sendo que, nos dois últimos estudos realizados, a metodologia empregada foi semelhante a nossa.

Em concordância com os relatos de Hoehne e Rosenfield (1954), o VCM médio de *B.variegatus* obtido neste estudo, demonstrou que as hemácias desses animais possuem um VMC maior que o encontrado em outros mamíferos como: cães=68,5 fl; gatos=47 fl; caprinos=22,5 fl; suínos=59 fl; ratos=61 fl e o homem=89 fl (SCHALM, JAIN e CARROL, 1975; WEISS, 1976; COLES, 1984; HAWKEY e DENNET, 1989; DO NASCIMENTO, 1998; SWENSON, 2006).

O RDW (*Red Blood Cell Distribution Width*) é um novo índice hematimétrico proveniente da atual tecnologia eletrônica. Portanto, não encontramos valores comparáveis com outros trabalhos em animais. Ele representa o coeficiente de variação do VCM, sendo, por isso, calculado a partir do desvio padrão (DP) deste. O RDW avalia a existência ou não de heterogeneidade volumétrica anormal na população eritrocitária, ou seja, presença de anisocitose (células normocíticas, macrocíticas e microcíticas na mesma amostra de sangue). Para humanos, o

valor normal do RDW, no Cell-Dyn 4000, é menor que 15, o que significa uma população de eritrócitos volumetricamente homogênea (FAILACE, 2003).

Nos animais estudados, encontramos um RDW médio de $15,1 \pm 2,3$. Analisando individualmente, observamos que duas fêmeas, a PG1 e a PG10, e um macho, a PG7, apresentaram anisocitose, detectada pelo RDW de, respectivamente 19,1 e 16,7, e 18,2 (ANEXO-A). Porém, apenas nas PG1 e PG7 a anisocitose foi possível de ser notada pela microscopia do esfregaço (Figura. 9), em função da exagerada variação no diâmetro de suas hemácias e não propriamente pelo VCM, como ocorre na determinação automatizada com o RDW.

Analisando-se os resultados individuais (ANEXO-A), podemos observar que a PG1, apresentou perfil diferente dos demais animais. Os valores individuais da Hb e do VCM foram mais baixos que os valores médios encontrados nas demais preguiças estudadas, respectivamente $8,9\text{g/dl}$ versus $11,1 \pm 1\text{g/dl}$ e $93,1\text{fl}$ versus $104 \pm 4\text{fl}$, além de suas hemácias apresentarem maior heterogeneidade volumétrica em relação aos demais (RDW de 19,1 versus $15,1 \pm 2,3$).

Estes resultados podem estar relacionados ao fato da idade apresentada pelo animal, já que o mesmo não pode ser considerado adulto, segundo os critérios de Wetzel e Ávila Pires (1985). Alguns estudos em mamíferos demonstraram que as cifras hematimétricas sofrem importantes alterações de acordo com a idade (AYRES, 2001; DIAS JUNIOR *et al.*, 2006). Entretanto, estudos em preguiças do gênero *Choloepus* (WALLACE e OPPENHEIM, 1996; VOGEL *et al.*, 1999), não verificaram diferenças nestes parâmetros entre preguiças juvenis e adultas. Assim, os resultados obtidos na PG1 não nos permitem afirmar que, em *Bradypus*, a idade possa interferir na hematimetria, em função de termos analisado apenas um animal jovem.

Os outros índices hematimétricos, a HCM e CHCM determinam, respectivamente, a quantidade e a concentração média de Hb por hemácia. São parâmetros secundários (indiretos) calculados automaticamente pelo computador e apresentaram, neste estudo, valores médios de $39,8 \pm 6,13\text{pg}$ (34-49,9) e $38,35 \pm 5,25\%$ (33,9 – 46,8), respectivamente (Tabela 2).

Medeiros *et al.*, (1993), e Barbosa (2004), verificaram que os valores das HCM's médios foram $27,16 \pm 1,89$ pg e $33,63 \pm 4,62$ pg, respectivamente, e os das CHCM's médios foram $32,44 \pm 0,76\%$ e $34,83 \pm 3,73\%$, respectivamente e Hoehne e Rosenfield (1954), em *B.tridactylus*, observaram valor médio da HCM de 31,2pg. Estes valores foram, portanto, inferiores aos encontrados neste estudo.

Comparando-se nossos resultados, em *Bradypus variegatus*, com os trabalhos realizados em *Choloepus*, verificamos valores semelhantes aos nossos, isto é, HCM de 40,8 e 41pg, respectivamente, em duas preguiças *C.hoffmanni* (MARVIN e SHOOK, 1963); e valor médio de 40,2pg em *C.hoffmanni* (WALLACE e OPPENHEIM, 1996) e $43,6 \pm 1$ pg em *C.didactylus* (VOGEL *et al.*, 1999). Já a CHCM, no presente estudo, em *B.variegatus* se mostrou maior que o valor médio encontrado nos estudos realizados com o gênero *Choloepus*: 32,9% (WALLACE e OPPENHEIM, 1996) e $32 \pm 04\%$ (VOGEL *et al.*, 1999).

Quando comparamos os índices hematimétricos secundários (HCM e CHCM), determinados em *B.variegatus*, no presente estudo, com os valores encontrados em outros mamíferos, verificamos que os valores da HCM são superiores aos encontrados em: cães, 19,5-24,5pg; gatos, 13-17pg; caprinos, 11-22pg; ratos, 15-22pg, e humanos, 24-33pg (WEISS, 1976; COLES, 1984; HAWKEY e DENNET, 1989; SWENSON, 2006; DO NASCIMENTO, 1998). Os valores da CHCM, também se mostraram maiores na preguiça em relação a estes animais, o que sugere a existência de um maior conteúdo de moléculas de Hb nas hemácias de *Bradypus* (hipercromia) em relação a estes mamíferos (WEISS, 1976; COLES, 1984; HAWKEY e DENNET, 1989; DO NASCIMENTO, 1998; SWENSON, 2006).

Ao analisarmos a existência da influência do sexo sobre os parâmetros hematimétricos, observamos que apenas a contagem de Hm's demonstrou-se com diferença significativa entre os sexos, sendo maior nos machos ($3 \pm 0,2 \times 10^6/\text{mm}^3$ de sangue) que nas preguiças fêmeas ($2,7 \pm 0,32 \times 10^6/\text{mm}^3$ de sangue). Divergindo com os nossos achados Vogel *et al.*, (1999), verificaram em *Choloepus didactylus* valor menor na contagem de Hm's em preguiças machos ($2,4 \times 10^6/\text{mm}^3$ de sangue) que nas fêmeas ($2,8 \times 10^6/\text{mm}^3$ de sangue). Outros estudos

realizados com preguiças não demonstraram haver influência do sexo em determinações hematimétricas (BRITTON, KLINE e SILVETTE, 1939; HOEHNE e ROSENFELD, 1954; MARVIN e SHOOK, 1963; JOHANSEN, MARTIN e SAWAYA, 1966; TOOLE, 1972; BOZZINI, HENRRQUES e LADOSKY, 1978; BUSH e GILROY, 1979; MERITT, 1985; MEDEIROS *et al.*, 1993; WALLACE e OPPENHEIM, 1996 e BARBOSA, 2004)

O VCM correlaciona-se inversamente com a contagem de hemácias. Animais com VCM baixos costumam apresentar número de hemácias maiores e vice-versa. Isto é bem evidente nos caprinos que apresentam pequeno VCM com elevado número de hemácias. Nas preguiças parece acontecer o contrário, ou seja, número reduzido de hemácias com VCM grande (SWENSON, 2006). Segundo Jain (1986), o VCM é uma característica individual de cada espécie animal e número de hemácias uma variável, regulada pela eritropoetina, em nível próprio à manutenção da Hb, o qual é o parâmetro homeostático central.

As características fisiológicas e comportamentais apresentadas por estes animais como: baixos metabolismo e temperatura (GOFART, 1971), reduzida PaO₂ (PEDROSA *et al.*, 2002) associada à capacidade de suportar apnéia, durante cerca de 20 minutos (IRVING, SCHOLANDER e GRINNELL, 1942) podem estar relacionados com estes achados hematimétricos.

Pedrosa *et al.*, (2002), avaliando a gasometria arterial em *B.variegatus* não anestesiadas, verificaram baixos níveis de PaO₂ (77,5±8,18mmHg), quando comparados aos de gatos não anestesiados (112,3±9,62mmHg). Esses baixos níveis foram justificados, por esses autores, serem decorrentes do baixo metabolismo que apresentam. Ainda neste estudo, Pedrosa *et al.*, (2002), verificou que as preguiças apresentavam baixa frequência respiratória (FR) em relação aos gatos, sendo respectivamente, 4,9±0,98 rpm e 23,83±8,59 rpm.

Barbosa (2004), ao relacionar o baixo teor de Hb e o reduzido número de hemácias encontrados em *Bradypus*, quando comparado a outros mamíferos, aliados aos resultados de Pedrosa *et al.*, (2002), sugeriu que esses achados parecem ser uma adaptação fisiológica desenvolvida por estes animais, em função do seu baixo metabolismo. Assim, a avaliação da Hb destes animais

poderia contribuir na elucidação e compreensão dessas características fisiológicas.

