



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Maria Isabel Afonso da Silva

**Alterações hematológicas e bioquímicas em uma população
de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em resposta a
estressores ambientais**

São José do Rio Preto - SP
2011

Maria Isabel Afonso da Silva

**Alterações hematológicas e bioquímicas em uma população
de *Phrynos geoffroanus* (Schweigger, 1812) em resposta a
estressores ambientais**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de Genética Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto – SP

2011

Silva, Maria Isabel Afonso da.

Adaptação e capacidade antioxidante em uma população de *Phrynos geoffroanus* em resposta a agressões ambientais / Maria Isabel Afonso da Silva. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

125 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hematologia veterinária. 2. Toxicologia – Aspectos ambientais. 3. Antioxidantes. 4. Quelônio - Adaptação. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 598.13

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE

Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Maria Isabel Afonso da Silva

**Alterações hematológicas e bioquímicas em uma população de
Phrynos geoffroanus (Schweigger, 1812) em resposta a estressores
ambientais**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética, área de Genética Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos
Professora Doutora
UNESP - São José do Rio Preto/SP
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Lilian Castiglioni
Professora Doutora
Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) -
São José do Rio Preto

Prof. Dr. Fabiano Gazzi Taddei
Professor Doutor
Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) -
São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 24 de fevereiro de 2011

**Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Estudos de Quelônios (CEQ) -
Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do
Departamento de Biologia e no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação
Ambiental, do Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com
auxílio financeiro do CNPq e CAPES.**

*Ao meu pai, **Pedro Messias da Silva** (in memoriam), exemplo de retidão de caráter, humildade e generosidade. Foi difícil vê-lo partir, mas saiba que em meu coração e memória permanecerá imortal, despertando sempre os melhores sentimentos e lembranças. Sua vida foi uma longa sucessão de ensinamentos e fonte de sabedoria para todos aqueles que tiveram a sorte de conhecê-lo.*

*À minha mãe, **Iracema Afonso da Silva**, pelos ensinamentos de vida, pelo apoio e amor incondicional, que me encorajam a lutar por meus objetivos e sonhos.*

O trabalho e empenho de vocês para me proporcionarem uma boa educação, me ensinaram o valor do conhecimento e representam meu maior incentivo nos estudos. Jamais terei palavras suficientes para expressar a minha gratidão e meu amor por vocês, por isso digo apenas: muito obrigada por tudo. À vocês, meus grandes amores, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida, por iluminar todos os meus passos e me dar forças para superar os desafios de cada dia. Obrigada, por permitir minha convivência com tantas pessoas maravilhosas, às quais posso, nesse momento, agradecer.

À minha querida família, sempre presente nos momentos mais importantes da minha vida. Aos meus pais, **Pedro Messias da Silva** (in memorian) e **Iracema Afonso da Silva**, pela formação e ensinamentos de vida, cuidado, apoio, amor e dedicação a mim dispensados. Aos meus irmãos, **Daniel Afonso da Silva**, **Rafael Afonso da Silva** e **Raquel Afonso da Silva**, pelo carinho, apoio, paciência e incentivo. Tenho muito orgulho de todos vocês!

Ao meu namorado, **Tiago Lucena da Silva**, pela paciência, companheirismo, amor e compreensão. Agradeço pela sua presença constante em minha vida, nos bons e nos maus momentos, sempre me apoiando e incentivando. Agradeço também aos seus pais, **Sandra Regina da Silva** e **Edson Lucena da Silva**, por me receberem de braços abertos em sua casa e me acolherem em sua família.

Aos meus cunhados, **Ana Paula**, **Bruna**, **Lucas**, **Yasmim** e **Kalel**, pelo carinho, atenção, amizade e pelos momentos de alegria, diversão e descontração.

Aos meus **amigos de Araxá**, que estão presentes em minha vida desde a infância, em especial à **Alessandra**, **Tânia**, **Rosa**, **Laura**, **Cibele**, **Gisele**, **Marcela**, **Marina**, **Bárbara**, **Bruna**, **Sônia** e minhas afilhadas, **Aline** e **Karine**, pela amizade de vários anos, carinho e pelos momentos de descontração e diversão. Àqueles que apareceram posteriormente em minha vida, mas em momentos muito importantes e se tornaram pessoas tão especiais e queridas: ao **Rudknely**, **Loren**, **Cíntia**, **Edsony**, **Priscila**, **Nilton**, **Pacheco** e **Graziele**. Obrigada pela amizade, apoio, carinho e pelos momentos de conversa, desabafo e descontração.

Aos meus **amigos da graduação e do PET**, pelo companheirismo, convivência, amizade, incentivo e pelas inúmeras conversas e momentos de descontração. Aos **amigos do coral IBILCE**, pela amizade e momentos de divertimento.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), àqueles que passaram e aos de convívio frequente:

Larissa, Tiago, Belini, Juliana, Carol, Danilo, Gisele, Paula, Eliana, Isabeth, Vinicius, Ítalo, Júlia, Lidiane, Haruo, Willian, Isabela, Rafael, Marina, Tayrone, Carlos, João Vitor, Josué, Aline, Flávia, Nelson, Luciana e Fabrício pelos bons momentos de discussão, aprendizagem, amizade e diversão. Obrigada, em especial, ao pessoal do Centro de Estudos de Quelônios (CEQ), que ajudaram diretamente na execução deste trabalho, desde a coleta das amostras até a discussão dos resultados, sempre com paciência, apoio e dedicação.

*Ao **Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida**, grande colaborador deste trabalho, por ceder seu laboratório para a realização dos ensaios bioquímicos, pelo auxílio na padronização e realização das análises enzimáticas, pelo conhecimento e valiosas informações fornecidas. Agradeço também a todos os seus alunos, pelo auxílio, atenção e companhia durante as análises.*

*Ao **Prof. Dr. Luiz Dino Vizotto**, pela participação, colaboração e incentivo nos trabalhos do CEQ, e pela amizade e exemplo profissional.*

*À família Bonini-Domingos, **Luiz Henrique, Claudia, Ana Luiza, Ana Carolina, D. Nadir e Lucas**, pela confiança, amizade e momentos de alegria compartilhados.*

*À **Profa. Dra. Maria Tercília V. Azeredo Oliveira** e à **Profa. Dra. Débora A. P. C. Zuccari** pela valiosa contribuição durante o exame geral de qualificação.*

*À **Profa. Dra. Lilian Castiglioni** e **Prof. Dr. Fabiano Gazzi Taddei** pela atenção, colaboração e se disponibilizarem a avaliar este trabalho.*

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos**, pela confiança, ensinamentos, paciência, apoio, amizade. Além da valiosa contribuição para a minha formação científica e profissional, agradeço também por participar da minha formação pessoal.*

Agradeço também a todos os demais professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Genética. À direção do Instituto e aos funcionários do Departamento de Biologia, Biblioteca e Seção de Pós-Graduação, que possibilitaram, direta ou indiretamente, a realização deste trabalho.

*Ao **CNPq** pela minha bolsa de estudos.*

"O caminho mais agradável e pacífico na vida é o que segue pelas avenidas da ciência e da instrução, e todo aquele que for capaz de remover algum obstáculo nesse caminho, ou descortinar novas perspectivas, deve, nessa medida, ser considerado um benfeitor da humanidade. E embora essas pesquisas possam parecer penosas e fatigantes, ocorre com algumas mentes o mesmo que com alguns corpos, os quais, tendo sido dotados de uma saúde vigorosa e exuberante, requerem severo exercício e colhem prazer daquilo que parece árduo e laborioso à humanidade em geral. A escuridão, de fato, é tão dolorosa para a mente como para a vista, mas obter luz da escuridão por mais esforço que acarrete, será sem dúvida motivo de júbilo e deleite (...), o raciocínio justo e exato é o único remédio universal".

(David Hume, 1748. "Uma investigação sobre o entendimento Humano")

RESUMO

Os quelônios estão entre os grupos de vertebrados com maior risco de extinção, sendo as principais ameaças para as populações, a degradação e poluição ambiental. A espécie *Phrynops geoffroanus*, popularmente conhecida como “Cágado-de-Barbelas”, tem se proliferado em ambiente poluído, sujeita a condições adversas que podem influenciar nos seus hábitos de vida e condições fisiológicas. Estudos que monitorem os efeitos da contaminação ambiental são fundamentais para o conhecimento da biologia da espécie e delineamento de estratégias de conservação efetivas. Deste modo, as análises dos parâmetros hematológicos e bioquímicos mostram-se importantes na avaliação da saúde de animais silvestres e riscos para o animal e ecossistema. O objetivo do trabalho foi verificar a influência do ambiente na fisiologia de uma população de *Phrynops geoffroanus* por meio da avaliação da capacidade antioxidante e respostas aos estressores ambientais, em comparação com espécimes de local sob condições controladas. Foram avaliadas, por meio do hemograma completo, dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), ensaio da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC) e atividades das enzimas antioxidantes catalase e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), amostras sanguíneas de sessenta espécimes, sendo trinta provenientes do córrego Felicidade, ambiente poluído, no perímetro urbano de São José do Rio Preto-SP; e trinta do criatório “Reginaldo Uvo Leone”, Tabapuã-SP, local sob condições controladas, cujas amostras constituem o grupo controle dos experimentos. Houve grande variação nos parâmetros hematológicos de *Phrynops geoffroanus* de ambiente urbano. Os valores de glóbulos vermelhos e hemoglobina foram significativamente menores que os observados em animais do criatório ($p = 0,0004$; $p = 0,0371$, respectivamente). Houve aumento significativo de trombócitos ($p < 0,0001$) e leucócitos ($p < 0,0001$) para os espécimes do córrego Felicidade. Os valores do índice de estresse foram similares entre os dois grupos ($p = 0,4077$). A dosagem de TBARS mostrou o potencial citotóxico dos compostos presentes no ambiente urbano, cujos animais apresentaram elevados níveis de peroxidação lipídica ($p < 0,0001$), apesar de demonstrarem uma resposta aos danos ambientais com aumento da capacidade antioxidante, verificada pelo ensaio TEAC ($p = 0,0207$). A redução na atividade da enzima catalase observada nos indivíduos do ambiente ($p = 0,000184$) pode ser devido à presença de compostos inibitórios; por outro lado, a atividade da enzima G6PDH foi elevada ($p = 0,002962$), atuando na geração de NADPH, que é utilizada em várias vias de detoxificação de compostos químicos. Assim, concluímos que a contaminação ambiental pode aumentar os danos oxidativos e gerar alterações fisiológicas na espécie em estudo. Esses dados são de grande utilidade para a conservação da espécie e dos quelônios em geral e, confirmam o uso dessas técnicas no monitoramento das regiões naturais e a adequação de *Phrynops geoffroanus* como um bioindicador de contaminação ambiental.

Palavras chave: Hematologia, ecotoxicologia, peroxidação lipídica, defesas antioxidantes, *Phrynops geoffroanus*.

ABSTRACT

The turtles are among the most endangered vertebrates groups, and the main threats to populations are the environmental pollution and degradation. The species *Phrynops geoffroanus*, popularly known as "Geoffroy's side-necked turtle", has proliferated in polluted environments, subject to adverse conditions that could influence their living habits and physiological conditions. Studies that monitor the effects of environmental pollution are the key to understand the species biology and design effective conservation strategies. Thus, the analysis of hematological and biochemical parameters showed to be important in assessing the health of wild animals and for the animal and ecosystem risks. This work aimed to assess the environmental influence on the physiology of a *Phrynops geoffroanus* population through the evaluation of antioxidant status and responses to environmental stressors, compared to specimens from a place under controlled conditions. They were evaluated by hemogram, measuring thiobarbituric acid reactive species assay (TBARS), Trolox-equivalent antioxidant capacity evaluation (TEAC) and the activities of antioxidant enzymes, catalase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), blood samples of sixty specimens, thirty from the Felicidade stream, polluted environment, within the São José do Rio Preto city, and thirty from the "Reginaldo Uvo Leone" breeding farm, Tabapuã-SP, place under controlled conditions, whose samples constitute the control group of the experiments. There was a wide variation in hematological parameters of *Phrynops geoffroanus* from the urban environment. The red blood cells and hemoglobin values were significantly less than those observed in animals from breeding farm ($p = 0.0004$; $p = 0.0371$, respectively). There was significant increase of thrombocytes ($p < 0.0001$) and leukocytes ($p < 0.0001$) to the animals from the Felicidade stream. The stress index values were similar between the two groups ($p = 0.4077$). The TBARS levels showed the cytotoxic potential of compounds in the urban environment, whose animals had elevated levels of lipid peroxidation ($p < 0.0001$), despite showing a response to environmental damages with increase of antioxidant capacity, verified by TEAC assay ($p = 0.0207$). The reduction of the catalase enzyme activity noticed in individuals from the environment ($p = 0.000184$) could be by presence of inhibitory compounds; on the other hand, the activity of the G6PDH enzyme was higher ($p = 0.002962$), acting in the NADPH generation, which is used in several pathways of chemical compounds detoxification. We concluded that environmental contamination can increase oxidative damages and generate physiological changes in this species. These data are very useful for the conservation of species and of turtles in general, and confirm the use of these techniques for monitoring of natural regions and the adequation of *Phrynops geoffroanus* as an environmental contamination bioindicator.

Key words: Hematology, ecotoxicology, lipid peroxidation, antioxidant defenses, *Phrynops geoffroanus*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. **A** – Visão geral de um espécime de *Phrynops geoffroanus*. **B** – Visão dos animais em decúbito dorsal, considerando as diferenças entre machos e fêmeas. **C** – Detalhe do dimorfismo sexual feminino. **D** – Detalhe do dimorfismo sexual masculino. ♀ - Fêmea. ♂ - Macho. Fotos obtidas em câmera digital por Zago (2007).....21

FIGURA 2. Esquema simplificado de sistemas oxidantes e antioxidantes dentro de uma célula. Ânion superóxido é produzido em quantidades significativas no citosol por monooxigenases, Fe^{2+} ou Cu^+ , e na mitocôndria pelo escape de elétrons provenientes da cadeia respiratória. Duas moléculas de superóxido reagem espontaneamente ou via SODs, produzindo peróxido de hidrogênio, o que permitirá o fluxo de EROs entre compartimentos celulares. O peróxido de hidrogênio pode ser metabolizado à água e oxigênio molecular por diversos sistemas enzimáticos, ou convertido a radical hidroxil, o qual é muito reativo, por meio de reações catalisadas por metais. Adaptado de Nordberg e Arner (2001).....27

FIGURA 3. Representação esquemática da cidade de São José do Rio Preto e sua posição no Estado de São Paulo. A população de *Phrynops geoffroanus* em estudo se localiza no percurso do córrego Felicidade, destacado no mapa da cidade, com um dos pontos de coleta indicado à direita (seta) (Mapa da cidade adaptado de Whitacker, 2007).....34

FIGURA 4. Imagens dos dois locais de coleta. À esquerda: criatório “Reginaldo Uvo Leone” e à direita: córrego Felicidade. O círculo destaca um ponto de despejo de efluentes (Fonte: ZAGO, 2007).....41

FIGURA 5. **A)** Exemplar de *Phrynops geoffroanus* em decúbito dorsal para a assepsia. **B)** Procedimento de punção cardíaca para coleta de sangue, com o orifício entre as placas umerais e peitorais.....42

FIGURA 6. Concentração de TBARS em ng/mL em amostras de animais de ambiente urbano e criatório. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) - Teste *Mann Whitney*.....55

FIGURA 7. Valores de TEAC em mmol/L em amostras de animais de ambiente urbano e criatório. Diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0207$) - Teste *Mann Whitney*.....56

FIGURA 8. Atividade da catalase em U/mg de proteína em amostras de animais de ambiente urbano e criatório. Diferença estatisticamente significativa ($p = 0,000184$) - Teste *Mann Whitney*.....57

FIGURA 9. Atividade da G6PDH em mU/mg de proteína em amostras de animais de ambiente urbano e criatório. Diferença estatisticamente significativa ($p = 0,002962$) - Teste *Mann Whitney*.....59

FIGURA 10. Correlações lineares positivas estabelecidas pelas análises em animais de ambiente urbano. **A)** Correlação positiva de 78% entre a contagem absoluta de eritrócitos

(GV) e o hematócrito (Ht) ($r = 0,7778$; $p < 0,00001$), e de 72 % entre a contagem absoluta de eritrócitos e a concentração de hemoglobina (Hb) ($r = 0,7156$; $p = 0,00001$). **B)** Correlação positiva de 45% entre os níveis de TBARS e atividade da catalase (CAT) ($r = 0,4464$; $p = 0,0134$).....61

FIGURA 11. Correlação linear negativa de aproximadamente 38% entre a atividade enzimática da G6PDH e a concentração de hemoglobina (Hb) dos animais do córrego Felicidade ($r = - 0,3761$; $p = 0,0405$).....62

FIGURA 12. Correlações lineares positivas do índice de estresse (IE) com os níveis de TBARS (47%) e os valores de heterófilo (HØ) (58%). O IE apresenta correlações negativas com: a contagem absoluta de glóbulos brancos (GB) (46%), valores de basófilos (BØ) (52%), eosinófilos (EØ) (42%), azurófilos (AØ) (50%), neutrófilos (NØ) (35%), linfócitos (LØ) (84%) e monócitos (MØ) (70%).....62

FIGURA 13. Correlações lineares positivas estabelecidas pelas avaliações em animais controle. **A)** Correlação positiva de 97% entre a contagem absoluta de eritrócitos (GV) e o hematócrito (Ht) ($r = 0,9733$; $p < 0,00001$), e de 89% entre a contagem absoluta de eritrócitos e a concentração de hemoglobina (Hb) ($r = 0,8875$; $p < 0,00001$). **B)** Correlação positiva de 46% entre o índice de estresse (IE) e a contagem total de glóbulos brancos (GB) ($r = 0,4647$; $p = 0,0097$).....64

FIGURA 14. Correlação linear negativa de 43% entre os valores de TEAC e a atividade enzimática da catalase (CAT) dos animais do criatório ($r = - 0,4316$; $p = 0,0173$).....65

FIGURA 15. Imagem microscópica da câmara de Neubauer, onde é realizada a contagem de eritrócitos e leucócitos. Os quatro quadrantes representados pela letra L são utilizados para a contagem total de leucócitos; e no quadrante central, os cinco quadrados em destaque são utilizados para a contagem de glóbulos vermelhos.....110

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores hematológicos das amostras de <i>Phrynos geoffroanus</i> de ambiente urbano e criatório: médias, desvios-padrão (DP), medianas, mínimos, máximos e comparação estatística dos valores obtidos de acordo com o local de coleta (total avaliado: 60 espécimes).....	50
TABELA 2. Valores hematimétricos de referência para <i>Phrynos geoffroanus</i> da região noroeste do estado de São Paulo; amplitude de variação estabelecida para cada parâmetro das séries vermelha e branca.....	51
TABELA 3. Índice de Estresse em <i>Phrynos geoffroanus</i> em função do local de coleta e sexo. Média, desvio padrão (DP), amplitude de variação (entre parênteses), mediana e comparação estatística dos valores por local de coleta e por sexo em cada local.....	53
TABELA 4. Concentração de TBARS em ng/mL em amostras de indivíduos de ambiente urbano e criatório: média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo dos valores de cada grupo (total avaliado: 60 espécimes).....	100
TABELA 5. Valores de TEAC em mmol/L nas amostras de indivíduos de ambiente urbano e criatório: média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo dos valores obtidos de acordo com o local de coleta (total avaliado: 60 espécimes).....	101
TABELA 6. Atividade da catalase, em U/mg da proteína, das amostras de indivíduos de ambiente urbano e criatório: média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo dos valores das amostras de cada local de coleta (total avaliado: 60 espécimes).....	102
TABELA 7. Atividade da G6PDH, em mU/mg da proteína, das amostras de indivíduos de ambiente urbano e criatório: média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo dos valores de cada grupo (total avaliado: 60 espécimes).....	103
TABELA 8. Correlação entre o índice de estresse e as seguintes variáveis: concentração de TBARS, contagem total de leucócitos e de cada tipo de glóbulo branco. Tipo de correlação (positiva/negativa e intensidade) e valores de r e p entre cada associação.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A Média	Média da absorbância da amostra
AØ	Azurófilo
ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
ABTS^{•+}	Radical cátion 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
BØ	Basófilo
BSA	Albumina Bovina
C1	Concentração inicial
C2	Concentração final
CAT	Catalase
CCC_{máx}	Comprimento curvilíneo máximo da carapaça
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
cm	Centímetros
Cu	Cobre
Cu⁺	Íon cobre
DP	Desvio-padrão
EØ	Eosinófilo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F	Fator de correção
Fe²⁺	Ferro
Fe³⁺	Ferro oxidado
fL	Femtolitros
g/dL	Gramas por decilitro
G6P	Glicose 6-fosfato
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase

GB	Glóbulos brancos
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GST	Glutathione S-transferase
GV	Glóbulos vermelhos
H	Número de eritrócitos/ μL .
HØ	Heterófilo
H⁺	Íons hidrogênio
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
[Hb]	Dosagem de Hemoglobina circulante
HCl	Ácido clorídrico
HGM	Hemoglobina Globular Média
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Ht	Valor do hematócrito
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IE	Índice de Estresse
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilogramas
KH₂PO₄	Fosfato de Potássio Monobásico
K₂S₂O₈	Persulfato de potássio
L	Litro
LØ	Linfócito
M	Molar ou mol/Litro
MØ	Monócito
m²	Metros quadrados

MDA	Malondialdeído
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mmol/L	Milimol por litro
Mn	Manganês
mU/mg	Mili unidades por miligrama
NØ	Neutrófilo
NaCl	Cloreto de sódio
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaH₂PO₄	Fosfato de Sódio Monobásico
Na₂HPO₄	Fosfato de Sódio Dibásico
Na₂SO₄	Sulfato de sódio
ng/mL	Nano grama por mililitro
nM	Nano molar
nm	Nanômetros (comprimento de onda)
nº	Número
O₂	Oxigênio molecular
¹O₂	Oxigênio singlete
O₂^{·-}	Radical ânion superóxido
OH⁻	Íon hidroxila
·OH	Radical hidroxil
p	Nível de significância
PBS	Solução salina isotônica
PCBs	Bifenilas policloradas
pg	Picogramas
pH	Potencial hidrogeniônico

Prx	Peroxiredoxina
q.s.p.	Quantidade suficiente para
r	Coeficiente de correlação
RO[•]	Radical alcóxido
ROO[•]	Radical peróxido
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TØ	Trombócito
T0	Absorbância inicial da solução
T5	Absorbância 5 minutos após acréscimo do Trolox
TAA	Atividade Antioxidante Total
TAAc	Atividade Antioxidante Total de cada amostra
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox
Tris.HCl	Tampão Tris-ácido clorídrico
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico
U/mg	Unidades por miligrama
V1	Volume inicial
V2	Volume final
VGM	Volume Globular Médio
Zn	Zinco
°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
%	Porcentagem
♀	Fêmea
♂	Macho

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Características gerais da espécie.....	19
1.2. Hematologia de quelônios.....	21
1.3. As influências antrópicas sobre as espécies de répteis... ..	25
1.4. Estresse Oxidativo.....	26
1.5. Sistemas de Defesa Antioxidante.....	30
1.6. Bioindicadores e Biomarcadores de Contaminação Ambiental.....	32
1.7. O ambiente em que vivem.....	33
2. OBJETIVOS	38
2.1. Objetivos Gerais.....	38
2.2. Objetivos Específicos.....	38
3. MATERIAL E MÉTODO.....	40
3.1. Amostras.....	40
3.2. Hemograma.....	42
3.2.1. Índice de Estresse (Razão Heterófilo/Linfócito)	44
3.3. Dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	44
3.4. Dosagem da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC).....	45
3.5. Atividade enzimática de biomarcadores de contaminação ambiental.....	46
3.5.1. Catalase	46
3.5.2. G6PDH.....	46
3.6. Análise Estatística.....	47
4. RESULTADOS	49
4.1. Hemograma.....	49
4.1.1. Índice de Estresse (Razão Heterófilo/Linfócito)	53
4.2. Dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	54
4.3. Dosagem da capacidade antioxidante em equivalência ao trolox (TEAC).....	55
4.4. Atividade enzimática de biomarcadores de contaminação ambiental.....	57
4.4.1. Catalase:.....	57
4.4.2. G6PDH:	58
4.5. Análise de Correlação entre as variáveis hematológicas e bioquímicas.....	60
5. DISCUSSÃO	67
5.1. Análise de Hemograma.....	67
5.1.1. Índice de Estresse	70
5.2. Verificação de estresse oxidativo e ação indireta de radicais livres.....	72
5.3. Verificação da capacidade antioxidante.....	74
5.4. Atividades enzimáticas da CAT e da G6PDH.....	76
5.5. Análise de Correlação.....	79
5.6. Considerações finais.....	82
6. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICES	100
ANEXOS	105

Introdução



1. INTRODUÇÃO

1.1. Características gerais da espécie

A Classe Reptilia foi a primeira cujos animais se adaptaram completamente para habitarem o ambiente terrestre, porém, tem sofrido significativa redução no número de espécies no decorrer da sua história evolutiva sendo que, das 16 ordens existentes no passado, apenas quatro possuem representantes na atualidade. Essas quatro ordens se definem atualmente em: Testudines (jabutis, cágados e tartarugas), Crocodilia (jacarés, aligátors, crocodilos e gaviais), Squamata (serpentes, lagartos e anfisbenas) e Rhynchocephalia (com duas espécies de tuataras), totalizando mais de 8.700 espécies (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; STORER et al., 2000; GOULART, 2004; RIDLEY, 2006; SHAFTER, 2009).

Atualmente, o Brasil ocupa a segunda colocação na relação de países com maior riqueza de espécies de répteis, possui aproximadamente 721 espécies naturalmente ocorrentes e se reproduzindo, sendo cerca de seis espécies de jacarés, 67 anfisbenas, 241 lagartos, 371 serpentes e 36 quelônios. Porém, ainda há poucas informações a respeito desses animais (BÉRNILS, 2010).

A ordem Testudines apresenta aproximadamente 328 espécies conhecidas no mundo atualmente (TURTLE TAXONOMIC WORKING GROUP, 2010). Possui características evolucionárias peculiares, resultantes de milhões de anos de evolução e adaptações, conforme as dificuldades impostas pela natureza; porém, há poucos estudos sobre seus exemplares, principalmente quanto ao perfil hematológico e bioquímico (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; STORER et al., 2000). Aproximadamente 20% das espécies de quelônios do mundo ocorrem na América do Sul, com representantes de oito famílias. Dessas, a família Chelidae é a mais diversificada, contando com 23 espécies, das quais 20 ocorrem no Brasil (SOUZA, 2004; BÉRNILS, 2010).

