

LARISSA PAOLA RODRIGUES VENANCIO

**CÁGADO-DE-BARBELAS (*Phrynops geoffroanus*  
(Schweigger, 1812), TESTUDINES: CHELIDAE) COMO  
MODELO PARA ECOTOXICOLOGIA EVOLUTIVA:  
RELACIONAMENTO ENTRE CONTAMINAÇÃO  
AMBIENTAL, CONDIÇÃO E VARIABILIDADE  
GENÉTICA**



Tese apresentada para obtenção do título  
de Doutor em Genética


---

São José do Rio Preto - SP

2012

LARISSA PAOLA RODRIGUES VENANCIO

**CÁGADO-DE-BARBELAS (*Phrynops geoffroanus*  
(Schweigger, 1812), TESTUDINES: CHELIDAE) COMO  
MODELO PARA ECOTOXICOLOGIA EVOLUTIVA:  
RELACIONAMENTO ENTRE CONTAMINAÇÃO  
AMBIENTAL, CONDIÇÃO E VARIABILIDADE  
GENÉTICA**



Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Genética, 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: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cláudia Regina Bonini-Domingos**  
**CO-ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari**

---

São José do Rio Preto - SP

Junho de 2012

Venancio, Larissa Paola Rodrigues.

Cágado-de-barbelas (*Phrynops Geoffroanus* (Schweigger, 1812), Testudines; Chelidae) como modelo para ecotoxicologia evolutiva : relacionamento entre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética / Larissa Paola Rodrigues Venancio. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

158 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Coorientador: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia animal. 2. Tartaruga. 3. Toxicologia ambiental. 4. Genética Animal. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Zuccari, Debora Aparecida Pires de Campos. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 598.13

**LARISSA PAOLA RODRIGUES VENANCIO**

**Cágado-de-barbelas (*Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812), Testudines: Chelidae) como modelo para ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética.**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Genética, 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Regina Bonini Domingos  
Professor Assistente Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

---

Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Caetano  
Professor Doutor  
EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia

---

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira  
Professor Assistente Doutor  
UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

---

Prof. Dr. Richard Carl Vogt  
INPA - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lilian Madi Ravazzi  
Professor Assistente Doutor  
UNESP – São José do Rio Preto

---

São José do Rio Preto, 14 de Junho de 2012

*Este trabalho foi realizado no Centro de Estudo de Quelônios (CEQ) e Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) do Departamento de Biologia; no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental, do Departamento de Química e Ciências Ambientais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, UNESP de São José do Rio Preto, e também no Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), com auxílio financeiro do CNPq e CAPES.*

---

Aos meus pais  
Orlando e Teresa  
e irmãs  
Bruna e Beatris

“Meu refúgio,  
Meu porto seguro,  
Minha fortaleza”

*Dedico*

---

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei nos ombros de gigantes.”*

*Isaac Newton*

Talvez este seja o momento mais difícil ao organizar este trabalho. Voltar no tempo, lembrar o que se passou durante esses quatro anos... É impossível evitar que uma espécie de filme passe pela cabeça. Todos os rostos, todos os gestos, todas as palavras, todo o esforço... A todos que de alguma maneira participaram de cada momento, o meu sincero obrigado. Mas, existem aqueles que não poderia deixar de mencionar. Em especial agradeço:

À minha querida orientadora **Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Claudia Regina Bonini Domingos**, que não foi só um exemplo de profissional durante esses quatro anos de convívio, mas um exemplo de pessoa, que no meu singelo ponto de vista, é muito mais importante. Minha chegada ao laboratório em 2008 foi um tanto “conturbada”... Foi um processo difícil e bastante confuso para mim (e acredito que para você também Claudia): mudança de orientação, laboratório, linha de pesquisa... Confesso que os primeiros dias foram bastante difíceis, e não era para menos. Mas, sem me conhecer, você abriu seus braços, seu laboratório e me “adotou como sua filha”. Literalmente assim. Além disso, aceitou minhas “ideias mirabolantes” e participou comigo desse desafio. O que posso garantir é que você, e sua família toda, estarão no meu coração para sempre! Obrigada por tudo, principalmente por confiar em mim e neste trabalho! E por me ensinar muito mais do que Ciência e Dedicção à Pesquisa durante todos esses anos! Obrigada!

Aos meus amigos, companheiros, parceiros de laboratório, que se tornaram meus “irmãos postiços ‘tartarugólos’ ”! Meu carinho e agradecimento aos meninos do CEQ (Centro de Estudo de Quelônios) que me receberam de braços abertos desde o início: **Tiago Lucena, Maria Isabel Silva, Vinicius Moschetta**, e os mais novos, **Jéssica Bacchi, Tayrone Pereira, Nathalia Rossigalli e Vanessa Leiko**. Obrigada por todas as conversas, científicas ou não, ajuda no campo e no manejo dos animais - como nos divertimos nas coletas! – por todos os questionamentos levantados, enfim, por tudo! Esse trabalho também é de vocês! Vocês são muito importantes para mim!

Agora, meu carinho e agradecimento aos meus “irmãos postiços do grupo dos humanos”! **Edis Belini, Gisele Carrocini, Lidiane Torres, Danilo Grünig, Jessika Okumura, Paula Zamaro, William Barberino e Isabela Chinelato!** Este trabalho também é um pouco de cada um de vocês. Obrigada pelo auxílio a todo o momento, me questionando, lendo os trabalhos comigo! Por darem todo o apoio, incentivo e pelo conhecimento que cada um de vocês me transmitiram durante esse tempo de convivência. Sim! E não foi pouco! Deixo aqui meu agradecimento especial a vocês, **Gi e Lidi**, “meu trio”! Vocês são especiais para mim! Obrigada pela amizade, pelas conversas, confidências, pelas risadas, pelas

festinhas (que não foram poucas!), pelas hospedagens na Delta-Dado... Enfim, por participarem de um modo especial de todos os momentos bons e não muito bons durante esse tempo e por terem sido amigas de verdade. Amo vocês!

Apesar de mais novos no laboratório, não me esqueci de vocês: **Mariana, Vanessa, Barbara, Renan, Giovana, Marina e Cristina**. Obrigada por tudo.

Agradeço também ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia) pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, por ter me acolhido por todos esses anos, desde a graduação.

À minha coorientadora **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari** por ter se mostrado tão solícita durante todos esses anos.

Agradeço também **Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida** pela colaboração fundamental para as análises ecotoxicológicas realizadas neste estudo. Seu apoio foi fundamental, desde ensinar a usar os equipamentos, até a discussão dos resultados. Em especial, menciono minhas amigas **Aline Rodrigues** e **Lilian Nogueira**, que são parceiras desde o período da graduação e que foram fundamentais nos experimentos realizados.

Ao Laboratório de Genética Animal (EMBRAPA/CENARGEN), em especial, ao **Prof. Dr. Samuel Rezende Paiva**, por ter me recebido tão prontamente em seu laboratório. Aos colegas de laboratório **Elisabete, Santuza, Naiara, Caio, Lilian e Carol** pela ajuda na genotipagem, pelas conversas, risadas e apoio, mesmo quando o tudo estava dando errado (“raio de ROX!”). Obrigada! Em especial, agradeço a você, **Elisabete** pelo auxílio na genotipagem e pela ajuda incalculável com a análise dos dados. Obrigada pela disposição e auxiliar na discussão dos resultados.

À minha mais do que querida amiga, quase-irmã, **Dr<sup>a</sup> Patricia Ianella**. Obrigada por ter me recebido durante dois meses em sua casa para realização da genotipagem dos microssatélites! Sem seu apoio parte deste trabalho não poderia ter sido concluído! Menciono aqui também **Dr. Alexandre Caetano** que teve contribuição fundamental para que estes experimentos fossem realizados.

Não me esqueci de vocês: **Dayane (Daya), Guilherme Scagion (Gui), Kamila (ComK), Ariela (Babuína), Lucas (Retalho), Guilherme Sabino (Gui) e Luciane (Lu)**. Vocês são especiais e se tornaram queridos! Faço um agradecimento especial a você, Daya, pela atenção, carinho, “reciprocidade”, queijos, tortas, macarronadas, almoços e tudo mais que você fez por mim durante esse tempo! Vocês são “minhas coisinhas”!

Aos meus queridos amigos de graduação, que mesmo longe (em outros países, em outros “planetas”), estavam perto durante todo o tempo: **Aline, Viviani, Daniele, Fernanda, Anita, Thiago, Cadu, Zé, Paula, Karla e Gabriela!** Sou muito orgulhosa de cada um de vocês e do que conquistaram!



Minha família: **Orlando, Teresa, Bruna e Beatris**. Meu refúgio, meu exemplo de amor, de respeito, de dedicação, de verdade. Obrigada pelo apoio incondicional e por apoiarem todas as minhas decisões, sempre com muito amor e muito conselho. Vocês são os meus exemplos para tudo, e este trabalho é tanto meu quanto de vocês. Meu amor incondicional. Para sempre.

A Deus. Durante toda a minha vida eu vi tua mão me dirigindo, me auxiliando, abençoando, repreendendo, ouvindo meus pedidos e confortando meu coração nos momentos mais difíceis. Só posso agradecer. **“O Senhor é a minha força e o meu escudo; nele confiou o meu coração, e fui socorrido: pelo que meu coração salta de prazer e com o meu canto o louvarei (Salmo 28:7)”**.

*“Em relação a todos os atos de iniciativa e de criação, existe uma verdade elementar: no momento em que nos comprometemos, a Providência Divina também se põe em movimento. Todo um fluir de acontecimentos surge a nosso favor. Como resultado da decisão, seguem todas as formas imprevistas de coincidências, encontros e ajudas que nenhum homem jamais poderia ter sonhado encontrar. Qualquer coisa que você possa fazer ou sonhar, você pode começar. A coragem contém em si mesma o poder, o gênio e as magias”*.

*Johann Wolfgang von Goethe  
Escritor Alemão (1749-1832)*

*“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”*

*Albert Einstein*

*“In research, you really have to Love and be committed to your work, because things have more of chance of going wrong than right. But, when things go right, there is nothing more exciting.”*

*Michael Smith*

*Prêmio Nobel de Química em 1993*

---

## RESUMO

**VENANCIO, L.P.R. Cágado-de-barbelas (*Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812), Testudines: Chelidae) como modelo para ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética. São José do Rio Preto, 2012, 158p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Genética – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.**

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da influência da atividade humana, como a contaminação ambiental e modificações do hábitat, como direcionadores de mudanças fisiológicas, bioquímicas e de diversidade genética entre populações de cágado-de-barbelas em uma das bacias hidrográficas mais impactadas do sudeste brasileiro. A fim de analisar o impacto da contaminação química e orgânica na espécie de estudo, foram realizadas análises ecotoxicológicas visando avaliar a ação de alguns dos principais componentes envolvidos com a proteção ao estresse oxidativo e metabolismo de detoxificação de fase I e II, e capacidade antioxidante. Os resultados indicam a influência de efluentes domésticos e industriais no metabolismo de detoxificação e estresse oxidativo. No entanto, apesar do aumento da atividade EROD e o efeito da atividade da GST, os valores médios de GST na área urbana estão dentro daqueles esperados em condição de hipóxia descritos na literatura. Esta observação sugere que o aumento da GST em resposta à produção de ERO pela presença de poluentes, aumenta a rede de defesa antioxidante, controlando os danos oxidativos causados pela hipóxia e pela reperfusão. Com o intuito de estimar a condição, que reflete a aptidão (*fitness*) individual do animal, foi avaliada a relação matemática entre peso e comprimento, que indicam alterações na forma do corpo e no incremento em peso, que permitem inferências sobre a saúde e o bem-estar animal. Os dados gerados informam diferenças em condição que estão associadas à área de avaliação, mas também ao sexo e período reprodutivo, e gradiente de contaminação indicando forte influência de estressores ambientais na fisiologia dos espécimes analisados. A partir da avaliação da estrutura genética entre populações do rio Preto e do córrego Felicidade, baseada em microssatélites, constatou-se que não há diferenciação genética, devido ao extenso fluxo gênico entre elas e elevada diversidade genética. Contudo, com a análise de estruturação intrapopulacional, observa-se a existência de cinco agrupamentos genéticos, que reflete as alterações no hábitat gerados pelo represamento e assoreamento nas áreas estudadas, que estão iniciando processos de separação (barreira) de subpopulações existentes. Com o intuito de avaliar a relação entre as informações geradas pelos dados bioquímicos, fator de condição e diversidade genética, foi realizado análise de correlação heterozigosidade-*fitness*. A relação negativa

---

observada pode ser explicada pelo perfil e mudanças estruturais e ecológicas nas populações estudadas, indicando a influência do homem na biologia de populações naturais. Portanto, *P. geoffroanus* apresenta adaptação à contaminação ambiental, mas modificações ecológicas e possível perda do hábitat estão alterando a diversidade genética das populações estudadas. Este é o primeiro trabalho avaliando estes aspectos concomitantemente em populações naturais, endêmicas do Brasil, e utilizando como objeto de estudo a espécie *Phrynops geoffroanus*.

**Palavras-chave:** *Phrynops geoffroanus*; ecotoxicologia; fator de condição; genética de populações; correlação heterozigosidade-*fitness*; alterações ambientais.