Com a finalidade de identificar a Hb em *Bradypus*, utilizamos duas técnicas comumente empregadas para identificar as Hb's normais e anormais em humanos: eletroforese em acetato de celulose, com pH alcalino (pH=8,6) e Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC). O padrão eletroforético apresentado pelo hemolisado de todas as preguiças estudadas se mostrou reprodutível. Levando em consideração o padrão de referência humano, o hemolisado de todos animais demonstrou a presença de Hb's na posição da Hb A1 humana, numa percentagem de 15%, e na posição da HbH na percentagem de 75%, sendo esta, considerada um tipo de Hb humana anormal – mutante que se caracteriza funcionalmente por apresentar grande afinidade ao O₂. (Figura.7). Este resultado mostra assim que, o padrão eletroforético encontrada pode ser considerado como típico ou “normal” de *B. variegatus*, devido a sua reprodutibilidade em todas amostras e ao fato de que todos animais encontravam-se saudáveis. Entretanto, é conhecida a limitação da eletroforese alcalina em acetato de celulose em identificar outras possíveis Hb's que possam apresentar a mesma velocidade migratória (mobilidade eletroforética) que as, até então, identificadas.

Para identificação qualitativa e quantitativa das Hb's de *B.variegatus*., utilizamos a HPLC, cujo padrão cromatográfico, também se mostrou reprodutível nas amostras sanguíneas de todos animais. Foram identificados cinco picos cromatográficos caracterizando assim a presença de cinco formas diferentes de Hb's no hemolisado dos animais: a Hb1, com percentual de 4,14±0,75%; Hb2 com percentual de 5,28±0,7%, a qual foi encontrada numa janela de tempo de retenção semelhante a Hb fetal humana (HbF); Hb3, a Hb funcionalmente mais importante, pelo seu maior valor quantitativo, de 75,67±2,6%; Hb.4 com 11,81±2,43%, encontrada em uma janela de tempo de retenção muito próxima da HbA1 do padrão humano, e, a Hb.5 que apresentou percentual de 2,97±1,06% do total, sendo encontrada em uma janela de tempo semelhante a HbA2, do padrão humano (Tabela 5, Figura 9 e ANEXO B).

Somente uma forma circulante de Hb é reportada em alguns animais, tais como o porco doméstico e o pingüim e duas formas de Hb's são relatadas no sangue de vacas, ovelhas, búfalos e várias espécies de pássaros (HILL, 1986). Alguns animais se caracterizam por apresentarem vários tipos de Hb's no seu sangue, tais como os galináceos, que apresentam três formas de Hb's (GULLAND e HAWKEY, 1990); algumas espécies de peixe como *Muraena helena* (PELEGRINI *et al.*, 1995) e *Anarhichas minor*, que apresentam três formas de Hb's (VERDE *et al.*, 2002), *Petromyzon marinus*, que apresenta seis formas de Hbs e o *Clupea harengus*, com oito formas de Hb's (HILL, 1986). A presença de duas ou mais formas de Hb no sangue, se justifica porque cada tipo de Hb apresenta uma diferença funcional quanto ao transporte de O₂ para os tecidos. Portanto, a multiplicidade de Hb's presente no sangue destas espécies assegura uma suficiência no transporte de O₂ a uma variedade de condições metabólicas e ambientais em relação a animais que apresentam duas ou apenas um tipo de Hb no seu sangue (HILL, 1986; PELEGRINI *et al.*, 1995 e VERDE *et al.*, 2002).

Hiebl *et al.* (1888), identificaram em abutres (*Gyps rueppellii*, *Aegyptiinae*), a presença de quatro Hb's distintas (HbA, HbA', HbD e HbD') que oferecem um gradiente com três níveis diferentes de afinidade ao O₂: baixa afinidade com HbA, afinidade intermediária com HbA' e alta afinidade com as Hb's D/D'. Esta característica, uma adaptação fisiológica, é responsável pela notável tolerância a hipóxia em extremas altitudes, uma vez que estes animais podem sobrevoar em altitudes de até 11.300 metros.

Animais que vivem em altitudes elevadas como a lhama, que habita os Andes da América do Sul, e o rato selvagem (*Peromyscus maniculatus*), que habita montanhas nos Estados Unidos, mostram que a curva de dissociação da HbO₂ apresenta-se desviada para a esquerda, o que propicia ao sangue destes animais maior eficiência na captação de O₂ nas baixas pressões existentes nas grandes altitudes (DUKE, 1978). Além disto, esses animais apresentam uma eritrocitose fisiológica com o objetivo de aumentar o conteúdo de Hb no sangue circulante (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

Em geral, os animais de pequeno porte têm uma curva de dissociação da HbO₂ localizada à direita e, portanto, apresentam menor afinidade da Hb ao O₂, um deslocamento que provavelmente, está relacionado com a taxa metabólica mais elevada nos tecidos destes animais (HILL, 1986). Nos animais que hibernam, condição caracterizada por um estado de hipometabolismo, a curva de dissociação da HbO₂, apresenta-se desviada para a esquerda em função da diminuição da temperatura corporal e redução da taxa de 2,3DPG nas hemácias destes animais durante este estado (VAN BREUKELEN e MARTIN, 2002; CLEMENTI *et al.*, 2003). Os tatus (*Armadillos*), animais que, em repouso apresentam baixa taxa metabólica, exibem alta afinidade da Hb pelo O₂ (BOGGS, FRAPPELL e KILGORE, 1998).

Kleinschmidt, Marz e Braunitzer (1989), examinaram a estrutura primária da Hb da preguiça *B. tridactylus*, através de cromatografia sobre carboximetil celulose CM-52 para separar os seus componentes. Estes autores verificaram que as cadeias α e β foram compostas por 141 e 146 aminoácidos, respectivamente, assim como nos humanos, apresentando também um peso molecular muito semelhante ao da Hb humana. Entretanto, as cadeias identificadas, quando comparada com as cadeias correspondentes a dos humanos, evidenciou 27 substituições de aminoácidos na cadeia α (19,1%) e 33 na cadeia β (22,6%). Ainda neste estudo, realizaram comparação com a Hb do tatu (*Armadillo – Dasypus novemcinctus*), que, assim como as preguiças, pertencem a ordem dos Xenarthras. Esta comparação revelou 25 e 34 substituições nas cadeias α e β , respectivamente. Os autores sugeriram que estas substituições foram necessárias para aumentar afinidade da Hb pelo O₂ e, desse modo, adaptar os tatus (*Armadillos*) a uma vida sob condições de hipóxia, enterrados embaixo da terra. Diferentemente destes, as preguiças vivem em árvores e não são submetidas a hipóxia ambiental. (KLEINSCHMIDT, MARZ e BRAUNITZER, 1989).

Irving, Scholander e Grinnel (1942), sob condições experimentais, verificaram nas preguiças uma capacidade de se manter em parada respiratória por cerca de 20 minutos. Durante este período, mesmo não especificando os valores, estes autores relatam que a PaCO₂ destes animais manteve-se baixa,

assim como estavam baixos os conteúdos de CO₂ e O₂ no sangue, o consumo de O₂, a FC e o metabolismo. A recuperação subsequente ao período de apnéia foi garantida pelo aumento da ventilação que restabeleceu rapidamente os estoques de O₂.

Esta característica das preguiças é comum aos mamíferos mergulhadores como focas e baleias, porém, estes animais são praticamente insensíveis ao CO₂ como estímulo à respiração. Foi demonstrado, entretanto, na preguiça que diferentemente dos mamíferos mergulhadores, sensibilidade ao CO₂ similar aos outros mamíferos não mergulhadores (IRVING, SCHOLANDER e GRINNELL, 1942; OZÓRIO DE ALMEIDA e BRANCA DE FIALHO, 1924).

No entanto, mamíferos mergulhadores como as Belugas (*Delphinapterus leucas*) e as orcas assassinas (*Orcinus orca*), apresentam como características hematológicas, elevados índices hematimétricos (CORNELL, 1983 e CORNELL, L.H. *et al.*, 1988).

Finalmente, verificamos, com este estudo, que as preguiças *Bradypus variegatus* apresentam características hematimétricas próprias, mostrando valores de hematócrito, contagem de hemácias e teor Hb menores em relação a outros mamíferos de alto metabolismo. Outros parâmetros hematimétricos, tais como o volume corpuscular médio, a hemoglobina corpuscular média e a concentração de hemoglobina corpuscular média apresentam-se maiores nesses animais. Influência do sexo foi encontrada apenas com relação ao número de hemácias, sendo maior nos machos. Esses achados hematimétricos associados à multiplicidade de Hb's encontradas em cinco formas distintas podem estar relacionados com as características fisiológicas apresentadas por estes animais tais como: baixo metabolismo e capacidade de se manter em parada respiratória, por mais de 20 minutos, sem repercussões fisiológicas. Estudos futuros para se obter a seqüência de aminoácidos de cada cadeia globínica e a afinidade das Hb's pelo O₂ que repercute na função transportadora de O₂ desta molécula, através da curva de dissociação da oxihemoglobina serão importantes e necessários.

6 – CONCLUSÕES

Os resultados, obtidos em preguiças (*Bradypus variegatus*) não anestesiadas, permitiram as seguintes conclusões:

- ▶ O valor médio do hematócrito, determinado nesses animais, foi inferior aos encontrados em *B. tridactylus* e *C.hoffmanni*;
- ▶ O valor médio do número de hemácias se mostrou inferior quando comparado a outros mamíferos, porém, foi similar ao encontrado nas outras preguiças *Bradypus* e *Choloepus*;
- ▶ O teor de hemoglobina foi mais baixo, quando comparado aos de outros mamíferos, porém semelhante aos encontrados nos gêneros *Bradypus* e *Choloepus*;
- ▶ O Volume Corpuscular Médio, a Hemoglobina Corpuscular Média e a Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média se mostraram semelhantes aos encontrados no gênero *Choloepus* e maiores quando comparados a grande maioria dos mamíferos, evidenciando hemácia de maior tamanho e conteúdo de hemoglobina no seu interior.
- ▶ O padrão cromatográfico, através do HPLC, demonstrou a presença de cinco picos cromatográficos, o que caracteriza a presença de cinco formas distintas de hemoglobinas existentes no eritrócito destes animais;
- ▶ Influência do sexo foi encontrada apenas no número de hemácias, sendo mais elevada nas preguiças machos.