A espécie *Phrynops geoffroanus*, popularmente conhecida como “Cágado-de-Barbelas”, pertence à ordem Testudines, subordem Pleurodira, família Chelidae. Foi descrita pela primeira vez por Schweigger em 1812, e apresenta ampla distribuição em áreas tropicais e temperadas da América do Sul. No Brasil, *Phrynops geoffroanus* está distribuída em quase todo território, nas bacias do rio Paraná, Amazonas e São Francisco. O animal pode ser influenciado pelas alterações ambientais, principalmente pelas condições da água em que habita, cujos compostos estão em contato direto com suas superfícies corpóreas, podendo alterar sua fisiologia (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989; GOULART, 2004; SOUZA, 2004).

Possui carapaça achatada e larga, que oferece pequena resistência ao deslocamento na água, com coloração uniforme, marrom ou cinza esverdeada, e plastrão com entalhe anal e coloração vermelho/rosada com manchas pretas irregulares. A cabeça é grande e achatada e os olhos são grandes e desenvolvidos, localizados dorso-lateralmente e recobertos por pálpebras. As características proeminentes dessa espécie são uma linha preta e larga que se estende longitudinalmente pelo olho, e um par de barbelas na mandíbula com a extremidade preta. Os membros, acinzentados, têm patas palmadas com garras e membranas interdigitais, para facilitar a locomoção, cópula e procura por alimentos (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; ERNEST; BARBOUR, 1989; GOULART, 2004). São animais de porte pequeno, com machos medindo cerca de 21 cm e as fêmeas 35 cm. Além da diferença em tamanho, o macho possui pequena concavidade no plastrão e cauda mais longa e robusta, com abertura cloacal na porção médio-distal; já a fêmea possui cauda menor e abertura cloacal que não ultrapassa o rebordo da carapaça (Figura 1) (PRITCHARD; TREBBAU, 1984).

A espécie *Phrynops geoffroanus* tem hábitos diurnos, é onívora, mas entre os principais recursos alimentares destacam-se muitos itens de origem animal, incluindo pequenos peixes, moluscos, minhocas, insetos e matéria orgânica de origem animal em decomposição. Porém, em locais degradados pela presença

humana, se alimentam de esgoto doméstico. Muito provavelmente esses animais são oportunistas, aproveitando-se da disponibilidade local de alimento (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; SOUZA, 2004).

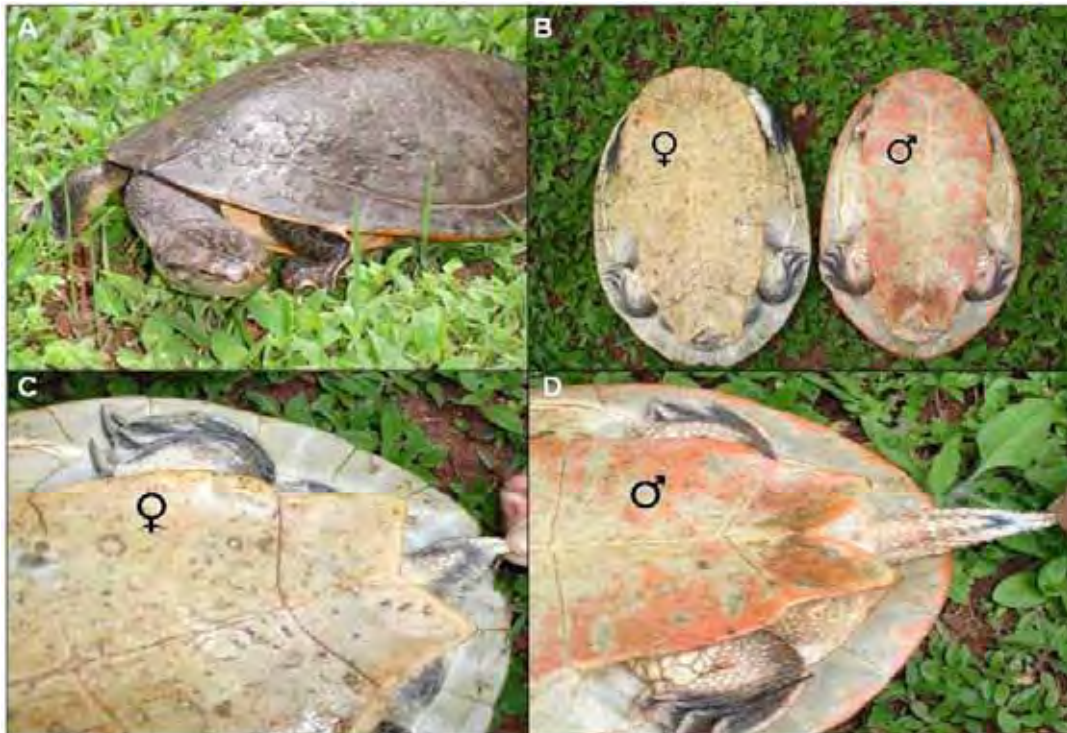


Figura 1. A – Visão geral de um espécime de *Phrynops geoffroanus*. B – Visão dos animais em decúbito dorsal, considerando as diferenças entre machos e fêmeas. C – Detalhe do dimorfismo sexual feminino. D – Detalhe do dimorfismo sexual masculino. ♀ - Fêmea. ♂ - Macho. Fotos obtidas em câmera digital por Zago (2007).

1.2. Hematologia de quelônios

A determinação do estado de saúde de animais silvestres é baseada no exame físico, e em valores hematológicos e bioquímicos. Os exames laboratoriais são métodos úteis para diagnosticar e prevenir doenças, e também indicar a qualidade ambiental, uma vez que a saúde do meio ambiente influencia na biologia e ecologia dos organismos que nele vivem (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007; FALCE, 2009). Assim, os estudos que combinam dados laboratoriais e inferências fisiológicas têm

fundamental importância para obtenção de parâmetros sobre a biologia da espécie e, sua utilização como ferramenta diagnóstica para manejo adequado e preservação. Estes estudos são ainda mais importantes em répteis, cuja manutenção e regulação da temperatura corpórea e atividades metabólicas estão relacionadas à variação ambiental (GOULART, 2004; MACHADO et al., 2006).

O sistema sanguíneo tem importância no transporte de gases, nutrientes e resíduos metabólicos; e também na proteção contra agentes invasores, refletindo várias características fisiológicas do animal (TROIANO; SILVA, 1998). O hemograma pode ser usado para detectar condições como anemia, doenças inflamatórias, parasitemias, distúrbios hematopoiéticos e alterações hemostáticas. A hematologia também é importante para avaliar a resposta dos animais a doenças e tratamentos (CAMPBELL, 2004; FALCE, 2009).

Os quelônios possuem eritrócitos e leucócitos nucleados, além dos elementos envolvidos no processo de coagulação, que são células nucleadas chamadas trombócitos (ALMOSNY; MONTEIRO, 2007; FALCE, 2009). A produção das células vermelhas está dividida entre o baço e a medula óssea, tendo o fígado como sítio hematopoiético secundário (STACY; WHITAKER, 2000; GOULART, 2004). Os eritrócitos são células normalmente grandes e numerosas, com formato ovóide ou elíptico. São consideradas carreadoras de oxigênio, devido ao citoplasma rico em hemoglobinas, e possuem um ou, raramente, dois núcleos irregulares com cromatina nuclear espessa e densamente granular. Por serem nucleadas, essas células podem realizar mitoses no sangue circulante e têm vida útil mais longa que os eritrócitos de mamíferos (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; GOULART, 2004; MIYAMOTO; VIDAL; MELLO, 2005; PITOL et al., 2008; ZAGO et al., 2010).

Os trombócitos são células elípticas, menores que os eritrócitos, com citoplasma escasso e finamente granular e núcleo basofílico de formato elíptico, com padrão de cromatina denso. São originados a partir de tromboblastos e desempenham múltiplas funções importantes nos répteis, atuando na inflamação,

promovendo a fagocitose, e com ação no processo de coagulação e de agregação (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; GOULART, 2004; MIYAMOTO; VIDAL; MELLO, 2005; PITOL et al., 2008; FALCE, 2009; ZAGO et al., 2010).

As células brancas, responsáveis pelos mecanismos de defesa, apresentam classificação controversa em répteis, pois critérios variados são utilizados para categorizar células ou linhagens celulares (PITOL et al., 2008). Os glóbulos brancos presentes no sangue periférico de quelônios são classificados em: monócitos, linfócitos, neutrófilos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e azurófilos. É importante ressaltar a baixa quantidade de neutrófilos e o aumento dos eosinófilos e basófilos circulantes, quando comparadas aos outros animais, além da presença de heterófilos e azurófilos, encontrados apenas em répteis e aves (GOULART, 2004; FALCE, 2009; ZAGO et al., 2010).

Os monócitos são células grandes, com o núcleo denteado ou curvado e cromatina condensada, requisitados no combate a doenças infecciosas de origem bacterianas e infecções crônicas. Sua contagem total varia de 3% até 20% do total de leucócitos de quelônios. Os linfócitos são células menores que os monócitos, com núcleo grande, arredondado e citoplasma ligeiramente basofílico. Estão presentes na resposta imune mediante quadro de infecção viral, podendo variar entre 15% e 40% do total de leucócitos, dependendo das condições ambientais e, principalmente, climáticas (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; CANFIELD, 1998; GOULART, 2004; ZAGO et al., 2010).

Os neutrófilos não possuem o núcleo segmentado como nos mamíferos, e o citoplasma apresenta cadeias fibrilares e granulações. Respondem às infecções bacterianas e sua contagem pode variar entre as espécies de 0,5% a 10% do total de leucócitos. Os heterófilos são acidófilos com granulações citoplasmáticas na forma de grânulos alongados ou bastões e núcleo periférico, lobado ou bilobado. Estão presentes no combate a infecções bacterianas, com função semelhante aos neutrófilos, sendo considerado por muitos autores como o neutrófilo de répteis, porém, são claramente diferenciados por microscopia de luz e eletrônica, e

representam 20% a 40% da contagem geral dos leucócitos (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; CANFIELD, 1998; GOULART, 2004; PITOL et al., 2008; ZAGO et al., 2010).

Os eosinófilos são acidófilos de formato esférico, com um núcleo periférico simples ou lobulado, e citoplasma preenchido com grânulos ovais. Essas células representam de 7% a 20% da contagem total de leucócitos e são encontradas em proporções elevadas nas infecções parasitárias (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; CANFIELD, 1998; PITOL et al., 2008; ZAGO et al., 2010). O relato da presença da enzima fosfatase ácida no citoplasma de eosinófilos sugere que estes são ricos em lisossomos e vacúolos secretores, fato relacionado à sua mobilização como célula de defesa (SILVA; AZEREDO-OLIVEIRA; BONINI-DOMINGOS, 2011).

Os basófilos apresentam conformação esférica, com núcleo segmentado e grânulos esféricos no citoplasma. A presença da enzima peroxidase nos basófilos de *Phrynosops geoffroanus*, que representam de 10% a 25% do total de leucócitos de quelônios e possuem grande número de granulações citoplasmáticas, sugere a existência de grande quantidade de enzimas e organelas como lisossomos e peroxissomos, possivelmente associadas a sua participação em reações imunes (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; CANFIELD, 1998; PITOL et al., 2008; SILVA; AZEREDO-OLIVEIRA; BONINI-DOMINGOS, 2010; ZAGO et al., 2010).

Outras células encontradas nos répteis são os azurófilos, que possuem formato irregular, núcleo e citoplasma basofílicos e representam 2% a 5% da contagem total de leucócitos (CANFIELD, 1998; ZAGO et al., 2010). Este tipo leucocitário pode apresentar alterações no tamanho celular, devido à variação na quantidade de vesículas e granulações citoplasmáticas (SILVA, W. et al., 2009). A definição acerca da natureza do azurófilo e sua função é ainda imprecisa, mas há relatos da sua participação em respostas inflamatórias e no combate a infecções, sendo as doenças granulomatosas crônicas consideradas a principal causa de azurofilia em répteis (ROSSKOPF, 2000; SILVA, W. et al., 2009).

1.3. As influências antrópicas sobre as espécies de répteis

Quelônios são animais de vida longa; no entanto, apresentam baixa taxa de reposição de indivíduos na população, pois possuem lentas taxas de crescimento e longos períodos para alcançarem a maturidade sexual. Espécies com estas características e história de vida são mais suscetíveis às pressões antrópicas e risco de extinção (POUGH; JANIS; HEISER, 2005). Aproximadamente 47,6% das espécies de quelônios estão nas mais altas categorias de risco (extintas, extintas na natureza, criticamente ameaçadas ou vulneráveis), e muitas outras espécies que ainda não foram avaliadas também podem estar sob séria ameaça. Dentre todos os grupos de vertebrados, os quelônios são os mais ameaçados de extinção e apresentam um *status* preocupante de conservação, o que coloca o grupo no topo da “Lista Vermelha” da *International Union for the Conservation of Nature* (IUCN) (TURTLE TAXONOMIC WORKING GROUP, 2010).

Os padrões de atividade dos quelônios, em geral, estão intimamente associados às condições climáticas. Variações sazonais afetam a morfologia e função do sistema imune de vertebrados ectotérmicos, especialmente dos répteis. Temperatura, fotoperíodo, estressores ambientais, fatores químicos e comportamentais modificam a reatividade imune e a fisiologia, afetando os parâmetros hematológicos. Além disso, fatores nutricionais e habitação modificam a imunoreatividade reptiliana (SOUZA, 2004; PITOL et al., 2008).

Espécies de répteis apresentam declínio populacional numa escala global, sendo as principais ameaças para as populações, a degradação e poluição ambiental, introdução de espécies exóticas, doenças, uso insustentável do ambiente e mudanças climáticas. Mudanças nas condições térmicas próximas aos ninhos podem resultar em desvios da razão sexual, o que constitui uma ameaça por si só (RODRIGUES, 2005; GENOY-PUERTO, 2008; POLETTA et al., 2008).

Um dos mais graves problemas da ocupação humana, tanto a nível mundial como no Brasil, é a falta de sistemas eficientes de tratamento de esgoto

(GALINDO; MOREIRA, 2009). Por conta da expansão das fronteiras agrícolas durante os últimos anos, muitas áreas de distribuição geográfica das espécies se sobrepõem com as regiões de agricultura intensiva e estas populações são prejudicadas pela perda, destruição e poluição do habitat, em favor da produção. A contaminação química do meio ambiente, incluindo os efeitos de longo prazo e exposição crônica dos organismos, têm resultado no declínio ou desaparecimento de muitas populações. O uso excessivo de fertilizantes, pesticidas e outros agroquímicos permanece como prática comum, especialmente em regiões tropicais, podendo afetar significativamente várias espécies de répteis, principalmente as aquáticas. Resíduos de pesticidas podem persistir em solos, e atingir os corpos de água, sendo transportados pela chuva (RODRIGUES, 2005; GARBELLINI; ULIANA, 2007; KAUR; SANDHU, 2008; POLETTA et al., 2008).

1.4. Estresse Oxidativo

Os radicais livres são átomos ou moléculas que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, resultando no não-emparelhamento dos mesmos, o que confere a eles alta reatividade. Porém, algumas moléculas reativas não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, não podendo ser designadas como radicais livres. Deste modo, usa-se o termo espécies reativas por ser mais geral e abranger ambos os casos. Dentre às inúmeras espécies reativas, as derivadas do oxigênio se destacam em processos biológicos, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2), os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil ($\cdot OH$), alcóxido ($RO^{\cdot-}$) e peróxido ($ROO^{\cdot-}$), dentre outros (PERCARIO et al., 2004; NETO et al., 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas e degradadas por organismos aeróbios, e são encontradas em concentrações fisiológicas dentro das células, para um funcionamento normal (NORDBERG; ARNER, 2001). O estado oxidativo é determinado pelo equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes,

atuando em várias funções celulares, como a transdução de sinais. Já o estresse oxidativo é gerado quando a taxa de produção das EROs excede a taxa de decomposição das mesmas pelos sistemas antioxidantes, o que provoca danos a diferentes componentes celulares (ALMEIDA et al., 2005; VOITURON et al., 2006; VALDIVIA et al., 2007; ANTUNES et al., 2008; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). A Figura 2 ilustra algumas vias de formação de EROs, assim como a atuação de enzimas antioxidantes.

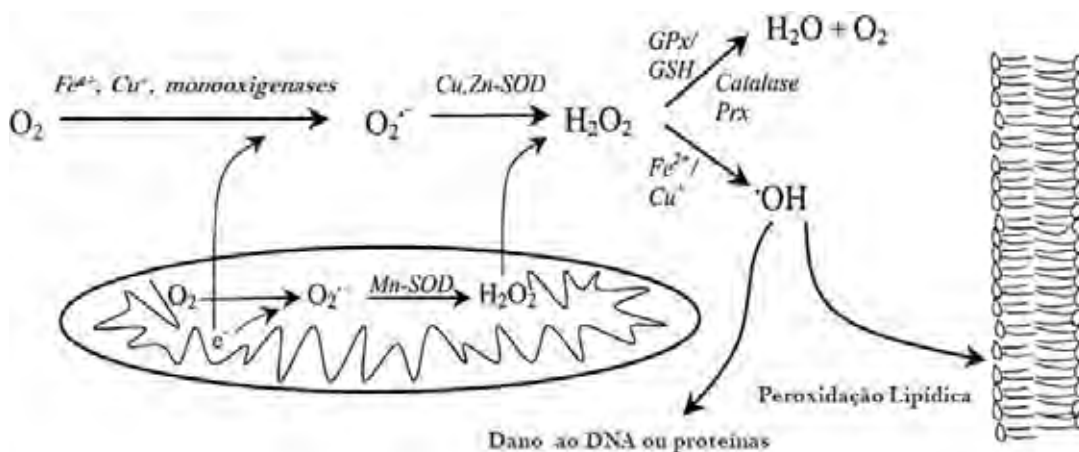
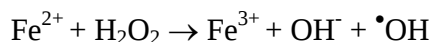
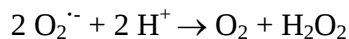


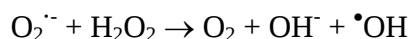
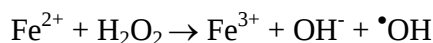
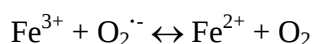
Figura 2. Esquema simplificado de sistemas oxidantes e antioxidantes dentro de uma célula. Ânion superóxido é produzido em quantidades significativas no citosol por monooxigenases, Fe^{2+} ou Cu^+ , e na mitocôndria pelo escape de elétrons provenientes da cadeia respiratória. Duas moléculas de superóxido reagem espontaneamente ou via SODs, produzindo peróxido de hidrogênio, o que permitirá o fluxo de EROs entre compartimentos celulares. O peróxido de hidrogênio pode ser metabolizado à água e oxigênio molecular por diversos sistemas enzimáticos, ou convertido a radical hidroxil, o qual é muito reativo, por meio de reações catalisadas por metais. Adaptado de Nordberg e Arner (2001).

As EROs podem reagir rapidamente com a maioria das biomoléculas, iniciando uma cadeia de formação de radicais livres. As três principais formas de EROs, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são encontradas em todos os sistemas biológicos. O ferro é um importante catalisador de reações de oxidação de biomoléculas, como observado nas reações de Fenton e de Haber-Weiss, nas quais são formados diferentes tipos de EROs, conforme descrito abaixo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNER, 2001; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



Devido a sua alta reatividade, as EROs são potencialmente citotóxicas e podem reagir com lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, originando lesões oxidativas que modificam sua estrutura e/ou função e podem ocasionar a morte celular ou dano ao órgão (PERCARIO et al., 2004; NETO et al., 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Estresse oxidativo pode ocorrer em animais aquáticos sob uma série de condições ambientais adversas. O estudo de diferentes sistemas, relatados para monitorar estresse oxidativo nesses organismos, pode fornecer informações importantes sobre seu estado fisiológico e também sobre a saúde ambiental, pois tanto os níveis de danos oxidativos quanto os sistemas de defesa antioxidantes são fortemente afetados pelos diferentes estressores ambientais (ALMEIDA et al., 2007). Indicadores de estresse oxidativo tais como a peroxidação lipídica e as atividades das principais enzimas antioxidantes, têm sido utilizados com sucesso como biomarcadores de exposição a contaminantes em uma variedade de espécies (VALDIVIA et al., 2007).

Ácidos graxos poli-insaturados são particularmente suscetíveis ao ataques por EROs frente ao estresse oxidativo. A oxidação desses ácidos graxos poli-insaturados, ou peroxidação lipídica, é uma importante consequência do estresse

oxidativo e tem sido considerada como uma das maiores causadoras da perda da função celular, pois acarreta alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, que podem resultar no seu rompimento (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ANTUNES et al., 2008).

O estudo da peroxidação lipídica indica, indiretamente, a ação de espécies reativas, sendo uma das formas mais utilizadas para a avaliação do estresse oxidativo. O processo inicia-se com a retirada de um átomo de hidrogênio destes ácidos graxos por uma espécie reativa. Forma-se um radical lipídico, que por sua vez pode reagir com o oxigênio molecular, formando um radical peroxil. Este pode subtrair um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo adjacente, estabelecendo assim uma cadeia de reações autocatalíticas que leva à oxidação das membranas em hidroperóxidos lipídicos. Estes, posteriormente, podem ser metabolizados enzimaticamente, produzindo uma série de produtos de menor peso molecular como cetonas e aldeídos, cujo principal é o malondialdeído (MDA), passíveis de serem quantificados como marcadores de danos oxidativos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; PERCARIO et al., 2004; VALDIVIA et al., 2007; ANTUNES et al., 2008).

Um método de identificação amplamente utilizado consiste na reação dos metabólitos da peroxidação lipídica com o ácido tiobarbitúrico (TBA), quantificando a soma das diferentes substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, denominadas TBARS, por meio da leitura espectrofotométrica (ANTUNES et al., 2008). Constitui também um útil biomarcador de danos oxidativos do DNA, pois indica a formação de adutos de DNA a partir da liberação de produtos aldeídicos durante a quebra de peróxidos lipídicos. A maioria dos aldeídos resultantes da peroxidação lipídica reage com bases do DNA, aumentando os adutos (VOITURON et al., 2006).

Existem poucos estudos de estresse oxidativo em quelônios, principalmente nos de habitats dulcícolas, que enfrentam estressores naturais e antropogênicos durante toda a sua vida. Além de serem suscetíveis a grandes

variações na disponibilidade de oxigênio para os tecidos, os efeitos prejudiciais incluem comprometimento da fisiologia, estresse crônico, função imunitária diminuída e aumento da suscetibilidade à doença (VOITURON et al., 2006; VALDIVIA et al., 2007).

1.5. Sistemas de Defesa Antioxidante

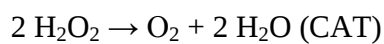
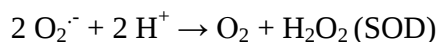
Para neutralizar o efeito oxidativo das EROs, todos os organismos aeróbicos desenvolveram defesas bioquímicas, como os sistemas enzimáticos antioxidantes envolvidos na detoxificação celular (VOITURON et al., 2006). Organismos com altos níveis de antioxidantes, constitutivos ou induzidos, por impedir, neutralizar ou reparar danos das EROs-induzidas, são reportados como mais tolerantes a danos oxidativos (DIONÍSIO-SESE; TOBITA, 1998; SREENIVASULU et al., 1999; BAKER et al., 2007; VALDIVIA et al., 2007).

Dentro da vasta gama de métodos utilizados para rastrear estas defesas bioquímicas, o ensaio da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC) permite avaliar o *status* antioxidante em fluidos biológicos, tais como o plasma, por verificar a capacidade antioxidante de misturas. Como estes sistemas bioquímicos são complexos e diversificados em sua constituição, com o número de compostos relatados sempre aumentando, este ensaio torna-se útil para examinar a soma das defesas antioxidantes (VAN DEN BERG et al, 1999; ARTS et al., 2003; BAKER et al., 2007).

Sistemas de defesa antioxidante enzimáticos e não-enzimáticos protegem as células contra os danos causados pelas EROs, produzidas por vias endógenas e/ou metabolismo de detoxificação de contaminantes, nas vias de biotransformação dos compostos químicos. Esses sistemas podem prevenir sua formação, inativar as reações oxidativas ou reparar o dano causado. A atividade dos sistemas antioxidantes pode ser aumentada ou inibida sob estresse químico. Estes dois tipos de resposta dependem da intensidade e tempo de exposição ao

contaminante, e da suscetibilidade da espécie exposta. Assim, antioxidantes constituem úteis marcadores, refletindo a exposição a poluentes e a toxicidade (COSSU et al., 2000; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase e peroxidase (GST e GPx), alguns dos mais importantes e bem estudados antioxidantes, eliminam os produtos primários de oxigênio parcialmente reduzido (BAKER et al., 2007; LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009). A SOD é uma metaloenzima que age como primeira linha de defesa, catalisando a transformação de $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 e oxigênio; CAT, então, detoxifica H_2O_2 (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), como demonstrado nas reações abaixo.



O balanço entre atividades de SOD e CAT em células é crucial para a determinação do nível do estado de equilíbrio de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Este balanço, juntamente com o sequestro de íons metálicos, é importante para prevenir a formação do radical hidroxil. A CAT é uma heme-enzima, composta por uma fração protéica e um grupo prostético heme, que contém um átomo de ferro. Sua atividade, dependente de NADPH, é indispensável para detoxificação e remoção de EROs durante o estresse (MITTLER, 2002; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009). A CAT é encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. Está presente em organelas subcelulares, principalmente em peroxissomos, justificando a proliferação peroxissomal em casos de poluição por compostos químicos artificiais - xenobióticos, sendo H_2O_2 a molécula sinal para esta proliferação (DEL RIO et al, 2002; LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009).

Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) pertence a uma via metabólica intermediária, específica, relacionada à defesa ao estresse. É a enzima chave da via pentose fosfato e responsável pela produção de NADPH, um importante cofator na biossíntese de lipídios e fornecedor de elétrons para regeneração do ciclo de vários antioxidantes. O estresse oxidativo aumentado é bem documentado na deficiência de G6PDH em eritrócitos, pois a diminuição no fornecimento de NADPH pode resultar na redução e/ou retardo da atividade de sistemas de biotransformação de xenobióticos dependentes de NADPH, tais como o citocromo P450 e a glutatona, e uma menor capacidade de sistemas de defesa não-enzimáticos (GÜL et al, 2004; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008).

1.6. Bioindicadores e Biomarcadores de Contaminação Ambiental

Bioindicadores são espécies utilizadas para avaliar a qualidade ambiental, por verificar os efeitos biológicos causados pela exposição aos poluentes, estabelecendo, assim, a conexão entre efeitos ecológicos e saúde do organismo (COLBORN, 1994; VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2009). As análises químicas de amostras ambientais não distinguem facilmente todos os contaminantes, nem a ação destes no organismo. Neste contexto, espécies sentinelas são úteis ferramentas de diagnóstico para manejo ambiental integrado, pois fornecem informações importantes a respeito das interações dos contaminantes com os sistemas biológicos (JHA et al., 2000).

Organismos com ciclo de vida longo, ampla distribuição e com populações persistentes na área de estudo são bons bioindicadores para avaliar os efeitos de contaminantes (VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2009). Os quelônios apresentam destaque no contexto ecotoxicológico mundial, com potencial para serem utilizados em programas de monitoramento de contaminação química e radioativa nos ecossistemas aquáticos; uma vez que são animais de vida longa, com ampla distribuição geográfica, encontrados em grande variedade de habitats, além de

estarem posicionados intermediariamente na cadeia trófica e serem facilmente capturados. A utilização de quelônios de vida livre combina informações sobre os efeitos da poluição a longo e curto prazo nas áreas onde estes animais estão presentes naturalmente (VIARENGO et al., 2007; PIÑA et al., 2009; TSANGARIS et al., 2010). Desta forma, a espécie *Phrynops geoffroanus* apresenta potencial para bioindicadora de contaminação ambiental.

A ecotoxicologia tem se preocupado cada vez mais com o uso de biomarcadores para avaliar o risco biológico de químicos tóxicos e a saúde ambiental. Um biomarcador é definido como uma variação induzida por xenobióticos em componentes e processos celulares ou bioquímicos, que são mensuráveis em amostras biológicas. Tais variações podem indicar a magnitude da resposta do organismo aos contaminantes, bem como a relação entre a presença de um poluente e um efeito ecológico. A abordagem por biomarcadores pode ser utilizada para avaliar a sensibilidade intrínseca da espécie, indicando a sua vulnerabilidade à contaminação ambiental (FOSSI, 1994; LAM; GRAY, 2003).

A biodisponibilidade química, bioacumulação de contaminantes e as respostas dos biomarcadores podem ser influenciadas por fatores como período de exposição, condições ambientais, concentrações de compostos químicos potencialmente tóxicos e interações entre essas substâncias químicas. Deste modo, o uso de espécimes capturados a partir de uma única população garante que estes estejam submetidos a condições equivalentes, o que permite uma avaliação mais precisa dos efeitos biológicos reais dos contaminantes (VIARENGO et al., 2007; BANNI et al., 2009; PIÑA et al., 2009; TSANGARIS et al., 2010).

1.7. O ambiente em que vivem

Phrynops geoffroanus podem ser encontrados em rios poluídos que atravessam o perímetro urbano e recebem esgotos domésticos e industriais, como observado durante o percurso do Rio Preto, em São José do Rio Preto-SP (Figura 3).

A cidade (20°49'12"S; 49°22'44"O; elevação 489 metros) possui clima tropical de altitude, que indica inverno seco e ameno, e a média de temperatura anual é de 23,6°C. Durante o ano, a temperatura mínima média é de 17°C, a máxima média é 30,4°C e a pluviosidade média anual é 1259,1mm (CEPAGRI, 2010).

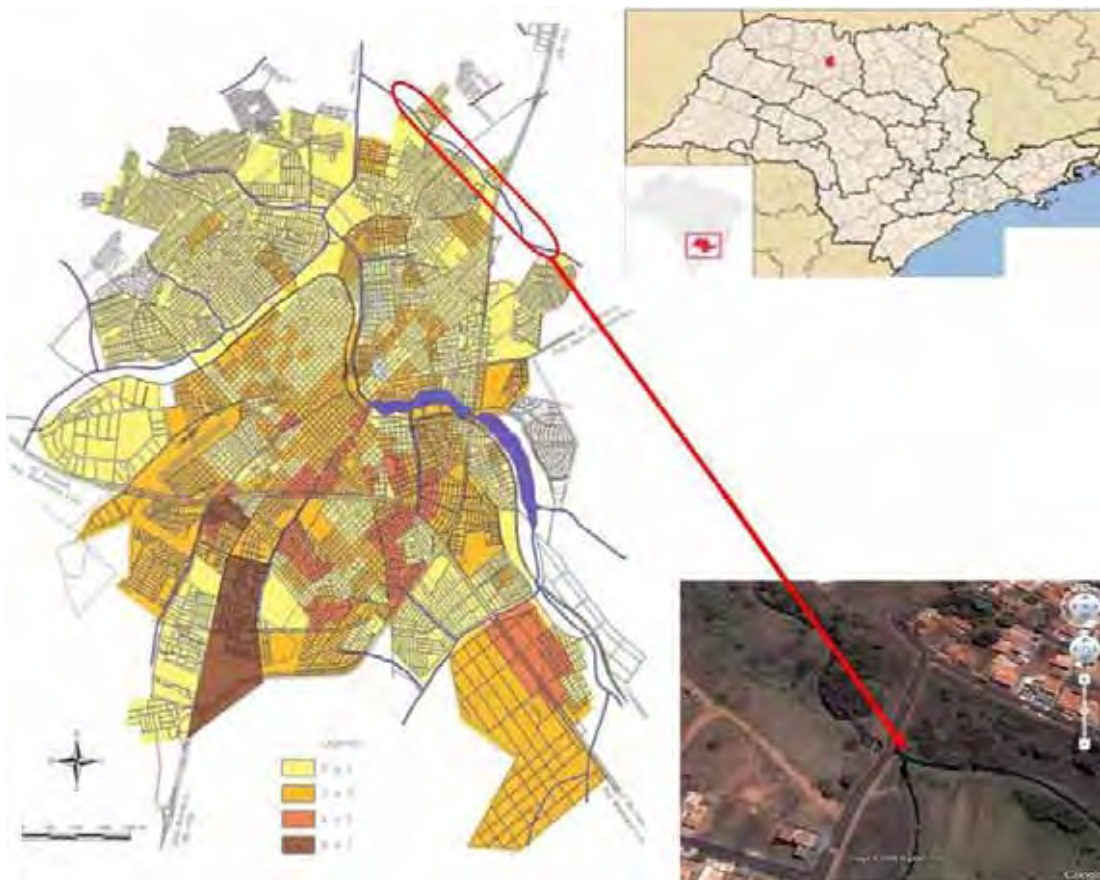


Figura 3. Representação esquemática da cidade de São José do Rio Preto e sua posição no Estado de São Paulo. A população de *Phrynops geoffroanus* em estudo se localiza no percurso do córrego Felicidade, destacado no mapa da cidade, com um dos pontos de coleta indicado à direita (seta) (Mapa da cidade adaptado de Whitacker, 2007).

A cidade é rodeada por rios e córregos, que pertencem à Bacia Turvo-Grande, que atualmente, após estudo da Secretaria do Estado do Meio Ambiente, é considerada a bacia hidrográfica mais poluída do Estado de São Paulo (MARQUES; BERTI, 2009). O Rio Preto recebe água de diversos córregos como o

Canela, Borá, Piedade e, antes de terminar sua travessia pelo município, encontra-se com o córrego Felicidade, local de coleta de exemplares da população em estudo. Nesses ambientes, os animais sobrevivem alimentando-se da matéria orgânica proveniente de efluentes urbanos e outras fontes. Estão expostos a pressões ecológicas, devido às atividades multissetoriais intensas que ameaçam a sua conservação, como por exemplo, o uso de agroquímicos nas monoculturas da região, tipo de contaminação difusa e de difícil avaliação, que juntamente com o despejo de efluentes domésticos e industriais, comprometem a qualidade dos corpos de água (SILVA, M., 2009).

Em artigo publicado no jornal Diário da Região (27 de setembro de 2009), relata-se o descarte irregular e sem critério de lixo orgânico, garrafas pet, pneus, produtos eletrônicos e plásticos em nove importantes córregos da região, e inclui o córrego Felicidade entre os três considerados em pior situação. A poluição indiscriminada prejudica a fauna e a flora e, atrapalha o curso natural da água. O lixo acumulado nos córregos desencadeia uma série de impactos ao meio ambiente, entre as quais está o acúmulo de matéria orgânica que, quando atinge a água, limita o oxigênio destinado aos organismos, colocando em risco todo o ecossistema aquático (MARQUES; BERTI, 2009).

A exposição a xenobióticos leva a interações entre estes agentes e os sistemas biológicos, originando alterações bioquímicas nas defesas antioxidantes e aumento das espécies reativas, com consequente geração de estresse oxidativo. Os estudos em relação a diversas condições ambientais contribuirão para o conhecimento dos hábitos de vida, adaptações ao ambiente e influência deste sobre a fisiologia dos quelônios, possibilitando uma futura comparação com outras espécies para maior compreensão dos aspectos evolutivos, permitindo então, sua preservação.

Há poucos relatos na literatura sobre a utilização desta espécie de quelônio endêmica da América do Sul, em estudos ecotoxicológicos, sendo este o primeiro trabalho com a espécie que se propôs a analisar a capacidade antioxidante, resposta de alguns antioxidantes e índices de danos oxidativos como biomarcadores

de contaminação ambiental. Esses estudos contribuirão para a avaliação da saúde e riscos do animal e do ecossistema, permitindo verificar efeitos de curto prazo e toxicidade aguda. A abordagem de parâmetros antioxidantes representa biomarcadores de interesse, considerando a complexidade dos agentes poluentes nos ecossistemas aquáticos, pois aplicados à espécie, considera a biodisponibilidade e os efeitos combinados dos contaminantes. Também permite a detecção precoce de alterações biológicas que podem resultar em distúrbios fisiológicos. Portanto, é válido estudar biomarcadores que predizem toxicidade e sistemas de detoxificação que garantam proteção celular contra agressões endógenas e exógenas, cujo comprometimento da função leva à lesão celular.

Objetivos



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Verificar a influência do ambiente na fisiologia de uma população de *Phrynops geoffroanus* por meio da avaliação da capacidade antioxidante e respostas aos estressores ambientais, em comparação com espécimes de local sob condições controladas.

2.2. Objetivos Específicos

- Pelo hemograma de espécimes de *Phrynops geoffroanus* (machos e fêmeas) de ambiente urbano e de criatório, verificar possíveis variações em relação aos valores do grupo controle, por influência do ambiente;
- Avaliar a peroxidação lipídica das membranas celulares pela dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Avaliar a capacidade antioxidante por meio do ensaio TEAC;
- Investigar as respostas das enzimas antioxidantes catalase e G6PDH no processo de detoxificação, em relação à poluição do meio ambiente aquático.

Material e Método



3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Amostras

Para a execução do projeto foram analisadas amostras sanguíneas de 60 espécimes de *Phrynops geoffroanus*, adultos, sendo 30 (9 machos e 21 fêmeas) provenientes do córrego Felicidade, afluente do Rio Preto, na área urbana de São José do Rio Preto-SP; e 30 (12 machos e 18 fêmeas) do criatório “Reginaldo Uvo Leone”, Tabapuã-SP, utilizados como controle. O estudo obteve autorização do IBAMA/ICMBio (registro 2838725/nº 16488-1 e nº16488-2), e aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (Protocolo FAMERP nº 5517/2008), comprovados nos Anexos A, B e C.

Para todos os espécimes coletados foram tomadas duas medidas: a massa corporal em gramas, utilizando balança com escala (10g-10Kg); e a medida do tamanho do animal, utilizando como parâmetro o comprimento curvilíneo máximo da carapaça ($CCC_{m\acute{a}x}$), que recobre toda a curvatura da carapaça, do ponto anterior médio do escudo nuchal até a extremidade posterior dos escudos supracaudais (WYNEKEN, 2001), com auxílio de uma trena flexível (0,1mm). As médias da massa corporal foram de 2093 ± 1009 g (variando de 750 a 4500 g) para os animais do córrego, e de 2013 ± 748 g (variando de 750 a 4400 g) para os animais de criatório. As médias dos $CCC_{m\acute{a}x}$ foram 284 ± 45 mm (variação: 213 – 370 mm) e 311 ± 34 mm (variação: 242 - 396 mm) dos animais de ambiente urbano e criatório, respectivamente, caracterizando-os como adultos.

O córrego Felicidade (20° 46' 20,6"S, 49° 21' 18,0"O, elevação 475m, posição atual NE 1m) recebe esgoto doméstico sem tratamento, despejo clandestino de lixo e apresenta-se degradado, sem preservação de sua mata ciliar e com decorrente assoreamento. O criatório (20° 59' 47,4"S, 49° 07' 16,6"O) é um

local livre de exploração agrícola e atividade urbana, para desta forma, garantir que os exemplares não tinham sido expostos a qualquer xenobiótico (Figura 4).



Figura 4. Imagens dos dois locais de coleta. À esquerda: criatório “Reginaldo Uvo Leone” e à direita: córrego Felicidade. O círculo destaca um ponto de despejo de efluentes (Fonte: ZAGO, 2007).

No criatório, os quelônios são mantidos em recintos de aproximadamente 100 m² de área, apresentando um tanque na região central, com profundidade máxima de 1,5 m. Cerca de metade da área do recinto é sombreada, enquanto a outra metade é exposta ao sol. No tanque existe uma rampa e vegetação aquática, e sua água é trocada a cada 3 meses. São colocados até 50 animais por tanque e os exemplares de *Phrynops geoffroanus* ocupam recintos separados de outras espécies de quelônios.

Foram coletados de 3 a 5 mL de sangue dos 60 espécimes, por punção cardíaca, cujas amostras foram acondicionadas em tubos identificados, contendo heparina (Roche®) como anticoagulante, e mantidas sob refrigeração. O período de armazenamento até as análises não excedeu 24 horas, evitando a coagulação das amostras. Para o procedimento, os animais foram lavados com água corrente e posicionados em decúbito dorsal para assepsia com álcool 70% e solução de iodo a 2% (Figura 5A). Na cardiocentese, os animais foram perfurados entre as placas umerais e peitorais, no centro frontal e o sangue coletado diretamente do

coração, utilizando agulhas (*BD Precision Glide*[®]) com calibre apropriado ao tamanho do animal, calibre 40:12 para animais de pequeno porte e, calibre 50:12 para animais maiores, acopladas a seringas de 5mL (*BD Precision Glide*[®]) (Figura 5B). Após a coleta, o orifício foi vedado com cola cirúrgica (*Vetband*[®]) e os animais mantidos em observação por 72 horas antes de serem devolvidos ao ambiente (ZAGO, 2007).

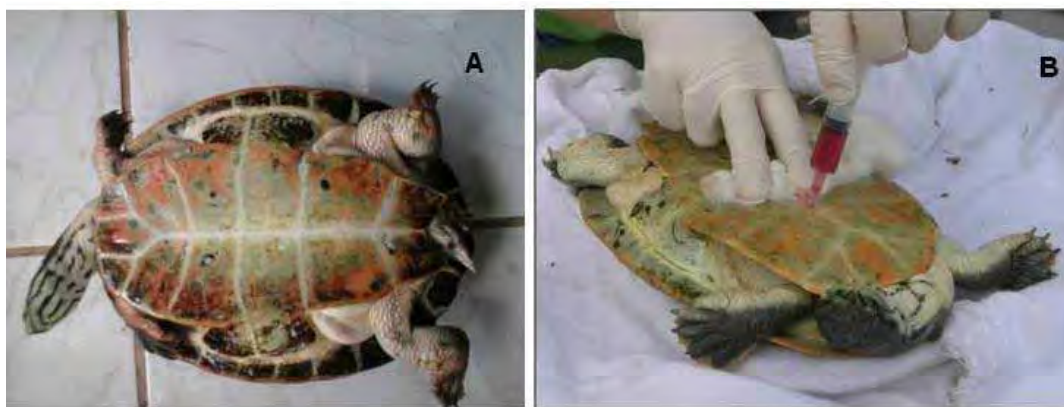


Figura 5. A) Exemplar de *Phrynops geoffroanus* em decúbito dorsal para a assepsia. B) Procedimento de punção cardíaca para coleta de sangue, com o orifício entre as placas umerais e peitorais.

3.2. Hemograma (CAMPBELL, 2004; modificado por ZAGO, 2007)

O hemograma é o exame laboratorial que fornece dados quantitativos sobre os eritrócitos, leucócitos, trombócitos e hemoglobina, para avaliar o estado geral de saúde do animal. Os exames foram efetuados manualmente, conforme metodologia preconizada para a clínica veterinária, com protocolo apresentado no Anexo D, que inclui:

- **O hematócrito:** verifica o volume globular, pela relação entre os glóbulos vermelhos e o volume de plasma, em porcentagem de eritrócitos no sangue.
- **A dosagem da hemoglobina circulante:** fornece a concentração de hemoglobina a partir do método da cianometahemoglobina. A hemoglobina e todos os seus derivados são transformados por um reativo a base de cianeto, em

cianometahemoglobina e em seguida quantificada por espectrofotometria com comprimento de onda de 540 nm. Ao final a concentração em g/dL é obtida.

- **Contagem global de células:** permite calcular o número absoluto de células contidas em um determinado volume de sangue. Consiste em colocar numa câmara de Neubauer, uma amostra de sangue diluído com reativo apropriado para o tipo de célula a ser estudado. A solução de Natt and Herrick (1952) foi utilizada como diluidor para as contagens de eritrócitos e leucócitos. Em alguns minutos, os elementos depositaram-se no fundo da câmara, cujo quadriculado permite a contagem ao microscópio. As contagens dos eritrócitos e leucócitos foram efetuadas separadamente, obedecendo a suas particularidades. Um cálculo, que considera a diluição e o volume da célula, forneceu o número de elementos, expressos por μL .

- **Cálculo dos índices hematimétricos:** podem ser utilizados para avaliar as características de eritrócitos no sangue periférico e representam valores importantes na análise sanguínea por sofrerem variações nos estados patológicos:

A) Volume globular médio (VGM) - indica o volume médio de eritrócitos expresso em femtolitros (fL).

B) Concentração de hemoglobina globular média (CHGM) - designa o índice médio da porcentagem de hemoglobina por hemácia (em %).

C) Hemoglobina globular média (HGM) - indica a quantidade total de hemoglobina em picogramas (pg).

- **Contagem diferencial dos leucócitos:** fórmula leucocitária obtida por meio do exame dos esfregaços sanguíneos corados com Panótipo (*Hematocor-Biológica*®), e que permite identificar a variedade de leucócitos e estabelecer suas proporções relativas. Estabeleceu-se o valor percentual de cada tipo de leucócito no sangue circulante, para depois, conhecendo-se o total de leucócitos circulantes, obter-se o total de cada tipo celular.

- **Contagem de trombócitos:** permite calcular o número absoluto de trombócitos em determinado volume de sangue, a partir de sua contagem relativa em esfregaços

sanguíneos corados com Panótipo (*Hematocor-Biológica*[®]). Estabeleceu-se o número de trombócitos a cada 1000 eritrócitos, e então, de acordo com o total de eritrócitos da respectiva amostra, calculou-se o total de trombócitos por μL de sangue.

3.2.1. Índice de Estresse (Razão Heterófilo/Linfócito)

A partir dos valores obtidos por meio da contagem diferencial de leucócitos, pode-se calcular a razão heterófilo/linfócito, resultando em um índice indicativo de estresse crônico, que é representado por uma elevação no número de heterófilos e uma diminuição dos linfócitos (SIEGEL, 1980).

3.3. Dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (YAGI, 1976; modificado por PERCÁRIO et al., 2004)

De todos os subprodutos e produtos intermediários da peroxidação lipídica, a dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tem sido a forma mais utilizada de avaliação da integridade de membranas. O método é baseado na reação destes produtos com o ácido tiobarbitúrico em condições ácidas e aquecimento.

Aldeídos são frequentemente produzidos quando lipoperóxidos são metabolizados por organismos aeróbios. Sua identificação fornece índice indireto de lesão oxidativa resultante de peroxidação lipídica. Esses aldeídos, cujo principal e mais abundante é o malondialdeído (MDA), reagem com duas moléculas de TBA, em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo de cor rosa e pico máximo de absorbância em 535 nm. Ao final, um cálculo fornece a concentração de TBARS da amostra, em ng/mL. O procedimento técnico é apresentado no Anexo E.

Esta análise pode ser realizada em soro, plasma, líquidos corporais e homogenados de tecido. As dosagens foram realizadas no plasma, para podermos

observar a resposta do organismo como um todo. O intervalo de 0 a 440 ng/mL de TBARS é considerado o intervalo de normalidade para esta determinação laboratorial em humanos, não existindo valores de normalidade determinados na literatura para répteis. Portanto, os valores de referência para quelônios foram estabelecidos nesse estudo.

3.4. Dosagem da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC) (MILLER et al., 1993, modificado por RE et al., 1999)

O potencial antioxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), produzindo diretamente o radical cátion $ABTS^{•+}$, cromóforo de coloração verde/azul, com absorbância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm. A adição de amostras contendo antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, sendo o grau e extensão da descoloração dependente da capacidade e concentração de antioxidantes e duração da reação. O produto é mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm durante o intervalo de tempo de 5 minutos. Assim, a extensão da descoloração como índice de inibição do radical cátion $ABTS^{•+}$ foi determinada como a atividade antioxidante total da amostra, sendo então calculada a sua relação com a reatividade do trolox como padrão, sob as mesmas condições. Os resultados finais foram expressos em micromoles por litro (mmol/L) correspondente a concentração do trolox com capacidade antioxidante equivalente à das amostras plasmáticas deste estudo, padrão de medida este denominado TEAC. O Anexo F contém o protocolo completo. Os valores de referência para a espécie foram estabelecidos nesses ensaios.

3.5. Atividade enzimática de biomarcadores de contaminação ambiental

As atividades antioxidantes da catalase (CAT) e da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foram realizadas em amostras de sangue total. O material foi adicionado em um meio de reação específico, para cada enzima avaliada, e a variação da absorbância por produção ou consumo do substrato foi acompanhada. Posteriormente, a taxa de variação da absorbância foi relacionada com a quantificação protéica, obtida pelo método de Bradford (1976), resultando no valor da atividade enzimática.

3.5.1. Catalase (BEUTLER, 1975)

O meio de reação foi preparado com 90 mL da solução de H_2O_2 10mM, a qual foi adicionada 5 mL do tampão da catalase e completada com 4 mL de H_2O MiliQ. Para o ensaio, acrescentou-se 40 μL de amostra a 960 μL de meio de reação e quantificou-se a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, pelo decréscimo de absorbância em 240 nm, a 30° C. O ensaio completo está descrito no Anexo G.

3.5.2. G6PDH (GLOCK; McLEAN, 1953)

O meio de reação foi preparado com Tris.HCl 0,1 M, pH 7,4, acrescido de MgCl_2 0,2 M, G6P, NADP e H_2O MiliQ. Uma parte do meio de reação foi preparada sem G6P e utilizada como o branco da reação. No ensaio com 980 μL de meio de reação e 20 μL de amostra, a G6PDH foi determinada pelo aumento de absorbância provocado pela redução de NADP^+ a NADPH em 340 nm, a 30°C. O protocolo desse ensaio é apresentado no Anexo H.

3.6. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *STATISTICA 8.0*. Para análise dos perfis estudados nos dois grupos e comparação entre seus dados em cada método, os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva. As variáveis foram testadas quanto à normalidade, pela inspeção dos histogramas segundo o teste de *Shapiro-Wilk*, e homogeneidade das variâncias, pelo teste de Levene. Para dados paramétricos, foi utilizado o Teste *t* Independente, e para dados não-paramétricos, o teste *Mann-Whitney* (ZAR, 1999).

Posteriormente, para avaliar o grau de associação entre as variáveis estudadas, realizou-se a análise de correlação de *Pearson* para dados paramétricos, e correlação de *Spearman* para dados não-paramétricos. O nível de significância (p) adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados



4. RESULTADOS

4.1. Hemograma

Na comparação entre os valores hematológicos dos animais, por local de origem, houve diferença significativa na maioria dos parâmetros analisados para a série vermelha, com exceção do hematócrito (Ht). A dosagem da hemoglobina circulante ([Hb]) ($p = 0,0371$), contagem total de glóbulos vermelhos ($p = 0,0004$), e a Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM) ($p < 0,0001$) foram maiores para os animais do criatório. Por outro lado, os índices hematimétricos Volume Globular Médio (VGM) ($p < 0,0001$) e Hemoglobina Globular Média (HGM) ($p = 0,0073$), e a contagem de trombócitos (TØ) ($p < 0,0001$) mostraram-se elevados para os espécimes do córrego Felicidade.

A análise da série branca revelou aumento significativo para a contagem total de leucócitos ($p < 0,0001$) nos espécimes do córrego Felicidade em comparação aos do criatório. Em relação aos valores percentuais de cada tipo de leucócito, os dois grupos apresentaram grandes semelhanças, havendo diferença significativa apenas para o percentual de eosinófilos (EØ) ($p = 0,0233$), que foi maior nos espécimes de ambiente urbano. Porém, como houve leucocitose nos espécimes do córrego Felicidade, os valores totais de cada tipo celular mostraram-se significativamente maiores nestes animais em comparação aos controles: basófilo (BØ) ($p = 0,0003$), eosinófilo (EØ) ($p < 0,0001$), heterófilo (HØ) ($p < 0,0001$), azurófilo (AØ) ($p < 0,0001$), neutrófilo (NØ) ($p = 0,0001$), linfócito (LØ) ($p < 0,0001$) e monócito (MØ) ($p < 0,0001$).

Os valores médios, respectivos desvios padrões, medianas, mínimos, máximos e comparações estatísticas dos parâmetros analisados nos hemogramas dos espécimes de ambiente urbano e de recinto com condições controladas estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores hematológicos das amostras de *Phrynos geoffroanus* de ambiente urbano e criatório: médias, desvios-padrão (DP), medianas, mínimos, máximos e comparação estatística dos valores obtidos de acordo com o local de coleta (total avaliado: 60 espécimes).