---

## ABSTRACT

**VENANCIO, L.P.R. Geoffroy's side-necked turtle (*Phrynops geoffroanus*, (Schweigger, 1812) Testudines: Chelidae) as a model for evolutionary ecotoxicology: relationship between environmental contamination, condition and genetic variability. São José do Rio Preto, 2012, 158p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Genética – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.**

The objective of this study was to evaluate the role of human activity influence, such as environmental contamination and habitat changes as drivers for changing physiological, biochemical, and genetic diversity among Geoffroy's side-necked turtle populations in one of the most impacted watersheds in southeastern Brazil. In order to analyze the impact of chemical and organic contamination, ecotoxicological analyses were performed to assess the action of some of the major components involved in oxidative stress protection and phase I and II of metabolism detoxification, and antioxidant capacity. The results indicate the influence of domestic and industrial effluents in detoxification metabolism and oxidative stress. However, in spite of increased activity and effect of EROD activity of GST, GST-average values in the urban area conform with those expected in hypoxia condition in the literature. This observation suggests that increased GST in response to the ROS production by the presence of pollutants increases the antioxidant defense network, controlling the oxidative damage caused by hypoxia and reperfusion. In order to estimate the condition, which reflects the individual ability (fitness), we evaluated the mathematical relationship between weight and length, indicating that changes in body shape and weight increase, allowing inferences about the health and well animal welfare. The data generated indicate differences in conditions that are associated with the area, but also with sex and reproductive period, and contamination gradient indicating strong influence of environmental stressors on the physiology of the specimens. From the evaluation of genetic structure among populations of the Preto River and Felicidade Stream, based on microsatellites, we found that there is no genetic differentiation, due to extensive gene flow between areas and high genetic diversity. However, with the analysis of intrapopulation structure, we observe the existence of five genetic groups, which reflects changes in habitat created by the damming and siltation, which are initiating separation processes (barrier) of sub-populations. In order to evaluate the relationship between the data generated by the biochemical data, condition factor and genetic diversity, analysis of heterozygosity-fitness correlation was performed. The negative relationship observed may be explained by the profile of structural and ecological

---

changes in the populations studied, indicating the important influence of man the natural population biology. Therefore, *P. geoffroanus* shows adaptation to environmental contamination and ecological changes and possible loss of habitat are altering the genetic diversity of populations studied. This is the first study evaluating all *Phrynops geoffroanus* these aspects simultaneously in natural populations in Brazil, using as an object of study.

**Key-words:** *Phrynops geoffroanus*; ecotoxicology; condition factor; population genetics; Heterozigosity-*Fitness* correlation; environmental changes.

## *Sumário*

---

|                              |            |
|------------------------------|------------|
| <b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b> | <b>14</b>  |
| <b>OBJETIVOS.....</b>        | <b>20</b>  |
| <b>CAPÍTULO 1.....</b>       | <b>21</b>  |
| <b>CAPÍTULO 2.....</b>       | <b>58</b>  |
| <b>CAPÍTULO 3.....</b>       | <b>92</b>  |
| <b>CAPITULO 4.....</b>       | <b>116</b> |
| <b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>  | <b>137</b> |
| <b>CONCLUSÕES.....</b>       | <b>146</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>      | <b>148</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>           | <b>156</b> |



---

## INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS



*1. Avaliação do impacto ambiental: do indivíduo à populações*

A ocupação desordenada e a ação humana em áreas naturais ocorrem em taxas aceleradas no mundo todo, mudando a estrutura física e processos ecológicos de habitats originais (MARZLUFF, 2001). A perda de habitat, mudanças climáticas, espécies invasoras, sobrexploração e poluentes ambientais são os elementos chave a atuam de modo sinérgico direcionando os eventos de extinção (FRANKHAM et al., 2008; KUUSSAARI et al., 2009). O impacto do aumento de populações humanas e suas atividades são percebidos na depleção da biodiversidade e variabilidade genética em populações naturais (VITUOSEK et al., 1997).

Biodiversidade pode ser definida como o número, variedade e variabilidade de organismos dentro de uma escala temporal e espacial, incluindo táxons superiores (gêneros, famílias, etc.), espécies, populações, subpopulações, indivíduos e genes. A interrupção do equilíbrio genético em um desses níveis influencia diretamente no declínio da diversidade, podendo resultar na extinção de espécies (BICKHAM et al., 2000).

Sabe-se que a sociedade humana é dependente do ambiente e que a degradação ambiental continuada ameaça à qualidade de vida. Essa recente preocupação baseia-se no efeito potencialmente crônico da contaminação ambiental entre gerações (BICKHAM et al., 2000). Embora a ligação direta entre efeitos ecológicos e saúde humana seja difícil de estabelecer, o uso de espécies animais como sentinelas de problemas ambientais mostra-se importante para esta conexão (COLBORN, 1994). Como os sistemas biológicos são os alvos para a ação de contaminantes ambientais, espécies sentinelas fornecem informações importantes que não são facilmente disponíveis a partir de análises químicas de amostras ambientais, e assim, poderiam ser utilizadas como ferramentas de diagnóstico para manejo ambiental integrado (JHA et al., 2000).

Para avaliar o impacto de cada poluente na qualidade ambiental é pertinente a realização de estudos de seus efeitos deletérios nos ecossistemas (WELLS et al., 2001). Nesse contexto, o uso de biomarcadores, analisados em nível molecular e celular, são de grande importância como

instrumento para análise de efeitos biológicos para avaliação da qualidade ambiental (LA TORRE FERNANDO et al., 2005; SARKAR et al., 2006). Como biomarcadores, entende-se a medida de fluídos corporais, células ou tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, a presença de contaminantes no organismo (BODIN et al., 2004). Há biomarcadores moleculares, celulares e até animais inteiros, sendo alguns poluente-específicos e outros que sofrem alterações em resposta a estresse natural ou causado por poluentes (PFEIFER et al., 2005).

Em estudos de problemas intensivos de poluição de animais, um grupo de biomarcadores tem recebido especial atenção para o biomonitoramento de impacto de poluentes, como por exemplo, análise de enzimas de detoxificação de fase I (citocromo P450) e de fase II (glutathione S-transferase, GST), além de esterases, como acetilcolinesterase (SARKAR et al., 2006). Esses biomarcadores são de grande significância para avaliar a exposição e efeitos de diferentes contaminantes (metais, xenobióticos orgânicos e compostos organometálicos) e podem ser medidos usando diferentes análises moleculares (ROSS et al., 2002). Por meio desses biomarcadores é possível avaliar a que poluente o organismo foi exposto e/ou magnitude da resposta do organismo aos poluentes (SARKAR et al., 2006).

Índices morfométricos também são extensamente utilizados para avaliação fisiológica do impacto da contaminação ambiental sobre uma população. Estressores ambientais podem alterar parâmetros fisiológicos e bioquímicos das espécies, incluindo índices morfométricos, respostas antioxidantes e parâmetros metabólicos energéticos (LI et al., 2009). Um parâmetro extensivamente utilizado é o fator de condição que indica o “bem-estar” animal em relação ao hábitat. Para comparar espécies de diferentes tamanhos, o fator de condição foi considerado o melhor índice (BOLGER; CONNOLLY, 1989). De acordo com esses autores, mudanças no fator de condição, baseado na relação peso-comprimento reflete alterações sazonais no balanço metabólico e padrões de maturação. O fator de condição, portanto, mostra-se um bom indicador do *fitness* de uma população.

No entanto, os efeitos somáticos apresentam relativa importância em toxicologia animal, por causa da conservação e manejo desses

animais e do ecossistema. Deste modo, estudos com foco em populações mostram-se muito importantes. Embora a saúde de um organismo seja um importante indício para a natureza do estresse experimentado por uma população, o mais profundo efeito ambiental ocorre em níveis maiores de organização, como populações e comunidades (BICKHAM; SMOLEN, 1994; BELFIORE; ANDERSON, 1998; BICKHAM et al., 2000).

Em condições naturais, ou seja, ausência de influências antropogênicas, frequências alélicas dentro de uma população, flutuam com o tempo de acordo com processos estocásticos (deriva), migração e/ou pressão de seleção ambiental, como mudanças climáticas ou de hábitat. Entretanto, várias perturbações em uma curta escala temporal, como a poluição causada pelo homem, pode diminuir a condição e a variabilidade genética, reduzindo a viabilidade (*fitness*) de populações naturais (MAES et al., 2005), por fixação de alelos deletérios. Sendo assim, a suscetibilidade ao estresse ambiental aumenta, enfraquecendo a sobrevivência das espécies (STANTON et al., 2000; MAES et al., 2005).

Deste modo, poluentes podem mostrar seus efeitos tóxicos em nível molecular, mas também iniciam uma cascata de respostas em níveis superiores, nos tecidos e saúde geral do organismo (*efeito somático*), reprodução, demografia populacional (*efeito ecológico*), genética de populações, e finalmente, processos evolutivos (*efeito evolutivo*) incluindo, nos casos mais drásticos, a extinção (BICKHAM et al., 2000; MEDINA et al., 2007; JHA, 2008).

O desenvolvimento de tecnologias de DNA, principalmente após a descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR), tem aumentado as oportunidades de estudos do efeito da variação genética como um fator de seleção, resistência e viabilidade de indivíduos e populações (BROWN et al., 2001).

Abordagens moleculares oferecem potencial para acessar a composição genética de populações e permitir estudos correlacionando genética de populações e exposição à contaminantes ambientais (STATON et al., 2001). Os enfoques empregados para medir a variação genética são selecionados baseando-se na necessidade do nível de diversidade alélica a ser analisada. Quando altos níveis de variação genética, ou seja, extenso polimorfismo são

necessários, estratégias como AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), análise de seqüências da região controle de mtDNA e DNA microssatélite são utilizados (BROWN et al., 2001). Microssatélites são particularmente variáveis e apresentam alto grau de polimorfismo identificado de modo satisfatório dentro de vários táxons (HUGHS; QUELLER, 1993).

Microssatélites são repetições em tandem de di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeo, amplamente distribuídas no genoma eucarioto e procarioto (KANDPAL et al., 1994; TÓTH et al., 2000; ZANE et al., 2002; ELLEGREN, 2004). Os microssatélites estão entre os mais versáteis marcadores moleculares devido a sua natureza altamente polimórfica, modo codominante de herança, fácil identificação, abundante distribuição no genoma e fácil utilização em experimento envolvendo PCR (BARKER et al., 1997; KIM et al., 2004).

Devido à alta variabilidade e rápida evolução desses elementos genéticos, os microssatélites mostram-se interessantes para estudos de diferenciação entre populações relacionadas e mudanças recentes ou rápidas em variabilidade genética dentro de uma população, como aquelas causadas por contaminantes ambientais (ELLEGREN et al., 1997).

Outra vantagem dos microssatélites é a possibilidade de avaliar múltiplos locos, aumentando a chance de detectar e observar eventos mutacionais. Esta vantagem pode ser particularmente importante no monitoramento de ambientes poluídos onde o tamanho amostral é limitado por causa da pequena área envolvida ou do perigo de extinção de alguns organismos. Pelo aumento do número de locos, o tamanho amostral é indiretamente aumentado, enquanto limita o impacto da amostragem na população (BICHKAM et al., 2000). Esses marcadores, portanto, mostram-se como uma ferramenta importante para avaliar a plasticidade e composição genética que se apresentam como um fator determinante para o sucesso de esforços em conservação e restauração.

Finalmente, o uso de biomarcadores para identificar efeitos somáticos pode ser empregado em conjunto com estudos de genética de populações, fornecendo uma conexão convincente entre os efeitos de

contaminantes em múltiplos níveis de organização biológica (BICKHAM; SMOLEN, 1994; PRETTI; COGNETTI-VARRIALE, 2001).

II. *Phrynops geoffroanus* como modelo para estudos ecotoxicológicos evolutivos

O Brasil possui a fauna e a flora mais ricas de toda a América Central e Sul. No entanto, informações para muitas das espécies, principalmente no que diz respeito aos répteis, ainda são preliminares (RODRIGUES, 2005). Possui 732 espécies de répteis, sendo seis espécies de jacarés, 67 anfisbênia, 248 lagartos, 375 serpentes e 36 quelônios. Atualmente, o Brasil ocupa a segunda colocação na relação de países com maior riqueza de espécies de répteis, atrás da Austrália (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2011).

Entre os répteis, a ordem Testudines mostra elevada importância no contexto ecotoxicológico. Representantes deste grupo apresentam-se úteis como indicadores de contaminação química e radioativa, nos ecossistemas aquáticos e terrestres, em programas de monitoramento, por apresentarem ampla distribuição geográfica e serem encontrados em uma grande variedade de habitats, além de possuírem vida longa (MEYERS-SCHÖNE; WALTON, 1994).

A ordem Testudines é constituída por 322 espécies de tartarugas, cágados e jabutis (TTGW, 2011) e está subdividida em duas subordens: Cryptodira (cripto: escondido; dire: pescoço), animais que retraem a cabeça horizontalmente para dentro do casco, dividida em três superfamílias: Testudinoidea, Trionychoidea e Chelonoidea. A outra subordem é chamada de Pleurodira (pleuro: lado), que retraem a cabeça e o pescoço lateralmente, dividida em duas famílias: Chelidae e Pelomedusidae encontrados apenas no Hemisfério Sul (POUGH et al., 2003).