7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, M.J.A.A.L; MIGLINO, M.A; AMORIM JR., A.A; SANTOS, T.C. Morphological aspects of placenta of the *Bradypus variegatus* Shinz, 1825. ***Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science***, v.40, p.217-226, 2003.

AUROCA, M.E; MIRANDA, L.B; LOPES, R.S; TAKAHIRA, R.K; CIARLINE,P.C; OBA, E. Valores hematológicos de capivaras (*Hydrochoerus Hydrochaeris*) criadas em cativeiro no município de Botucatu-SP. ***Ciência Rural, Santa Maria***, v.30, n.5. p.813-817, 2000.

AYRES, M.C.C. Avaliação da influência de fatores relacionados ao sexo sobre a variabilidade do eritrograma de zebuínos (*Bos indicus*, Linnaeus, 1758) da raça Nelore, criados no Estado de São Paulo. ***Veterinária Brasil Saúde Produção. Animal.***, v.1, p.31-36, 2001.

BARBOSA, A. **Perfil hematológico na preguiça (*Bradypus variegatus*)**. Monografia de Conclusão de Curso - Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 2004.

BOGGS, D.F; FRAPPELL, P.B; KILGORE, Jr D.L. Ventilatory, Cardiovascular and metabolic responses to hypoxia and hypercapnia in the armadillo. ***Respiration Physiology***, v. 113, p.101-109, 1998.

BONELLO, F.L; CIARLINI, P.C; AZEVEDO, E.Z. Eritrograma e proteína plasmática total (PPT) em araras-canidé (*Ara ararauna*) mantidas em cativeiro. ***Ciência Agrária e Saúde***, v.2, n.2, p -20-24, 2002.

BOZZINI, C.E.; HENRIQUES, J.A.P.; LADOSKY, W. Characterization of the blood and iron kinetics in the three-toed sloth (*Bradypus tridactylus*). ***Comparative Biochemistry. Physiology***, v. 61, p.417-418. 1978.

BRITTON, S.W. Form and function in the sloth. *Quarterly Review Biology*, v.16, p. 190-207, 1941.

BRITTON, S.W; KLINE, R.F; SILVETTE. Blood-chemical and other conditions in normal and adrenalectomized sloths. *American Journal of Physiology* 127:701-704, 1939.

BUNN, H.F. Evolution of mammalian hemoglobin function. *Blood*, v. 58, p. 189-197, 1981.

BUSH, B.M. **Manual de laboratório veterinário de análises clínicas**. Zaragoza: Acribia, 1982.467p.

BUSH, M. & GILROY, B.A. A bleeding technique from nonpalpable vessels in anaesthetized two-toed sloths (*Choloepus didactylus*) – plus hematologic data. *Journal of Zoo Animal Medicine*. v.10, p. 26-27, 1979.

CABRAL, A.M.; DA COSTA, C.P.; HUGGINS, S.E. Cardiac output in the three-toed sloth (*Bradypus tridactylus*). *Comparative Biochemistry. Physiology*, v. p.527-530. 1980.

CABRAL, M.C.C.S;. **Compilação sobre a Mastofauna do Estado de Pernambuco**. Recife, 2000. 65p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

CHAVES, N.; BARROS, M.; MENDONÇA, D.; PORTELA, E.; BACQ, Z. M. Adrenaline, noradrenaline, reflexes sino-carotidien chez le Paresseux (*Bradypus tridactylus*). *Archives of Internal Physiology and Biochemistry*, v.68, p.263-266. 1960.

CLEMENTI, M.E; PETRUZZELLI, R.; FILIPPUCI, R.; CAPO, C.; MISITI, F.; GIARDINA, B. Molecular adaptation to hibernation: the hemoglobin of *Dryomys nitedula*. *European Journal Physiology*, v. 446, p. 46-51, 2003.

COLES, E.H. Eritrócitos. In: COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3.ed. São Paulo:Manole,1984. p. 73-85.

CORNELL, L.H. Hematology and clinical chemistry values in the whale, orcinus orca L. **Journal of Wildlife Diseases**, v.19(3) .p.259-264, 1983.

CORNELL, L.H; DUFFIELD, D.S; JOSEPH, B.E; STARK, B. Hematology and serum chemistry values in the Beluga (*Delphinapterus leucas*). **Journal of Wildlife Diseases**. V.24(2). p. 220-224, 1988.

COSTANZO, L. Fisiologia Respiratória. In: COSTANZO, L. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.150- 190.

COUBROUGH, R.I. Stress and fertility. A review. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 153-156, 1985.

DIAS JUNIOR, R. F; BRACARENCE, A. P. F; MARÇAL, W. S; ROCHA, M. A, DIAS, R.C.F. Valores de referência e influência da idade no eritrograma de fêmeas bovinas da raça Aquitânica. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p311-315, 2006.

DO NASCIMENTO, S.J. **Exame laboratorial e sua interpretação clínica na veterinária**. Recife: Art Cópias, 1998. p.53-62.

DUARTE, D.F.; DA COSTA, C.P.; HUGGINS, S.E. Cardiovascular response in the sloth (*Bradypus tridactylus*) to autonomic blockade. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.19, n.4-5, p.518A 1986.

DUARTE, D.F.; DA COSTA, C.P.; HUGGINS, S.E. The effects of posture on the blood pressure and heart rate in three-toed sloth (*Bradypus tridactylus*). ***Comparative Biochemistry. Physiology***, v. 73A, p.697-702.1982

DUARTE, D.F.; HUGGINS, S.E.; DA COSTA, C.P.; LEAL, A.M. Responses of the three-toed sloth, *Bradypus tridactylus*, to some commonly used pharmacologic agents. I – autonomic drugs. ***Comparative Biochemistry. Physiology***, n.2, p.275-285,1987.

DUARTE, D.F.; HUGGINS, S.E.; DA COSTA, C.P.; LEAL, A.M. The effects of posture changes on blood pressure and heart rate of anesthetized and reserpinized sloth. ***Comparative Biochemistry. Physiology***, v.94A, n.1, p.159-165. 1989a.

DUARTE, D.F.; HUGGINS, S.E.; DA COSTA, C.P.; LEAL, A.M. Responses of the three-toed sloth, *Bradypus tridactylus*, to some commonly used pharmacologic agents. II – chloralose and reserpine. ***Comparative Biochemistry. Physiology***, v.92C, n.2, p. 405-411. 1989b.

DUARTE, D.F.; DA COSTA, C.P.; GILMORE, D.P.; LIMA, A.M.J.; SILVA, V.L. Circadian rhythms in blood pressure in free ranging three-toed sloth (*Bradypus variegatus*). ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v.36, p.273-278.2003.

DUKE J.B. **Fisiologia Animal: adaptación y medio ambiente**. 1ªed, cap.3. Barcelona: editora Omega S.A, 1978. p.60-82.

FAILACE, R. Eritrograma. In: FAILACE, R. **Hemograma: Manual de Interpretação**. Porto Alegre: Artmed, 2003. p.39- 71.

FÊLIX, C.H.; DUARTE, D.P.F.; DA COSTA, C.P.; ZIN, W.A. Controle da Ventilação em preguiças (*Bradypus variegatus*) anestesiadas. **Resumo da XII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental**. v.1, n. 251, p.183. 1987.

GIARDINA, B; MOSCA, D; De ROSA, M.C. The effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. ***Acta Physiology Scandinavia***. v.182, p.229-244,2004.

GILMORE, D. P.; DA COSTA C.P. The three-toed sloth in biomedical research: an update on the reproductive and endocrine systems. ***Medical Science Research***, v. 23, p. 579-581, 1995.

GILMORE, D. P.; DA COSTA C.P.; CABRAL, A.; DUARTE, D.P.F.; MONTGOMERY, I.; WILSON, C. A. Further studies on reproductive function in the three-toed sloth. *Bradypus tridactylus*. ***Medical Science Research***, v. 22, p. 255-256, 1994.

GILMORE, D. P.; DA COSTA C.P.; VALENÇA, M.; DUARTE, D.P.F.; WILSON, C. A.; GRAY, C.E. Effects of exogenous LHRH on plasma LH and sex steroid levels in the three-toed sloth *Bradypus tridactylus*. ***Medical Science Research***, v. 19, p. 333-335, 1991.

GILMORE, D.P.; DA COSTA, C.P.; DUARTE, D.P.F. An update on the physiology of two-and three-toed sloths. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v.33, n.2, p.129-146. 2000.

GOFFART, M. **Function and Form in the Sloth**. In: GOFFART M. Oxford: Pergamon Press, 1971. p. 225.

GRANDALL, L.S. Order Edentata. In: CRANDALL, L.S. **The management of wild mammals in captivity**. Chicago: University of Chicago Press, 1964. p. 183-194.

GRASSÉ, P.P. Ordre des Edentés. Sous-ordre des Xénarthres. **Traité de Zoologie**, v. 7, II, p. 1182-1266, 1955.

GULLAND, F.M.D., HAWKEY, C.M. Avian Hematology. **Veterinary Annual** V.30, p.126-136,1990.

HAWKEY, C.M., DENNET, T.B. **Comparative veterinary haematology**. Ipswich: W.S.Cowell,1989. 192p.