PARÂMETROS		Animais de ambiente urbano (n= 30)				Animais de criatório (n= 30)				p
Série Vermelha		Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	
Ht (%)		26,63 ± 4,15	27	18	36	25,7 ± 4,95	26	18	34	0,4318 ¹
[Hb] (g/dL)		4,46 ± 1,11	4,17	2,78	6,94	4,93 ± 0,82	5	3,61	6,39	0,0371 ^{2*}
Hemáceas (x 10 ⁶ céls./µL)		0,45 ± 0,09	0,44	0,31	0,68	0,57 ± 0,12	0,60	0,35	0,77	0,0004 ^{2*}
VGM (fL)		606,98 ± 79,02	591,53	500	828,57	457,57 ± 28,91	452,38	413,22	523,81	< 0,0001 ^{2*}
CHGM (%)		16,63 ± 2,31	16,15	13,37	22,43	19,37 ± 1,67	19,15	15,24	22,6	< 0,0001 ^{1*}
HGM (pg)		100,78 ± 18,91	96,57	77,03	161,94	88,76 ± 10,42	86,43	72,06	108,06	0,0073 ^{2*}
TØ (x 10 ³ /µL)		18,28 ± 9,4	16,23	5,11	37,7	5,76 ± 2,29	5,56	2,02	12,23	< 0,0001 ^{2*}
Série Branca										
Leucócitos (x 10 ³ l/µL)		19,47 ± 4,42	20	12	29	10,13 ± 2,43	10	6	15	< 0,0001 ^{1*}
BØ (x 10 ³ /µL)		1,78 ± 0,89	1,58	0,6	4,14	1,03 ± 0,39	0,99	0,48	2,34	0,0003 ^{2*}
EØ (x 10 ³ /µL)		5,81 ± 2,32	5,78	1,8	13,05	2,54 ± 0,8	2,47	1,26	4,8	< 0,0001 ^{2*}
HØ (x 10 ³ /µL)		6,02 ± 1,73	5,84	3,6	11,76	3,54 ± 1,38	3,12	1,96	7	< 0,0001 ^{2*}
AØ (x 10 ³ /µL)		1,13 ± 0,42	1,17	0,48	2,25	0,61 ± 0,18	0,6	0,35	1,04	< 0,0001 ^{2*}
NØ (x 10 ³ /µL)		0,24 ± 0,12	0,22	0	0,48	0,13 ± 0,06	0,12	0	0,26	0,0001 ^{1*}
LØ (x 10 ³ /µL)		3,05 ± 1,11	2,97	1,12	5,98	1,56 ± 0,35	1,54	1,02	2,47	< 0,0001 ^{2*}
MØ (x 10 ³ /µL)		1,43 ± 0,62	1,26	0,6	2,86	0,72 ± 0,21	0,7	0,35	1,17	< 0,0001 ^{2*}

Valor de significância (p); Hematócrito (Ht); Dosagem da hemoglobina circulante ([Hb]); Número de hemáceas x 10⁶ células/µL; Volume Globular Médio (VGM); Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM); Hemoglobina Globular Média (HGM); Número de trombócitos (x 10³/µL) (TØ); Número de leucócitos (x 10³ leucócitos/µL); Basófilo (x 10³/µL) (BØ); Eosinófilo (x 10³/µL) (EØ); Heterófilo (x 10³/µL) (HØ); Azurófilo (x 10³/µL) (AØ); Neutrófilo (x 10³/µL) (NØ); Linfócito (x10³/µL) (LØ); Monócito (x 10³/µL) (MØ). Utilizou-se o Teste t Independente ⁽¹⁾ para dados paramétricos; Teste Mann-Whitney ⁽²⁾ para dados não paramétricos; Diferença significante - p < 0,05 (*).

De acordo com os valores hematimétricos observados nas amostras do grupo controle deste estudo, foram estabelecidos valores de referência para os parâmetros do hemograma da espécie *Phrynosops geoffroanus* da região noroeste do estado de São Paulo. A amplitude de variação nos valores hematimétricos das séries vermelha e branca são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores hematimétricos de referência para *Phrynosops geoffroanus* da região noroeste do estado de São Paulo; amplitude de variação estabelecida para cada parâmetro das séries vermelha e branca.

PARÂMETROS		VALORES DE REFERÊNCIA
SÉRIE VERMELHA		
Hematócrito		20,75% - 30,65%
Dosagem de Hemoglobina		4,11 g/dL - 5,75 g/dL
Hemáceas		4.5 x 10 ⁵ hem/μL - 6.9 x 10 ⁵ hem/μL
VGM		428,66 fL - 486,48 fL
CHGM		17,7% - 21,04%
HGM		78,34 pg - 99,18 pg
Trombócitos		3470 células/μL - 8050 células/μL
SÉRIE BRANCA		
Leucócitos		7700 células/μL - 12560 células/μL
Porcentagem de cada tipo de leucócito	Basófilos	6,72% - 14,02%
	Eosinófilos	19,63% - 30,91%
	Heterófilos	27,3% - 41,16%
	Azurófilos	4,98% - 7,02%
	Neutrófilos	0,78% - 1,88%
	Linfócitos	13,29% - 17,91%
	Monócitos	5,85% - 8,55%

Foram analisadas amostras sanguíneas de 30 espécimes de *Phrynosops geoffroanus* (9 machos e 21 fêmeas) provenientes do córrego Felicidade e 30 (12 machos e 18 fêmeas) do criatório. Embora o número de amostras de machos e

fêmeas coletadas para as análises não seja homogêneo, realizou-se a comparação dos valores hematológicos entre os sexos de cada local de coleta.

Na comparação dos parâmetros hematológicos entre fêmeas e machos do córrego Felicidade, não houve diferença significativa em nenhum dos valores da série vermelha. Em relação à série branca, houve diferença significativa apenas na contagem de azurófilos, cujos valores foram maiores para os machos na contagem absoluta ($p = 0,0208$), assim como no percentual de azurófilos ($p = 0,0395$). Na contagem absoluta, as fêmeas apresentaram média de 1020,48 ($\pm 316,47$) azurófilos/ μL e os machos, média de 1396,67 ($\pm 518,77$) azurófilos/ μL . Em relação ao percentual deste tipo de leucócito, a média estabelecida para as fêmeas foi de 5,33% ($\pm 1,2\%$) e para os machos foi de 6,78% ($\pm 1,79\%$).

Na comparação dos valores hematológicos de fêmeas e machos do criatório, observou-se diferença significativa em dois valores da série vermelha, que foram maiores para os machos: CHGM ($p = 0,0154$) e HGM ($p = 0,0158$). A média de CHGM para as fêmeas foi de 18,78% ($\pm 1,68\%$), em comparação com 20,26% ($\pm 1,27\%$) dos machos. Já para HGM, as fêmeas apresentaram média de 85,11 ($\pm 9,66$) pg e os machos, média de 94,25 ($\pm 9,35$) pg.

Em relação à série branca, fêmeas e machos do criatório apresentaram diferença significativa apenas na contagem de eosinófilos, que apresentaram valores absolutos ($p = 0,0089$) e em percentuais de glóbulos brancos ($p = 0,0211$) mais elevados nas fêmeas do grupo. Na contagem absoluta, as fêmeas obtiveram média de 2841,11 ($\pm 804,08$) eosinófilos/ μL e os machos, média de 2091,67 ($\pm 552,61$) eosinófilos/ μL . Em relação ao percentual deste tipo de leucócito, a média estabelecida para as fêmeas foi de 27,17% ($\pm 4,96\%$) e para os machos foi de 22,42% ($\pm 5,58\%$).

4.1.1. Índice de Estresse (Razão Heterófilo/Linfócito)

Na razão Heterófilo/Linfócito em *Phrynos geoffroanus* em função do local de coleta e sexo, não houve diferença estatística entre os grupos amostrados. A proximidade entre os valores médios desse índice não permitiu uma nítida separação entre os grupos, porém a amplitude de variação dos resultados foi muito maior entre os animais de ambiente urbano, enquanto os níveis do criatório foram mais estáveis. A Tabela 3 apresenta as médias, desvios padrões, amplitude de variação, medianas e comparações estatísticas dos índices de estresse em função do local de coleta e sexo.

Tabela 3. Índice de Estresse em *Phrynos geoffroanus* em função do local de coleta e sexo. Média, desvio padrão (DP), amplitude de variação (entre parênteses), mediana e comparação estatística dos valores por local de coleta e por sexo em cada local.

Sexo/Local	Índice de Estresse			
	Média ± DP	Variação	Mediana	p
Animais de ambiente urbano (n = 30)	2,28 ± 1,2	(1,0 - 6,29)	1,89	0,4077
Animais de criatório (n = 30)	2,28 ± 0,78	(1,4 - 4,54)	2,12	
Fêmeas - ambiente urbano (n = 21)	2,37 ± 1,25	(1,18 - 6,29)	1,87	0,4552
Machos - ambiente urbano (n = 9)	2,07 ± 1,1	(1,0 - 3,83)	1,92	
Fêmeas – criatório (n = 18)	2,17 ± 0,6	(1,53 - 3,92)	2,09	0,6567
Machos – criatório (n = 12)	2,45 ± 0,99	(1,4 - 4,54)	2,14	

Utilizou-se o Teste *Mann-Whitney* para todas as análises; Diferença significativa - $p < 0,05$.

4.2. Dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

De acordo com os valores da concentração de TBARS das amostras do grupo controle e nas condições de estudo, estabeleceu-se o intervalo de normalidade para *P. geoffroanus* de 256,96 ng/mL a 344,84 ng/mL de TBARS. Considerando o valor de normalidade, 25 animais (83,33%) do córrego Felicidade apresentaram concentrações acima deste valor, enquanto apenas cinco animais (16,67%) do criatório demonstraram alterações, sendo seus valores pouco elevados em relação ao normal.

As concentrações de TBARS dos animais de ambiente urbano variaram de 263,70 ng/mL à 934,86 ng/mL, apresentando média de 481,63 ng/mL e um desvio-padrão de 147,44 ng/mL. Já os animais de criatório apresentaram uma média das concentrações de TBARS de 300,90 ng/mL, com um desvio-padrão de 43,94 ng/mL, sendo que os valores individuais alteraram entre 183,34 ng/mL e 357,09 ng/mL.

O teste *Mann Whitney*, comparando as concentrações de TBARS de acordo com o local de origem dos animais coletados, revelou aumento significativo ($p < 0,0001$) para o grupo de ambiente urbano, conforme demonstrado na Figura 6. A Tabela 4, com os valores individuais da concentração de TBARS e análise descritiva dos dados de cada grupo, está representada no Apêndice A.

Na comparação dos níveis de TBARS em função do sexo, não houve diferença estatística entre fêmeas e machos do córrego Felicidade, nem entre fêmeas e machos do criatório. No ambiente urbano, houve grande amplitude de variação dos valores de TBARS entre espécimes do mesmo sexo, estabelecendo-se média $\pm$ desvio-padrão de $459,73 \pm 121,41$ ng/mL para as fêmeas, e de $532,74 \pm 194,29$ ng/mL para os machos. Já no criatório, onde os níveis de TBARS foram menores e mais estáveis, as fêmeas apresentaram média $\pm$ desvio-padrão de $303,11 \pm 38,79$ ng/mL, e os machos $297,59 \pm 52,40$ ng/mL.

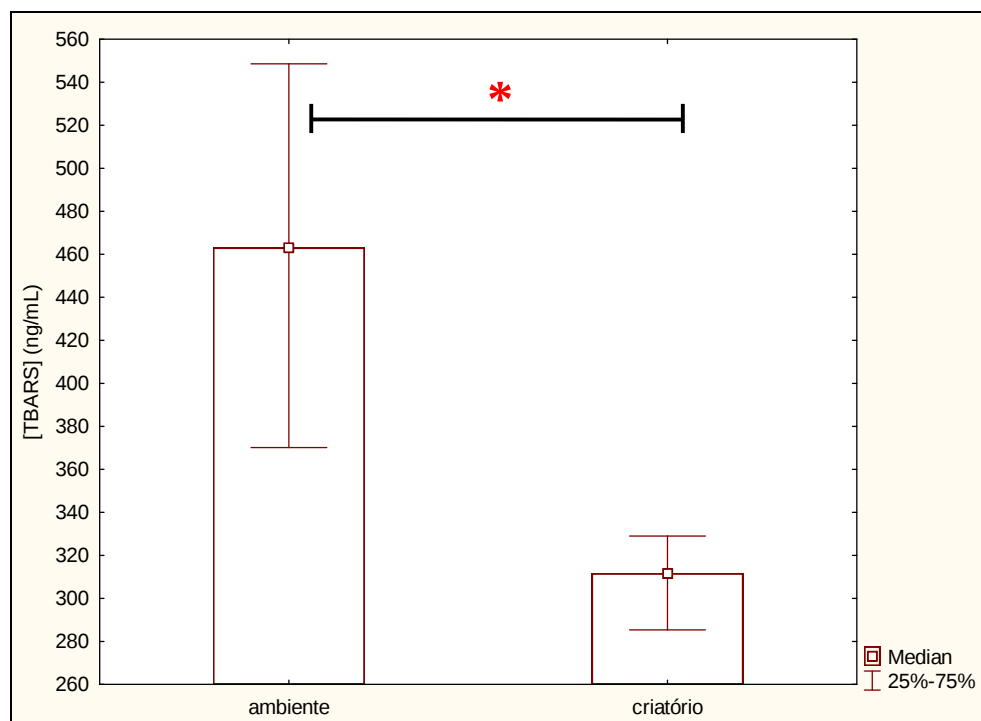


Figura 6. Concentração de TBARS em ng/mL em amostras de animais de ambiente urbano e criatório. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) - Teste *Mann Whitney*.

4.3. Dosagem da capacidade antioxidante em equivalência ao trolox (TEAC)

Os valores de TEAC das amostras plasmáticas dos sessenta espécimes foram comparados pelo teste *Mann Whitney*, de acordo com o local de origem, revelando um aumento significativo ($p = 0,0207$) dos valores de TEAC para as amostras dos animais de ambiente urbano (Figura 7).

A média dos valores de TEAC das amostras dos espécimes de ambiente urbano foi de 1,84 mmol/L e o desvio-padrão de 0,46 mmol/L, sendo o valor mínimo de TEAC apresentado por esses animais de 0,52 mmol/L e o máximo de 2,43 mmol/L. Os valores de TEAC observados nos animais de criatório variaram entre 0,66 mmol/L e 2,36 mmol/L, apresentando uma média de 1,68 mmol/L e desvio-padrão de 0,36 mmol/L. A Tabela 5, no Apêndice A, apresenta os valores individuais de TEAC e a análise descritiva dos dados de cada grupo.

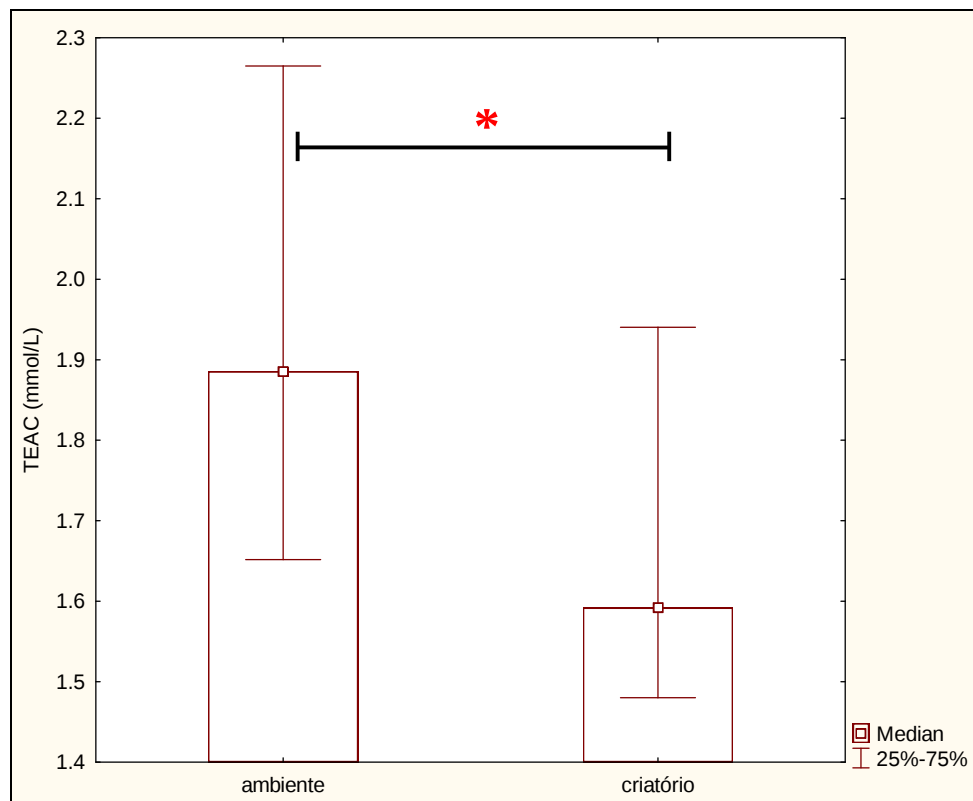


Figura 7. Valores de TEAC em mmol/L em amostras de animais de ambiente urbano e criatório. Diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0207$) - Teste *Mann Whitney*.

Com base nos resultados do grupo controle do estudo, estabeleceu-se o intervalo de normalidade para TEAC entre 1,32 mmol/L e 2,04 mmol/L, valores esses, ultrapassados por 36,67% dos espécimes de ambiente urbano.

O teste *Mann Whitney*, comparando os valores de TEAC de acordo com o sexo, não revelou diferença significativa entre fêmeas e machos do córrego Felicidade, nem entre fêmeas e machos do criatório. As médias $\pm$ desvios-padrão apresentados por fêmeas e machos de ambiente urbano foram, respectivamente, de $1,77 \pm 0,51$ mmol/L e $2,0 \pm 0,27$ mmol/L. Em relação aos valores de TEAC de fêmeas e machos do criatório, as médias $\pm$ desvios-padrão observados foram de $1,68 \pm 0,4$ mmol/L e $1,69 \pm 0,32$ mmol/L, respectivamente.

4.4. Atividade enzimática de biomarcadores de contaminação ambiental

4.4.1. Catalase

A Figura 8 apresenta a comparação das atividades da catalase (U/mg de proteína) entre os grupos dos dois ambientes, realizada pelo teste *Mann Whitney*.

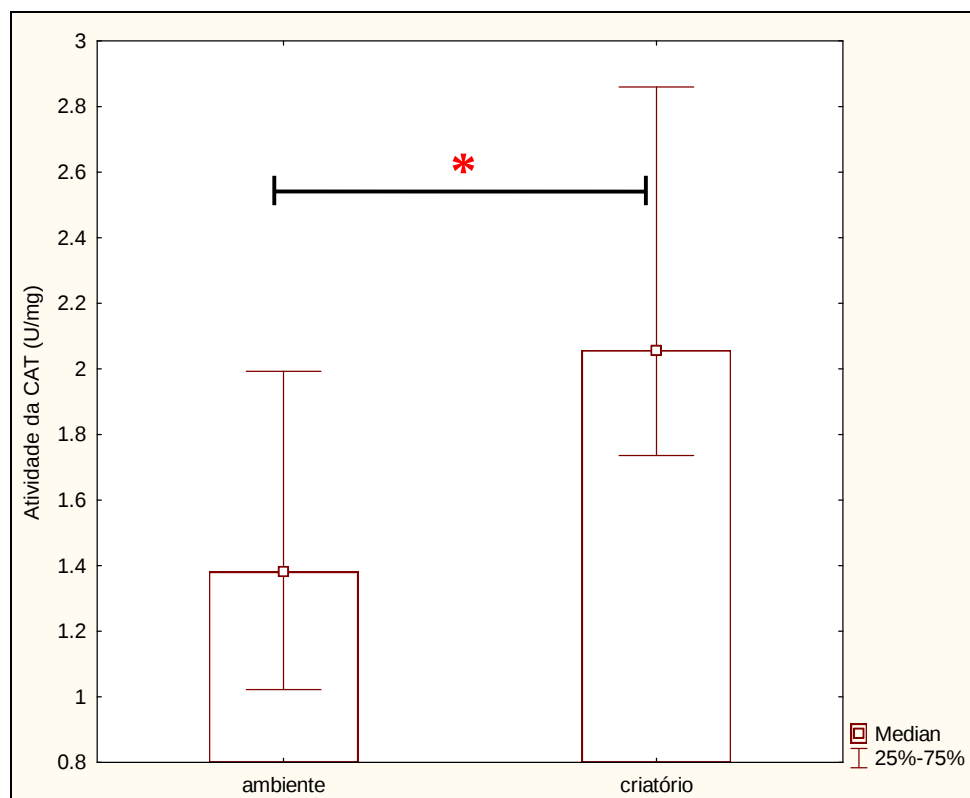


Figura 8. Atividade da catalase em U/mg de proteína em amostras de animais de ambiente urbano e criatório. Diferença estatisticamente significativa ($p = 0,000184$) - Teste *Mann Whitney*.

A atividade desta enzima apresentou-se reduzida com diferença significativa ($p = 0,000184$) para as amostras dos animais de ambiente urbano, quando comparadas aos valores obtidos para os animais controle. De acordo com os resultados obtidos no grupo controle, estabeleceu-se os valores de referência entre

1,64 e 2,96 U/mg da proteína. Segundo esses valores, 19 espécimes do córrego (63,33%) mostraram a atividade enzimática menor que o limite inferior de referência.

As atividades da catalase nas amostras dos animais de ambiente urbano apresentaram valor mínimo de 0,69 U/mg e máximo de 3,18 U/mg de proteína; compondo uma média de 1,61 U/mg para o grupo, com desvio-padrão de 0,69 U/mg. Já os animais de criatório tiveram uma atividade mínima de 1,45 U/mg e máxima de 3,80 U/mg de catalase, sendo a média das atividades da catalase deste grupo de 2,30 U/mg e o desvio-padrão de 0,66 U/mg. A Tabela 6, no Apêndice A, apresenta os valores individuais e a análise descritiva dos dados de cada grupo.

Não houve diferença significativa para a atividade desta enzima entre fêmeas e machos do córrego Felicidade, de acordo com o teste *Mann Whitney*, sendo que as fêmeas apresentaram uma média de 1,61 U/mg de catalase, com desvio-padrão de 0,74 U/mg da proteína; valores similares aos dos machos cuja média foi de 1,63 U/mg e o desvio-padrão de 0,61 U/mg de catalase. A comparação da atividade da catalase entre fêmeas e machos do criatório foi realizada pelo teste *t* Independente e também não revelou diferença significativa. Os valores médios e respectivos desvios-padrão observados foram de 2,26 e 0,61 U/mg da proteína para as fêmeas, e de 2,36 e 0,74 U/mg da proteína para os machos.

4.4.2. G6PDH

Para a atividade de G6PDH, a comparação pelo teste *Mann Whitney* revelou aumento significativo ($p = 0,002962$) para os espécimes de ambiente urbano, como apresentado na Figura 9.

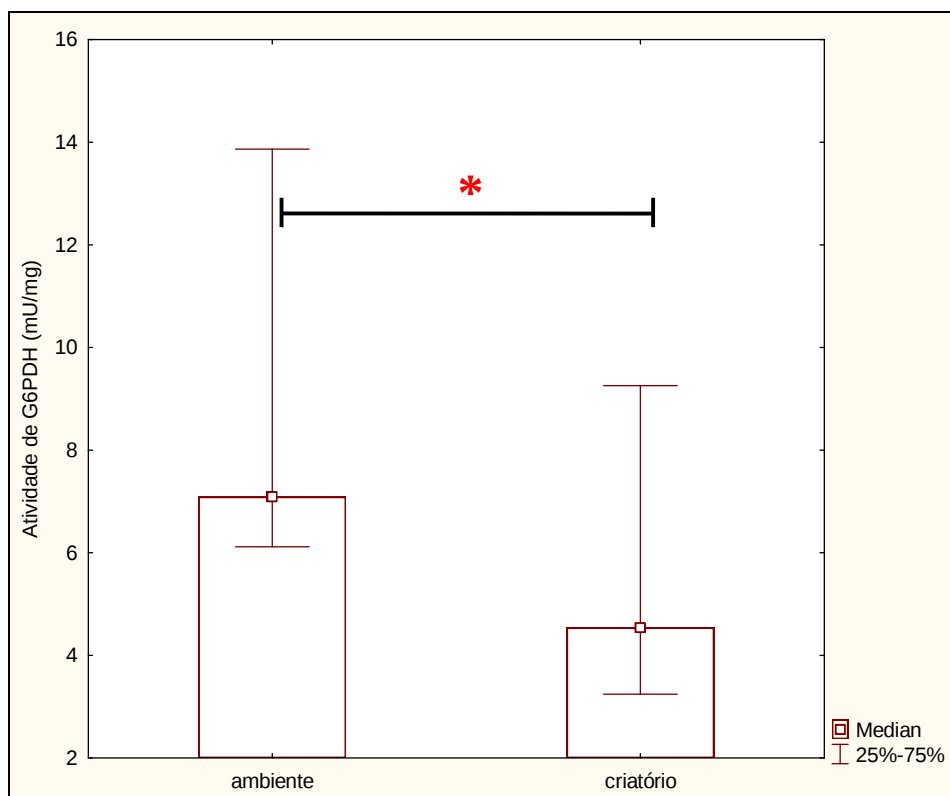


Figura 9. Atividade da G6PDH em mU/mg de proteína em amostras de animais de ambiente urbano e criatório. Diferença estatisticamente significativa ($p = 0,002962$) - Teste Mann Whitney.

A média das atividades da G6PDH para o grupo de ambiente urbano foi de 11,50 mU/mg, com desvio-padrão de 11,05 mU/mg de proteína. O valor do desvio padrão deve-se à grande amplitude de variação dos valores das atividades enzimáticas entre os espécimes do mesmo grupo, mínimo de 4,73 e máximo de 54,67 mU/mg de G6PDH. As atividades desta enzima apresentadas pelas amostras sanguíneas dos animais controle variaram entre 1,40 mU/mg e 23,86 mU/mg, com média de 6,92 mU/mg e desvio-padrão de 5,68 mU/mg. Os valores individuais e a análise descritiva dos dados de cada grupo estão representados na Tabela 7 do Apêndice A.