MCCORD et al., 2001 adjectiva a história taxonômica dos Pleurodira do Novo Mundo como no mínimo “turbulenta”. *Phrynops* (*senso lato*) é um gênero de quelônio endêmico da América do Sul, que inclui espécies de

cágados cujo interrelacionamento é incerto. Dentro deste grupo, a espécie *Phrynops geoffroanus*, popularmente conhecida como cágado-de-barbelas, tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo na América do Sul a leste dos Andes, desde a Colômbia até a Argentina (Misiones) (LEMA; FERREIRA, 1990). Segundo Pritchard e Trebbau (1984), esta espécie parece habitar mais frequentemente lagoas e riachos a rios de maior volume. Outra observação interessante é que *Phrynops geoffroanus* pode ser encontrado em rios poluídos que atravessam algumas cidades brasileiras (BRITES, 2002; FERRONATO, 2008; PIÑA et al., 2009). Esta espécie é vista com frequência, em concentrações de indivíduos em alguns pontos, principalmente nas áreas mais urbanizadas com a presença de esgotos domésticos e industriais. A concentração desta espécie nestas áreas parece estar relacionada a abundância de alimentos provenientes dos esgotos e de outras fontes (BRITES, 2002).

Apesar do registro na literatura da concentração desta espécie em áreas afetadas por influência antropogênica, não existem estudos avaliando biomarcadores para análise de estresse ambiental e a influência deste fator na história evolutiva dessa espécie. Além disso, há registros escassos sobre a arquitetura genética da espécie em questão. O conhecimento sobre marcadores nucleares, em especial microssatélites, permite a identificação de unidades de conservação e manejo, diferenças no comportamento migratório de macho e fêmeas e comportamento sexual (BOWEN et al., 2005; JENSEN et al., 2006).

Baseando-se no fato de que *Phrynops geoffraonus* é uma espécie que ocorre com certa frequência em áreas impactadas por poluição gerada por esgoto doméstico e industrial, avaliar a ação desses contaminantes em nível bioquímico, fisiológico e da influência dos mesmos na diversidade genética desta espécie, mostra-se de grande importância não somente para quelônios de forma geral, mas também para toda a comunidade associada a esses ambientes impactados, inclusive para a manutenção de mananciais para benefício humano.

Este trabalho teve como **objetivo principal** avaliar os efeitos de contaminantes originados por atuação antrópica (despejo de lixo orgânico e industrial) e suas influências nas mudanças evolutivas por padrões de diversidade genética em população de *Phrynops geoffroanus* existentes no Rio Preto e seu afluente Córrego Felicidade, localizados na bacia hidrográfica Turvo/Grande. Esta bacia é considerada a mais degradada e poluída do estado de São Paulo.

Os **objetivos específicos** foram:

- A) Avaliar sistemas relacionados com a biotransformação de xenobióticos, metais e compostos organometálicos de fase I (atividade EROD) e fase II (atividade da GST), capacidade antioxidantes (G6PDH) e avaliar a atividade da esterase acetilcolinesterase (AChE) em *Phrynops geoffroanus*, como biomarcadores sensíveis a contaminação;
- B) Avaliar a condição dos animais coletados por meio da análise do fator de condição, baseando-se em dados de peso e comprimento como ferramenta para averiguação da condição fisiológica e bem-estar dos animais capturados em ambiente controle e urbano;
- C) Realizar análise de diversidade populacional com a finalidade de realizar um estudo de estrutura populacional e genética de populações;
- D) Estimar parâmetros de relação dos dados observados pela análise de biomarcadores e variabilidade genética (correlação heterozigidade-*fitness*) como um primeiro estudo ecotoxicológico evolutivo para uma espécie endêmica da América do Sul e especificamente para a espécie *Phrynops geoffroanus*.



---

**CAPÍTULO 1 - POLLUTION-INDUCED METABOLIC  
RESPONSES IN HYPOXIA-TOLERANT FRESHWATER TURTLES**

**ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY  
(FATOR DE IMPACTO: 4.8)**



**Pollution-induced metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles**

Larissa Paola Rodrigues Venancio<sup>1</sup>, Maria Isabel Afonso da Silva<sup>1</sup>, Tiago Lucena da Silva<sup>1</sup>, Vinicius Augusto Gobbe Moschetta<sup>1</sup>, Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari<sup>2</sup>, Eduardo Alves de Almeida<sup>3</sup>, Claudia Regina Bonini-Domingos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Centro de Estudo de Quelônios (CEQ) e Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), IBILCE, UNESP;

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São José do Rio Preto,

<sup>3</sup>Departamento de Química e Ciências Ambientais, Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental (LABCA), IBILCE, UNESP.

*\* Artigo submetido à revista indexada Environmental Science and Technology*

Environmental Science & Technology

**Pollution-induced metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Journal:                      | <i>Environmental Science &amp; Technology</i>   |
| Manuscript ID:                | es-2012-00306h  |
| Manuscript Type:              | Article   |
| Date Submitted by the Author: | 24-Jan-2012   |
| Complete List of Authors:     | Rodrigues Venancio, Larissa; UNESP - Sao Paulo State University, Biology<br>Silva, Maria; UNESP - Sao Paulo State University, Biology<br>Silva, Tiago; UNESP - Sao Paulo State University, Biology<br>Moschetta, Vinicius; UNESP - Sao Paulo State University, Biology<br>Zuccari, Debora Aparecida; Sao Jose do Rio Preto School of Medicine,<br>Almeida, Eduardo; UNESP - Sao Paulo State University, Chemistry<br>and Environmental Science<br>Bonini-Domingos, Claudia; UNESP - Sao Paulo State University, Biology |

SCHOLARONE™  
Manuscripts

ACS Paragon Plus Environment

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Pollution-induced metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles

*Larissa Paola Rodrigues Venancio*<sup>1\*</sup>, *Maria Isabel Afonso da Silva*<sup>1</sup>, *Tiago Lucena da Silva*<sup>1</sup>, *Vinicius Augusto Gobbe Moschetta*<sup>1</sup>, *Déborá Aparecida Pires de Campos Zuccari*<sup>2</sup>, *Eduardo Alves de Almeida*<sup>3</sup>, *Claudia Regina Bonini-Domingos*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Department of Biology, Centro de Estudo de Quelônios (CEQ) and Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), IBILCE, UNESP - Sao Paulo State University, Sao Jose do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil

<sup>2</sup> Sao Jose do Rio Preto School of Medicine, FAMERP, Sao Jose do Rio Preto, SP 15090-000, Brazil

<sup>3</sup> Department of Chemistry and Environmental Science, Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental (LABCA), IBILCE, UNESP - Sao Paulo State University, Sao Jose do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil

\*Corresponding author: [larissa\\_biorp@yahoo.com.br](mailto:larissa_biorp@yahoo.com.br), Phone +55 017 3221 2392

WORD COUNT: Abstract and Text (4656) + Figure 1 (a) (b) (41) + Figure 2 (a-k) (76) + Figure 3 (48) + Figure 4 (98) + Figure 5 (221) + Figure 6 (124) + Table 1 (14) = 5278

### ABSTRACT

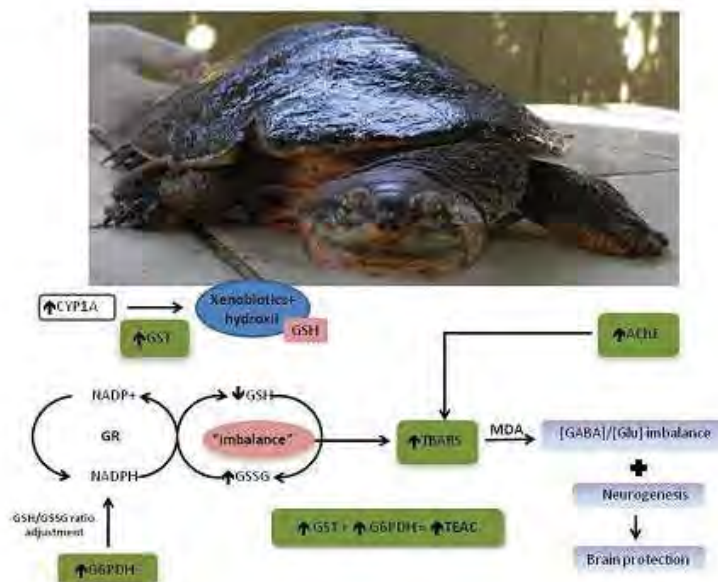
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

The physiological control to support the absence of O<sub>2</sub> for long periods of diving, and oxidative damage impact caused by the whole process of hypoxia/reperfusion in freshwater turtles is well known. However, effects of contaminants may act as co-varying stressors and cause biological damage, disrupting the hypoxia/reperfusion oxidative damage control. We performed biochemical analysis of biotransformation enzymes, oxidative stress, as well as neuromuscular, physiological and morphological parameters in *Phrynops geoffroanus*, an hypoxic-tolerant freshwater turtle endemic of South America. Animals from the urban area exhibited higher EROD, GST, G6PDH, AChE activities and also TEAC and TBARS values. Furthermore, we examined whether two morphometric indices (K and HIS) were modified. The K of the urban animals was significantly decreased compared to the control animals, but the HIS value was increased in animals from the urban area. We propose that *P. geoffroanus* have the ability to enhance its antioxidants defences in order to protect from tissue damage caused by hypoxia and reperfusion, but also that caused by environmental contamination and that the oxidative damage control in hypoxic conditions has resulted in an adaptive condition in hypoxic-tolerant freshwater turtle species, in order to better tolerate the release of contaminated effluents resulting from human activity.

Key-word: *Phrynops geoffroanus*, contaminated domestic effluent, oxidative damage and antioxidant capacity, biochemistry and morphometric markers, hypoxia.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

TOC ART



Introduction

Brazil has the richest fauna and flora of the entire world, with about 1.8 million species, and is second in regards to wealth of reptilian species, though most information on reptiles is still preliminary (1-3). The Order Testudines are very important in an ecotoxicological context, however, the use of reptiles as bioindicators of environmental contamination is a recent development. There are many reasons for this: the difficulty in sampling specimens in sufficiently large numbers, a lack of perceived economic value and the difficulty of acclimatizing them to the laboratory. However, their persistence in a variety of habitats, wide geographic distribution and longevity, actually make them very suitable bioindicators of contamination (4).

1  
2  
3 The biological effects of pollution and the anthropogenic impact on Brazilian aquatic  
4 systems are poorly evaluated, despite of the importance of Brazil's natural wealth. Only  
5 3.7% of the Turvo/Grande Watershed, located in south east Brazil, it is covered with  
6 natural vegetation, and has significant levels of organic domestic pollutants, as well as a  
7 high risk of chemical contamination to both the soil and water, and a very poor water  
8 quality index needed to protect aquatic life (5) (Fig.1). Despite the Turvo/Grande  
9 Watershed's poor water quality, *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) specimens, an  
10 hypoxic-tolerant freshwater turtle endemic to South America are commonly found, though  
11 the specie's natural history is poorly understood. The chelonians species are a group of  
12 turtles with a minimum tolerance of hypoxia/anoxia of more than 4.5 hours (6). The  
13 physiological control to support the absence of O<sub>2</sub> for long periods of diving, and oxidative  
14 damage impact caused by the whole process of hypoxia/reperfusion in freshwater turtles is  
15 well known (7-10). However, effects of contaminants may act as co-varying stressors and  
16 cause biological damage, disrupting the hypoxia/reperfusion oxidative damage control.  
17 This raises an intriguing question of how contaminants may influence the control of  
18 oxidative damage caused by the events of hypoxia and reperfusion in hypoxic-tolerant  
19 freshwater turtles.