HIEBL I; WEBER R.E; SCHNEEGANSS D; KOSTERS J; BRAUNITZER G. High-altitude respiration of birds. Structural adaptations in the major and minor hemoglobin components of adult Ruppell`s Griffon (*Gyps rueppellii*, Aegyptiinae): a new molecular pattern for hypoxic tolerance. **Biology Chemistry Hoppe-Seyler**. v.369(4), p.217-32, 1988.

HILL, R.W. Exchanges of Oxygen and carbon dioxide: Transport in body fluids. In: HILL, R.W. **Comparative Physiology od Animals: an environmental approach**. New York: Harper Publishers,1986. p. 373-442.

HOCHSTETTER, F. Ein Beitrag zur vergleichenden anatomie des Venensystems der Edentaten. **Morphologir Jahrbuch** v.25:p.362-376,1898.

HOEHNE, L.; ROSENFELD, G. Estudos de Hematologia comparada. IV Dados hematológicos de *Bradypus tridactylus* L.1748 (preguiça). **Memória Instituto Butantan**. p.75-83. 1954.

IRVING, L; SCHOLANDER, P.F.; GRINNELL, S.W. Experimental studies of respiration of sloths. **Journal Cellular Comparative Physiology**. v.28, p.189-209, 1942.

JAIN, N.C. Evaluation of the Eritron In: JAIN, H.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 4 ed, 1986. p.1221-36.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.p.234-302.

JOHANSEN, K.; MARTIN, A. W.; SAWAYA, P. Some circulatory characteristics of the three-toed sloth *Bradypus tridactylus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.38, p.543-551. 1966.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. Eritropoiese In: JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 241-248.

KLEINSCHMIDT, T; MARZ, J; BRAUNITZER, G. The primary structure of pale-throated tree-toed sloth (*Bradypus tridactylus*, Xenarthra) hemoglobin. **Biology Chemistry Hoppe-Seyler** , v. 370, p. 303-308, 1989.

LOOMIS, M.R; HENRICKSON, R.V; ANDERSON, J.W. Effects of ketamine hydrochloride on the hemogram of rhesus monkeys (*Macaca mullatta*). **Laboratory Animal Science**, v. 30, p. 852-853,1980.

LORENZI, T.F; VERRASTRO, T. Eritrócitos. In: AIRES, M.M. **Fisiologia** 2^aed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1999. p. 107-124.

LOREY F; CUNNINGHAM G; SHAFER F. Universal Screening for hemoglobinopathies using High-Performance Liquid Chromatography: Clinical Results of 2.2 Million Screens. **European Journal Human Genetic**; v.2, p. 262-271,1994.

LUMEIJ, J.J.T. Avian clinical Biochemistry. In: KANEKO, J.J., HARVEY, J.W. & BRUSS, M.L. ***Clinical Biochemistry of Domestic Animals***, 5 ed, San Diego: Academic Press, 1997, p.857-883.

LUMSDEN, J.H.; MULLEN, K.; ROWE, R. Hematology and biochemistry reference values for female Holstein cattle. ***Canadian Journal Comparative Medicine.***, v.44, p.24-31, 1980.

MADELLA, D.A.; RODRIGUES, E.J.; FELISBERTO, M.E.; SOUZA, C.E. Valores hematológicos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre na região de Campinas-SP. ***Ciência Rural, Santa Maria***, v.36, n.4, p.1321-1324, 2006.

MARENGO R.J. Radip Electrophoresis of Human hemoglobin. ***American Journal Clinics Pathology***, v.18, p. 790-792, 1975.

MARVIN, H. M; SHOOK, B.R. Hematological studies on the two-toed sloth, *Choloepus didactylus*. ***Comparative Biochemistry Physiology***, v.8, p.187-186. 1963.

MASPES, V. **Fisiopatologia dos órgãos hemopoiéticos, sangue e da hemostasia**. São Paulo: Laboratório de Artes Gráficas da FAU, 1973, p.2

MCNAB, B.F. Energetics, population biology, and distribution for Xernathrans, living and extinct. In: MONTGOMERY, G.G. **The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1985. p.219-232.

MEDEIROS, I.R.T.; VASCONCELOS, A.E.; SILVEIRA, A.P.; HENRIQUES, F.G.O.T.B.; MONTENEGRO, P.F.G.P.; MARCELINO, N.A.; DUARTE, D.P.F.; DA COSTA, C.P.; CABRAL, A.M.S. Estudos hematológicos na preguiça (*Bradypus variegatus*). **Anais da VIII Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, p.268. 1993.

MERIT, D.A. **Edentate immobilisation at Lincoln Park Zoo**. Chicago: International Zoo Year-book 12, 1972, p.218-220.

MERRITT, D.A. The two-toed sloth, *Choloepus hoffmanni* Peters. In: MONTGOMERY, G.G. (Ed). **The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths and Vermilinguas**, Washington: Smithsonian Institution Press. 1985. p.333-341.

MONTGOMERY, G.G; SUNQUIST, M.E. Impact of sloths on neotropical energy flow and nutrient cycling. In: MEDINA & GOLLY. **Trends in Tropical Ecology**, New York: Springer-Verlag, 1975. p. 69-98.

MONTGOMERY, G.G.; SUNQUIST, M.E. Habitat selection and use by two-toed and three toed sloths. In: MONTGOMERY, G.G. **The Ecology of Arboreal Folivores**, Washington D.C: Smithsonian Institution Press,1978. p.329-359.

MOREIRA, M.I.A.; NOVAIS, S.L.; NASCIMENTO, M.L.P. Frequências de anemias microcíticas e macrocíticas no Laboratório Dalmo de Oliveira em Recife, PE. **News Laboratory**, v.70,p.90-96,2005.

NASCIMENTO M.L.P; CARDOSO, L.S; ALMEIDA R.S; COUTINHO, R.A. A Hemoglobina Corpuscular Média (HCM -pg) não é o melhor indicador da hipocromia. **Laes & Haes**, Ano 25, n.147, 130-144,fev/mar,2004

NAVARRO, C.E.K.G; PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. São Paulo: Livraria Varela, 1994. p.163-179.

OLIVEIRA, L.H.A.; DA COSTA, C.P.; HUGGINS, S.E. Cardiac mass, blood temperature and ventricular fibrillation: a study of the comparative physiology of the three-toed sloth and domestic cat. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.67A, n.X, p.483-490. 1980.

OZORIO DE ALMEIDA, A.; BRANCA DE FIALHO, A. Metabolisme, température et

quelques autres déterminations physiologiques faites sur l'ê Paresseux (*Bradypus tridactylus*). **Comptes Rendus de la Societe de Biologie**, v. 91, p. 1124-1125, 1924.

PAPADEA, C; CATE, J. Identification and quantification of hemoglobins A, F, S, and C by automated chromatography. **Clinical Chemistry**, v.42, p.157-163,1996

PEDROSA, M.A.C.; DUARTE, D.F.; DA COSTA, C.P.; GILMORE,D.P.; LIMA, A.M.J.; BEZERRA, A . P. The effect of feeding on the respiratory activity of the sloth. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.7, p.851-854. 2002.

PELEGRINI. M; GIARDINA. B; VERDE. C; PRISCO.G. Structural–functional characterization of the cathodic haemoglobin of the conger eel *Conger conger*: molecular modelling study of an additional phosphate-binding site. **Biochemical Journal** v. 372. p.679-687. 2003.

REECE, W.O. Sangue e suas funções, In: REECE, W.O. **Fisiologia de animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1996. p. 91-113.

SANTOS, M.S.B. **Contribuição ao estudo do sistema respiratório em preguiças *Bradypus variegatus*: Uma abordagem fisiológica e morfológica**. Recife, 2000. 47 f. Dissertação de Mestrado (Fisiologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. **Veterinary hematology**. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975. p.122-143.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Sangue. In: SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal – adaptação e meio ambiente**. 5 ed. São Paulo: Santos, 2002. p. 65-88.

SHOLANDER, P.F.; KROG, J. Countercurrent heat exchange and vascular

bundles in sloths. ***Journal of Applied Physiology***, v.10, p.405-411, 1957.

SWENSON, M.J. Propriedades Fisiológicas e Constituintes Químicos e Celulares do Sangue. In: SWENSON, M.J. & REECE, W.O. **Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12^aed, cap. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 19-43.

TOOLE, J.F. Blood chemistry of the sloth. ***Laboratory Animal Science***, v.22, p.118-121. 1972.

TURNER, H.N. Blood chemistry of the sloth. ***Trans Roy Soc Edinburg***, v. 27, p.70-104, 1876.

VALENTINUZZI, M.E.; RUIZ, E.V.; DA COSTA, C.P. Ventricular fibrillation threshold in the three-toed sloth (*Bradypus tridactylus*). ***Acta Physiology et Pharmacology Latinoamer***, v.34, p.312-322. 1984.

VAN BREUKELEN, F. & MARTIN, S.L. Molecular adaptations mammalian hibernators:unique adaptations or generalized reponses? ***Journal Applied Physiology***, v. 92, p.2640-2647, 2002.

VELLA F. Acid Agar Gel Electrophoresis of Human Hemoglobin. ***American Journal Clinics Pathology***, v. 49, p.440-442, 1968.

VERDE, C; CARRATORE, V; RICCIO, A; TAMBURRINI, M; PARISE, E; PRISCO, G. The functionally distinct hemoglobins of the arctic spotted wolffish *Anarhichas minor*. ***The Journal of Biological Chemistry***, v.227. n.39, p.312-320, 2002.

VOGEL, I; VIÉ, J-C.; THOISY, B.; MOREAU, B. Hematological and serum chemistry profiles of free-ranging southern two-toed sloths in French Guiana. ***Journal of Wildlife Diseases***, v. 35. n.3, p. 531-535, 1999.