Os resultados obtidos com os animais controle permitiram estabelecer os valores de referência para a atividade da G6PDH em sangue entre 1,24

mU/mg e 12,6 mU/mg de proteína. Pela ampla faixa de variação, apenas 26, 67 % dos animais do córrego encontram-se fora do limite, apesar dos valores deste grupo serem relativamente elevados em relação ao controle.

As análises comparativas das atividades enzimáticas em função do sexo de cada local, realizadas pelo teste *Mann Whitney*, não demonstraram diferença significativa entre fêmeas e machos de um mesmo local. No córrego Felicidade, as fêmeas apresentaram uma média de 10,46 mU/mg de G6PDH, com desvio-padrão de 8,64 mU/mg; e os machos, média de 13,92 mU/mg e desvio-padrão de 15,72 mU/mg de G6PDH. Entre os animais do criatório, as médias observadas para as fêmeas foi de 6,68 mU/mg, com desvio-padrão de 5,85 mU/mg de G6PDH. Os machos obtiveram média de 7,28 mU/mg e desvio-padrão de 5,67 mU/mg da proteína.

4.5. Análise de Correlação entre as variáveis hematológicas e bioquímicas

De acordo com esta análise, estabeleceu-se a correlação entre algumas das variáveis estudadas em cada um dos grupos, indicando o grau de associação entre elas. No grupo de ambiente urbano, houve correlação forte e positiva entre a contagem absoluta de eritrócitos e o hematócrito ($r = 0,7778$; $p < 0,00001$), e entre a contagem absoluta de eritrócitos e a concentração de hemoglobina ($r = 0,7156$; $p = 0,00001$) (Figura 10 A). Outra correlação positiva foi estabelecida entre a concentração de TBARS e a atividade da catalase, porém esta se apresentou como uma associação fraca ($r = 0,4464$; $p = 0,0134$) (Figura 10 B).

A atividade enzimática da G6PDH se correlacionou de modo fraco e negativo à concentração de hemoglobina ($r = - 0,3761$; $p = 0,0405$), como ilustrado na Figura 11. Houve associação entre o índice de estresse e as variáveis: concentração de TBARS, contagem absoluta de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos (Figura 12).

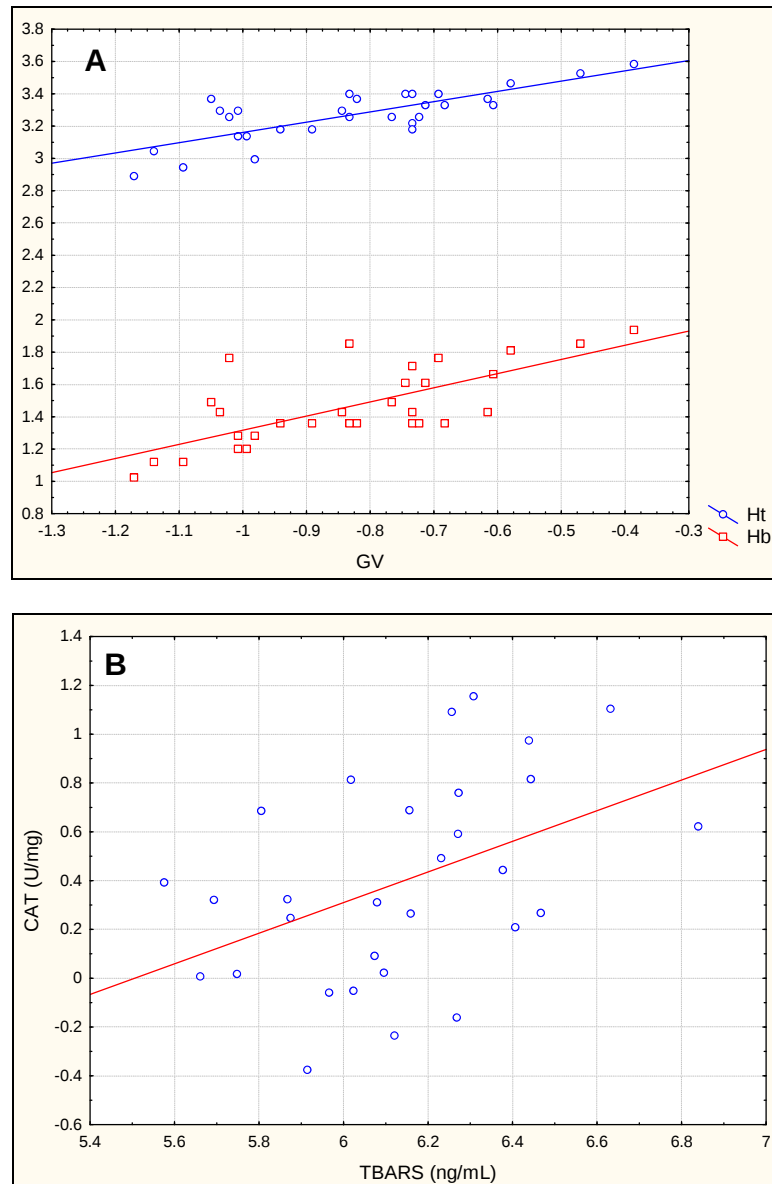


Figura 10. Correlações lineares positivas estabelecidas pelas análises em animais de ambiente urbano. **A)** Correlação positiva de 78% entre a contagem absoluta de eritrócitos (GV) e o hematócrito (Ht) ($r = 0,7778$; $p < 0,00001$), e de 72 % entre a contagem absoluta de eritrócitos e a concentração de hemoglobina (Hb) ($r = 0,7156$; $p = 0,00001$). **B)** Correlação positiva de 45% entre os níveis de TBARS e atividade da catalase (CAT) ($r = 0,4464$; $p = 0,0134$).

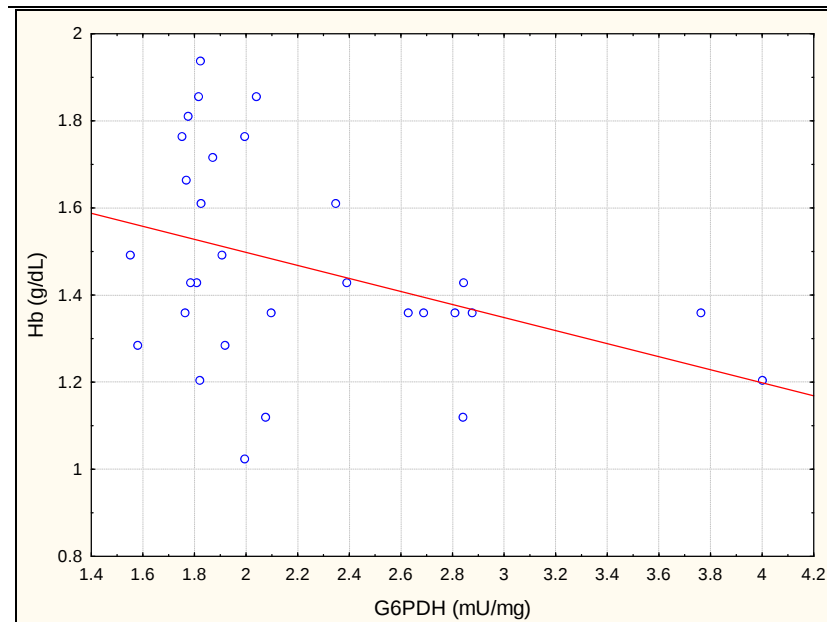


Figura 11. Correlação linear negativa de aproximadamente 38% entre a atividade enzimática da G6PDH e a concentração de hemoglobina (Hb) dos animais do córrego Felicidade ($r = -0,3761$; $p = 0,0405$).

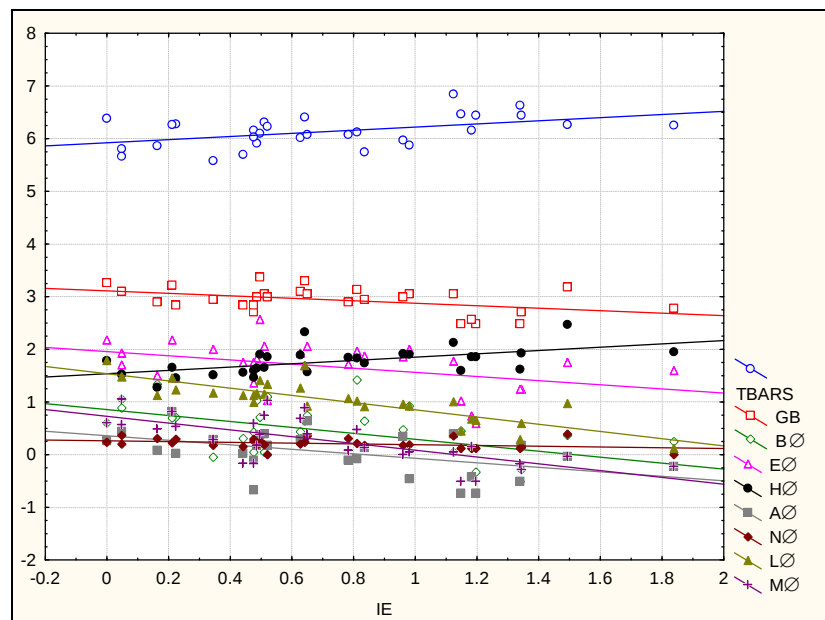


Figura 12. Correlações lineares positivas do índice de estresse (IE) com os níveis de TBARS (47%) e os valores de heterófilo (HØ) (58%). O IE apresenta correlações negativas com: a contagem absoluta de glóbulos brancos (GB) (46%), valores de basófilos (BØ) (52%), eosinófilos (EØ) (42%), azurófilos (AØ) (50%), neutrófilos (NØ) (35%), linfócitos (LØ) (84%) e monócitos (MØ) (70%).

A Tabela 8 apresenta o tipo de correlação (positiva/negativa e intensidade) entre o índice de estresse e cada uma das variáveis: concentração de TBARS, contagem absoluta de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos; além dos valores de r e p , que indicam o grau da associação.

Tabela 8. Correlação entre o índice de estresse e as seguintes variáveis: concentração de TBARS, contagem total de leucócitos e de cada tipo de glóbulo branco. Tipo de correlação (positiva/negativa e intensidade) e valores de r e p entre cada associação.

Índice de Estresse	Correlação	r	p
TBARS (ng/mL)	Positiva e Fraca	$r = 0,4728$	$p = 0,0083$
Leucócitos ($\times 10^3$ l/ μ L)	Negativa e Fraca	$r = -0,4620$	$p = 0,0102$
BØ ($\times 10^3/\mu$ L)	Negativa e Moderada	$r = -0,5156$	$p = 0,0035$
EØ ($\times 10^3/\mu$ L)	Negativa e Fraca	$r = -0,4189$	$p = 0,0212$
HØ ($\times 10^3/\mu$ L)	Positiva e Moderada	$r = 0,5762$	$p = 0,0009$
AØ ($\times 10^3/\mu$ L)	Negativa e Moderada	$r = -0,5019$	$p = 0,0047$
NØ ($\times 10^3/\mu$ L)	Negativa e Fraca	$r = -0,3546$	$p = 0,0545$
LØ ($\times 10^3/\mu$ L)	Negativa e Forte	$r = -0,8373$	$p < 0,00001$
MØ ($\times 10^3/\mu$ L)	Negativa e Moderada	$r = -0,6963$	$p = 0,00002$

Número de leucócitos ($\times 10^3$ leucócitos/ μ L); Basófilo ($\times 10^3/\mu$ L) (BØ); Eosinófilo ($\times 10^3/\mu$ L) (EØ); Heterófilo ($\times 10^3/\mu$ L) (HØ); Azurófilo ($\times 10^3/\mu$ L) (AØ); Neutrófilo ($\times 10^3/\mu$ L) (NØ); Linfócito ($\times 10^3/\mu$ L) (LØ); Monócito ($\times 10^3/\mu$ L) (MØ). Utilizou-se a análise de correlação. Valor de significância (p); coeficiente de correlação (r).

Em relação aos resultados obtidos nas análises para os animais do criatório, observou-se, assim como no ambiente urbano, uma correlação forte e positiva entre a contagem absoluta de eritrócitos e o hematócrito ($r = 0,9733$; $p < 0,00001$), e entre a contagem absoluta de eritrócitos e a concentração de hemoglobina ($r = 0,8875$; $p < 0,00001$) (Figura 13 A). Também houve uma correlação positiva o índice de estresse e a contagem total de leucócitos, apesar de ser uma associação fraca ($r = 0,4647$; $p = 0,0097$) (Figura 13 B).

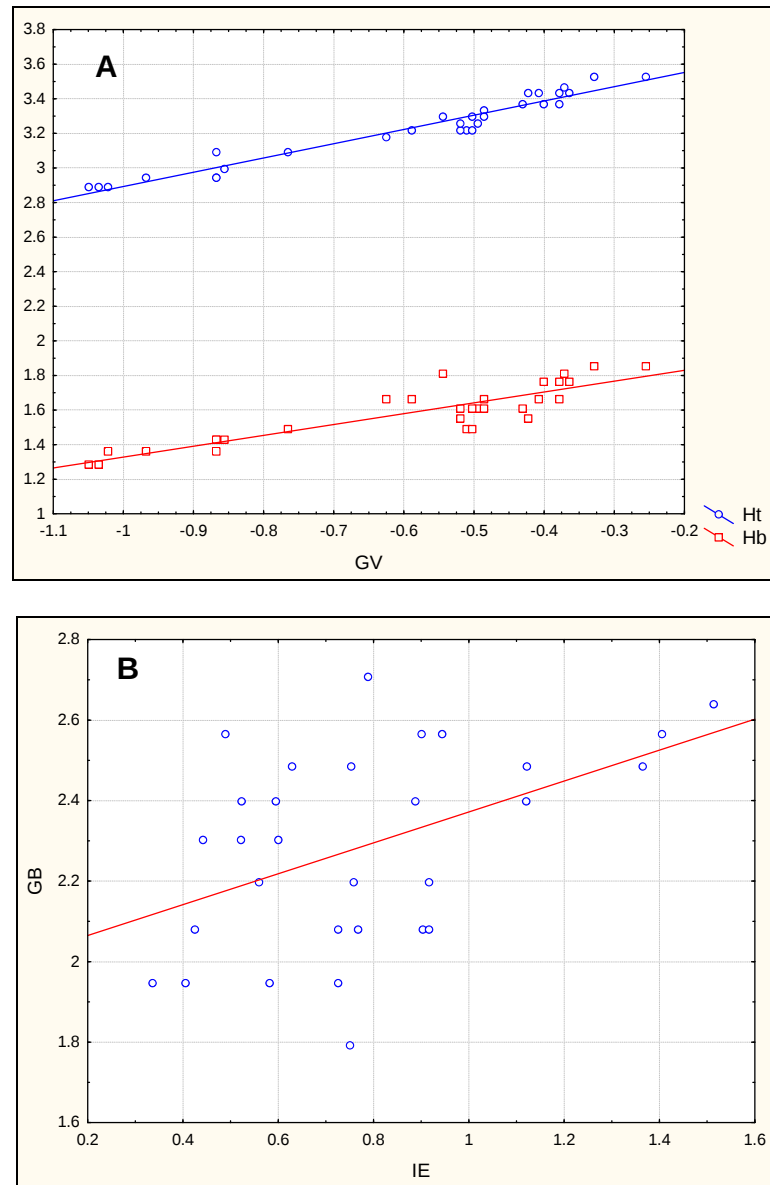


Figura 13. Correlações lineares positivas estabelecidas pelas avaliações em animais controle. **A)** Correlação positiva de 97% entre a contagem absoluta de eritrócitos (GV) e o hematócrito (Ht) ($r = 0,9733$; $p < 0,00001$), e de 89% entre a contagem absoluta de eritrócitos e a concentração de hemoglobina (Hb) ($r = 0,8875$; $p < 0,00001$). **B)** Correlação positiva de 46% entre o índice de estresse (IE) e a contagem total de glóbulos brancos (GB) ($r = 0,4647$; $p = 0,0097$).

Por outro lado, estabeleceu-se uma correlação linear negativa e fraca entre os valores de TEAC e a atividade enzimática da catalase nos espécimes controle ($r = -0,4316$; $p = 0,0173$), como ilustrado na Figura 14.

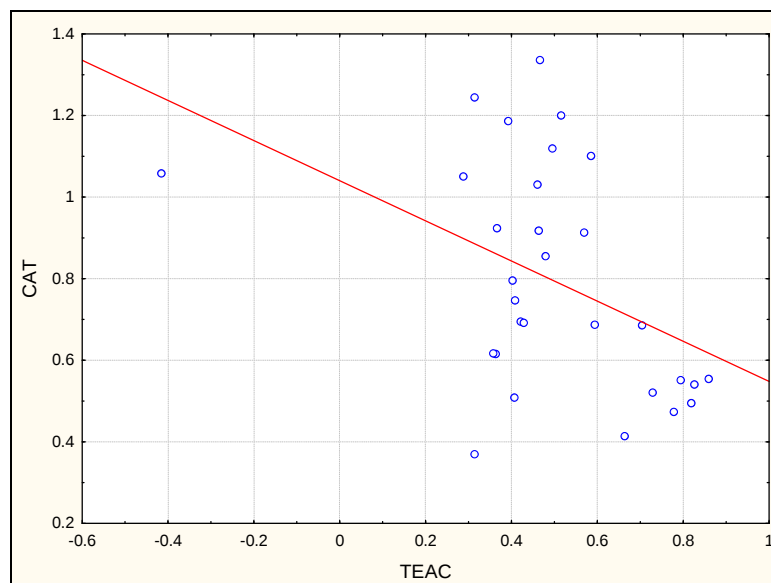


Figura 14. Correlação linear negativa de 43% entre os valores de TEAC e a atividade enzimática da catalase (CAT) dos animais do criatório ($r = -0,4316$; $p = 0,0173$).

Discussão



5. DISCUSSÃO

5.1. Análise de Hemograma

Os valores de glóbulos vermelhos e a concentração de hemoglobina dos espécimes do ambiente urbano encontram-se significativamente menores que os valores dos indivíduos do criatório, o que sugere que as condições ambientais do córrego interferiram na quantidade dos eritrócitos, o que pode prejudicar o suprimento de oxigênio dos animais e agravar os danos fisiológicos ocasionados pela exposição aos contaminantes. Valores da hematologia de vertebrados ectotérmicos exibem extensas variações inter e intra-específicas. Essas diferenças são atribuídas à nutrição, sexo, idade, dinâmica da população e condições ambientais (STACY; WHITAKER, 2000). A própria hidrodinâmica do rio pode influenciar nos valores de glóbulos vermelhos, pela força do fluxo de água estar relacionada ao esforço do nado e consequente consumo de oxigênio (FERRONATO et al., 2009).

Segundo Miyamoto, Vidal e Mello (2005), hemoglobinas de répteis revelam grandes variações quando as comparações são promovidas entre espécies de diferentes ambientes. Eventualmente, eritrócitos de répteis de locais com diferentes condições ambientais podem apresentar duração de vida diferente. Assim, as variações observadas na hemoglobina e contagem de eritrócitos podem ser explicadas, em parte, pelas diferenças entre os ambientes de estudo, principalmente, quando se observa o elevado índice de peroxidação lipídica nas amostras de animais de ambiente urbano, capaz de ocasionar um aumento na hemólise. Já às diferenças observadas nos índices hematimétricos, como são variáveis calculadas a partir do hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem de glóbulos vermelhos, foram provavelmente influenciadas por estes valores (FERRONATO et al., 2009), aos quais estão relacionados direta ou inversamente.

Os valores dos hemogramas dos espécimes de ambiente urbano mostraram-se alterados em relação ao padrão estabelecido, ao longo do estudo, para a

espécie nesta região, indicando maior suscetibilidade a danos ou constantes ajustes fisiológicos. Este dado sugere que os animais submetidos às influências das condições ambientais podem estar enfrentando infecções ou estresse. Contudo, não há resultados críticos de hemograma, indicando o potencial desses animais de se ajustarem às condições do meio.

Em relação à série branca, os valores totais de leucócitos apresentados pelos espécimes do córrego Felicidade mostraram-se significativamente elevados quando comparados aos valores de referência estabelecidos, e também em relação aos valores médios relatados para *Trachemis scripta* por Goulart (2004) e aos valores de *Phrynops geoffroanus* de outros rios da região sudeste do Brasil (BRITES; RANTIN, 2004; FERRONATO et al., 2009). A leucocitose é, geralmente, resultante de processo infeccioso, em resposta a microrganismos e poluentes, mas ainda pode ocorrer após situações de estresse e traumatismos, longa época de seca, altas temperaturas ou hipóxia (BRITES; RANTIN, 2004; GOULART, 2004). Em nosso estudo, pode indicar resposta à agressão ambiental por esgoto não tratado e despejos clandestinos, especialmente pela presença de microrganismos patogênicos, não excluindo a provável agressão por outros poluentes.

Apesar de apenas os eosinófilos diferirem no percentual do total de leucócitos, os altos valores da contagem de glóbulos brancos elevaram os valores absolutos de todos os tipos de leucócitos, em relação à faixa de normalidade relatada para diversas espécies de quelônios (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994; CANFIELD, 1998; GOULART, 2004; PITOL et al., 2008), e também em relação aos valores de referência estabelecidos pelo grupo controle. Esses leucócitos são responsáveis por respostas a infecções de origem bacterianas e infecções crônicas (monócitos, heterófilos e neutrófilos), participação em reações imunes (basófilos), defesa mediante quadro de infecção viral (linfócitos), resposta a infecções parasitárias (eosinófilos) e resposta inflamatória (azurófilos).

Embora os animais de ambiente apresentem leucocitose, até os valores obtidos para o controle mostraram-se mais elevados na contagem total e

diferencial do que os apresentados em outros estudos com a mesma espécie (BRITES; RANTIN, 2004; FERRONATO et al., 2009). Desta forma, poderia haver um perfil hematológico característico para a espécie na região de São José do Rio Preto, uma vez que o sistema imunitário reptiliano é afetado pelo ciclo sazonal. As variações climáticas produzem mudanças no ritmo neuroendócrino, o que afeta o sistema imune, a histologia dos órgãos linfóides e as funções dos leucócitos (ZAPATA et al., 1983; ZAPATA; VARAS; TORROBA, 1992; SOUZA, 2004; PITOL et al., 2008). Por outro lado, os animais do criatório apresentaram índice de estresse semelhante ao do córrego, indicando que o ambiente de cativeiro com área limitada também é uma situação estressante. Isto poderia alterar a produção de glóbulos brancos dos animais, o que explicaria o aumento de leucócitos observados neste estudo em relação aos outros trabalhos com a mesma espécie.

De acordo com o local de coleta dos animais, também houve diferença significativa na quantidade de trombócitos, que assim como os valores de glóbulos brancos, também apresentou aumento no grupo de ambiente urbano. A contaminação ambiental associada às altas temperaturas e má distribuição dos períodos de chuvas durante o ano, que caracterizam o clima da região, pode favorecer a exposição da espécie a diferentes microrganismos, aumentando sua demanda de leucócitos e também de trombócitos. Estes, além de atuarem na coagulação, têm outras funções importantes, respondendo à inflamação e promovendo a fagocitose (ROSSKOPF, 2000; GOULART, 2004; PITOL et al., 2008; FALCE, 2009; ZAGO et al., 2010).

Diferenças nos parâmetros hematológicos em relação ao sexo são comuns em algumas espécies de quelônios. Apesar de Ferronato e colaboradores (2009) não encontrarem diferenças nos parâmetros entre machos e fêmeas de *Phrynops geoffroanus* de vida livre; Brites (2002), comparando duas subpopulações dessa espécie no rio Uberabinha, observou diferenças quanto ao sexo nos parâmetros, hemoglobina, HGM, CHGM, contagem total de leucócitos e eosinófilos. Muito semelhante ao encontrado na comparação entre fêmeas e machos do criatório neste

estudo, no qual os valores de CHGM, HGM também foram maiores nos machos, enquanto o aumento de eosinófilos ocorreu nas fêmeas.

A frequência dos diferentes leucócitos pode variar em função da resposta a vários fatores como sexo, idade, sazonalidade, distribuição geográfica, efeitos ecológicos e condições patológicas (DUGUY, 1970; PITOL et al., 2008). A diferença entre os sexos no número de eosinófilos poderia ser uma resposta das fêmeas a estímulos antigênicos ou um caráter adaptativo ao maior esforço requerido na reprodução para produção e postura de grande número de ovos. Na comparação entre fêmeas e machos de ambiente urbano, os machos apresentaram maior quantidade de azurófilos, assim como observado por Brites (2002) na mesma espécie e no estudo de Hart e colaboradores (1991) com *Geochelone gigantea*.

Os dados hematológicos revelam influência das condições ambientais sobre o organismo em estudo, que apesar da capacidade de ajuste às adversidades do ambiente, necessita de um monitoramento eficiente das possíveis contaminações ambientais, de modo a propiciar um ambiente adequado à espécie na região e garantir sua preservação.

5.1.1. Índice de Estresse

O cativeiro pode ser uma situação estressante para quelônios (CASE; LEWBART; DOERR, 2005), assim como ambientes antropizados (RUIZ et al., 2002), principalmente quando poluídos. Portanto, para este parâmetro, o grupo de animais de criatório não pode ser considerado controle. Como também não há valores de referência de normalidade para este índice, nem estudos de longo prazo com animais de vida livre, não pode se afirmar com certeza que os valores estejam elevados ou diminuídos, apenas demonstrar a relação entre os grupos estudados. Apesar de todos os cuidados com os animais no criatório, a pequena área do recinto (~100 m²) e o grande número de animais por área são fatores estressantes e podem

alterar o comportamento desses animais. Além disso, não há nenhum fluxo de água e nem troncos para que possam escalar e se apoiarem para assoalhar.

Embora os animais de vida livre tenham uma grande área de atividade e deslocamento, que os permitam interagir melhor com o meio, as descargas contínuas de efluentes domésticos e industriais, além de ocasionar desequilíbrio ecológico, representam um grande estressor ambiental que acarreta a degradação da qualidade da água e, conseqüentemente, altera as comunidades biológicas desse ambiente aquático. Deste modo, os valores similares apresentados por ambos os grupos desta espécie pode ser indicativo de que ambos os ambientes apresentam condições estressantes, embora sejam estressores de origens diferentes.