20  
21  
22 To investigate the relationship between hypoxia and the environmental stressors derived  
23 from sewage wastewater effluents, which contain constituents considered complex  
24 mixtures of unknown composition, we have conducted an evaluation of EROD (CYP1A),  
25 Glutathione S-transferase (GST), Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH),  
26 Acetylcholinesterase (AChE) activities as well as an evaluation of thiobarbituric acid  
27 reactive substances (TBARS) and trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC) in  
28 *Phrynops geoffroanus* collected in both urban and controlled areas. We also determined the  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 condition factor (K) and hepatosomatic index (HIS) as indicators of physiological status  
4 that summarizes their growth, reproduction, and secretion activities under a given  
5 environmental condition. We report the physiological and biochemical impact caused by  
6 pollution and the effects of these changes in antioxidant activity and in oxidative damage  
7 control produced by hypoxia and reperfusion events, beyond the specie adaptation to  
8 adverse condition generated by environmental contamination.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

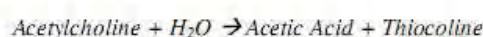
### 19 **Experimental Section**

20 **Samples.** We collected 10 animals from the urban area (Felicidade stream, Preto river,  
21 Turvo/Grande Watershed, Sao Paulo State, 20°46'25.99"S; 49°21'17.63" W) and 10  
22 animals in the controlled area ("Reginaldo Uvo Leone" breeding farm, Sao Paulo State,  
23 20°59'47.5"S, 49°07'16.6"W). This breeding farm works with wild and exotic reptiles,  
24 amphibians and birds for commercial purposes. The number of samples was chosen in an  
25 effort to obtain an acceptable balance between statistical power and any adverse effects on  
26 the natural turtle population which is already under anthropogenic pressure, and about  
27 which the population size was unknown. All specimens were collected in the same period  
28 (February and March) to avoid deviations in the morphometric parameters caused by  
29 influences from the breeding period and season. The collection activities, of animals and  
30 biological material, were authorized and approved by IBAMA/ICMBio (register nº  
31 28387/16488-1 and 16488-2) and the Ethics Committee for Animal Experimentation of Sao  
32 Jose do Rio Preto School of Medicine (FAMERP nº5517/2008). Capture of animals in the  
33 urban area was done with traps with netting used in the controlled area. From all specimens  
34 were collected two morphological parameters (A) maximum over-the-curve carapace  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 length, in centimetres, from the anterior-most part of the carapace to the posterior-most tip  
4  
5 of the carapace on the same side (11) and (B) body mass in grams.  
6  
7

8  
9  
10 **Chemicals.** All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, M.O.,  
11  
12 U.S.A.).  
13  
14

15  
16 **Ecotoxicology evaluation.** For ecotoxicological assays, we used liver, brain and peripheral  
17  
18 blood from euthanised animals in accordance with procedures recommended by COBEA.  
19  
20 For the AChE analyses, brain tissue was homogenized (1:4, w-vol) in a 0.1M Tris buffer, at  
21  
22 pH 8.0, and then centrifuged for 30 mins at 30,000g. The AChE activity was measured and  
23  
24 then characterized following methodology previously described (12). The enzymatic  
25  
26 activity is performed based on the following equation:  
27  
28

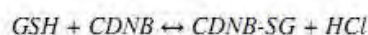


32  
33 The spectofotometric assay is performed at 25°C,  $\lambda=412$  nm,  $\epsilon_{\text{mM}}=13.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , following  
34  
35 the DTNB reaction with thiocoline in 2 min. The reaction was performed using a Tris-HCl  
36  
37 buffer (100mM, pH 8.0), acetylthiocoline iodide 100mM, DTNB 1mM and the extract in a  
38  
39 final volume of 1mL.  
40  
41

42  
43 For GST (13), G6PDH (14) and EROD (15) (with modifications) analyses, the liver was  
44  
45 homogenized (1:4, w/v) in a Tris 20 mM buffer (pH 7.4), sucrose 0.5 mM, KCl 0.15 mM  
46  
47 and 1 mM protease inhibitor (PMSF). The samples were then centrifuged at 9,000g for 20  
48  
49 mins at 4°C, and the upper phase was collected and centrifuged once more at 50,000g for  
50  
51 60 mins. The cytosolic fraction was then collected for GST and G6PDH analysis, while  
52  
53 EROD activity (indicative of CYP1A) was measured in the pellet, which was resuspended  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 in 100  $\mu$ L Tris 100 mM buffer, at pH 7.5, containing EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 100  
4  
5 mM and 20% glycerol. The GST assay is performed based on the reaction below:  
6



8  
9  
10 The spectofotometric evaluation was performed at 30°C,  $\lambda=340$ nm. The reaction was  
11  
12 conducted with a potassium phosphate buffer 0.2 M, pH 6.5, GSH 200mM, CDNB 200mM  
13  
14 and sample.  
15

16  
17 The spectofotometric evaluation of G6PDH activity was performed at 1 min.,  $\lambda=340$ nm.  
18  
19 The reaction was conducted with 50mL of Tris-HCl buffer 0.1M, pH7.4,  $MgCl_2$  0.2mol/L,  
20  
21 10mg of NADP and water (final volume: 100mL). 21.25mg of G6P at 50mL of the reaction  
22  
23 medium was added. The assay was performed using a solution without G6P and a sample  
24  
25 and 2 aliquots of reaction medium containing G6P and sample.  
26  
27

28  
29 The EROD evaluation was performed in fluorometer. The  $\lambda_{Ex}$  (excitation) = 537 nm and the  
30  
31  $\lambda_{Em}$  (emission) = 583 nm, performed in 180s. The assay is performed with Potassium  
32  
33 Phosphate buffer 80mM, pH 7,4, 7-etoxiresorufin 332  $\mu$ M, NADPH 20mM and  
34  
35 homogenized sample, totalling 2mL of reaction. The reaction was monitored for 3 min. at  
36  
37 30°C and EROD activity was calculated based on a resorufin standard curve that had been  
38  
39 prepared. The protein evaluation was performed using the Bradford method (16).  
40  
41

42  
43 The plasma level of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) (17) (with modifications)  
44  
45 was used to evaluate the samples' lipid peroxidation. The method is based on the reaction of  
46  
47 malondyaldehyde and other aldehydes with tiobarbituric acid (TBA) at a low pH and high  
48  
49 temperature to form a complex with a maximum absorption at 535nm. The final TBARS  
50  
51 amount in each sample was obtained in ng/mL. The antioxidant potential of the samples  
52  
53 was determined according to their equivalence to a potent known antioxidant, trolox (6-  
54  
55 hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), a water-soluble synthetic analogue  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 of vitamin E. This is a colorimetric method based on the reaction of ABTS (2,2'-azino-  
4 bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic-acid)) with potassium persulfate ( $K_2S_2O_8$ ),  
5  
6 producing the radical cation  $ABTS^{+\bullet}$ , a chromophore of greenish/blue, with maximum  
7  
8 absorbance at wavelengths 645, 734 and 815nm. The samples addition containing this  
9  
10 preformed cation radical was reduced once again in ABTS and the decolorization assessed  
11  
12 at 734nm. Final results were expressed in mM/L, corresponding to the concentration of the  
13  
14 studied sample's trolox equivalent antioxidant capacity, called TEAC (18).

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22 **K and HIS evaluation.** The condition factor (K (19)) and length-weight relationship were  
23  
24 determined by measuring total weight and total length, and the curves parameters **a** and **b**  
25  
26 were determined by log transformation of raw data (20). Growth curves obtained from  
27  
28 straight line for regression between total weight and total length is  $\log W = \log a + b \cdot \log L$ .  
29  
30 The theoretical equation of the length-weight relationship followed the equation  $W = a * L^b$ .  
31  
32 Condition factor was assessed by the following expression:  $K = W/L^b$ , where K=  
33  
34 condition factor; W = total weight; L = total length; b = coefficient of regression. The HIS  
35  
36 was calculated by liver weight/ total body weight \* 100 (21).

37  
38  
39  
40  
41  
42  
43 **Statistical analysis.** For the statistical analysis of the evaluation of ecotoxicological assays,  
44  
45 the data were assessed for normality and homogeneity of variances through Shapiro-Wilk  
46  
47 W and Levene's tests, respectively. Log transformation of data was employed where  
48  
49 necessary, in order to allow the use of parametric statistical methods. The probability of  
50  
51 significance was set at  $\alpha < 0.05$ , and data reported as mean  $\pm$  s.e.m. Data were subjected to  
52  
53 parametric testing (*t*-test), two-tailed, and for independent samples. Associations between  
54  
55 biomarker variables and morphometric indices were examined by Pearson's correlation  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 procedure using individual turtle data. After confirmation of the homogeneity of slopes,  
4 analysis of covariance (ANCOVA) was used to compare the intercepts of these  
5 relationships between the areas of study. Biochemical and morphometric parameters  
6 variation was further summarized in the principal component analysis (PCA). PCA is a bi-  
7 linear modelling method where the information carried by the variables is projected onto a  
8 smaller number of underlying ("latent") variables called principal components. The length  
9 and direction of the lines represent the significance of the associated variables for the  
10 plotted components and for the discrimination of the samples based on PC, and each  
11 variable has a loading along each PC. The loadings show how much each variable  
12 contributes to the meaningful variation in the data. For cluster analysis, Euclidean distances  
13 are calculated between each sample, making it possible to view groups and, consequently,  
14 samples with similar characteristics. The statistical analyses were performed in  
15 STATISTICA<sup>®</sup> version 8.0.

## 36 Results and Discussion

37  
38  
39  
40 **Assessment of ecotoxicological parameters.** Under normal physiological conditions,  
41 animals maintain a balance between generation and neutralization of reactive oxygen  
42 species (ROS). However, when organisms are subjected to xenobiotic compounds, the  
43 production rate of ROS, such as superoxide anion radicals ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide  
44 ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radicals ( $\bullet OH$ ) and peroxy radical ( $ROO^{\bullet}$ ) exceeds their scavenging  
45 capacity (22). All organisms have their own cellular antioxidative defence system,  
46 composed of both enzymatic and non-enzymatic components.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

To identify the impact of xenobiotic compounds resulting from sewage wastewater effluent exposure, we performed several biochemical analyses of contamination biomarkers.

Liver, plasma and brain samples collected from both the urban and controlled area animals were evaluated in order to assess variations in hepatic EROD activity (IA isoform of Cytochrome P450, a phase I biotransformation enzyme), GST (Phase II), G6PDH and TEAC (antioxidant capacity), encephalic AChE (neurotoxicity) and TBARS (lipid peroxidation) (Table 1).

Animals from the urban area exhibited higher EROD activity when compared to those from the controlled area, indicating a twofold increase in liver CYP1A (Fig.2A), which may be related to the presence of anthropogenic organic contaminants in the urban area, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) (23-25).

The GST activity evaluation showed values 1.36 times higher in animals from the urban area (Fig.2B). The primary reaction catalysed by GSTs is the nucleophilic attack by reduced GSH on a diverse group of hydrophobic compounds which contain an electrophilic carbon, nitrogen, or sulphur atom (26).

The evaluation of G6PDH activity presented a significant difference with higher activity in animals from the urban area (1.76 times) (Fig.2C), suggesting an increased action in the antioxidant defences of animals from the contaminated area. It is known that G6PDH activity can increase during stressful situations in order to guarantee the NADPH supply which is key to sustaining antioxidant defences (27). This action is confirmed by the TEAC analysis, which showed elevated values in the urban area (1.23 times higher) (Fig.2D). We therefore expected low rates of lipid peroxidation (LPO). However, the LPO analysis showed higher values in the urban area (1.76 times) in comparison to the controlled area (Fig.2E). It is known that TBARS levels may be elevated following exposure to metals,

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

such as aluminium (Al) and cadmium (Cd), as well as diesel fuel exposure and heat stress (28,29). Therefore, the data generated in this study suggest that the impact of water pollution on the population of hypoxia-tolerant freshwater turtles can be further compounded by the association between high temperatures, common to tropical areas, and metal contamination.

In this study, the animals of the urban area exhibited higher values (1.3 times) of AChE activity compared to the control animals (Fig.2F). This result indicates that there are elements in the environment that stimulate AChE activity. The water present in the urban area showed annual lower O<sub>2</sub> dissolved levels (1.42–3.71 mg L<sup>-1</sup>, unpublished data), high concentrations of cadmium (Cd, 2.0 to 3.0 µg/L (30)) and aluminium (Al, 174.8 to 707.85 µg/L, unpublished data). It has been proposed that the high Cd levels can be associated with high TBARS levels (28), and high Al levels with increased AChE activity (29).

These results indicate a consistent picture of a strong environmental impact in the urban area. However, the TEAC evaluation demonstrates that urban freshwater turtles have a high antioxidant capacity. We propose that this freshwater turtle specie have the ability to enhance its antioxidants defences in order to protect from tissue damage caused by hypoxia and reperfusion, but also that caused by environmental contamination.

**Assessing K and HIS indices.** Next, we investigated if the physiology and welfare of the urban animals were modified as a result of environmental disturbance caused by pollution. We examined whether two morphometric indices (K and HIS) which help in assessing the general condition and possible liver disease, respectively, were modified. These indices can provide important information on potential pollution impact on aquatic animals (24).

1  
2  
3 To test this question, these indices were calculated through the relationship between total  
4 body length and weight (K), and the total liver weight and total body weight (HIS). The K  
5 of the urban animals was significantly decreased (12.9 times) compared to the control  
6 animals (Fig.2G), but the HIS value was increased (2.17 times) (Fig.2H) in animals from  
7 the urban area, supporting the idea of an impact in physiology and life quality in the urban  
8 freshwater turtles. In this study, animals in the urban area proved to be heavier than the  
9 animals from controlled area (Table 1), and ANCOVA (analysis of covariance) showed that  
10 mass varied significantly between areas, considering the liver weight as a covariate  
11 ( $F=33.74381$ ,  $p=0.000000$ ). We suggested that the increased weight seen in the urban area  
12 is due to fat accumulation from the consumption of large amounts of decomposing organic  
13 material available to these animals. In relation to HIS, the values indicate an association  
14 with effluent rich in organic materials, and enhanced detoxification activities in response to  
15 the presence of contaminants, with an increase in cell length and number, which was  
16 reflected in overall liver weight (31,32).