WALLACE, C.; OPPENHEIM, Y.C. Hematology and serum chemistry profiles of captive Hoffmann's two-toed sloths (*Choloepus hoffmanni*). ***Journal of Zoology***

and Medicine, v.27, p.339-345. 1996.

WEISS, E. Fisiopatologia de la sangre y tejido hematopoyético. In: SPÖRRI, H.; STÜNZI, H. **Fisiopatología de los animals domésticos**. Espanha: Achibia, 1976. p.1-16.

WETZEL, R. M.; ÁVILA-PIRES, F.D. Identification and distribution of the recent sloths of Brazil (Edentata). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 40, n. 4, p. 831-836, 1980.

WETZEL, R.M. The idenfication and distribution of recent Xenarthra (= Edentata) of Brazil In: MONTGOMERY, G.G. **The evolution and Ecology af Armadillos Sloths and Vermilinguas**. Washigton and London: Smithsonian Instituion Press, 1985. p. 5-21.

WIMBERLEY, PD.; BURNETT, RW.; COVINGTON, AK. Guidelines for routine measurement of blood hemoglobin oxygen affinity. **Scandinav Journal Clinical Laboratory Invest** (Suppl 203), p. 227-34, 1990.

WISLOCKI, G.B. Observations on the gross and microscopic anatomy of the sloth (Bradypus griseus griseus Gray and Choloepus hoffmanni Peters). **Journal of Morphology and Physiology**, v. 46, p. 317-377, 1928.

WITHERS, P.C. **Comparative Animal Physiology**. In: WITHERS, P.C. Los Angeles: International Edition, cap.15, 1992.

ANEXO - A

Tabela 5 - Valores individuais de peso, temperatura e parâmetros hematimétricos em *Bradypus variegatus*.

PREGUIÇA	SEXO	PESO (kg)	TEMP. (°C)	HEMÁCIAS (x10 ⁶ /mm ³)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	RDW
1	♀	1,9	30	2,9	8,9	27	93,1	34	36,2	19,1
2	♂	3,65	29	2,95	10,6	30,7	104	36	34,6	13,3
3	♂	4	30	3	11	31,6	105	36,4	34,7	13,5
4	♀	2,6	30	2,23	11,1	23,6	106	49,5	46,8	13,6
5	♀	3,35	29,5	2,94	13,3	30,5	104	45,2	43,6	13,6
6	♂	3,75	32	2,8	11	23,5	107	49,9	46,8	13,5
7	♂	3,65	32	3,36	11,5	33,9	101	34,3	33,9	18,2
8	♂	4,65	29	3	10,6	31	103	35,4	34,3	13,3
9	♂	4	29	3,23	12,2	34,6	107,1	37,8	35,3	14,5
10	♀	4	29	2,7	10,7	28,7	105,9	39,5	37,3	16,7

ANEXO. B – Demonstra individualmente todos os cromatogramas do HPLC realizados com as preguiças *Bradypus variegatus*.