Ferronato (2008) analisou animais de dois rios próximos a grandes centros urbanos, com pólos industriais e monoculturas ao redor, e um grupo de animais de cativeiro, provenientes da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Foi observado que o grupo de animais em cativeiro apresentou os maiores valores de índice de estresse, quando comparados aos outros, dando indícios que possam ser os animais mais estressados. Uma interpretação desse resultado poderia ser o fato de haver registro de dados populacionais e reprodutivos de *Phrynops geoffroanus* em rios urbanos poluídos, onde os animais apresentam elevada biomassa e densidade (SOUZA; ABE, 2000).

No presente estudo, os ajustes apresentados por animais de ambiente poluído, como aumento da capacidade antioxidante e aumento das defesas leucocitárias, embora não evitem danos oxidativos e outras alterações fisiológicas, mostram capacidade de resposta para reduzir o nível de estresse. Essa afirmação pode ser corroborada pelas populações de *Phrynops geoffroanus* existentes e com capacidade de reprodução nos rios urbanos poluídos, parecendo estar aptas a este tipo de ambiente.

5.2. Verificação de estresse oxidativo e ação indireta de radicais livres

Os mais altos níveis de TBARS apresentados pelos animais do córrego Felicidade, em comparação com os do local de referência, indicam danos causados por EROs e reforçam a associação existente entre exposição ao contaminante e aumento nos danos celulares. A peroxidação de lipídios representa uma consequência primária do estresse oxidativo celular e produz espécies reativas adicionais (por exemplo, 4 – hidroxinonenal, malondialdeído e outros aldeídos), que podem agravar a toxicidade (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). Deste modo, a concentração de TBARS tem sido largamente utilizada como indicador de danos oxidativos em diferentes organismos aquáticos, e é um dos biomarcadores que melhor respondem à presença de contaminantes prooxidantes (ALMEIDA et al., 2005; VOITURON et al., 2006).

A exposição dos organismos aos contaminantes prooxidantes aumenta a geração de EROs e induz o estresse oxidativo intracelular. A toxicidade das espécies reativas depende da sua reatividade e tempo de vida. Maior tempo de vida lhes permite difundir, interagir com substratos biológicos sensíveis e causar danos a várias organelas, interrompendo o desenvolvimento e diferenciação celular normal. O estresse oxidativo é citotóxico, pode causar numerosos efeitos deletérios às células, incluindo a peroxidação lipídica, inativação de enzimas, oxidação de bases de DNA, e degradação protéica, causando distúrbio morfológico-funcional da célula lesada, morte celular e danos aos órgãos (ALMEIDA et al., 2005; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008; KAUR; SANDHU, 2008).

A peroxidação lipídica é facilitada pela hemoglobina, um catalisador para a geração de radicais hidroxila, que podem se difundir para o exterior de hemácias danificadas após estresse. O ferro livre pode aumentar a geração de EROs e levar a dano oxidativo. Estudos sugerem que os tecidos do sistema cardiovascular podem ser suscetíveis ao ataque de espécies reativas (BAKER et al., 2007). No sangue, a função normal do eritrócito depende da integridade de sua

membrana, já que esta pode ser afetada por muitos produtos químicos tóxicos, os quais podem danificá-la, comprometendo as funções bioquímicas e fisiológicas dos eritrócitos. Danos oxidativos às células eritróides podem ocasionar hemólise, eritropoiese ineficaz e curta sobrevida dos glóbulos vermelhos na circulação. Glóbulos brancos também são expostos ao estresse oxidativo, o que pode resultar em infecções bacterianas recorrentes (ALMEIDA et al., 2005; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008; KAUR; SANDHU, 2008). Neste contexto, o estresse oxidativo induzido por xenobióticos presentes no córrego Felicidade é responsável pelo alto nível de peroxidação lipídica nas células sanguíneas, alterando os valores hematológicos dos espécimes deste local.

Parte da produção de EROs é endógena, resultante do próprio metabolismo, como subprodutos da respiração celular. Cerca de 2% do consumo de O_2 mitocondrial total resulta em formação de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Além da produção mitocondrial, EROs podem surgir como produto de reações enzimáticas. NADPH oxidases produzem EROs em resposta a estímulos exógenos, como parte da resposta imune inata das células fagocíticas à infecção ou para respostas de sinalização aos estímulos fisiológicos. Apesar da biotransformação resultar na detoxificação de muitos xenobióticos a metabólitos facilmente excretáveis, muitas vezes pode resultar também na ativação de espécies químicas mais reativas (ALMEIDA et al., 2005; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). Assim, a produção endógena de EROs pode ser responsável por pelo menos parte do aumento da peroxidação lipídica dos animais de ambiente urbano, uma vez que a maior atividade do sistema de defesa pode causar aumento das EROs, como subprodutos indiretos da atividade enzimática.

Além dos efeitos gerados pela interação direta dos poluentes com os constituintes celulares, estes ainda podem alterar o metabolismo dos organismos expostos a eles. Isto pode agravar os danos celulares, uma vez que o aumento na atividade metabólica favorece a ocorrência de lesões oxidativas em biomoléculas,

conforme demonstrado por Souza Jr, Oliveira e Perreira (2005), em estudos sobre estresse oxidativo com animais experimentais e seres humanos.

O valor de normalidade para TBARS apresentam grande variabilidade nos diversos estudos, estando relacionados com as condições experimentais utilizadas nos diferentes ensaios (STEGHENS et al., 2001; SIM et al., 2003). Desta forma, torna-se clara a necessidade de se determinar o intervalo de referência para cada método desenvolvido e para cada organismo analisado (ANTUNES et al., 2008), como realizado no presente trabalho, no qual o método mostrou-se importante para comparação de peroxidação lipídica entre os grupos de ambiente urbano e criatório.

A análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, incluindo indicadores de estresse oxidativo (como sistemas de defesa antioxidante, danos do DNA e peroxidação lipídica), é um instrumento útil na avaliação da saúde de animais silvestres, especialmente em organismos aquáticos. Estes estudos podem fornecer informações importantes sobre o estado fisiológico de espécies ameaçadas ou em perigo e sobre a saúde ambiental, podendo ser parte de um sistema de biomarcadores para examinar a qualidade ambiental em estudos de ambientes impactados, colaborando para o desenvolvimento desse sistema (ALMEIDA et al., 2007; VALDIVIA et al., 2007).

5.3. Verificação da capacidade antioxidante

Nossos dados revelaram um aumento significativo dos valores de TEAC para as amostras de animais de ambiente urbano, em relação às amostras de animais provenientes do criatório. Valores mais elevados de TEAC para as amostras dos espécimes de ambiente urbano indicam uma melhor resposta antioxidante e, um possível ajuste enzimático na tentativa de evitar danos causados por estressores locais. Mesmo em animais com extraordinária capacidade antioxidante, o estresse oxidativo pode, no entanto, ocasionar problemas durante longos períodos de

exposição aos contaminantes (BAKER et al., 2007). Apesar dos animais de ambiente urbano apresentarem aumento da capacidade antioxidante, essas defesas não foram suficientes para proteger o organismo após a persistência das condições estressoras ambientais e evitar acúmulo de produtos de danos oxidativos, conforme observado pelo aumento na concentração plasmática de TBARS. Essa elevação no plasma de produtos de peroxidação lipídica pode retratar a falta de capacidade do organismo em suportar o estresse oxidativo por longo tempo.

Todos os animais aeróbios dependem de defesas antioxidantes para evitar danos oxidativos aos componentes celulares. Baker e colaboradores (2007) descreveram várias adaptações bioquímicas e fisiológicas que permitem que animais ectotérmicos, como a tartaruga *Chrysemys picta*, hibernem no frio, em água anóxica sem risco de mortalidade. Muitos dos organismos tolerantes à anóxia aumentam as atividades das enzimas antioxidantes para prevenir dano oxidativo, que poderia resultar de EROs geradas durante a recuperação aeróbia após o mergulho (BAKER et al., 2007). No entanto, alterações importantes nos sistemas antioxidantes desses organismos podem ocorrer durante a privação de oxigênio (ALMEIDA et al., 2005), comprometendo a capacidade de detoxificação das EROs geradas. Abele e Puntarulo (2004) sugeriram que a produção de EROs em animais ectotérmicos pode ser elevada durante o estresse fisiológico. Sob estresse, alguns quelônios aquáticos mantêm altas atividades das enzimas antioxidantes para neutralizar qualquer espécie reativa gerada pelo metabolismo ou por compostos exógenos.

Os antioxidantes trabalham em conjunto, e a medição de apenas um ou alguns compostos pode ser enganosa. Deste modo, o ensaio TEAC foi útil na avaliação da capacidade antioxidante no plasma, demonstrando as respostas dos animais ao estresse oxidativo pelo aumento da sua capacidade antioxidante potencial. Porém, a análise de vias antioxidantes específicas pode esclarecer os efeitos específicos dos contaminantes e auxiliar na compreensão dos mecanismos bioquímicos de detoxificação e defesa antioxidante na espécie.

5.4. Atividades enzimáticas da CAT e da G6PDH

Fisiologicamente, o organismo pode se defender da agressão mediada pelas espécies reativas utilizando reservas antioxidantes celulares, que são constituídas por três sistemas de defesa antioxidante: enzimático, moléculas pequenas e o sistema de quelação de metais (NETO et al., 2005). Uma vez que as enzimas antioxidantes estão sob regulação de acordo com as necessidades, pode-se detectar um aumento nas suas atividades após a formação de EROs, como um mecanismo de proteção. Porém, animais de locais contaminados podem algumas vezes apresentar uma menor atividade de suas enzimas do que animais controles, provavelmente devido à presença de compostos inibitórios, como pesticidas e $O_2^{\cdot-}$, que podem inativar ou danificar a CAT e várias outras enzimas antioxidantes. Além disso, compostos oxidantes, tais como metais redox-ativos, induzem a heme oxigenase desencadeando o decaimento dos grupos heme, essenciais para a atividade da CAT (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008; VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2009).

Apesar da CAT não ser a única enzima a detoxificar o peróxido de hidrogênio, desempenha papel importante na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo e na resposta adaptativa das células (DEL RIO et al., 2002). Diminuições na atividade da CAT, em organismos de locais contaminados, podem resultar na redução da capacidade de neutralizar as EROs e também, no aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo, assim como observado por Pampanin e colaboradores (2005). Assim, a redução da atividade da CAT em 30% nos espécimes do local poluído pode aumentar a dificuldade em compensar o estresse oxidativo e, consequentemente, os danos celulares ocasionados pelo ataque das espécies reativas.

Estudo com mexilhões transplantados para áreas impactadas por diferentes atividades antrópicas ao longo do litoral grego também encontraram atividades da CAT significativamente inferiores nos locais impactados quando comparadas aos locais de referência (TSANGARIS et al., 2010). A resposta da CAT aos produtos químicos tóxicos muitas vezes demonstra um aumento inicial na

atividade devido à indução enzimática, seguida pela diminuição na atividade devido ao reforço da taxa catabólica e/ou inibição direta por produtos químicos tóxicos (VIARENGO et al., 2007). Tais tendências nas atividades da CAT podem ser encontradas nos organismos de locais poluídos de acordo com os níveis e duração da exposição aos poluentes. Esta enzima responde a uma ampla gama de contaminantes capazes de produzir EROs, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs), metais pesados, pesticidas (TSANGARIS et al., 2010), de modo que a evidente alteração observada na atividade da CAT esteja relacionada aos diferentes poluentes presentes no córrego, provenientes da contaminação por fontes difusas urbanas, industriais e agrícolas.

A G6PDH é uma enzima vital para todas as células, pois catalisa a primeira etapa da via metabólica do ciclo das pentoses, enquanto reduz NADP^+ a NADPH, o qual é utilizado nas vias de proteção contra danos oxidativos (BILMEN et al., 2001). A redução de NADP^+ a NADPH permite sua reutilização no metabolismo, em muitas reações biossintéticas, detoxificação e remoção de EROs. NADPH além de ser necessário para a manutenção da atividade da catalase, também a protege de dano oxidativo ligando-se a ela para evitar sua conversão para o estado inativo (DEL RIO et al., 2002; DEL RIO et al., 2005).

Apesar do aumento da G6PDH em 66,18% e, conseqüentemente, de NADPH nos indivíduos do córrego Felicidade, sua atividade não foi suficiente para prevenir a redução da atividade da CAT e protegê-la de compostos inibitórios. Possivelmente, a atividade de G6PDH está sendo requisitada por outros sistemas antioxidantes dependentes de NADPH, tais como o citocromo P450 e a glutatona, que são vias importantes nas fases I e II do metabolismo de biotransformação de xenobióticos e, provavelmente, devem estar em maior atividade, devido à grande quantidade de poluentes do córrego Felicidade. Deste modo, a NADPH produzida estaria sendo utilizado por sistemas ativos, não restando moléculas livres para se ligarem à CAT. Não foi possível estabelecer a ordem das alterações enzimáticas, apesar dos valores de G6PDH não estarem elevados nas primeiras coletas, de modo

que a redução da CAT pode ter ocorrido anteriormente ao aumento da atividade de G6PDH, e o organismo ainda não ter conseguido recuperar os níveis normais da CAT.

Como a catalase é indispensável para detoxificação de EROs durante o estresse, a diminuição da atividade observada sugere um estado precário caracterizado por uma maior suscetibilidade ao estresse ambiental e potencial efeito adverso. Como a G6PDH é responsável por gerar NADPH para sua reutilização em vários sistemas de biotransformação de xenobióticos, essa indução pode ser considerada um ajuste dos organismos ao ambiente para evitar danos fisiológicos. Apesar destas respostas, há outros sistemas antioxidantes respondendo às agressões ambientais e produção de EROs, e é possível que essas outras vias de detoxificação de xenobióticos estejam em alta atividade, o que justificaria o valor aumentado da capacidade antioxidante detectada pelo ensaio TEAC para os indivíduos do ambiente. O aumento na concentração de TBARS nos animais de ambiente poluído pode indicar que a capacidade antioxidante inata não foi suficiente para proteger o organismo frente a persistência das condições estressoras.

A toxicidade dos produtos depende do tempo e da concentração a que se está exposto. Muitos dos efeitos de pesticidas, por exemplo, são crônicos e podem ter consequências para todo o ecossistema, incluindo lesões e morte em animais, supressão do sistema imune, alterações do sistema endócrino, inibição ou falha reprodutiva, efeitos teratogênicos e carcinogênicos, alterações celulares e moleculares, incluindo danos de DNA (POLETTA et al., 2008). Fatores diferentes podem ser alistados para explicar a maior suscetibilidade de espécies aquáticas, como a taxa de bioacumulação e eliminação de metais de transição, que contribuem para realçar a formação de danos, diferenças relacionadas à taxa metabólica, ou à eficiência das defesas antioxidantes e/ou os mecanismos de reparo, mas estas permanecem pouco esclarecidas (ALMEIDA et al., 2007).

Piña e colaboradores (2009) avaliaram a concentração de metais em amostras sanguíneas de *Phrynos geoffroanus*, provenientes de local contaminado

com metais pesados, e encontraram presença de vários metais no plasma desses animais, sendo os níveis plasmáticos de cobre e chumbo os mais altos já descritos em répteis. Porém, nenhum sinal clínico de patologia foi detectado. Embora atualmente esta contaminação não seja patológica, não há informação sobre o tempo necessário para que esses contaminantes exerçam alterações fisiológicas e causem danos aos organismos, de modo que, tal contaminação poderia, por exemplo, afetar o sucesso reprodutivo da população, em alguns anos. Do mesmo modo, em nosso estudo, embora o grupo experimental analisado tenha alterações nos parâmetros bioquímicos, com peroxidação lipídica da membrana e alterações nas defesas antioxidantes causados por poluentes, os animais também não apresentam sinais clínicos de patologia grave e a população persiste no local, indicando a grande tolerância à contaminação apresentada pela espécie.

5.5. Análise de Correlação

A forte correlação positiva da contagem absoluta de eritrócitos com o hematócrito e a concentração de hemoglobina foi também observada no estudo de Brites (2002) com a mesma espécie. Esta associação já era esperada, tanto para o grupo de ambiente urbano, como para o controle; uma vez que estes parâmetros são intimamente relacionados. Como os eritrócitos são carreadores de hemoglobina, proteína de enorme importância no transporte de gases, a quantidade de eritrócitos, considerando um volume celular normal, é diretamente proporcional à concentração de hemoglobina, correlação também estabelecida para o quelônio asiático *Trionyx gangeticus* (VERMA; BANERJEE, 1981). Uma vez que o hematócrito exprime a porcentagem do volume ocupado pelos glóbulos vermelhos, em geral, um aumento do hematócrito indica maior proporção de glóbulos vermelhos. Destaca-se que, embora o grau dessas associações tenha sido forte, o percentual de correlação do grupo controle foi muito maior, o que destaca que seus valores hematológicos

encontram-se mais próximo ao esperado, sem grandes variações como observado nos os animais do córrego.

A correlação positiva entre a concentração de TBARS e a atividade da catalase dos animais de ambiente urbano deve-se à relação desta enzima antioxidante e os níveis de peroxidação lipídica observados. A catalase pode sofrer uma indução inicial, com aumento na sua atividade, na tentativa de combater o desequilíbrio do estado oxidativo pelo excesso das EROs geradas. Porém, como há uma inibição da catalase neste ambiente, as EROs, que seriam em parte neutralizadas pela catalase não fosse sua inibição, geram maior nível de peroxidação lipídica, o que eleva a concentração de TBARS. Contudo, há outros fatores atuando sobre essas variáveis, visto que o grau da associação entre as variáveis foi fraco.

Já a atividade enzimática da G6PDH se correlacionou negativamente à concentração de hemoglobina no grupo do ambiente urbano. Nos eritrócitos esta enzima é a única fonte de NADPH, o que torna G6PDH essencial para proteger a hemoglobina e prevenir a oxidação da membrana (SÁNCHEZ et al., 2003; BEUTLER, 2008). Além disso, NADPH também é capaz de se ligar a algumas hemoproteínas, como é o caso da hemoglobina, o que ajuda na proteção contra ação das EROs (DEL RIO et al., 2002; DEL RIO et al., 2005). G6PDH foi induzida pela geração de espécies reativas, porém seu aumento não foi suficiente para evitar danos oxidativos, que podem gerar hemólise, com perda de hemoglobina ou agirem diretamente sobre esta, danificando-a.

O índice de estresse, por sua vez, mostrou-se associado a vários parâmetros no grupo do córrego Felicidade: concentração de TBARS, contagem absoluta de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos. Como este índice utiliza a razão de heterófilos por linfócitos, a correlação positiva com heterófilo e negativa com linfócito resultam do próprio cálculo. A outra variável com a qual o índice de estresse apresentou correlação positiva foi TBARS. Apesar dessa associação fraca, é plausível que um aumento na peroxidação lipídica das membranas, considerada a principal causa de morte celular, ocasione um estresse maior ao organismo.

A correlação entre o índice de estresse e a contagem total de leucócitos foi negativa, assim como a correlação entre o índice de estresse e a maioria dos tipos leucocitários. Uma vez que os glóbulos brancos são células de defesa do organismo, sua produção é elevada em um ambiente poluído e que também apresenta microrganismos patogênicos. Este aumento da defesa leucocitária é capaz de reduzir o nível de estresse, atenuando os danos que esses estressores causariam ao organismo. Isto explica o fato do índice de estresse não ser criticamente elevado na presença de tantos estressores ambientais.

Ao contrário dos animais do córrego, a correlação entre o índice de estresse e a contagem total de células brancas foi positiva para os espécimes do criatório. Como os leucócitos são requisitadas conforme a necessidade, um fator gerador de estresse que atue sobre o organismo, pode induzir a produção de leucócitos como um mecanismo de defesa.

Embora os espécimes do criatório apresentem capacidade antioxidante e atividade das enzimas analisadas, consideradas normais, a correlação estabelecida entre os valores de TEAC e a atividade da catalase foi negativa. Uma explicação provável seria que a capacidade antioxidante desses organismos, que é menor e mais estável, não esteja sendo requisitada além da taxa normal de combate a espécies reativas do metabolismo endógeno. Porém, as espécies aquáticas são sujeitas à maior variação na taxa de oxigênio disponível, por exemplo, durante mergulhos anaeróbios. Tal como outros répteis tolerantes à hipóxia, *P. geoffroanus* lida com uma quantidade significativa de EROs gerados como consequência da isquemia e reperusão associados com o mergulho. Deste modo, a catalase nesses animais estaria presente para responder às EROs geradas pelo próprio metabolismo endógeno e em situações de hipóxia. Como inúmeros outros antioxidantes estão envolvidos no valor do TEAC, a correlação é fraca, pois a catalase não poderia ter uma resposta tão expressiva na capacidade antioxidante geral do organismo.

5.6. Considerações finais

Apesar da riqueza e diversidade, a pesquisa sobre a fauna de répteis no Brasil é restrita e menos ainda se sabe sobre as características hematológicas e bioquímicas de répteis em ambientes alterados em consequência às diferentes influências antrópicas. Estudos que monitorem os efeitos da degradação e da poluição dos ecossistemas naturais são fundamentais para aprimorar o entendimento desse grupo e delinear estratégias de conservação efetivas que preservem o potencial evolutivo das linhagens existentes (RODRIGUES, 2005). Deste modo, as análises dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, incluindo indicadores de estresse oxidativo, mostram-se importantes na avaliação da saúde de animais silvestres (VALDIVIA et al., 2007). A mensuração do estresse oxidativo é uma ferramenta eficaz para a avaliação da saúde de espécies ameaçadas ou em perigo, além de bom biomarcador no monitoramento de ambientes impactados, como demonstrado neste estudo, no qual revelou a ameaça que os poluentes do córrego Felicidade representam para a população de *Phrynops geoffroanus*, afetando a fisiologia desses animais.

O Estado de São Paulo destaca-se como o maior consumidor de pesticidas do Brasil (GARBELLINI; ULIANA, 2007). A toxicidade aguda de pesticidas é bem documentada, mas pouca atenção tem sido dada aos efeitos crônicos de baixas doses, que podem não ter sintomas clinicamente reconhecíveis, mas poderiam produzir efeitos metabólicos cumulativos que eventualmente afetam a saúde e o desempenho geral de um animal (KAUR; SANDHU, 2008). Os efeitos da exposição a contaminantes em longo prazo precisam ser compreendidos para delinear estratégias de conservação apropriadas. O monitoramento de populações de répteis é essencial em situações como esta, para melhor avaliar a influência ambiental na fisiologia da espécie e verificar o potencial dos compostos poluentes de causarem lesões oxidativas e as respostas dos organismos a essas agressões (RODRIGUES, 2005; POLETTA et al., 2008).

O presente estudo mostrou o comprometimento ambiental do córrego Felicidade, onde a degradação e assoreamento, juntamente com a contaminação e baixa disponibilidade de oxigênio na água, resultaram no desaparecimento dos peixes e de grande parte da vegetação. Atualmente, o local é habitado principalmente por quelônios, cuja respiração é essencialmente pulmonar e, que persistem e se reproduzem no local, apesar de terem a fisiologia e sobrevida comprometidas pela contaminação. Outro fato importante é que os poluentes ou contaminantes, como efluentes domésticos e industriais, carga difusa urbana e agrícola, podem ser transportados a longas distâncias, propagando-se pelas águas, alterando suas características naturais de qualidade e determinando impactos negativos e/ou riscos sobre os organismos, localizados na própria área ou em seus arredores. A ausência de controle dos resíduos despejados no afluente submete os organismos ali presentes à exposição a diversos contaminantes, colocando em risco a qualidade de vida e comprometendo a saúde e sobrevivência desses animais, a longo prazo. Essas condições podem influenciar nos hábitos de vida e condições fisiológicas do animal. Compostos químicos tóxicos presentes no córrego Felicidade podem ocasionar aumento na frequência de micronúcleos, indução de aberrações cromossômicas, demonstrada pela análise de fragmentação do DNA no ensaio cometa, e outros danos oxidativos, confirmando o potencial mutagênico, genotóxico e citotóxico dos poluentes sobre a espécie (SILVA, M., 2009).

Além da peroxidação lipídica das membranas, os altos níveis de TBARS indicam a formação de adutos de DNA. Estes resultam da reação dos aldeídos, liberados durante a quebra de peróxidos lipídicos, com as bases do DNA, e podem gerar aumento da frequência de micronúcleos e aberrações cromossômicas observadas por Silva, M. (2009). Outro estudo envolvendo dois organismos modelos, *Allium cepa* (cebola) e *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo), também evidenciaram o comprometimento dos recursos hídricos superficiais da cidade de São José do Rio Preto. A água da represa municipal apresentou-se poluída com metais pesados como cobre, ferro, manganês, chumbo, alumínio, zinco e cádmio, os quais provocaram

alterações a nível celular nos dois organismos-testes anteriormente citados (MASCHIO, 2008).

O desenvolvimento de um sistema de biomarcadores para avaliar o estado de saúde de quelônios e detectar precocemente a exposição a contaminantes ambientais e outros estressores, proporcionaria um instrumento útil para a conservação das espécies aquáticas e poderia ser usado como referência em áreas onde a poluição e outros impactos ambientais têm ameaçado as populações (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998; VALDIVIA et al., 2007). Em nossa contribuição, temos padronizado e aplicado as análises de hemograma, TBARS, TEAC e atividade das enzimas antioxidantes CAT e G6PDH em amostras sanguíneas de *P. Geoffroyanus* e confirmado a influência da poluição e degradação ambiental sobre os parâmetros hematológicos, estado oxidativo e atividades antioxidantes da espécie, por comparação com um grupo controle da mesma região.

As alterações hematológicas refletem as más condições ambientais do córrego, que acarretam danos fisiológicos como, por exemplo, redução de eritrócitos circulantes e da concentração de hemáceas, prejudicando o suprimento de oxigênio dos animais. Por outro lado, os aumentos nas quantidades de trombócitos e leucócitos demonstram ajustes fisiológicos para combater microrganismos patogênicos ou, os mecanismos de proteção a infecções e inflamações.

Os danos oxidativos, que podem ser responsáveis por parte da redução eritrocitária devido à hemólise, confirmam o potencial citotóxico dos contaminantes e o desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes. Os poluentes presentes no córrego também geram alterações nas atividades antioxidantes dos organismos; podendo reduzir a atividade de algumas enzimas, como ocorreu com a catalase, por provável presença de compostos inibitórios. Porém, há indução enzimática, com elevação da atividade de outras enzimas antioxidantes, conforme demonstrado pela G6PDH, sendo provavelmente requisitada para geração de NADPH utilizada em outras vias de detoxificação de xenobióticos, que explicariam o aumento da capacidade antioxidante dos espécimes, detectada pelo ensaio TEAC. Apesar deste

aumento não ser suficiente para evitar danos oxidativos, alterações hematológicas e bioquímicas, os animais do ambiente urbano demonstraram vários ajustes que respondem à persistência das condições estressoras locais, permitindo a proliferação da população neste habitat e evitando patologias mais graves, que poderiam ser letais.