17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39 **Biomarkers, K and HIS indices relationship.** Next, we performed multivariate  
40 exploratory techniques with all variables analyzed. The cluster analysis indicated two  
41 distinct groups corresponding to samples collected in the controlled area and another of  
42 samples collected in the urban area (Fig.3). Biochemical and morphometric parameter  
43 variation was further summarized in the principal component analysis (PCA). The PCA  
44 analysis and component loading plots analysis exhibited a separation of components in  
45 morphometric variables (PC 1, 38.29%), biomarkers and elements associated with  
46 antioxidant capacity (PC 2, 25.27%) in the controlled area (Fig.4A), and a separation of  
47 components in biomarkers (PC 1, 32.80%) and weight/length (PC 2, 30.77%) in the urban  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 area (Fig.4B). In the controlled area a strong positive correlation was observed between  
4 AChE activity and TBARS levels (Fig.4C). In the urban area, positive correlation was  
5 observed between HIS and G6PDH activity (Fig.4D), and a negative correlation was  
6 observed between K and EROD activity (Fig.4E). This analysis reflects the existence of an  
7 important effect of phase I of xenobiotic detoxification in the ability of animals to tolerate  
8 toxic challenge and environmental stress (23). The higher values in HIS were associated  
9 with higher values of G6PDH activity reflecting the possible exposure of turtles to a sub-  
10 lethal concentration of pollutants, resulting in an increase in the number of hepatic cells, as  
11 a consequence of induction or activation of biotransformation enzymes (31-33). The  
12 ANCOVA analyses showed that HIS varied significantly between areas after allowing for  
13 G6PDH activity as a covariate ( $F=40,39983$ ,  $p=0,000001$ ).

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32 **Analysis of ecotoxicological parameters and morphometric indices.** In this study we  
33 have shown that environmental contamination affects antioxidant capacity and the network  
34 of elements involved in the protection of oxidative stress caused by hypoxia/reperfusion in  
35 hypoxic-tolerant freshwater turtles (Fig.5). Biotransformation plays a critical role in the  
36 elimination of xenobiotics and that different CYPs can catalyse the direct insertion of  
37 oxygen atoms into several organic compounds (34). The intermediary elements generated  
38 in phase I of biotransformation, and other biochemical reactions can be conjugated with  
39 glutathione (GSH) in a reaction catalysed by GST. Thus, GST expression is of importance  
40 when considered susceptible to environmental chemical toxicity (35). The increased GST  
41 activity in animals from natural populations is directly related to the increase in oxidative  
42 stress. Like other hypoxia-tolerant reptiles, freshwater turtles must deal with a significant  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 amount of ROS generated as a consequence of the ischemia-reperfusion associated with  
4 diving (7). When the balance is tipped in favour of oxidative stress, the intracellular  
5 overgeneration of such radicals may cause damage to macromolecules and thus affect cell  
6 function in numerous ways (36).  
7  
8  
9

10  
11  
12 Turtles have mechanisms that prevent the formation of ROS or that minimize oxygen free  
13 radical damage during oxygen reperfusion in the recovery period (6,8,37-39). Such  
14 mechanisms could involve the use of both enzymatic and nonenzymatic antioxidant  
15 defence systems. The most important of the nonenzymatic antioxidants is glutathione.  
16 Because GSH is present in high intracellular concentrations, there is a high probability that  
17 any ROS will be immediately quenched on formation. Glutathione disulfide (GSSG) is  
18 formed but is subsequently reduced by glutathione reductase (GR) to restore GSH. When  
19 ROS are present in large amounts, GSSG formation can exceed its clearance and the ratio  
20 of reduced to oxidized glutathione (GSH/GSSG) decreases (23). The maintenance of GSH  
21 levels, and thereby the reducing environment of the cell, is crucial to organisms that  
22 periodically undergo oxidative stress (8). This maintenance is guaranteed by glutathione  
23 reductases and G6PDH, that have been shown to increase as the GSH/GSSG decreases  
24 (40).  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

43 Previous studies have shown that the total activity of turtle liver GSTs decreases by 25%  
44 during hypoxia/anoxia (37). Purification and characterisation of turtle liver GSTs showed a  
45 decrease in activity of all isoforms during anoxia from 7.3 U/mg protein in aerobic  
46 conditions to 2.8 U/mg protein under anoxic conditions (37,38). The implication of this is  
47 that the turtle liver relies on a fixed pool of glutathione during prolonged hypoxia/anoxia  
48 (with lower turnover), which it can use for buffering redox changes, associated with  
49 changes in GST activity in support of anaerobiosis (38). Therefore, the glutathione function  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

analysis in hypoxia-tolerant turtles shows that a reduction in enzyme activity is associated with use/degradation (i.e. GST) and an increase in the activities of enzymes involved on the production of GSH in key tissues (kidney, liver, heart and brain) during hypoxia, prevents the formation of, or minimizes damage by, ROS during transitions between hypoxic and aerobic states (8). High redox buffer capacity associated with high basal levels of total thiols in red blood cells, attributed to increased GSH levels, and has been postulated as a mechanism preventing reperfusion injury in the hypoxia-resistant turtle *Phrynops hilarii* (39). Thus, based on the fact that the GST activity in animals of the urban area in this study saw an increase compared with the control, we can infer the existence of an imbalance in the GSH/GSSG ratio by increasing GST activity.

Influxes of oxyradical-generating compounds due to environmental contaminants may alter GSH status and/or metabolism in several ways. Increased fluxes of oxyradicals can impose an intracellular drain on equivalent reductors with potentially profound consequences on a variety of metabolic processes. The consumption of GSH due to the direct scavenging of oxyradicals, or as a cofactor for GSH-dependent enzymes (i.e. GSTs and glutathione peroxidases), may represent such a drain, and NADPH must be continuously oxidized to maintain GSH levels via glutathione reductase (GR) (41). The results of G6PDH activity and NADPH production derived from enzyme activity are directly associated with the generation of elements related to the increase of antioxidant activity (Fig.5A, Fig.6A). In animals from the urban area, the G6PDH requirement increased compared to the controlled area, indicating the presence of exogenous elements that are changing the activity of the enzymatic and nonenzymatic factors associated with oxidative processes in *P. geoffroanus*. In addition, there was strong relationship between G6PDH activity and HIS. The increase in G6PDH activity is closely related to lipid biosynthesis (42), which also influences the

1  
2  
3 HIS increase, as the index also identifies increased liver fat. The disruption of this balance  
4 by the presence of xenobiotics may be more accentuated during re-oxygenation recovery.  
5  
6  
7 However, it is known that in tissues from organs such as the heart, kidney and brain, due to  
8 glutathione status, little or no oxidative stress occurs during anoxia or recovery from anoxia  
9 (8). Thus, the changes impact on enzyme activity involved in detoxification and antioxidant  
10 activity in freshwater turtles, due to the presence of environment pollutants, and can alter  
11 the entire mechanism of tolerance to hypoxia and normoxia.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

19 The increase in antioxidant activity might reflect a general metabolic expression response  
20 to anoxia/hypoxia that may affect protein synthesis. Indeed, translation is known to be a  
21 highly ATP consuming process (43), requiring an increase in metabolic activity, and higher  
22 physiological efforts, reflected in the fitness of the impacted population, that may be  
23 evidenced by K and HIS evaluation. However, the increased G6PDH activity ensures  
24 increased NADPH production and a direct response in GR production and recycling of  
25 GSH levels, to support the redox buffering capacity of tissues protecting against oxidative  
26 stress. Moreover, NADPH also provides the reducing power for the detoxification and  
27 xenobiotic transformation reactions catalyzed by the cytochrome P540 family of enzymes  
28 (44) (Fig.5A).  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46 **Assessment of acetylcholinesterase activity.** Among biomarkers, the measurement of  
47 AChE activity is considered of great interest in evaluating the effects of exposure to  
48 neurotoxic compounds in aquatic animals (45). AChE plays an important role in the  
49 functioning of the neuromuscular system, preventing continuous muscular contraction (46).  
50 Analysis of metal concentration in water samples of the urban area (unpublished data)  
51 showed high aluminium (Al) levels. Evaluation of *in vivo* and *in vitro* effects of aluminium  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

(Al) on the activity of mouse brain AChE revealed a higher effect of Al *in vivo* in relation to *in vitro* tests, with a crescent activity of AChE along the exposure period (47). Indeed, chronic Al exposure reveals effects on brain physiology, including alteration of the lipid composition and the activities of various membrane-bound enzymes. The effect of Al on AChE activity may be due to a direct neurotoxic effect of the metal or perhaps a disarrangement of the plasmatic membrane caused by increased LPO (29). This result indicates the important impact of metal contaminants, like Al, in brain physiology of freshwater turtles. With the increase of AChE activity in the brain, acetylcholine hydrolysis (ACh) in synaptic clefts is probably increased. Consequently, the reduction of this neurotransmitter and neuromodulator in the central nervous system could lead to cerebral dysfunctions that affect the behaviour, locomotor system, balance and orientation (48). In hypoxia-tolerant turtles, the increase of LPO and malondialdehyde (MDA) in the brain can induce sleep-like and fatigue-like behaviours, as well as a glutamate and GABA imbalance, resulting in turtle brain suppression and an increase in the protective response of the brain (Fig.5B). These demonstrate that the turtle's brain has a stronger capacity to fight stress than mammals (49). Also, the neurons and glial cells in certain parts of the central nervous system continue to be produced throughout a turtle's lifespan (50). In the brain these cells proliferate more rapidly under warm conditions than at colder temperatures (51), providing a potential means to replace anoxia-damaged cells during the warmer months (52) (Fig.5C). We suggest that the lower K values could be associated with high impact of metal exposure on this population's fitness through a disruption in normal AChE activity, associated with the increase in metabolic activity required by the replacement of damaged cells, a [GABA]/[Glu] ratio imbalance and behaviour modification by LPO in specific brain areas, breaking the turtle brain homeostasis. But, the condition of cell replacement in brains of

1  
2  
3 hypoxia-tolerant turtles suggests evidence of brain damage possibly caused by the presence  
4 of contaminants in the environment while maintaining normal brain conditions (Fig.5B,C;  
5  
6 Fig.6B,C).  
7  
8

9  
10 Our results reveal the important influence that industrial and domestic effluent  
11 contamination plays in hypoxic-tolerant freshwater turtles. The strong antioxidant capacity  
12 shows up as a major source of control of oxidative stress in hypoxia and recovery (Fig. 6, to  
13 review, see (52)). Despite the increase in EROD activity and the effect on GST activity, the  
14 mean GST values in the urban area are within those expected under hypoxia conditions.  
15  
16 This observation suggests that the GST increase in response to ROS production due to the  
17 presence of pollutants, increases the antioxidant defence network, controlling the oxidative  
18 damage caused by hypoxia and reperfusion. Despite the increase in the antioxidant capacity  
19 in urban area, the morphometric indices indicate an impact on health and physiological  
20 condition, probably due to the increased physiological strain of maintaining high levels of  
21 antioxidant capacity to protect against hypoxia damage caused by contamination. The  
22 results presented here may have evolutionary implications. The increase in antioxidant  
23 capacity in the urban animals reflects an adaptation to the adverse environmental conditions  
24 caused by pollution, reinforcing the observation that reproduction in *P. geoffroanus* does  
25 not seem to be affected in polluted areas, and nests and hatchlings apparently show normal  
26 morphology and physiology, suggesting that this species is very tolerant to pollution  
27 impact, having exhibited the highest reported levels of metal concentration in reptiles (53),  
28 making this species a good bioindicator of environmental contamination. However, a  
29 significant influence on fitness can be observed. There is no data about the time scale of  
30 metal contamination in the areas studied, suggesting that the effects could currently still be  
31 subclinical, and yet lead to disruption in the population's reproductive success over time  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

(53). Furthermore, it is also suggested that the robust stress-tolerance mechanisms that permit long term anaerobiosis by turtles may also support the longevity of these animals (54). Thus, the oxidative damage control in hypoxic conditions associated with spectacular levels of antioxidant capacity would have introduced a strong condition of tolerance in hypoxic-tolerant freshwater turtles species, allowing them to withstand the adverse environmental situation, such as contaminated effluent released as a result of human activity.

#### Acknowledgements

We are grateful to Luís Dino Vizotto, Ph.D, for his important suggestions, and Lilian Nogueira, Camila Trídico and Aline Rodrigues for their technical assistance. This study was supported by CNPq – Brazil fellowship to LPRV (MCT/CNPq n°27/2007 – 143419/2008-0). This research was also supported in part by Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) and Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental (LABCA), Unesp, Brazil.