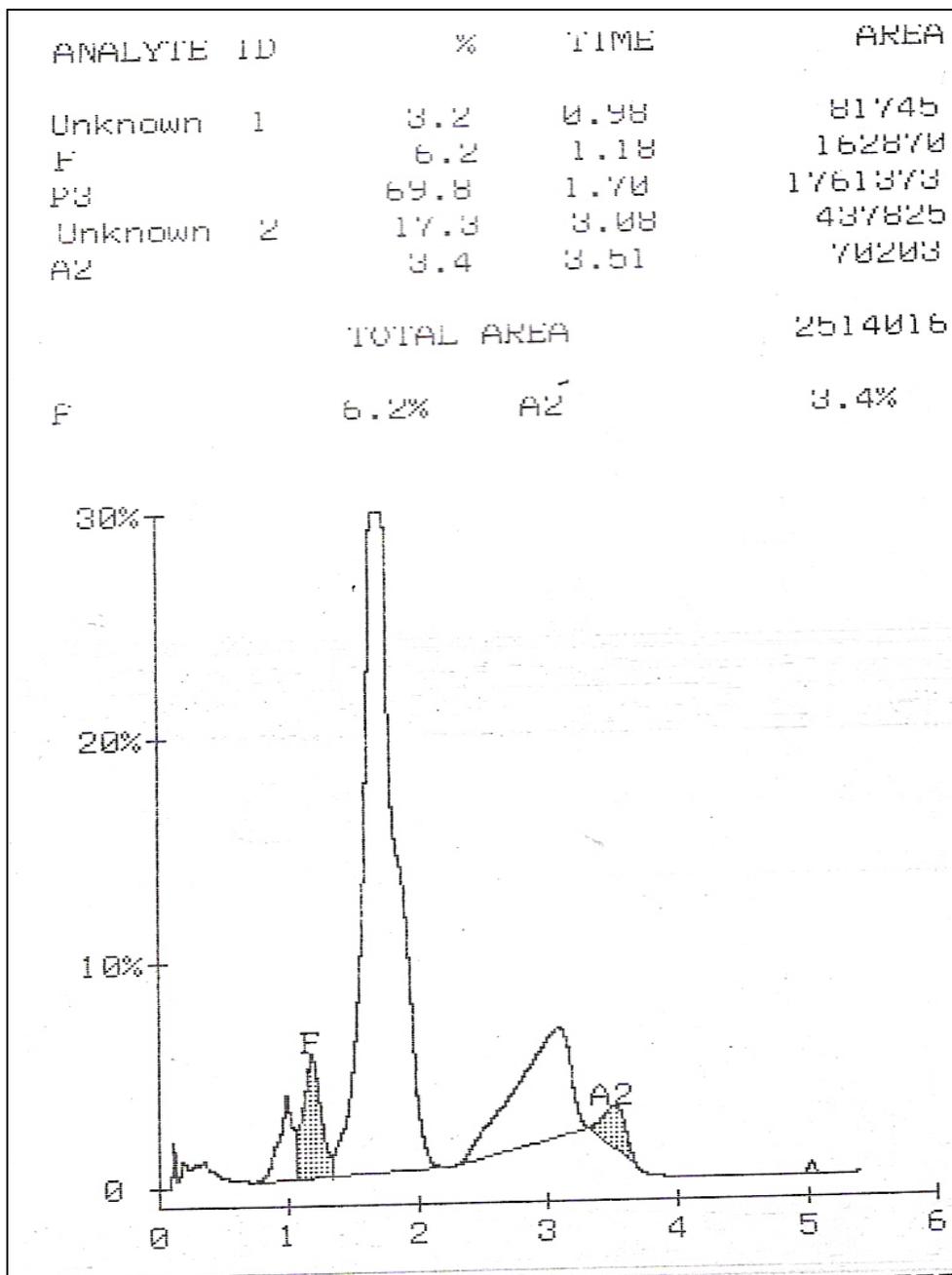


FIGURA. 11 – Cromatograma – HPLC da Preguiça 01

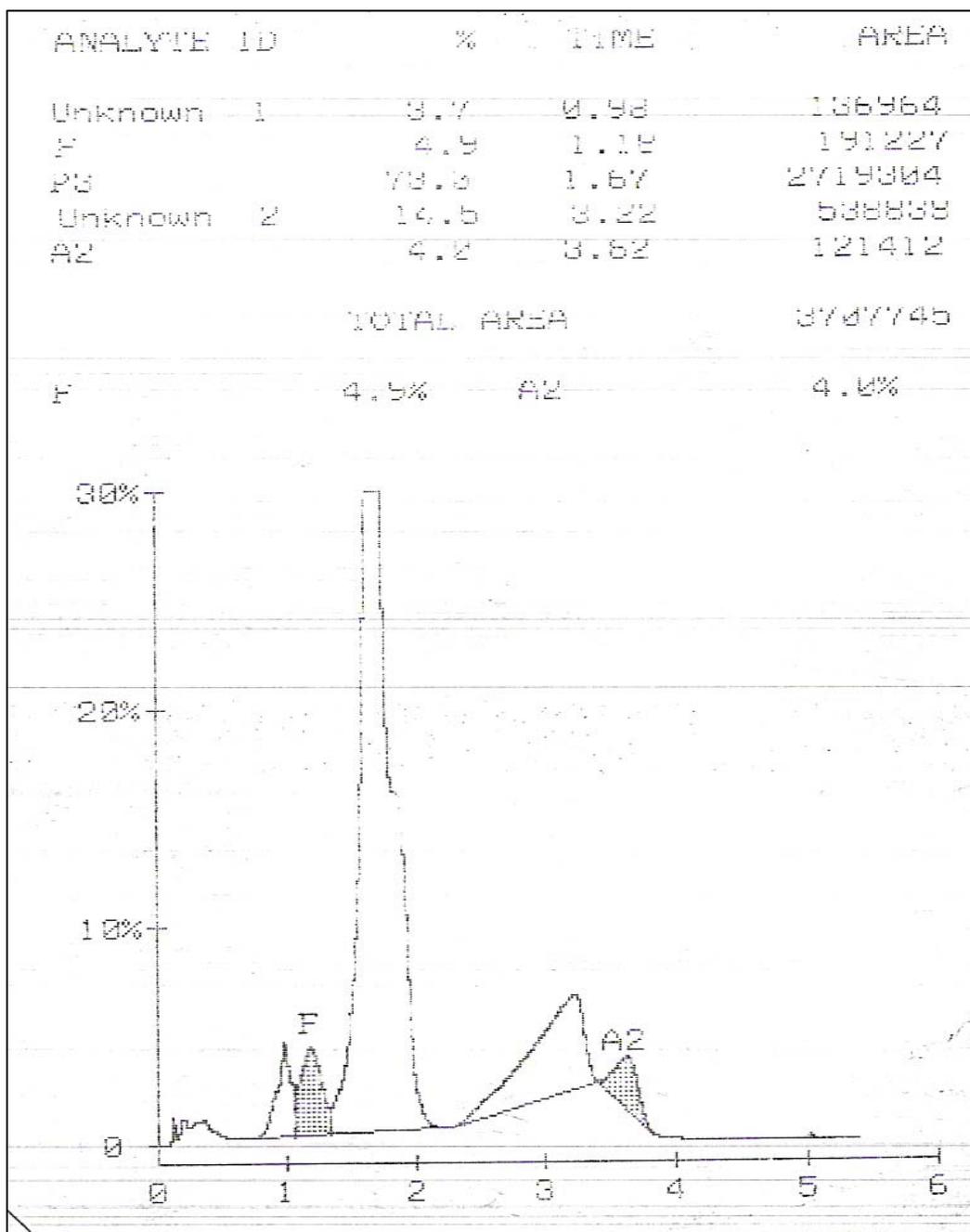


FIGURA. 12 – Cromatograma – HPLC da Preguiça 02

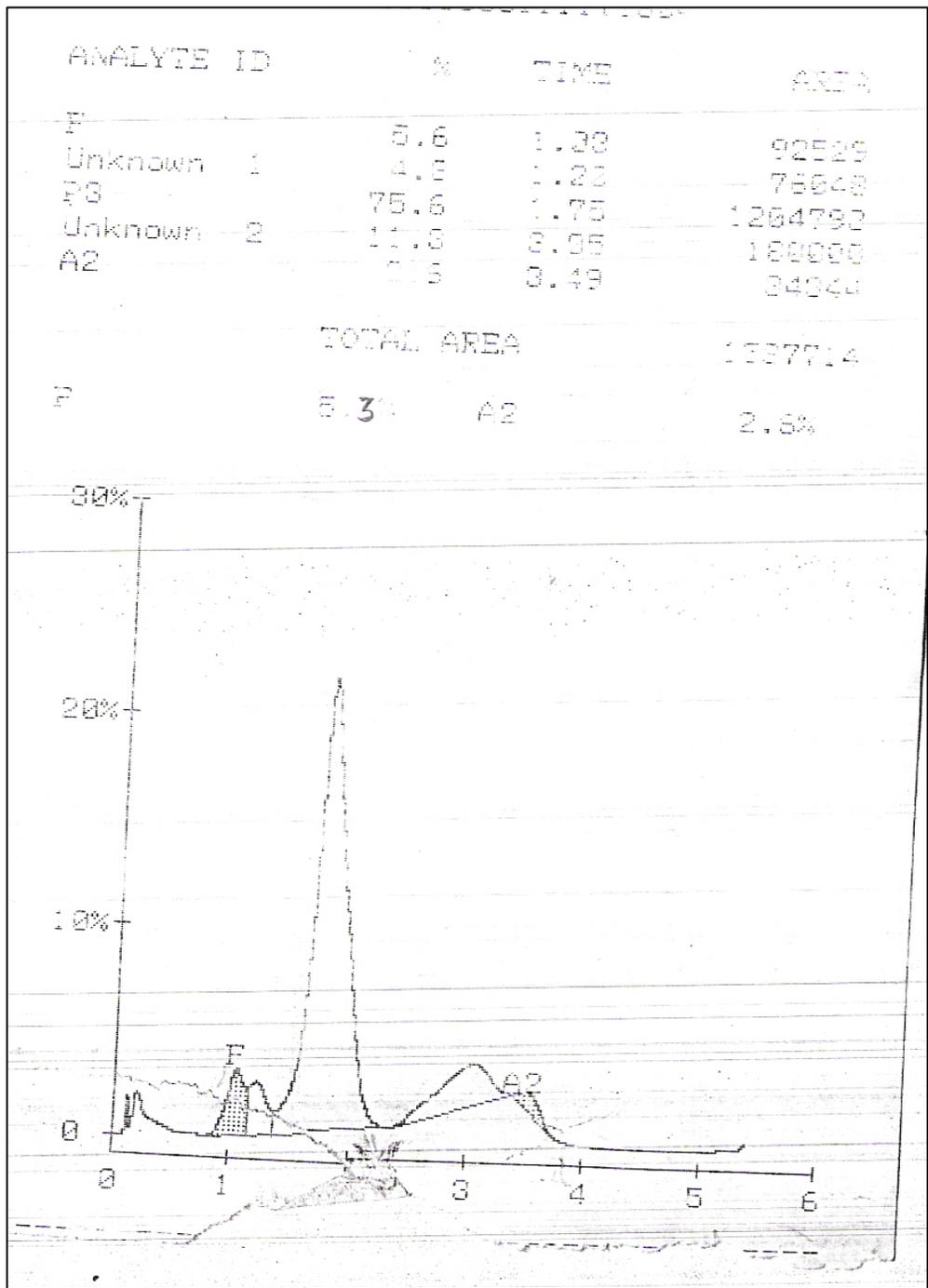


FIGURA. 13 – Cromatograma – HPLC da Preguiça 03

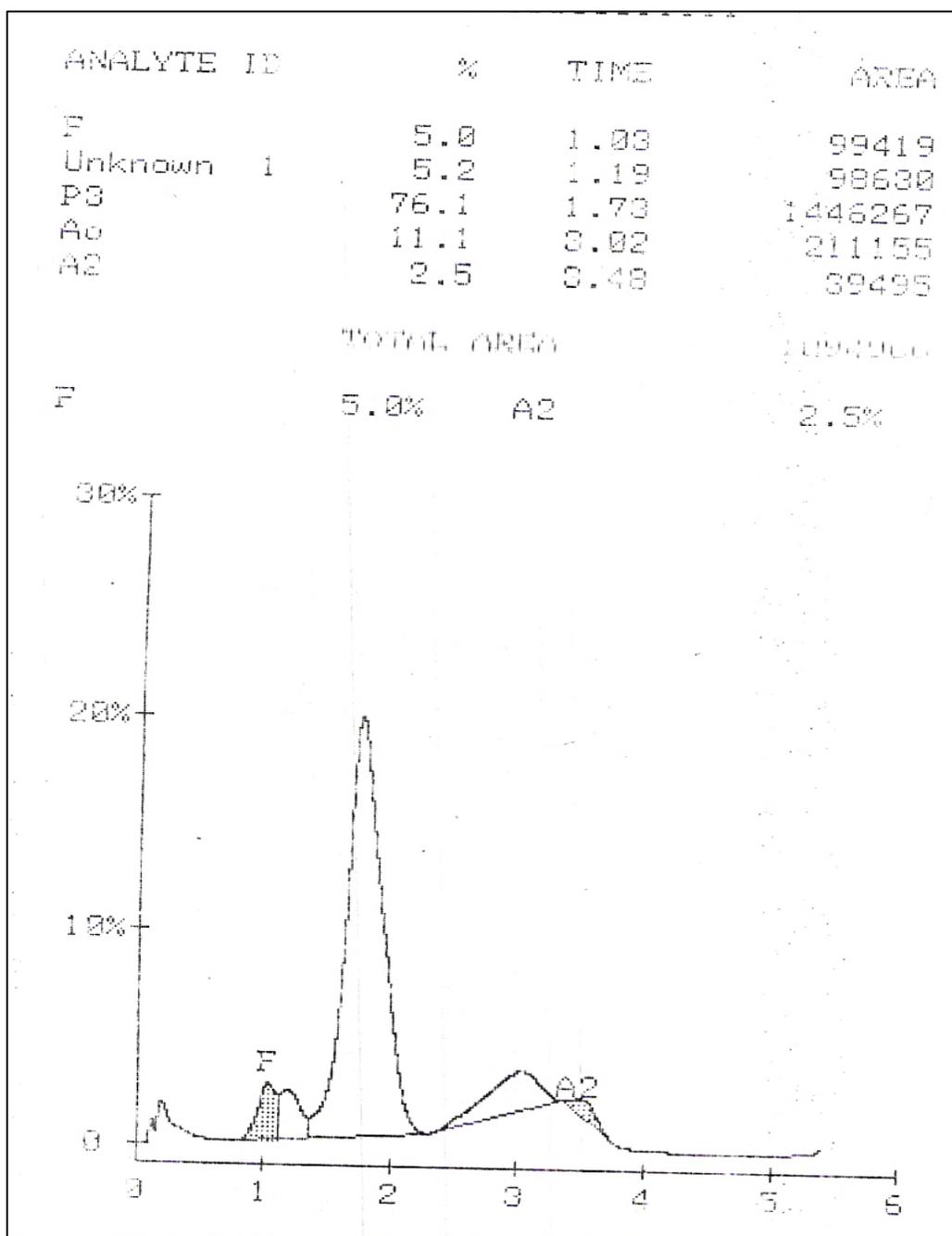


FIGURA. 14 – Cromatograma – HPLC da Preguiça 04

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
Unknown 1	4.6	1.04	92698
F	4.9	1.23	106113
P3	78.9	1.78	1603148
Unknown 2	9.4	3.30	191398
A2	2.0	3.61	33817
TOTAL AREA			2027174
F	4.9%	A2	2.0%