Os resultados globais confirmam o valor potencial da dosagem de TBARS como ferramenta para avaliação de agentes citotóxicos, e a utilização do ensaio TEAC para avaliar a capacidade antioxidante de amostras biológicas de quelônios, refletindo a atividade antioxidante geral do organismo. O uso conjunto dessas técnicas mostra-se útil como instrumento de monitoramento ambiental, auxiliando no delineamento de estratégias visando a conservação de quelônios de vida livre. Os dados fornecidos aqui são úteis para futuros estudos que envolvam o biomonitoramento das regiões naturais onde ocorre *P. geoffroanus*, empregando esta espécie como organismo sentinela de avaliação da qualidade ambiental.

Conclusões



6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados neste estudo, conclui-se que:

1) Há grande variação nos parâmetros hematológicos de *Phrynos geoffroanus* de ambiente urbano, quando comparado aos valores de referência do grupo controle, por influência ambiental, com redução significativa dos valores de glóbulos vermelhos e hemoglobina. Há aumento significativo na quantidade de leucócitos e trombócitos nos espécimes do córrego Felicidade, como resposta à agressão ambiental por esgoto não tratado e presença de microrganismos patogênicos. Porém, os valores similares entre os índices de estresse de ambos os grupos indicam que a condição de cativeiro também é estressante e, que os ajustes fisiológicos dos animais do córrego possibilitam a persistência e reprodução no ambiente poluído.

2) O aumento da concentração de TBARS no plasma dos quelônios indica o potencial citotóxico dos compostos presentes no córrego Felicidade, pois os espécimes coletados nesse local apresentaram níveis mais altos de peroxidação lipídica em comparação com os espécimes do grupo controle, corroborando a associação entre a exposição ao contaminante e o aumento de danos oxidativos.

3) Nos animais do ambiente urbano foi encontrada uma resposta aos danos ambientais, indicada pelo aumento da capacidade antioxidante, detectada pelo ensaio TEAC. Apesar deste aumento, as defesas antioxidantes não foram suficientes para proteger o organismo, com a persistência das condições estressoras.

4) A redução na atividade da enzima catalase no grupo do ambiente urbano pode ser devido à presença de compostos inibitórios. A atividade elevada da enzima G6PDH se deve à requisição para geração de NADPH, utilizada em outras vias de detoxificação, explicando o aumento na capacidade antioxidante.

Referências



REFERÊNCIAS

- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology- Part A**, v. 138, n. 4, p. 405–415, 2004.
- AGUIRRE, A.A. et al. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 68, n. 5, p. 831-854, 1995.
- ALMEIDA, E.A. et al. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 318, p. 21-30, 2005.
- ALMEIDA, E. A. et al. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 146, p. 588-600, 2007.
- ALMOSNY, N.R.P.; MONTEIRO, A.O. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO DIAS, J.L. **Tratado de Animais Selvagens**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 59, p.939-966.
- ANTUNES, M. V. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 279-287, 2008.
- ARTS, M.J.T.J. et al. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. **Food Chemistry**, v. 80, p. 409–414, 2003.
- BAKER, P.J. et al. Oxidative stress and antioxidant capacity of a terrestrially hibernating hatchling turtle. **J Comp Physiol B**, v. 177, n. 8, p. 875–883, 2007.
- BANNI, M. et al. Mixture toxicity assessment of cadmium and benzo[a]pyrene in the sea worm *Hediste diversicolor*. **Chemosphere**, v.77, p. 02-906, 2009.
- BÉRNILS, R. S. (org.). 2010. **Brazilian reptiles – List of species**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em: 17 de Nov. 2010.

- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. Ed. Grune & Stratton– New York, 1975.
- BEUTLER, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. **Blood**, v. 111, p. 16-24, 2008.
- BILMEN, S. et al. Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 303, p. 83-86, 2001.
- BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p.248–254, 1976.
- BRITES, V. L. C. **Hematologia, bioquímica do sangue, parasitologia, microbiologia, algas epizoárias e histopatologia de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudinata, Chelidae), expostos a diferentes influências antrópicas no rio Uberabinha, Minas Gerais**. 2002. 196 f. Tese de doutorado em Ecologia e Recursos Naturais. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos, 2002.
- BRITES, V. L. C.; RANTIN, F. T. Hematologia, bioquímica de sangue, parasitologia, microbiologia, algas epizoárias e histopatologia de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudinata, Chelidae), expostos a diferentes influências antrópicas no rio Uberabinha, Minas Gerais. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 7, n. 1, 2004.
- CAMPBELL, T.W. Hematology of Reptiles. In: THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; DENICOLA, D.; CAMPBELL, T.W.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 1. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 2004. cap.18, p.259-276.
- CANFIELD, P. J. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 12, p. 793-800, 1998.
- CASE, B.C.; LEWBART, G.A.; DOERR, P.D. The physiological and behavioural impacts of and preference for an enriched environment in the eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*). **Applied Animal Behaviour Science**, Edinburgh, v. 92, p. 353-365, 2005.

CEPAGRI. Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura (UNICAMP). **Clima dos Municípios Paulistas**, 2010. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br>>. Acesso em: 17 de Nov. 2010.

COLBORN, T. The wildlife/human connection: modernizing risk decisions. **Environmental Health Perspectives**, v.102, p.55-59, 1994.

COSSU, C. et al. Antioxidant Biomarkers in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, in Response to Different Contamination Profiles of Aquatic Sediments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, n. 2, p. 106-121, 2000.

DEL RIO, D. et al. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v.15, p. 316-328, 2005.

DEL RIO, L.A. et al. Reactive oxygen species, antioxidants systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n.372, Antioxidants and Reactive Species in Plants Special Issue, p. 1255-1272, 2002.

DIONÍSIO-SESE, M. L.; TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science**, Strasbourg, v. 135, p. 1-9, 1998.

DUGUY, R. Number of blood cells and their variation. In: GANS, C.; PARSON, T. S. **Biology of the reptilia**. New York: Academic Press, 1970. v. 3, p. 93-109.

ERNEST, C. H.; BARBOUR, R. W. **Turtles of the World**. Washington D. C.: Smithsonian Institution Press, 1989. p. 29-30, 182-183, 209-210.

FALCE, M.C.L.B. **Hematologia de répteis - revisão bibliográfica**. 2009. 53. F. Monografia de conclusão do curso de Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos. Universidade Castelo Branco. Instituto Quallitas de pós-graduação. Campinas, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERRONATO, B.O. **Phrynops geoffroanus (Testudines, Chelidae) em ambiente antrópico: perfil hematológico e microbiota oral**. 2008. 64 f. Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), Piracicaba, 2008.

- FERRONATO, B. O. et al. Notes on the hematology of free-living *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in polluted rivers of Southeastern Brazil. Short Communication – **Zoologia**, v. 26, n. 4, p. 795-798, 2009.
- FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The Role of Oxidative Stress in Hemolytic Anemia. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 7, p. 609-619, 2008.
- FOSSI, M.C. Nondestructive Biomarkers in Ecotoxicology. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, Supplement 12, p. 49-54. 1994.
- GALINDO, T. P.; MOREIRA, L. M. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 2, p. 394-398, 2009.
- GARBELLINI, G.S.; ULIANA, C.V. Toxidez, degradação no meio ambiente e métodos eletroanalíticos de detecção do pesticida carbaril. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 17, p. 29-36, 2007.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. **Manual de Hematologia Veterinária**. 1. Ed. São Paulo: Livraria Varela Ltda., 1994, p. 69-71, 123-132.
- GENOY-PUERTO, E. A. **Citometria de fluxo de leucócitos sanguíneos de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) provenientes de ambientes poluídos: metodologia de isolamento e estimulação**. 2008. 103. F. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008.
- GLOCK, G.E.; McLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal**, v. 55, n.3, p. 400-408, 1953.
- GOULART, C. E. S. **Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis**. Ed L. F. Livros de Veterinária Ltda, 1.ed., 2004. p. 21-56, 99-108, 131-144.
- GROSS, W.B.; SIEGEL, H.S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 27, n. 4, p. 972-979, 1983.
- GÜL, S. et al. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International**, v. 30, p. 605-609, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, Oxford, 4. ed, 2007.

HART, M. G. et al. An analysis of haematological findings on a feral population of Aldabra giant tortoises (*Geochelone gigantea*). **Comparative Haematology International**, v. 1, p. 145-149, 1991.

JHA, A.N. et al. Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Mutation Research**, v.464, p.213-228, 2000.

KAUR, R.; SANDHU, H.S. *In vivo* changes in antioxidant system and protective role of selenium in chlorpyrifos-induced subchronic toxicity in *bubalus bubalis*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 26, p. 45-48, 2008.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 182-186, 2003.

LANCE, V.A.; ELSEY, R.M. Plasma catecholamines and plasma corticosterone following restraint stress in juvenile alligators. **Journal of Experimental Zoology**, Philadelphia, v. 283, p. 559-565, 1999.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, p. 137-147, 2009.

MACHADO, C.C. et al. Seasonal influence on hematologic values and hemoglobin electrophoresis in brazilian *Boa constrictor amarali*. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 4, p. 487-491, 2006.

MARQUES, R.; BERTI, M. Córregos se transformam em lixões aquáticos. **Jornal Diário da Região**. São José do Rio Preto, 27 set. 2009. Disponível em: <<http://www.google.com.br/search?hl=ptBR&q=diario+da+regi%C3%A3o+sjpg+16%2F11+polui%C3%A7%C3%A3o+dos+rios&meta=&aq=f&oq>>. Acesso em: 18 nov. 2009.

MASCHIO, L.R. Avaliação do Potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto/SP. **Tese de Doutorado**, Programa de Pós-Graduação em Genética – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2008.

- MILLER N. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.
- MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 135-147, 1998.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Review - TRENDS in Plant Science**, v.7, n. 9, p.405-410, 2002.
- MIYAMOTO, M.; VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. S. Chromatin supraorganization, DNA fragmentation, and cell death in snake erythrocytes. **Biochemistry and Cell Biology**, Canada, v. 83, p. 15-27, 2005.
- NATT, M. P.; Herrick, C. A. A new diluent for counting the erythrocytes and leukocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, p. 735-737, 1952.
- NETO, A. F. et al. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 134-139, 2005.
- NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
- PAMPANIN, D.M. et al. Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 140, p. 41-52, 2005.
- PERCÁRIO, S. et al. Dosagem do Malondialdeído (MDA). **NewsLab**, ANO II, n. 6, p.46-50, 2004.
- PIÑA, C.I. et al. Heavy Metal Contamination in *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) in a River Basin, São Paulo, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 6, p. 771-775, 2009.
- PITOL, D.L. et al., Radioautographic study of the seasonal distribution of leukocytes in turtles *Phrynops hilarii* (Chelonia Chelidae). **Micron**, v. 39, n. 8, p. 1381-1386, 2008.

- POLETTA, G.L. et al., *Caiman latirostris (broad-snouted caiman)* as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. **Mutation Research: Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis**, v. 650, p. 202-209, 2008.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **Vertebrate life**. Pearson Prentice Hall, 7. ed., 2005.
- PRITCHARD, P. C. H.; TREBBAU, P. **The Turtles of Venezuela**. Fundación de Internados Rurales (Venezuela), Society for the study of Amphibians and Reptiles, 1984. p. 111-117.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad Biol Med** v.26, p.1231-1237, 1999.
- RIDLEY, M. **Evolução**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2006, 752 p.
- RODRIGUES, M.T. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 87-94, 2005.
- ROSSKOPF, W.J. Jr. Disorders of reptilian leukocytes and erythrocytes. In: Fudge A.M. (Ed.), **Laboratory Medicine: Avian and exotic pets**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p.198-204.
- RUIZ, G. et al. Hematological parameters and stress index in rufous-collared sparrows dwelling in urban environments. **The Condor**, Albuquerque, v. 104, p. 162-166, 2002.
- SÁNCHEZ, T.A. et al. Anemia hemolítica por deficiência de G6PD y estrés oxidativo. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 22, n. 3, p. 186-191, 2003.
- SHAFTER, H. B. Turtles (Testudines). In: HEDGES, S. B.; KUMAR, S. **The Timetree of Life**. 1.ed. New York, United States: Eds. Oxford University Press, 2009. cap. 55, p. 398-401.
- SIEGEL, H.S. Physiological stress in birds. **Bioscience**, Washington, v. 30, p. 529-534, 1980.
- SILVA, M.I.A. **Perfil hematológico e estresse por influência ambiental em *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae)**. 2009. 52. F. Monografia de

- Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2009.
- SILVA, M.I.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Atividade peroxidásica em basófilos de *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). Imagens em Hematologia Clínica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 6, p. 500, 2010.
- SILVA, M.I.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Fosfatase ácida em esfregaços sanguíneos de *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). Imagens em Hematologia Clínica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2011 - in press.
- SILVA, W.B. et al. Avaliação da resposta hematológica em cascavéis (*Crotalus durissus* Linnaeus, 1758) inoculadas com BCG. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 12, p. 985-992, 2009.
- SIM, A.S. et al. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. **Journal of Chromatography B**, v. 785, n. 2, p.337-344, 2003.
- SOUZA, F.L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, v. 3, n. 1, p. 15-27, 2004.
- SOUZA, F.L.; ABE, A.S. Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting a polluted urban river in south-eastern Brazil. **Journal of the Zoological Society of London**, London, v. 252, p. 437-446, 2000.
- SOUZA Jr, T. P.; OLIVEIRA, P. R.; PEREIRA, B. Exercício físico e estresse oxidativo - Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. **Revista Brasileira Med. Esporte**, Niterói, v. 11, n. 1, p. 91-96, 2005.
- SREENIVASULU, N. et al. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. **Plant Science**, Strasbourg, v. 141, p. 1-9, 1999.
- STACY, B.A.; WHITAKER, N. Hematology and blood biochemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 31, n. 3, p. 339–347, 2000.

STEGHENS, J. P. et al. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 242-249, 2001.

STORER, I. S. et al. **Zoologia Geral**. 6. ed., São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2000.

TROIANO, J. C.; SILVA, M. C. Valores hematológicos de referência em tortugas terrestres Argentina (*Chelinoidis chilensis chilensis*). **Analecta Veterinária**, v. 18 ½, p. 47-51, 1998.

TSANGARIS, C. et al. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, p. 369-378, 2010.

TURTLE TAXONOMIC WORKING GROUP (RHODIN, A.G.J.; VAN DIJK, P.P.; IVERSON, J.B.; SHAFFER, H.B.) Turtles of the world, 2010 update: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. **Chelonian Research Monographs**, n. 5, p.85-164, 2010.

VALDIVIA, P.A. et al. Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizi*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 111-117, 2007.

VAN DEN BERG, R. et al. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry: Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section**, v. 66, p. 511-517, 1999.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VERMA, G. K.; BANERJEE, V. The erythrocytes and related blood parameters of a common indian turtle *Trionyx gangeticus*. **Annales Zoologici Fennici**, v. 18, p. 135-146, 1981.

VIARENGO, A. et al. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 3, p. 281-300, 2007.

- VIOQUE-FERNÁNDEZ, A. et al. Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: Integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 1784-1797, 2009.
- VOITURON, Y et al. Oxidative DNA damage and antioxidant defenses in the European common lizard (*Lacerta vivipara*) in supercooled and frozen states. **Cryobiology**, v. 52, p. 74-82, 2006.
- WHITACKER, A.M. Inovações tecnológicas, mudanças nos padrões locacionais e na configuração em cidades médias. **Scripta Nova**, v. XI, n. 245, 2007.
- WYNEKEN, J. The anatomy of sea turtles. **National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA Technical Memorandum, National Marine Fisheries Services)**, 2001, 172p.
- YAGI, K. A Simple Fluorometric Assay for Lipoperoxide in Blood Plasma. **Biochemical Medicine**, v. 15, n. 2, p. 212-216, 1976.
- ZAGO, C.E.S. **Anatomia do aparelho reprodutor e hematologia de *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae)**. 2007. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2007.
- ZAGO, C.E.S. et al. Morphological, morphometrical and ultrastructural characterization of *Phrynops geoffroanus*’ (Testudines: Chelidae) blood cells, in different environments. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1005-1010, 2010.
- ZAPATA, A. et al. Relationships between neuroendocrine and immune systems in amphibians and reptiles. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 7, n. 3, p. 771–779, 1983.
- ZAPATA, A.G., VARAS, A.; TORROBA, M. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. **Immunology Today**, Madrid, Spain, v. 13, n. 4, p. 142-147, 1992.
- ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**, 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall International, 1999. 929 p.

Apêndices



APÊNDICE A - Tabelas

Tabela 4. Concentração de TBARS em ng/mL em amostras de indivíduos de ambiente urbano e criatório: média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo dos valores de cada grupo (total avaliado: 60 espécimes).

Concentração de TBARS (ng/mL)		
Local	Animais de ambiente poluído (n= 30)	Animais de criatório (n= 30)
	934,86	314,17
	625,28	337,16
	628,35	310,65
	758,62	342,53
	528,73	291,19
	643,67	325,67
	471,26	347,89
	521,07	324,90
	548,57	303,45
	508,05	311,87
	606,03	289,65
	332,04	298,85
	588,49	357,09
	529,82	236,01
	410,67	352,49
	287,29	350,95
	296,97	256,70
	263,70	350,95
	472,97	233,71
	527,40	260,53
	313,30	320,85
	353,21	311,24
	370,15	321,59
	443,94	234,35
	413,09	183,34
	434,26	301,63
	355,63	328,98
	390,11	315,67
	454,82	285,36
	436,68	227,70
Média	481,63	300,90
Desvio Padrão	147,44	43,94
Mediana	463,04	311,56
Mínimo	263,70	183,34
Máximo	934,86	357,09

Tabela 5. Valores de TEAC em mmol/L nas amostras de indivíduos de ambiente urbano e criatório: média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo dos valores obtidos de acordo com o local de coleta (total avaliado: 60 espécimes).

TEAC (mmol/L)		
Local	Animais de ambiente poluído (n= 30)	Animais de criatório (n= 30)
	1,89	1,44
	1,71	1,67
	1,65	1,79
	2,37	1,37
	1,74	1,59
	1,84	1,33
	1,79	0,66
	1,89	1,37
	1,88	1,61
	0,52	1,52
	1,89	1,64
	2,26	1,44
	2,27	1,50
	2,33	1,59
	2,43	1,50
	2,26	1,77
	2,33	1,48
	1,43	1,43
	1,16	1,53
	1,99	1,59
	0,82	1,50
	1,45	1,81
	1,53	2,07
	2,17	2,27
	1,71	1,94
	1,71	2,21
	1,49	2,18
	2,07	2,28
	2,39	2,02
	2,27	2,36
Média	1,84	1,68
Desvio Padrão	0,46	0,36
Mediana	1,89	1,59
Mínimo	0,52	0,66
Máximo	2,43	2,36

Tabela 6. Atividade da catalase, em U/mg da proteína, das amostras de indivíduos de ambiente urbano e criatório: média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo dos valores das amostras de cada local de coleta (total avaliado: 60 espécimes).

Atividade da CAT (U/mg)		
Local	Animais de ambiente poluído (n= 30)	Animais de criatório (n= 30)
	1,86	1,85
	2,65	3,32
	2,26	3,01
	3,02	1,45
	1,81	3,80
	1,31	2,86
	1,99	2,88
	2,98	3,47
	3,18	2,35
	1,63	2,00
	1,23	3,06
	1,99	2,52
	1,56	1,66
	2,13	2,50
	2,25	2,11
	1,01	2,49
	1,38	3,27
	1,48	1,85
	1,30	2,00
	0,85	2,80
	1,02	2,21
	1,38	1,99
	0,69	1,68
	1,02	1,64
	0,95	1,51
	1,10	1,74
	1,28	1,61
	0,94	1,72
	0,79	1,98
	1,36	1,74
Média	1,61	2,30
Desvio Padrão	0,69	0,66
Mediana	1,38	2,06
Mínimo	0,69	1,45
Máximo	3,18	3,80

Tabela 7. Atividade da G6PDH, em mU/mg da proteína, das amostras de indivíduos de ambiente urbano e criatório: média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo dos valores de cada grupo (total avaliado: 60 espécimes).

Atividade da G6PDH (mU/mg)		
Local	Animais de ambiente poluído (n= 30)	Animais de criatório (n= 30)
	6,15	23,86
	5,78	18,80
	10,94	13,93
	13,87	17,82
	14,71	10,42
	4,73	3,19
	6,82	5,78
	16,60	4,08
	4,86	5,98
	17,14	1,85
	43,15	3,24
	54,67	3,53
	17,19	2,97
	17,78	3,72
	5,92	1,58
	10,46	3,44
	7,99	5,22
	6,12	1,40
	6,21	1,89
	7,70	15,09
	6,49	3,23
	5,84	9,26
	7,35	9,87
	7,36	7,68
	5,97	4,99
	6,19	6,39
	5,86	3,73
	6,74	7,06
	8,15	3,50
	6,19	4,08
Média	11,50	6,92
Desvio Padrão	11,05	5,68
Mediana	7,09	4,54
Mínimo	4,73	1,40
Máximo	54,67	23,86

Anexos



ANEXO A - Autorização do IBAMA/ICMBio (registro 2838725/nº 16488-1)



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16488-1	Data da Emissão: 19/08/2008 10:08	Data de Validade: 19/08/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2838725	Nome: Larissa Paola Rodrigues Venancio	CPF: 326.516.068-80
Título do Projeto: Cágado-de-barbelas (<i>Phrynops geoffroanus</i> - Testudine - Chelidae) como modelo para ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética		
Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO		CNPJ: 48.031.918/0011-04

Observações, ressalvas e condicionantes

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/sisbio . Em caso de material consignado, consulte: www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, triprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Aline Fernanda Chessa	Pesquisadora	346.405.458-60	33749356-X ssp-SP	Brasileira
2	Maria Tereza Vilela de Azeredo Oliveira	Pesquisadora	018.731.028-95	7842186-X ssp-SP	Brasileira
3	Claudia Regina Bonini Domingos	Orientadora da Pesquisa	042.642.068-39	7609225 SSP-SP	Brasileira
4	Raio Cristiano Ribeiro	Pesquisador	358.534.388-09	40105487-X SSP-SP	Brasileira
5	Tiago Lucena da Silva	Pesquisador	329.812.378-10	433137782 ssp-SP	Brasileira
6	Carlos Eduardo Saranz Zago	Pesquisador	246.376.258-12	21233397 ssp-SP	Brasileira
7	Josue Rodrigues dos Santos	Pesquisador	546.317.698-15	5246165 ssp-SP	Brasileira
8	Maria Isabel Alfonso da Silva	Pesquisador	074.664.676-90	8.836.693 SSPMG-MG	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		SP	CÁregos Felicidade, Piedade e Rio Preto (S.J. Rio Preto)	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Phrynops geoffroanus
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Phrynops geoffroanus
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Phrynops geoffroanus ("Gêdo: 25)
4	Marcação de animais silvestres in situ	Phrynops geoffroanus

* Gêdo: de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 23948844



Página 1/3

ANEXO B - Autorização do IBAMA/ICMBio (registro 2838725/nº 16488-2)

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16488-2	Data da Emissão: 23/09/2009 15:06
Dados do titular	
Nome: Larissa Paola Rodrigues Venancio	CPF: 326.516.068-80
Título do Projeto: Cágado-de-barbelas (<i>Phrynops geoffroanus</i> - Testudine: Chelidae) como modelo para ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética	
Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Análise de EROD	09/2009	12/2009
2	Análise de Esterase	09/2009	12/2009
3	Coleta de animais e amostras de sangue	10/2009	10/2010
4	Construção das bibliotecas genômicas parciais	11/2009	05/2010
5	Isolamento de microssatélites	02/2010	10/2010

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Dos. Identidade	Nacionalidade
1	Aline Fernanda Chessa	Pesquisadora	346.405.458-60	33749356-X ssp-SP	Brasileira
2	Maria Tereza Vilela de Azeredo Oliveira	Pesquisadora	018.731.028-95	7842186-X ssp-SP	Brasileira
3	Claudia Regina Bonini Domingos	Orientadora da Pesquisa	042.642.068-39	7609225 SSP-SP	Brasileira
4	Italo Cristiano Ribeiro	Pesquisador	356.534.388-08	40109487x SSP-SP	Brasileira
5	Yago Lucena da Silva	Pesquisador	329.812.378-10	433137782 SSP-SP	Brasileira
6	Carlos Edsardo Saranz Zago	Pesquisador	246.316.238-12	21233397 ssp-SP	Brasileira
7	Josue Rodrigues dos Santos	Pesquisador	546.317.698-15	6246965 ssp-SP	Brasileira
8	Maria Isabel Alfonso da Silva	Pesquisador	074.584.676-90	8.836.693 SSPMG-MG	Brasileira
9	Vinicius Augusto Gobbe Mochetta	Pesquisador	368.971.228-90	46916448-7 -	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		SP	Córrego Felicidade, Piedade e Rio Preto (S.J. Rio Preto)	Fora de UC
2	SAO JOSE DO RIO PRETO	SP	córrego Felicidade, córrego Piedade e rio Preto	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 97868443



Página 1/3

**ANEXO C - Aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da
FAMERP**



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA

FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090-000 Tel. 3201-5700 S. J. Rio Preto/ SP

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O projeto de pesquisa intitulado "Cágado-de-Barbelas (*Phrynops geoffroanus* – Testudines: Chelidae) como modelo para ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética" (Protocolo FAMERP nº 5517/2008) sob responsabilidade da Profa. Dra. Débora Ap. Pires de Campos Zuccari, por cumprir com os princípios éticos exigidos em experimentação animal, foi aprovado pela CEEA-FAMERP.

Lembramos ao senhor pesquisador a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

São José do Rio Preto, 16 de Outubro de 2008.

Profa. Dra. Cristiane Damas Gil

Presidente CEEA - FAMERP

ANEXO D - Protocolo para realização de Hemograma em quelônios

Hemograma (CAMPBELL, 2004; modificado por ZAGO, 2007).