Figures and Tables

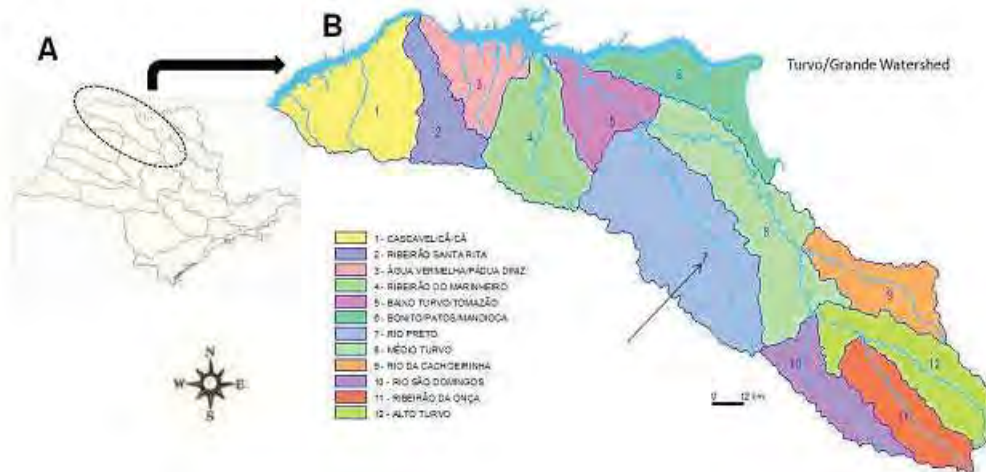


Figure 1. Maps of Turvo/Grande Watershed geographic localization. (A) São Paulo state, south east region of Brazil. The Turvo/Grande Watershed is located in north west of the state. (B) the division of Turvo/Grande Watershed. The black arrow indicates the river Preto.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

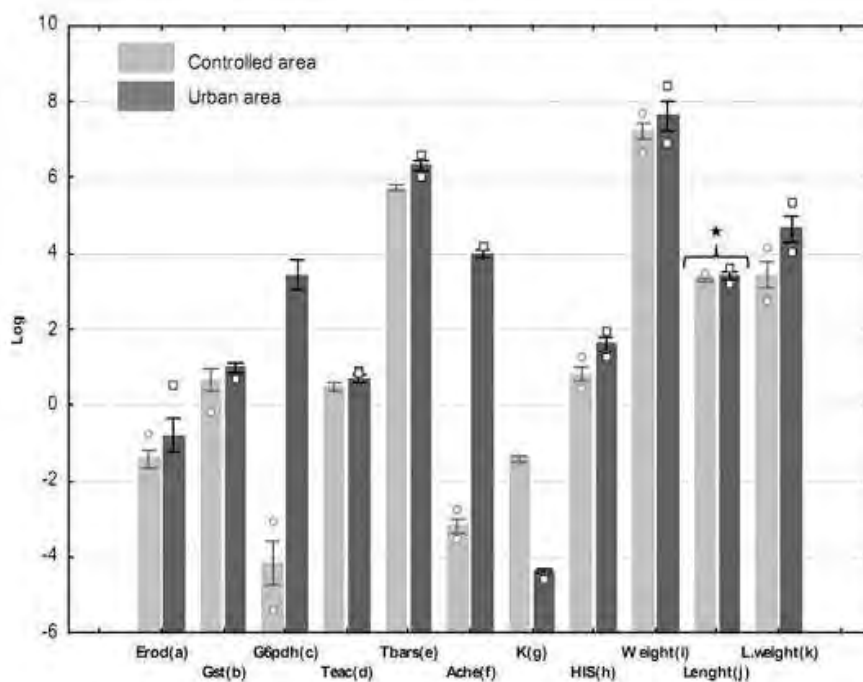
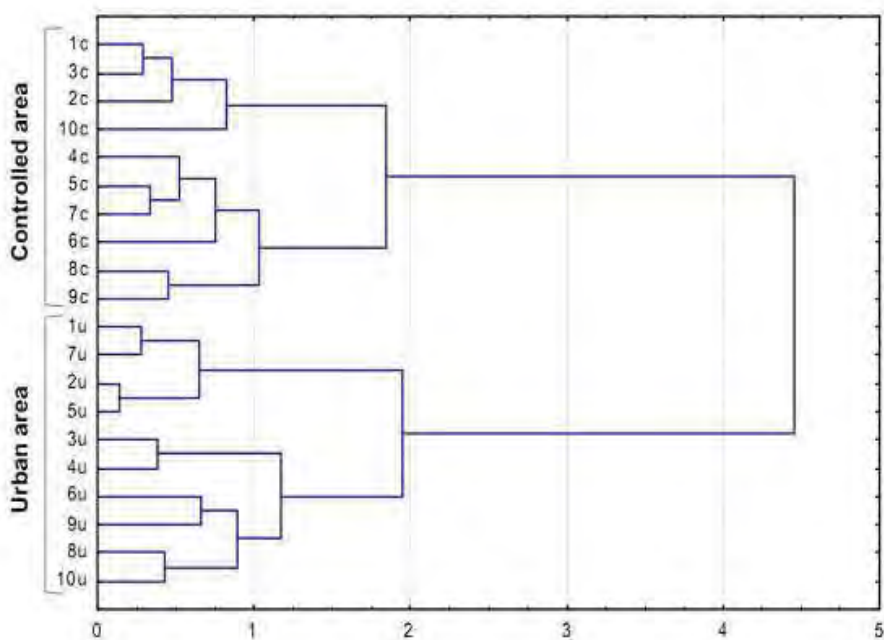


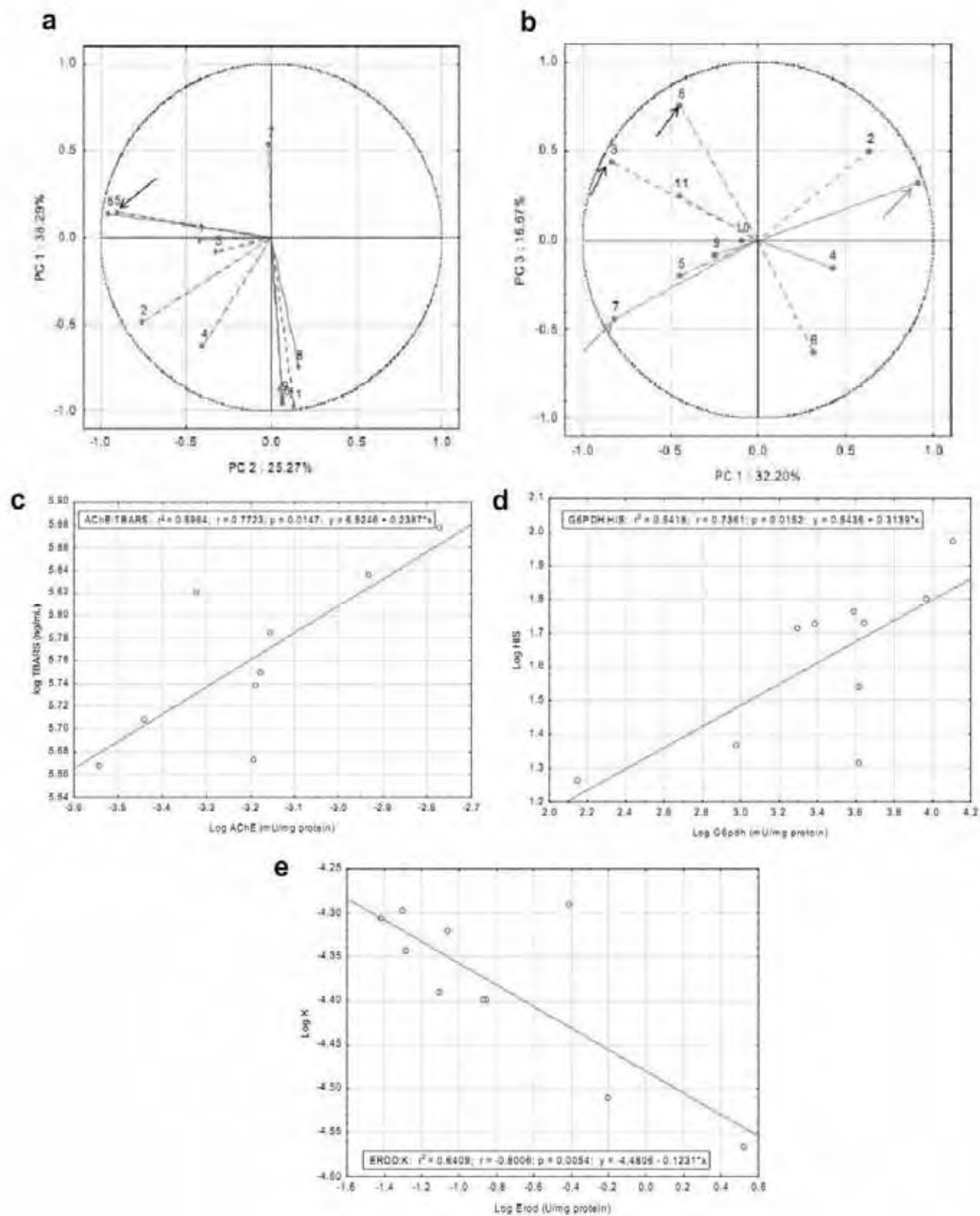
Figure 2. Enzymatic activities and morphometric data between areas. (A) EROD activity. (B) GST activity. (C) G6PDH activity. (D) TEAC evaluation. (E) TBARS assessment. (F) AChE activity. (G) K (condition factor). (H) HIS (hepatosomatic index). (I) body weight evaluation. (J) body length. (K) liver weight. All parameters, with the exception of K, showed higher values in the urban area. There was no observed difference in body length between animals from the urban and controlled areas (★).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Figure 3. Urban and controlled area cluster analysis.** The analysis indicates the presence of two groups, which relate to the two areas of study. For this analysis all parameters (biochemical and morphometric) were used and evaluated in the study, and all these parameters were responsible for the groupings.



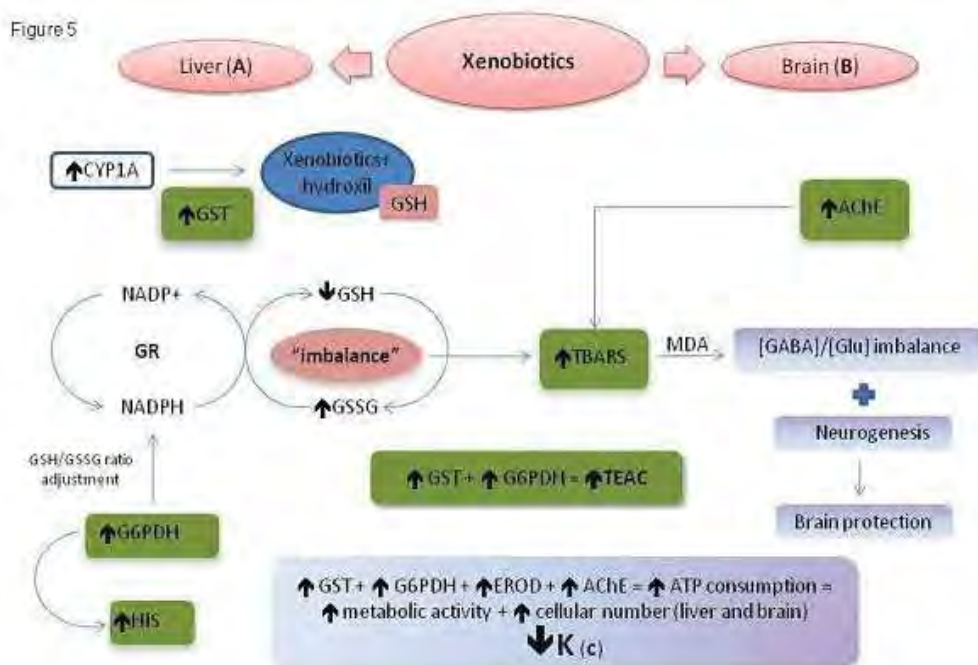


1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Figure 4. PCA loading plots and correlation analysis between significant variables.**

(A) Controlled area PCA plot. (B) Urban area PCA plot. The analysis indicated a correlation between TBARS assessment (5) and AChE activity (6) (black arrow). The correlation analyses between these parameters showed a strong positive relationship ( $r=0.7723$ ,  $p=0.0147$ ), indicated in (C). The urban area PCA (B) indicated a correlation between G6PDH activity (3) and HIS (8) (gray arrows), and EROD activity (1) and K (7) (black arrows). (D) the correlation between HIS and G6PDH ( $r=0.7361$ ,  $p=0.0152$ ). (E) Correlation analysis between EROD activity and K ( $r=-0.8006$ ,  $p=0.0054$ ).