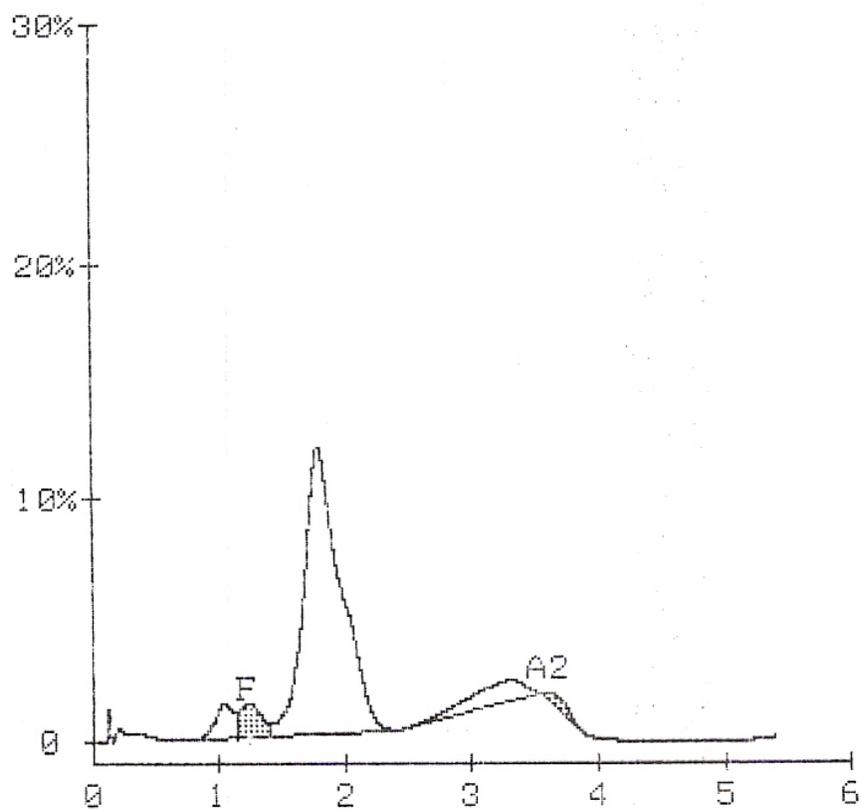


FIGURA. 15 – Cromatograma – HPLC da Preguiça 05

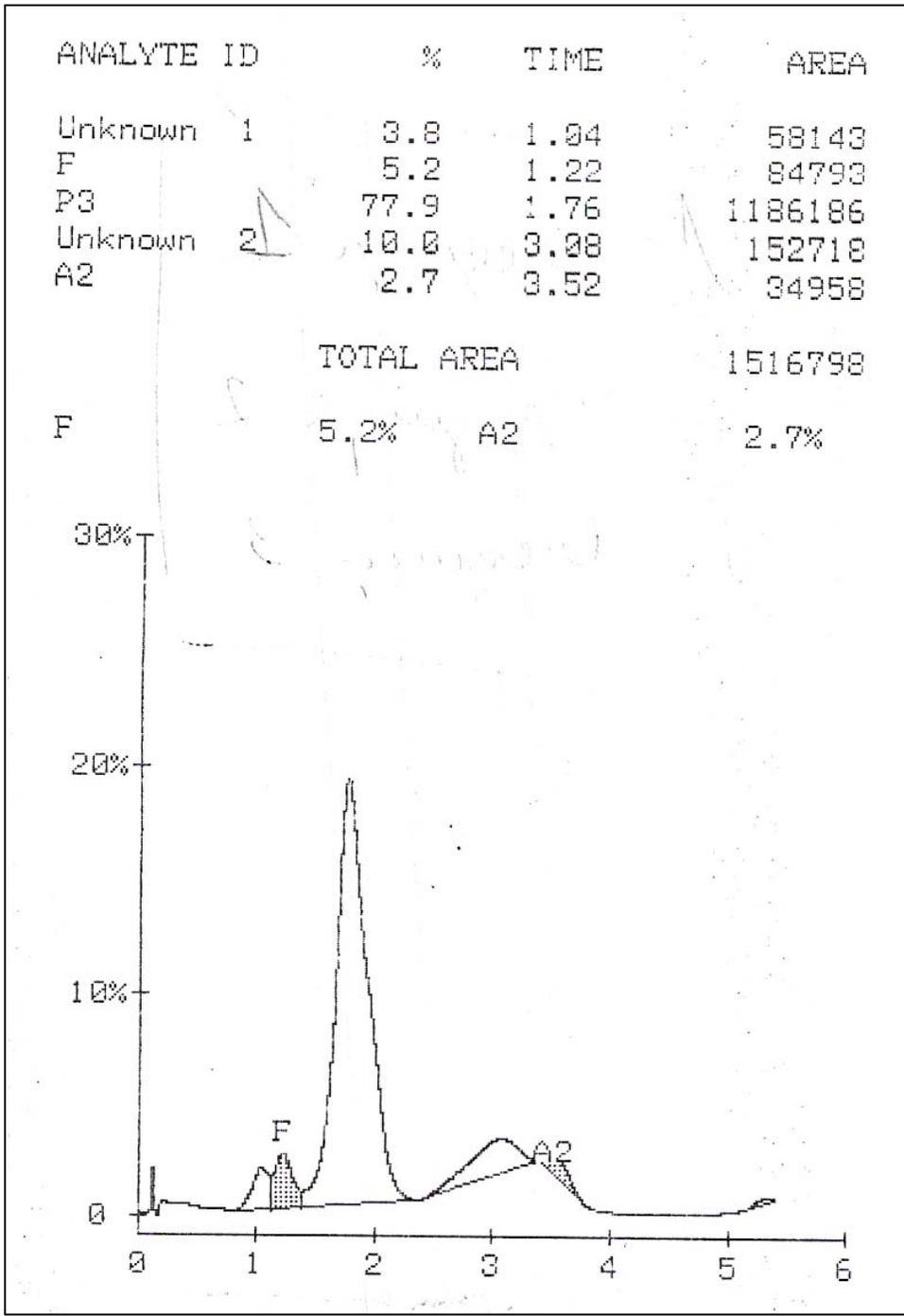


FIGURA. 16 – Cromatograma – HPLC da Preguiça 06

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
Unknown 1	5.0	1.03	76336
F	5.4	1.19	85658
P3	74.4	1.72	1130656
Ao	12.8	2.94	194657
A2	2.3	3.44	28914

TOTAL AREA 1516221

F 5.4% A2 2.3%

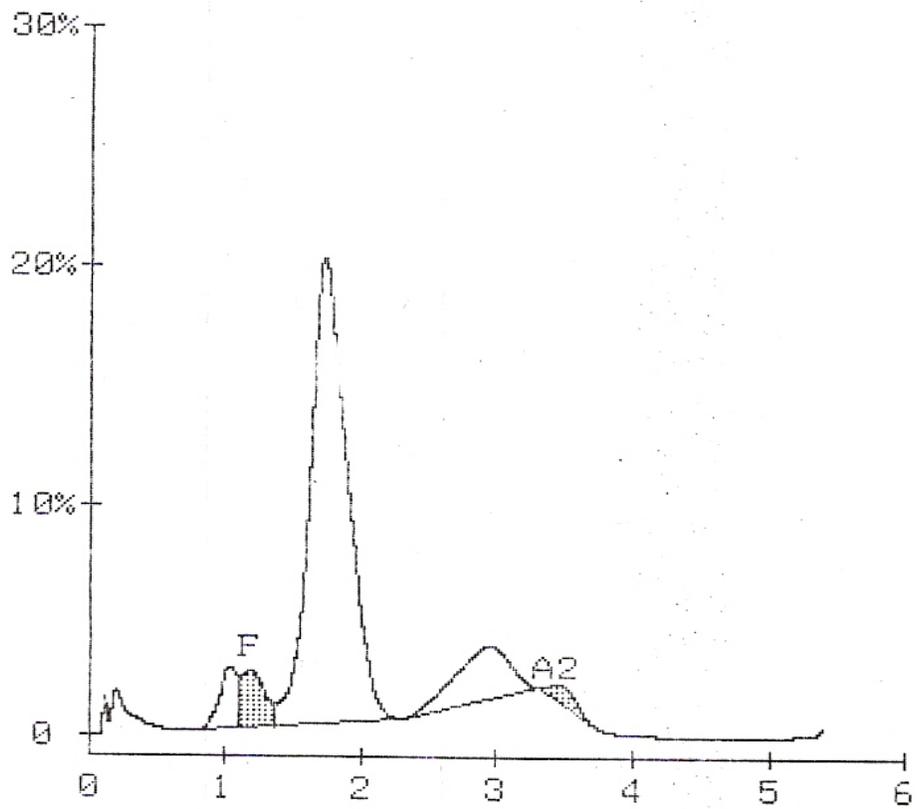


FIGURA. 17 – Cromatograma – HPLC da Preguiça 07

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
Unknown 1	3.8	1.04	62790
F	5.3	1.22	93919
P3	78.6	1.77	1295939
Unknown 2	10.1	3.12	167189
A2	1.9	3.52	26048