O hemograma é o exame laboratorial que fornece dados quantitativos sobre os eritrócitos, leucócitos, trombócitos e hemoglobina e permite avaliar o estado geral de saúde do animal. Os exames são efetuados manualmente, conforme metodologia preconizada para a clínica veterinária.

Hematócrito:

Verifica o volume globular, pela relação entre os glóbulos vermelhos e o volume de plasma, ou seja, a porcentagem de eritrócitos no sangue. Consiste dos seguintes passos:

- Homogeneizar bem a amostra com delicadeza; preencher $\frac{3}{4}$ do tubo capilar de microhematócrito com sangue.
- Fechar uma das extremidades do tubo e colocá-lo na centrífuga própria por cerca de 5 minutos a 13.000 rpm.
- Fazer a leitura no cartão de referência, cujos valores são dados em porcentagem de volume celular em relação ao total.
- O valor de hematócrito normal para a maioria dos répteis varia entre 20 e 40%.

Dosagem da hemoglobina circulante:

Fornece a concentração de hemoglobina do sangue analisado a partir do método da cianometahemoglobina. A hemoglobina e todos os seus derivados são transformados, por um reativo especial a base de cianeto, em cianometahemoglobina e em seguida, quantificada por espectrofotometria. Sua realização consiste nas seguintes etapas:

- Adicionar 20 μ L da amostra em 5 mL de solução Drabkin (Solução Drabkin: 0,20g de ferricianeto de potássio, 0,20g de cianeto de potássio e 1000 mL de água destilada q.s.p.).
- Medir em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm. O resultado da leitura da absorbância é dividido por 15,3 e multiplicado por 250 como fator de correção, tendo a concentração de hemoglobina em mM. Este total multiplicado por 1,7 fornece a concentração em g/dL.
- Branco: solução de Drabkin.

A concentração de hemoglobina normal de muitas espécies de répteis varia entre 5,0 e 10,0 g/dL.

Contagem global de células:

Permite calcular o número absoluto de células contidas em um determinado volume de sangue. Consiste em colocar numa câmara de Neubauer, uma amostra de sangue diluído com um reativo apropriado para o tipo de célula. Em alguns minutos, os elementos depositam-se no fundo da câmara, cujo quadriculado permite a contagem ao microscópio. Um cálculo, que considera a diluição e o volume da célula, fornece o número de elementos, expressos por μ L. O número de eritrócitos e leucócitos é variável entre os répteis e dependem das condições ambientais, estado nutricional, o sexo, e sazonalidade. As contagens dos eritrócitos e leucócitos são efetuadas separadamente, obedecendo a suas particularidades, como descrito a seguir.

a) Contagem de eritrócitos:

- Com a pipeta de Thomas, aspirar sangue total homogeneizado até a graduação 1 e completar com a solução de Natt and Herrick (1952) até a marca 101. Esta solução é utilizada como diluidora, por destacar os leucócitos com coloração anil.
- Agitar a pipeta com movimentos circulares, homogeneizando a mistura. O sangue, agora diluído em 1:100, deve permanecer de um a dois minutos na

pipeta. Despreza-se as primeiras gotas. Colocar a pipeta na abertura da câmara de Neubauer, formando com ela um ângulo de 45° ; enche-la com o líquido que penetra por capilaridade entre a câmara e a lamínula.

- Deixar a câmara em ambiente úmido por 5 minutos, para a perfeita sedimentação dos eritrócitos.
- O número total de eritrócitos nos 5 pequenos quadrantes (4 das extremidades e o central), na área do grande quadro central da câmara de Neubauer (Figura 15), é determinado no microscópio, em objetiva de 40x (aumento de 400 vezes).
- O valor total dessa contagem (N) deve ser multiplicado por 5000, valor que considera a diluição, a altura da câmara e área contada, resultando no valor estimado de eritrócitos por microlitro de sangue.

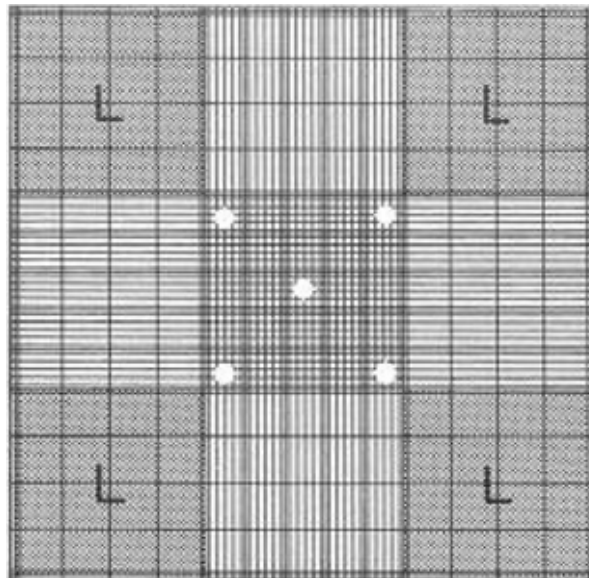


Figura 15. Imagem microscópica da câmara de Neubauer, onde é realizada a contagem de eritrócitos e leucócitos. Os quatro quadrantes representados pela letra L são utilizados para a contagem total de leucócitos; e no quadrante central, os cinco quadrados em destaque são utilizados para a contagem de glóbulos vermelhos.

b) Contagem de leucócitos:

- Realiza-se o mesmo procedimento inicial e a mesma diluição de sangue com solução de Natt and Herrick (1: 100), e então a câmara de Neubauer é preenchida por capilaridade.
- Deixar a câmara em ambiente úmido por 5 minutos, para a perfeita sedimentação das células.
- Usando a iluminação reduzida do microscópio, observar primeiramente na objetiva de 10x, para verificar a distribuição das células; depois passar para objetiva de 40x e fazer a contagem. Os leucócitos, corados de azul, são contados nos quatro quadros laterais da câmara, marcados com L na Figura 15.
- O valor desta contagem é multiplicado por 1000, resultando no total de leucócitos por microlitro de sangue.

Solução de Natt and Herrick:

Os seguintes reagentes são adicionados à água destilada para produzir um volume total de 1L de solução:

- Cloreto de sódio (NaCl) – 3,88 g
- Sulfato de sódio (Na₂ SO₄) – 2,50 g
- Fosfato de sódio dibásico (Na₂ HPO₄: 12H₂O) – 2,91 g
- Fosfato de potássio monobásico (KH₂ PO₄) – 0,25 g
- Formalina (37%) – 7,50 mL
- Metil violeta 2B – 0,10 g

A solução é mantida overnight e filtrada antes do uso.

Cálculo dos índices hematimétricos:

Os índices podem ser utilizados para avaliar as características de eritrócitos no sangue periférico e representam o volume médio de eritrócitos, o teor de hemoglobina das hemácias e a quantidade total de hemoglobina, valores

importantes na análise sanguínea por sofrerem alterações nos estados patológicos. São obtidos por meio dos cálculos detalhados a seguir.

- **VGM ou Volume Globular Médio:** Indica o volume médio de eritrócitos expresso em femtolitros (fL). É obtido, dividindo-se o volume globular fornecido pelo hematócrito, pelo número de eritrócitos presentes no mesmo volume (obtido pela contagem), em seguida multiplicado por 10, segundo a fórmula:

$$\text{VGM} = \frac{\text{Ht} \times 10 \text{ fL}}{\text{H}}$$

- **CHGM ou Concentração de Hemoglobina Globular Média:** Designa o índice médio da porcentagem de hemoglobina por hemácia. O cálculo consiste em dividir o resultado da dosagem de hemoglobina pelo hematócrito, relaciona-se assim a hemoglobina à unidade de volume do eritrócito resultado geralmente expresso em %, como indica a fórmula:

$$\text{CHGM} = \frac{\text{Hb} \times 100 \%}{\text{Ht}}$$

- **HGM ou Hemoglobina Globular Média:** Indica a quantidade total de hemoglobina em picogramas (pg). É obtida relacionando-se o resultado da dosagem da hemoglobina ao número de eritrócitos obtido pela contagem. Sua fórmula é:

$$\text{HGM} = \frac{\text{Hb} \times 10 \text{ pg}}{\text{H}}$$

- Os índices utilizados são obtidos a partir de valores de hemoglobina, hematócrito e contagem das células, representados pelas seguintes abreviações:

Ht: Valor do hematócrito.

H: Número de eritrócitos/ μL .

Hb: Hemoglobina.

Contagem diferencial dos leucócitos:

É a fórmula leucocitária, que por meio do exame de esfregaços sanguíneos corados com Panótipo (*Hematocor-Biológica*®), permite identificar a variedade de leucócitos e estabelecer suas proporções relativas. Visa estabelecer o valor percentual de cada tipo de leucócito no sangue circulante, para depois, conhecendo-se o total de leucócitos circulantes, conhecer-se o total de cada tipo celular.

- Utiliza-se o esfregaço sanguíneo, feito com uma gota da amostra de sangue total, que é estendida sobre uma lâmina de vidro com ajuda de uma segunda lâmina, e corado com Panótipo (*Hematocor-Biológica*®).
- O esfregaço é observado ao microscópio com objetiva de imersão à óleo (100x) e contam-se 100 células, anotando cada tipo diferencial. Ao final da contagem, são estabelecidos os valores percentuais relativos de cada tipo.
- Multiplicando-se o valor obtido na contagem total de leucócitos pelo número percentual de cada tipo diferencial e dividindo por 100, obtêm-se o valor absoluto desses tipos celulares.

Contagem de trombócitos:

Permite calcular o número absoluto de trombócitos em determinado volume de sangue, a partir de sua contagem relativa em esfregaços sanguíneos corados com Panótipo (*Hematocor-Biológica*®).

- Utiliza-se o mesmo esfregaço sanguíneo corado com Panótipo (*Hematocor-Biológica*®) feito para a contagem diferencial de leucócitos.
- Em objetiva de imersão (100x), realiza-se a contagem do número de trombócitos para 1000 eritrócitos.

- Este valor, multiplicado pelo número de eritrócitos/ μL da respectiva amostra e dividido por 1000, resulta no total de trombócitos por microlitro.

Índice de Estresse:

Por meio da contagem diferencial de leucócitos, pode-se calcular o índice de estresse, dividindo-se o número absoluto de heterófilos pelo de linfócitos (AGUIRRE et al., 1995; GROSS; SIEGEL, 1983; LANCE; ELSEY, 1999). Essa razão heterófilo/linfócito é um indicativo de estresse crônico, representada pela elevação no número de heterófilos e diminuição dos linfócitos (SIEGEL, 1980).

ANEXO E - Protocolo da dosagem de TBARS

Dosagem de TBARS (YAGI, 1976; modificado por PERCÁRIO et al., 2004)

Princípio:

A dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada para avaliar a peroxidação lipídica das amostras. O método é baseado na reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo com absorção máxima em 535 nm. Esta dosagem pode ser realizada em soro, plasma, líquidos corporais e homogenados de tecido.

Reagentes:

Água ultrapura ou água destilada

Cloreto de Potássio (KCl) 1,15%

Fosfato Monobásico de Potássio (KH_2PO_4) – Tampão fosfato 75Mm (pH 2,5)

Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 10nM

Solução Padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano) 20 μM

Álcool n-Butílico

Preparo de plasma:

O sangue foi coletado em tubo heparinizado e identificado. Permaneceu por um período de 20 minutos em descanso, sob Banho Maria a 38°C. Após, centrifugar a 1500 rpm, durante 20min. Foi separado em recipiente (tudo 1,5mL) devidamente identificado de acordo com o protocolo de identificação de peças da pesquisa 1mL (ou mais) de plasma (quantidade mínima aceitável 800µL) que estará pronto para a dosagem de TBARS.

Preparo final dos controles e amostras:

Está é a etapa final de preparação, a qual antecede a leitura dos valores de absorvância em espectrofotômetro. O reagente TBA deve ser sempre preparado no dia da dosagem de TBARS, não podendo ser estocado.

Recomenda-se que os tubos de ensaio tenham paredes reforçadas, resistentes a alta temperatura (dimensões de 11x100, parede de 2mm). Pipeta-se 1 mL do reagente TBA para cada tubo.

O tubo de ensaio de número 1 recebe, então 0,5ml (500µL) de água destilada. Estes serão os tubos de controle branco. O tubo de ensaio de número 2 recebe 0,5mL (500µL) da Solução Padrão MDA 20µM. Estes serão os tubos de controle padrão MDA. Por fim, os tubos de ensaio de número 3 em diante deverão receber 0,5mL (500µL) das amostras. Utiliza-se 2 tubos de ensaio para cada amostra (ensaio em duplicata).

Após a pipetagem das amostras, todos os tubos devem foram colocados em Banho Maria à temperatura de 94°C, onde permanecem durante 1h. Após uma hora em Banho Maria a 94°C, as amostras foram resfriadas. Durante este tempo já poderá se observar uma coloração transparente nos tubos 1 (controle branco) e rósea nos tubos 2 (controle padrão MDA).

Terminado o resfriamento, acrescenta-se 4 mL do reagente álcool n-Butílico a cada tubo de ensaio. Nessa etapa, utiliza-se um dispensador automático de 4 mL.

Os tubos são cuidadosamente tampados com rolhas apropriadas e individualmente, homogenizados em agitador de tubos tipo vortex, para que haja a máxima extração de TBARS para a fase orgânica.

Por fim, centrifuga-se os tubos a 2500 rpm durante 10 minutos, de modo que a amostra obtém duas fases. Uma ao fundo, transparente e límpida e outra mais superficial de coloração mais ou menos rósea, de acordo com a quantidade de TBARS na amostra. Retira-se 3mL da fase mais superficial e realiza-se a leitura a 535nm no espectrofotômetro.

Leitura em Espectrofotômetro:

Horas antes da leitura, colocamos as cubetas em solução desincrustante e ajustamos o espectrofotometro em 535 nm. Zeramos o aparelho com o CONTROLE BRANCO (tubo 1) e a dosagem dos tubos de número 2 são anotadas para os cálculos finais de dosagem do TBARS.

Cálculo do valor de TBARS da amostra:

O valor final de TBARS da amostra, em ng/mL é obtido pelo emprego da seguinte fórmula:

TBARS = A média x F, no qual:

$$\mathbf{A\ média = (A1+A2)/2}$$

(amostras com diferenças entre A1 e A2 superiores a 10% devem ser desconsideradas).

F = ([padrão TBARS] x 440,61)/ A padrão TBARS, como a solução padrão MDA utilizada tem concentração de 10nM temos:

$$\mathbf{F = 10 \times 440,61 / A\ padrão\ TBARS,}$$

$$\mathbf{F = 4406,1 / A\ padrão\ TBARS}$$

(lembrando que A padrão TBARS é a média, ou seja $(A1+A2)/2$ referente às amostras 2).

ANEXO F - Protocolo da dosagem de TEAC

Dosagem da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC) modificado (MILLER et al., 1993; RE et al., 1999).

O potencial antioxidante das amostras foi determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametoxicromono-2-carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolínacido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), produzindo diretamente o radical cation $ABTS^{\bullet+}$, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm. A adição de amostras contendo antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS e a descoloração é avaliada em 734nm. Os resultados finais foram expressos em micromoles por litro (mmol/L), correspondente a concentração do trolox com capacidade anti-oxidante equivalente à da amostra que foi estudada, padrão de medida este denominado TEAC.

Reagentes:

PBS pH 7.2

Solução Salina Isotônica com pH 7.2 foi usada como solvente no preparo de reagentes e diluição de amostras.

- 1,48g de Na_2HPO_4 (Fosfato de Sódio Dibásico)
- 0,43g de NaH_2PO_4 (Fosfato de Sódio Monobásico)
- 7g de NaCl
- H_2O destilada q.s.p. ----- 1 litro

Ajustar em Phmêtro para pH 7.2, acrescentar mais Na_2HPO_4 ou Ácido Acético se necessário. Volume final: 1L.

Solução de estoque ABTS^{•+}:

Sal diamônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) – ABTS: Sigma-Aldrich® (A1888).

A solução de estoque ABTS^{•+} foi preparada de 12 a 16h antes das dosagens.

Deverá ser misturada uma solução do sal diamônio ABTS a 7mM com uma solução de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ – Sigma-Aldrich P5592) cuja concentração final será de 2,45mM.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$140\text{mM} \times 352\mu\text{L} = C \times 20.000\mu\text{L}$$

$$C \approx 2,45\text{mM}$$

(A) ABTS 7mM: 0,0768g ----- 20mL de PBS

(B) $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 140mM: 0,7560g ----- 20mL de PBS

▪ Retirar com pipeta automática 352 μL da solução (A) e misturar a esta 352 μL da solução (B):

19,648 ml de (A) + 352 μL * de (B) **

* pipetar 176 μL + 176 μL

** A concentração final de (B) nessa mistura será 2.45 mM

- Foram preparados 20 mL da solução de estoque ABTS^{•+}.
- A mesma deve permanecer no escuro, em temperatura ambiente (em bancada) durante 12-16h para formar o radical cátion ABTS^{•+}
- O radical é estável por cerca de dois dias estocado desta forma, no escuro, à temperatura ambiente.

Solução de trabalho de ABTS^{•+}:

- Misturar a solução de estoque ABTS a PBS até que a absorbância a 734 nm seja de 0.7 ± 0.02 (concentração de ABTS $\pm 47 \mu\text{M}$), equilibrada a 30°C .

A expectativa é diluir 2289 μL da solução de estoque ABTS em 200 mL de PBS.

- Calibrar o espectrofotômetro na leitura de 734 nm, zerando com PBS.
- Preparar Erlenmeyer com 200 mL de PBS.
- Começar com 1800 μL da solução de estoque ABTS, misturar ao PBS, homogenizar e ler no espectro. Subir ou diluir até atingir valor de leitura de 0.7 ± 0.02 a 30°C , ou seja, de 0,680 a 0,720. Atingido esse valor está pronta a solução de trabalho ABTS⁺⁺

Solução estoque de trolox (2.5mM):

Trolox (Aldrich Chemical Co 23,881-3), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico.

- Cálculo base: 0,647g de TROLOX (Aldrich 23,881-3) em 1L de PBS.
- Logo, para 200 mL – 0,1294g de Trolox
para 100 mL – 0,0647g de Trolox

Atenção:

- Material de difícil dissolução.
- Medir o volume desejado em PBS.
- Colocar apenas uma parte deste volume em placa agitadora magnética, turbilhonar com leve aquecimento.
- Acrescentar todo o soluto (trolox), despejando-o diretamente no solvente (PBS) sem diluir antes – retirar o material que ficará retido lavando o becker com PBS.
- Esperar diluir por completo.
- Esta solução é estável por uma semana quando estocada a 4°C ou 6 meses se estocada a -20°C .

Preparo das amostras:

Plasma:

- Colher o sangue usando anticoagulante (heparina).
- Centrifugar a 1500 rpm durante 20 minutos.
- Pipetar a camada superficial amarela (correspondente ao plasma) cuidadosamente.
- Estocar em freezer a -20°C ou em gelo caso seja prontamente analisado.

Dosagem:

- Adequamos o método para leitura em espectrofotômetro em temperatura ambiente: 25°C. O volume final de cada amostragem para leitura será de 3 mL (3000 µL).
- Se a capacidade antioxidante da amostra que se pretende estudar não é conhecida ou se espera que ela seja superior a escala estabelecida na curva padrão (0 a 2,5 mM), é prudente realizar as dosagens da mesma sob diversas diluições.
- Convém que sejam feitas amostragens para leitura em duplicatas (A1 e A2) para termos maior certeza dos resultados, nesse caso aceitar diferenças de até 10% entre a média das leituras A1 e A2. Para a realização da curva padrão, convém que sejam feitas triplicatas.
- A leitura foi feita em espectrofotômetro, a 734 nm.

Realizando as leituras:

- Em uma cubeta colocar com pipeta automática 2970 µL da solução de trabalho ABTS^{•+} outrora preparada. Realizar leitura da absorbância a 734 nm e anotar o valor (correspondente a T0).
- Retirar a cubeta e imediatamente acrescentar 30 µL da solução de trolox acionando neste exato momento o cronômetro.
- Homogenizar a mistura manualmente por 20 segundos e re-iniciar leitura (734nm) anotando o valor decorridos exatos 5 minutos (corresponderá a T5).
- Repetir o procedimento para cada solução de trolox (tubos de A-F).

- Fazer em triplicata anotando os resultados na tabela do protocolo curva padrão da atividade antioxidante do trolox. Aceitar diferenças de até 10% entre a média das absorbâncias de 5 minutos (T5) e os valores individuais.
- Fazer o mesmo procedimento com as amostras biológicas a serem estudadas. Fazer também um controle branco (com 30 µL de PBS) e um padrão (com 30µL de Trolox 1mM). Realizar a dosagem das mesmas em duplicatas anotando os valores referentes de T0 e T5. Aceitar diferenças de até 10% entre a média das absorbâncias de 5 minutos (T5) e os valores individuais.

Cálculo dos resultados:

- Defina o Valor Médio da absorbância em T5 conforme descrito no item anterior.
- Calcule a Atividade Anti-oxidante Total (TAA) de cada amostra usando a seguinte fórmula:

$$TAA = \frac{T0 - T5}{T0}$$

- Calcule o valor corrigido da Atividade Anti-oxidante total de cada amostra (TAAC) de cada amostra subtraindo o valor de TAA das amostras biológicas e do Padrão do valor de TAA encontrado para o Branco:

$$TAAC = TAA - TAA \text{ do Branco}$$

ANEXO G - Protocolo do ensaio da Catalase

Ensaio da Catalase (BEUTLER, 1975 - com modificações)

Tampão para catalase (50 mL):

Em 50 mL de H₂O MiliQ adicionar:

1- Tampão Tris-Ácido Clorídrico (TRIS-HCl) 1M: 6,055 g

2- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5 mM: 0,7305g

* Ajustar em pH 8,0.

Meio de Reação:

1- Colocar 100 µL de H₂O₂ 30% em 100 mL de H₂O MiliQ (Concentração obtida: 10 mM);

2- Desta solução de H₂O₂ 10 mM, descartar 10 mL;

3- Nos 90 mL restantes, adicionar 5 mL do Tampão para catalase;

4- Adicionar 4 mL de H₂O MiliQ.

Ensaio:

960 µL de meio de reação + 40 µL de amostra já diluída. Realizar a leitura no espectrofotômetro a 240 nm a 30°C.

Usar H₂O MiliQ como o branco da reação.

Observação: No caso de sangue de quelônios, a amostra precisa ser diluída em 1: 50, ou seja, 10 µL de sangue total + 490 µL de H₂O MiliQ, antes da sua adição ao meio de reação.

ANEXO H - Protocolo do ensaio da G6PDH

Ensaio da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (GLOCK; MCLEAN, 1953 – com modificações)

Para 10 mL de meio de reação:

- Tampão Tris-Ácido Clorídrico (Tris.HCl) 0,1 M, pH 7,4: 5,0 mL
- Cloreto de magnésio (MgCl₂) 0,2 M: 0,18 mL
- Glicose-6-fosfato (G6P): 4,25 mg
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP): 1,0 mg

- H₂O MiliQ: 4,8 mL

Técnica de Preparo do meio de reação:

Deve ser preparada sempre uma parte do meio de reação sem G6P, que servirá como o branco da reação.

Procedimento:

Para 50 mL de meio de reação completo e 50 mL do meio de reação sem G6P, deve-se proceder da seguinte forma:

1) Misturar em um erlenmeyer de 250 mL:

- 50 mL de tampão Tris.HCl 0,1M, pH 7,4
- 1,8 mL de MgCl₂
- 10 mg de NADP
- 48 mL de H₂O MiliQ

2) Retirar 50 mL desta mistura e transferir para um erlenmeyer de 125 mL. Esta solução será o branco da reação (solução sem G6P).

3) Adicionar 21,25 mg de G6P ao erlenmeyer inicial. Esta solução será utilizada para dosar a enzima (solução com G6P).

Ensaio:

- Zerar com tampão Tris.HCl 0,1M, pH 7,4
- Para cada amostra a ser analisada utilizar duas cubetas, uma com 980 µL da solução com G6P + 20 µL de amostra já diluída (dosagem da enzima), e a outra com 980 µL da solução sem G6P + 20 µL de amostra já diluída (referência). Realizar a leitura no espectrofotômetro por 2 ou 3 minutos a 340 nm, a temperatura de 30°C.

- Observação: No caso de sangue de quelônios, a amostra precisa ser diluída em 1:20, ou seja, 10 µL de sangue total + 190 µL de H₂O MiliQ, antes da sua adição ao meio de reação.

Determinação Protéica (BRADFORD, 1976)

O reagente de Bradford pode ser usado para determinar a concentração de proteínas em soluções biológicas. O procedimento é baseado na formação de um complexo entre o corante e as proteínas da solução. O complexo proteína-corante provoca uma mudança no máximo de absorção do corante de 465 nm para 595 nm, quando a ligação à proteína ocorre. A quantidade de absorção é proporcional à quantidade da proteína presente, e essas interações estabilizam a forma aniônica do corante, provocando uma mudança de cor visível (marrom para azul). O reagente de Bradford não exige diluição e é apropriado para ensaios padrões.

Processo:

- Zerar utilizando apenas o reagente Bradford. Entre as leituras lavar a cubeta com álcool.
- 990 µL do Reagente Bradford + 10 µL da amostra já diluída (a mesma amostra utilizada nos ensaios das enzimas). Homogeneizar para começar a reação entre o corante e as proteínas, então deixar de 40 a 50 minutos no escuro.
- Após este período é realizada a leitura no espectrofotômetro a 595 nm.

Para estabelecer a curva padrão da dosagem utilizam-se cinco concentrações de Bradford com BSA (albumina bovina):

P1: 995 µL do Reagente Bradford com 5 µL de BSA.

P2: 990 µL do Reagente Bradford com 10 µL de BSA.

P3: 985 µL do Reagente Bradford com 15 µL de BSA.

P4: 980 μL do Reagente Bradford com 20 μL de BSA.

P5: 975 μL do Reagente Bradford com 25 μL de BSA.

A partir da curva padrão de absorbância determinada, são estabelecidas as quantificações protéicas das amostras, em quantidade de proteína/amostra, considerando no cálculo o fator de diluição.

Posteriormente, a taxa de variação da absorbância analisada nos ensaios de cada enzima (CAT e G6PDH), é relacionada com a quantificação protéica, resultando no valor da atividade enzimática.