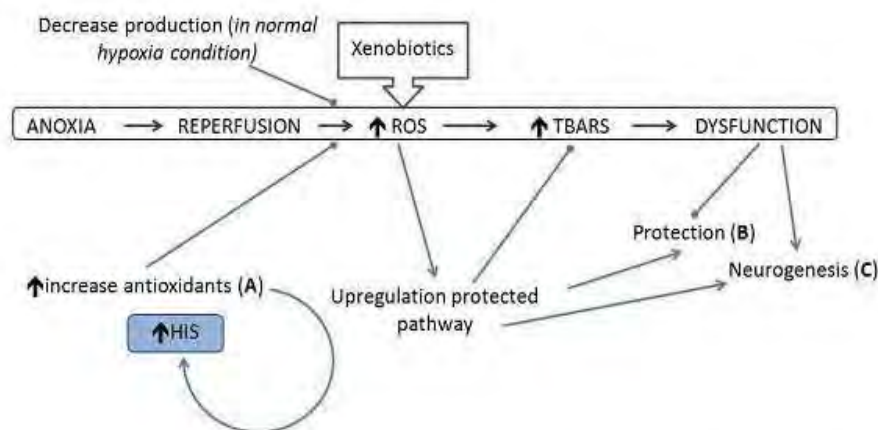
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Figure 5. Physiological mechanism of protection to environmental contamination associated with hypoxia.** (A) With the increase in GST activity and in turn the consumption of GSH, occurs an imbalance in the GSH/GSSG ratio in favour of GSSG. To maintain the reduced cellular status, G6PDH activity increases in order to maintain high levels of NADPH for GR activity that restores the GSH levels in an attempt to maintain physiological balance. The increase in antioxidant capacity directly reflects the increased hepatocytes request, which can be seen in the HIS increase. (B) In the brain, with the increased AChE activity, there is a possible complementary increase in LPO. The increased concentration of LPO products such as MDA, can lead to imbalance in the [GABA]/[Glu] ratio, breaking homeostasis between GABAergic and glutamatergic activities (50), which reduces brain activity in an attempt to withstand oxidative stress. Also, there is the

1  
2  
3 possibility of cell replacement in specific brain areas (50,51). (C) The increase in enzyme  
4 activity may lead to increased ATP consumption in situations where consumption is to be  
5 basal. The higher metabolic activity and cell replacement in brain and liver tissue,  
6 combined with possible behavioural changes (e.g. sleep-like and fatigue-like behaviours)  
7 can change the animal's condition. However, the physiological adjustments to protect  
8 against oxidative damage have proved effective for maintenance and protection in highly  
9 contaminated environments.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Figure 6. Adaptation of freshwater turtles to polluted environments associated with the reduction or prevention of oxidative stress caused by reoxygenation/hypoxia.** Anoxia/reperfusion in mammals results in an increase in ROS that causes damage in proteins, lipids and nucleotides, resulting in cellular dysfunction and death (purple box). Turtles survive the successive situations of hypoxia and re-oxygenation and this physiological condition also confers survival in polluted areas by increasing antioxidant capacity (A). Furthermore, physiological support for hypoxia promotes an increase in elements associated with cellular damage protection (B) such as increasing the stability of nucleotides, proteins and lipid structures associated with the upregulation of repair functions. An important adaptation seen in these animals is neurogenesis (C), which allows cell division and neuronal replacement (Adapted from (52)).

Table 1- Summary of variable statistical data (morphometric data, biomarkers values and morphometric indices).

| Variables                   | Controlled area ( $n = 10$ ) | Urban area ( $n=10$ )   | $p (<0.05)$ – two-tailed |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                             | Mean $\pm$ s.e.m.(†)         | Mean $\pm$ s.e.m.(†)    |                          |
| Total Weight (g)            | 1420.0 $\pm$ 370.660         | 2334.0 $\pm$ 134.2055   | 0.046988                 |
| Liver Weight (g)            | 35.3327 $\pm$ 4.71285        | 115.893 $\pm$ 17.63052  | 0.000018                 |
| Length (cm)                 | 27.49 $\pm$ 2.908016         | 30.7 $\pm$ 1.413899     | 0.150928**               |
| EROD activity <sup>a</sup>  | 0.400209 $\pm$ 0.048971      | 0.850832 $\pm$ 0.216017 | 0.01513                  |
| GST activity <sup>b</sup>   | 2.00341 $\pm$ 0.177          | 2.73568 $\pm$ 0.151129  | 0.006390                 |
| G6PDH activity <sup>c</sup> | 19.86900 $\pm$ 4.940655      | 34.62360 $\pm$ 4.745804 | 0.046040                 |
| AChE activity <sup>e</sup>  | 42.11478 $\pm$ 3.450063      | 55.05644 $\pm$ 2.743828 | 0.009691                 |
| K <sup>d</sup>              | 0.1565 $\pm$ 0.00558         | 0.0121 $\pm$ 0.000314   | 0.00000                  |
| HIS (%)                     | 2386682 $\pm$ 0.182654       | 5.1828 $\pm$ 0.373144   | 0.00001                  |
| TBARS <sup>e</sup>          | 310.3445 $\pm$ 11.02144      | 564.678 $\pm$ 98.16588  | 0.000000                 |
| TEAC <sup>f</sup>           | 1.609453 $\pm$ 0.080435      | 1.981427 $\pm$ 0.090415 | 0.006544                 |

a: Activity expressed in pmol/min/mg protein; b: Activity expressed in U/mg protein; c: Activity expressed in mU/mg protein, d: not unit expressed (index); e: expressed in ng/mL; f: expressed in nM/L; \*\*: no statistic difference; g: grams; cm: centimetres;

%: percentage symbol; s.e.m.: standard error of mean.

†: t-student (statistical test)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Literature Cited

1. Rodrigues, M. T. The conservation of Brazilian reptiles: challenges of a megadiverse country. *Cons. Biol.* **2005**, 19, 659-664.
2. Bérnilis, R.S. (org) Brazilian reptiles – List of species. **2010**; <http://www.sbherpetologia.org.br>
3. *Comunicado Ipea. Sustentabilidade ambiental no Brasil: biodiversidade, economia e bem-estar humano, Série Eixos do Desenvolvimento Brasileiro, nº 78 (Biodiversidade), Governo Federal, Brasil.* [http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/comunicado/110217\\_comunicadoipea78.pdf](http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/comunicado/110217_comunicadoipea78.pdf), **2011**, 1-52.
4. Meyers-Schöne L.; Walton, B.T. Turtles as monitors of chemical contaminants in the environment. *Ver. Environ. Contam. T.* **1994**, 135, 93-153.
5. *Comitê de Bacia Hidrográfica Turvo/Grande, Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 15 (CBH-TG-UGRH15), Relatório de situação dos recursos hídricos.* [http://www.comitetg.com.br/tg/index.php/documentos/cat\\_view/42-planos-e-estudos](http://www.comitetg.com.br/tg/index.php/documentos/cat_view/42-planos-e-estudos); **2010**, 1-32.
6. Belkin, D.A. Anoxia: tolerance in reptiles. *Science* **1963**, 139, 492-493.
7. Storey, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1996**, 29, 1715-1733.
8. Willmore, W.G.; Storey, K.B. Glutathione systems and anoxia tolerance in turtles. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **1997**, 273, 219-225.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
9. Hermes-Lima, M.; Zenteno-Savín, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Com. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2002**, 133, 537-556.
  10. Gorr, T.A.; Wichmann, D.; Hu, J; Hermes-Lima, M.; Welker, A.F.; Terwilliger, N.; Wren, J.F.; Viney, M.; Morris, S.; Nilsson, G.E.; Deten, A.; Soliz, J.; Gassmann, M. Hypoxia tolerance in animals: biology and applications. *Physiol. Biochem. Zool.* **2010**, 83, 733-752.
  11. Wyneken, J. *The anatomy of sea turtles*. U.S. Department of commerce NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-470; 2001, pp. 1-172.
  12. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andress, V.; Featherstone, M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 4, 88-95.
  13. Keen, J.H.; Habig, W.H.; Jakoby, W.B. Mechanisms for the several activities of the glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 6183-6188.
  14. Glock, G.E.; McLean, P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.* **1953**, 55, 400-408.
  15. Burke, M.D.; Mayer, R.T. Ethoxyresorufin-direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Disp.* **1974**, 2, 583-588.
  16. 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.* **1976**, 72, 248-254.
  17. Yagi, K. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* **1976**, 15, 212-216.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

18. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231-1237.
19. Le Cren, D.J. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *J. Anim. Ecol.* **1951**, *20*, 201-219.
20. Froese, R. Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *J. Appl. Ichthyol.* **2006**, *22*, 241-253.
21. Oguri, M. On the hepatosomatic index of holocephalian fish. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **1978**, *44*, 131-134.
22. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*; Oxford University: 1999.
23. Whyte, J.J.; Jung, R.E.; Schmitt, C.J.; Tillitt, D.E. Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* **2000**, *30*, 347-570.
24. Van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.* **2003**, *13*, 57-149.
25. Pathiratne, A.; Hemachandra, C.K. Modulation of ethoxyresorufin *O*-deethylase and glutathione *S*-transferase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by polycyclic aromatic hydrocarbons containing two to four rings: implications in biomonitoring aquatic pollution. *Ecotoxicology* **2010**, *19*, 1012-1018.
26. Hayes, J.D.; Pulford, D.J. The glutathione *S*-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **1995**, *30*, 445-600.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
27. Ramnanan, C.J.; Storey, K.B. Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation during hypometabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *339*, 7-16.
28. Downs, C.A.; Fauth, J.E.; Woodley, C.H. Assessing the health of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Mar Biotechnol.* **2001**, *3*, 380-397.
29. Kaiser, R.R.; Corrêa, M.C.; Spanevello, R.M.; Morsch, V.M.; Mazzanti, C.M.; Gonçalves, J.F.; Schetinger, M.R. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1865-1870.
30. Maschio, L.R.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Marin-Morales, M.A. Assessment of the mutagenic, genotoxic and cytotoxic potential of the waters of the Preto river in the area influenced by Sao Jose do Rio Preto, SP. *Genet. Mol. Res.* **2009**, *8*: 1107-1108.
31. Yeom, D-H.; Lee, S-A.; Kang, G.S.; Seo, J.; Lee, S-K. Stressor identification and health assessment of fish exposed to wastewater effluents in Miho Stream, South Korea. *Chemosphere* **2007**, *67*, 2282-2292.
32. Sol, S.Y.; Johnson, L.L.; Boyd, D.; Olson, O.P.; Lomax, D.P.; Collier, T.K. Relationship between anthropogenic chemical contaminants exposure and associated changes in reproductive parameters in male English sole (*Parophrys vetulus*) collected from Hylebos Waterway, Puget Sound, Washington. *Arch. Environ. Con. Tax.* **2008**, *55*, 627-638.
33. Kopecka-Pilarczyk, J.; Correia, A.D. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to *in vivo* exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotox. Environ. Safe* **2009**, *72*, 1296-1302.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

34. Letcher, R.J.; Klasson-Wehler, E.; Bergman, A. Methyl sulfone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. In *New types of persistent halogenated compounds*. Springer-Verlag: Berlin 2000, pp. 317-357.
35. Richardson, K.L.; Bouchot, G.G.; Schlenk, D. The characterization of cytosolic glutathione transferase from four species of sea turtles – loggerhead (*Caretta caretta*), green (*Chelonia mydas*), olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2009**, 279, 279-284.
36. Jones, D.J. The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In *Oxidative Stress*; London Academic; 1985; pp.151-195.
37. Willmore, G.W.; Storey, K.B. Purification and properties of the glutathione S-transferase from the anoxia-tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. *FEBS J.* **2005**, 272, 3602-3614.
38. Willmore, G.W.; Storey, K.B. Purification and properties of glutathione reductase from liver of the anoxia-tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Mol. Cell. Biochem.* **2007**, 297, 139-149.
39. Reischl, E. High sulfhydryl content in turtle erythrocyte: is there a relation with resistance to hypoxia? *Comp. Biochem. Physiol. B* **1986**, 85B, 723-726.
40. Xu, J.; Makis, D.; Stapleton, S.R. Mediation of cadmium-induced oxidative damage and glucose-6-phosphate dehydrogenase expression through glutathione depletion. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2003**, 17, 67-75.
41. Di Giulio, R.T.; Benson, W.H.; Sanders, B.M.; van Veld, P.A. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In *Fundamental of Aquatic*

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Taylor & Francis: London 1995; pp. 523-562.
42. Zomeño, C.; Blasco, A.; Hernández, P. Influence of genetic live on lipid metabolism traits of rabbit muscle. *J. Anim. Sci.* **2010**, *88*, 3419-3427.
43. Hochachka, P.W.; Lutz, P.L. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *130*, 435-459.
44. DiGiulio, R.T.; Washburn, P.C.; Wenning, R.J.; Winston, G.W.; Jewell, C.S. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* **1989**, *8*, 1103-1123.
45. Cajaraville, M.P.; Bebianno, M.J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C.; Viarengo, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total. Environ.* **2000**, *247*, 295-311.
46. Fulton, M.H.; Key, P.B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*, 37-47.
47. Zatta, P.; Ibn-Lkhatat-Idrissi, M.; Zambenedetti, P.; Kilyen, M.; Kiss, T. In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. *Brain Res. Bull.* **2002**, *59*, 41-45.
48. Silva, A.S.; Monteiro, S.G.; Gonçalves, J.F.; Spanevello, R.; Oliveira, C.B.; Costa, M.M.; Jaques, J.A.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R.; Mazzanti, C.M.; Lopes, S.T. Acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and spinal cord of rats infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.* **2011**, *175*, 237-244.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

49. Li, F.; Yang, Z.; Lu, Y.; Wei, Y.; Wang, J.; Yin, D.; He, R. Malondialdehyde suppresses cerebral function by breaking homeostasis between excitation and inhibition in turtle *Trachemys scripta*. *PLOS One* **2010**, *5*, 1-9.
50. Gould, E.; Gross, C.G. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 619-623.
51. Radmilovich, M.; Fernandez, A.; Trujillo-Cenoz, O. Environment temperature affects cell proliferation in the spinal cord and brain of juvenile turtles. *J. Exp. Biol.* **2003**, *206*, 3085-3093.
52. Milton, S.L.; Prentice, H.M. Beyond anoxia: the physiology of metabolic downregulation and recovery in the anoxia-tolerant turtle. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **2007**, *147*, 277-290.
53. Piña, C.I.; Lance, V.A.; Ferronato, B.O.; Guardia, I.; Marques, T.S.; Verdade, L.M. Heavy metal contamination in *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) in a river basin, São Paulo, Brazil. *B. Environ. Contam. Tox.* **2009**, *83*, 771-775.
54. Krivoruchko, A.; Storey, K.B. Forever young: mechanisms of natural anoxia tolerance and potential links to longevity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2010**, *3*, 186-198.