TOTAL AREA 1645685

F 5.3% A2 1.9%

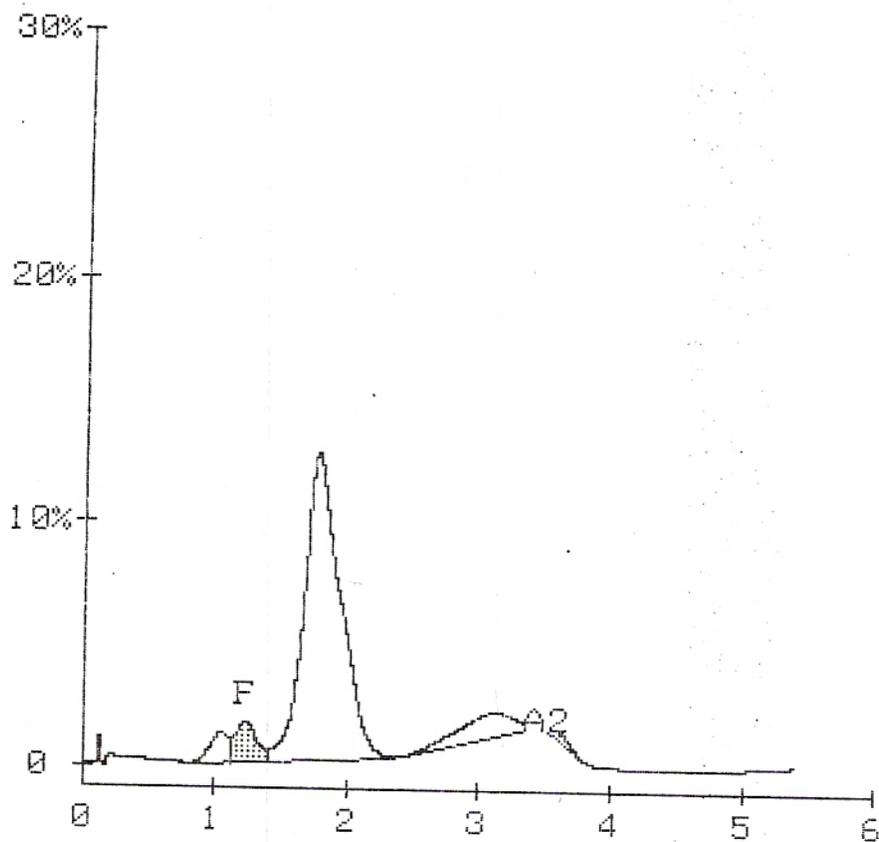


FIGURA. 18 – Cromatograma – HPLC da Preguiça 08

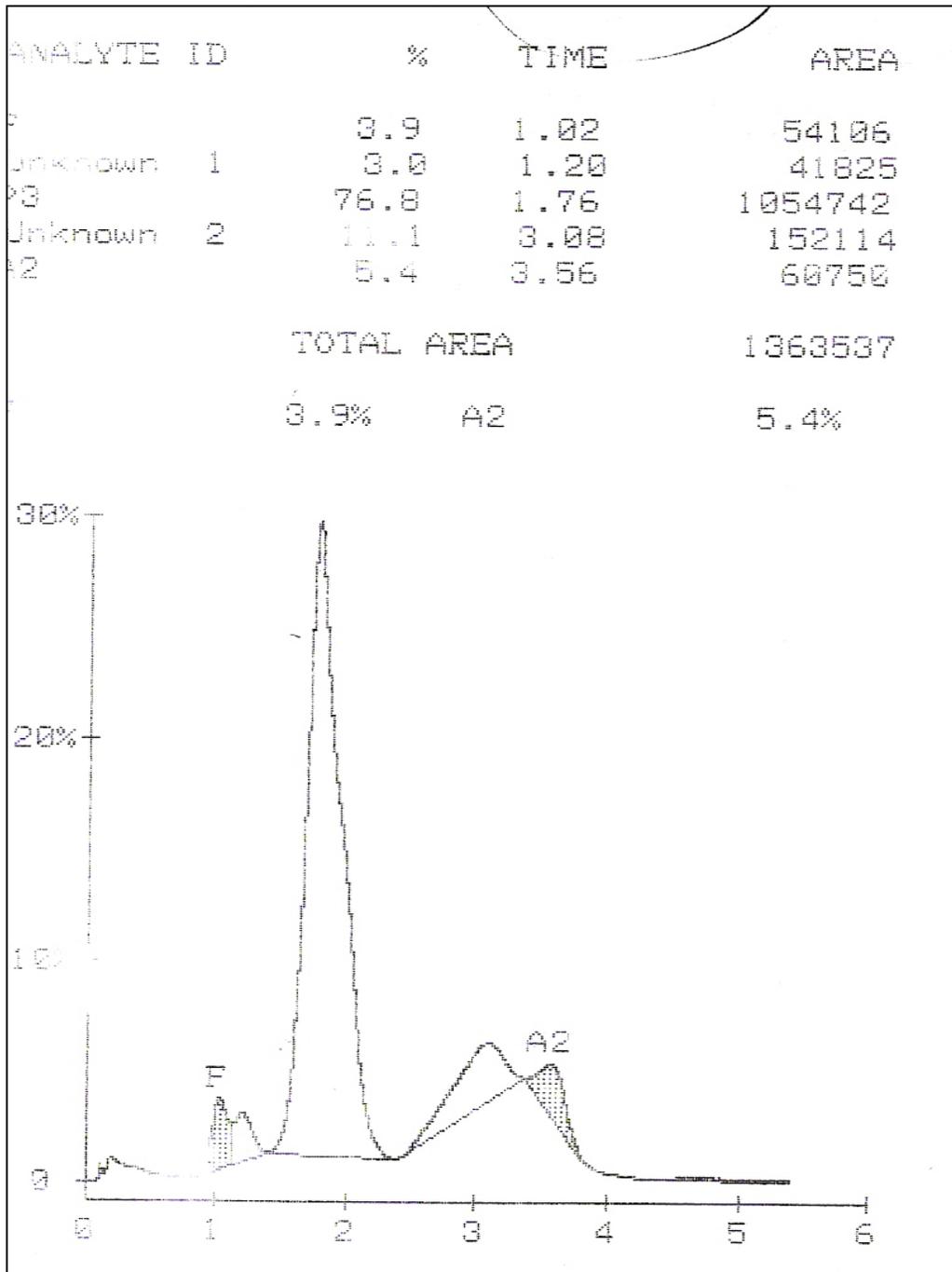


FIGURA. 19 – Cromatograma – HPLC da Preguiça 9

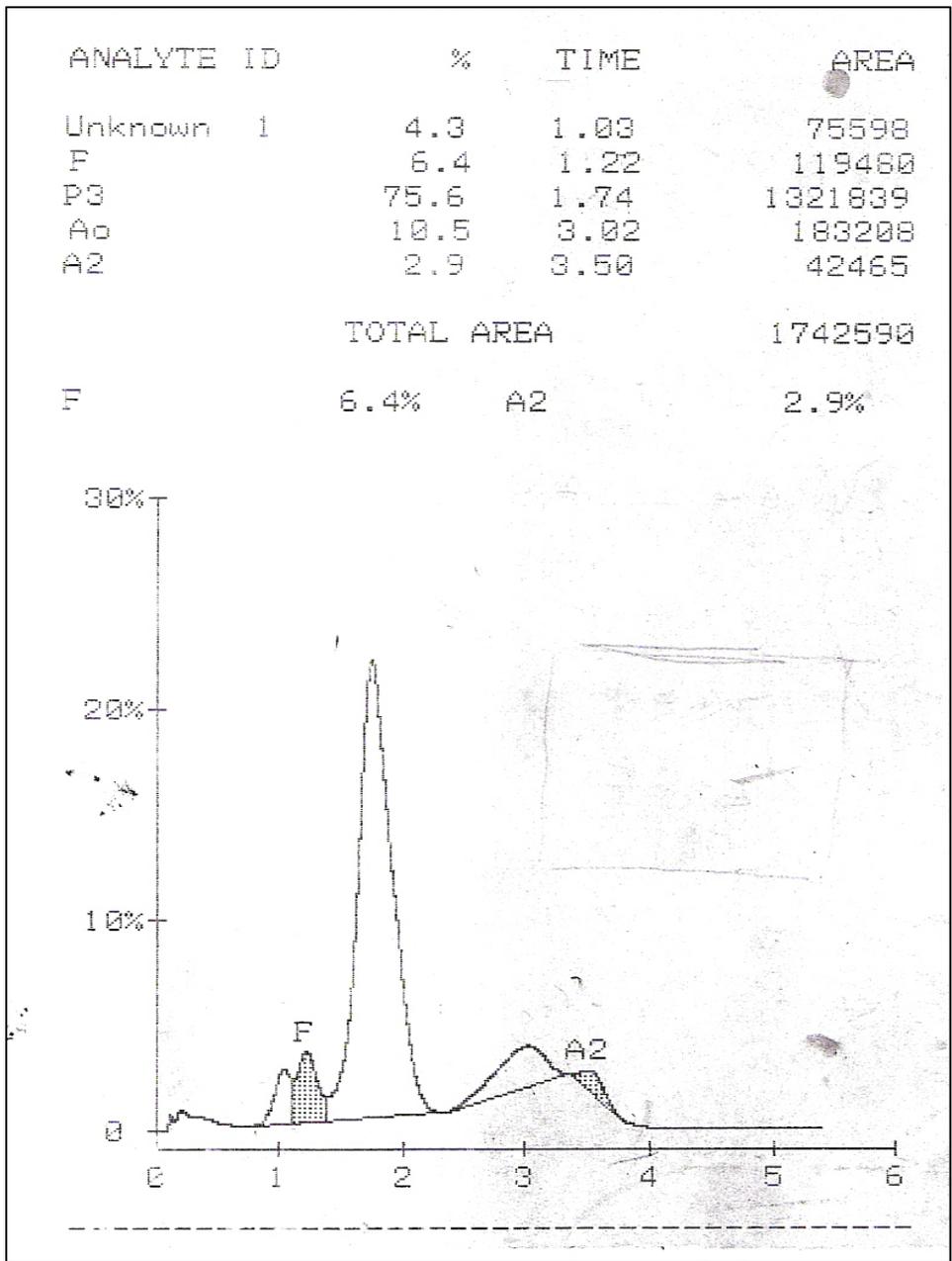


FIGURA. 20 – Cromatograma – HPLC da Preguiça 10