---

**CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO E MODIFICAÇÃO AMBIENTAL EM *PHRYNOPS GEOFFROANUS* (SCHWEIGGER 1812) EVIDENCIADO PELA AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO.**

**ARTIGO A SER SUBMETIDO A REVISTA JOURNAL OF ANIMAL ECOLOGY (FATOR DE IMPACTO: 4.4)**

**Influência da contaminação e modificação ambiental em *Phrynops geoffroanus* (Schweigger 1812) evidenciado pela avaliação da condição.**

Larissa Paola Rodrigues Venancio<sup>1\*</sup>, Tiago Lucena da Silva<sup>1</sup>, Maria Isabel Afonso da Silva<sup>1</sup>, Vinicius Augusto Gobbe Moschetta<sup>1</sup>, Jessica Basilio Bacchi<sup>2</sup>, Tayrone Luis Coltro<sup>1</sup>, Nathalia Rossigalli Alves Costa<sup>1</sup>, Claudia Regina Bonini-Domingos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

\*Correspondência: larissa\_biorp@yahoo.com.br

**Resumo**

1. Estressores ambientais como a contaminação por efluentes domésticos e industriais podem influenciar a taxa de sobrevivência de indivíduos e de populações inteiras pela alteração na magnitude das reservas energéticas, e por sua vez a dinâmica reprodutiva da espécie.

2. Este estudo avaliou a influência da degradação ambiental, por meio do índice de condição de espécimes de *Phrynops geoffroanus*, um quelônio de água doce sul-americano. À análise do fator de condição, foram associadas avaliações de abióticos como pluviosidade e temperatura do ar, além de fatores como sexo e período reprodutivo.

3. Baseando-se em dados de peso e comprimento durante quatro anos e três áreas de estudo, avaliou-se 1) se alterações ambientais modificam a condição dos animais, baseando-se na comparação com animais de ambiente controle; 2) se há diferença na condição entre os sexos nos três ambientes; 3) se a condição

foi alterada em relação ao período de reprodução; 4) se há relação dos valores do fator de condição com a temperatura do ar e pluviosidade.

4. A análise dos dados sugere que existe influência do ambiente na condição destes animais e que está associado a um gradiente de contaminação, apresentando piores condições na área mais impactada. O período reprodutivo foi um fator importante para alterações da condição nos ambientes avaliados; no entanto, na área mais contaminada, esta relação foi menos clara, indicando que as alterações deste ambiente podem exercer maior influência sobre a fisiologia dos animais. Além disso, houve relação da pluviosidade e temperatura do ar com a condição das fêmeas, principalmente às do ambiente controle, sugerindo, que em condições controladas, a reprodução e as mudanças nos níveis de umidade e temperatura refletem significativamente sobre a condição.

5. Os resultados deste estudo sugerem influência de estressores ambientais sobre a condição de *P.geoffroanus* e indicam a necessidade de atenção e monitoramento das áreas de ocorrência da espécie, em especial àquelas alteradas pelo homem, visto que existe pouca informação a respeito da biologia desta espécie pertencente a um grupo taxonômico de história natural e evolutiva controversa.

**Palavras-chave:** condição, contaminação aquática, estação chuvosa e seca, período reprodutivo, *Phrynops geoffroanus*

## Introdução

A ocupação desordenada de áreas naturais ocorre em taxas aceleradas no mundo todo, mudando a estrutura física e processos ecológicos de hábitat originais (Marzluff 2001). Os efeitos biológicos da poluição e o impacto antropogênico em sistemas aquáticos brasileiros são pouco avaliados, apesar da importância do Brasil no cenário mundial em relação à sua riqueza natural. O Brasil possui a fauna e flora mais rica do mundo, com cerca de 1,8 milhões de espécies, e está em segundo lugar no que diz respeito à riqueza de espécies de répteis (Bérnilis 2011) incluindo répteis, ainda são preliminares (Rodrigues, 2005).



O cágado sul-americano, *Phrynops geoffroanus* (Schweigger 1812), conhecido popularmente como “cágado-de-barbelas”, apresenta uma ampla distribuição geográfica, abrangendo desde a Amazônia Colombiana até Sudeste do Brasil, Uruguai e Nordeste da Argentina (Pritchard & Trebbau 1984; Vanzolini 1994). *P. geoffroanus* é uma espécie integrante do chamado “Complexo *Phrynops geoffroanus*”, que abrange espécies como *P. hilarii*, *P. williamsi*, *P. tuberosus* (Rhodin & Mittermeier, 1983). Este complexo de espécies é objeto de grande controvérsia taxonômica, que ainda não foi completamente esclarecida. Vários autores sustentam este táxon como uma superespécie, suscetível a ser fracionada em várias entidades específicas; já outros autores, sustentam que esta é uma espécie politípica com várias subespécies diferentes (Rueda-Almonacid *et al* 2007). Apesar da ampla distribuição geográfica da espécie, estudos com interesse na história natural são praticamente inexistentes e, grande parte das informações biológicas está relacionada com estudos de espécimes cativas (Guix *et al* 1989; Molina, 1989, 1996).

Além de habitar rios e lagos de maior volume, *P. geoffroanus* também pode ser encontrada em rios urbanos poluídos por efluentes domésticos e industriais (Souza & Abe 2001; Brites, 2002; Piña *et al* 2009). Por este motivo, sugere-se que esta espécie seja resistente ao impacto da poluição ambiental, visto que os ninhos e filhotes aparentemente apresentam morfologia e fisiologia normais, suportando, inclusive, os maiores níveis de concentração de metal para répteis descritos na literatura. No entanto, como não há o registro da escala temporal da contaminação nestes locais, muitos dos efeitos deletérios da contaminação ambiental podem ainda ser subclínicos, podendo levar à ruptura no sucesso reprodutivo das populações em alguns anos (Piña *et al* 2009).

Estressores ambientais podem alterar parâmetros fisiológicos e bioquímicos das espécies, incluindo respostas antioxidantes, parâmetros metabólicos energéticos e índices morfométricos (Li *et al* 2010). “Condição” é um importante determinante da aptidão (*fitness*) individual do animal, e suas implicações são relevantes no contexto ecológico (Green 2000). Em termos gerais, “condição” é um termo utilizado para referir-se à magnitude das reservas energéticas orgânicas, que afeta a probabilidade de sobrevivência no nível individual e populacional (Ardia 2006; Jennings *et al* 2006). Os índices de

condição corporal são utilizados para auxiliar na descrição da saúde e do bem-estar de várias espécies selvagens (Stevenson & Woods 2006), definir a influência de fatores como a degradação ambiental, parâmetros da história de vida e interações ecológicas na saúde animal (Stevenson & Woods 2006).

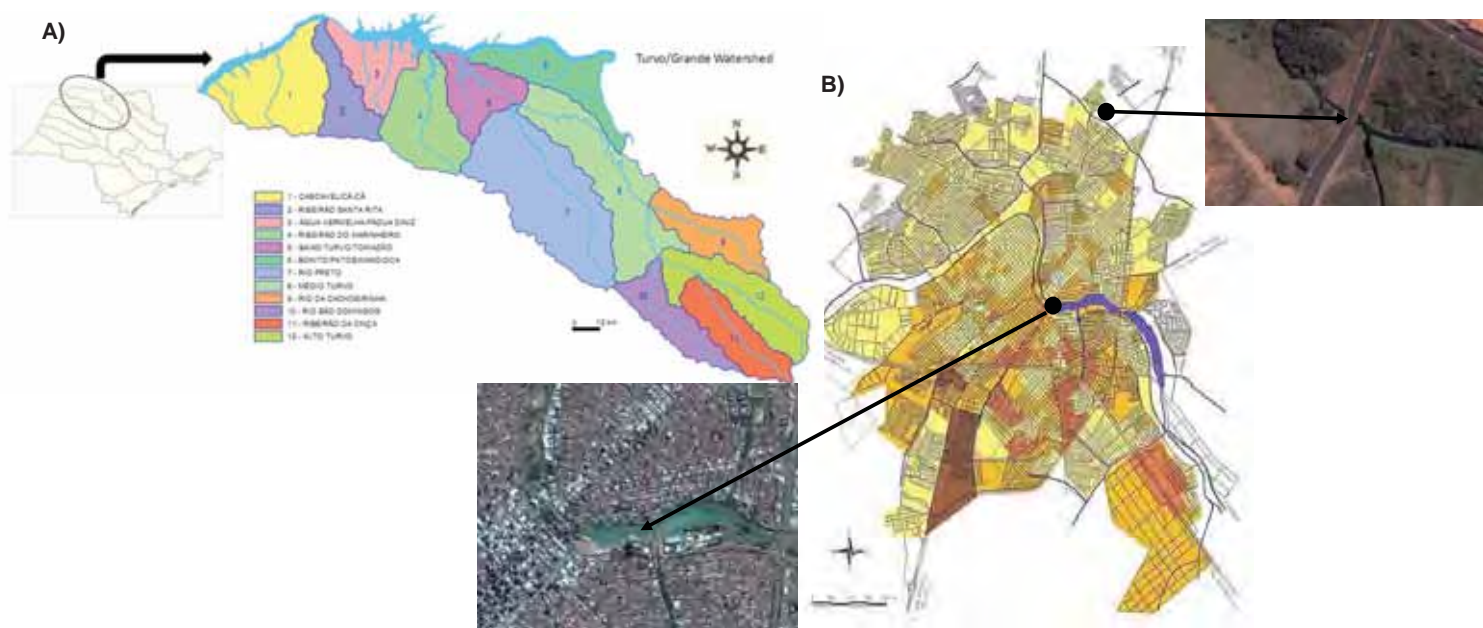
Mudanças na condição resultam de alterações na composição bioquímica tecidual e mobilização de reservas energéticas, podendo ser relacionado com as estações do ano, períodos de vida, reprodução, saúde e exposição a estressores (Barton *et al* 2002). Sendo assim, o sucesso reprodutivo, e, portanto, a dinâmica populacional depende da condição dos organismos (Stevenson & Woods, 2006; Labrada-Martagón *et al* 2010). Deste modo, entender as causas da variação na condição permite avaliar e prever variações demográficas, bem como a habilidade de uma população em responder a estressores ambientais (Sandeman *et al* 2008). A avaliação da condição baseia-se na relação entre massa corporal e medidas lineares do tamanho do corpo (Green 2001). Não há informações na literatura sobre índices de condição em cágados e tartarugas de água doce, mas apenas para tartarugas marinhas (Labrada-Martagón 2010) e tartarugas terrestres (Hailey 2000).

Assim, justifica-se avaliar a condição de espécimes de *P. geoffroanus* que habitam ambientes impactados pelo homem, e tais dados podem indicar alterações subclínicas que afetariam diretamente a aptidão (*fitness*) das populações impactadas. O objetivo deste estudo foi avaliar o índice de condição de *P. geoffroanus* de ambientes contaminados por efluentes domésticos e industriais em relação a animais de ambiente controlado, além das possíveis diferenças neste parâmetro em relação ao sexo e período reprodutivo, associados inclusive, com fatores abióticos como precipitação, temperatura do ar e estação (chuvosa e seca). A condição foi avaliada por meio da utilização de dados de peso e comprimento, a fim de averiguar a saúde e bem-estar destes animais como elemento importante na determinação da aptidão das populações estudadas.

### **Material e Método**

#### *ÁREA DE ESTUDO*

Durante os anos de 2008 a 2011, espécimes de *P. geoffroanus* foram capturados em três áreas, da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande, região Noroeste do estado de São Paulo (Sudeste do Brasil) (Figura 1a). Duas áreas de coleta localizam-se no perímetro urbano da cidade de São José do Rio Preto - SP, e são elas: Córrego Felicidade (CF) (20°46'25.99"S, 49°21'17.63"O) e rio Preto (RP) (20°48'31.86"S, 49°22'27.61"O). Esta cidade situa-se a 489 m acima do nível do mar; possui clima tropical de altitude, que indica inverno seco e ameno, com média de temperatura anual de 25,33°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. As estações do ano não são bem definidas como nas regiões temperadas; mas as características meteorológicas da área confirmam a existência de duas grandes estações: uma chuvosa, de outubro a março, e outra seca, de abril a setembro (Barbieri, Rao & Franchito 2010). Os dados meteorológicos utilizados referem-se à média mensal de temperatura do ar e pluviosidade dentro do período de estudo. A cidade é dividida fisicamente pelo rio Preto e seus tributários, sendo o córrego Felicidade um deles (Figura 1b). O rio Preto possui aproximadamente 120 km de extensão, e é tributário do rio Turvo, que deságua no rio Grande (Bacia Turvo/Grande) (20). Com aproximadamente 450 mil habitantes, a cidade é fonte constante de poluição aquática derivadas de resíduos agrícolas gerados pela cultura da cana-de-açúcar e curtumes nos nove córregos que atravessam a cidade (Zago *et al* 2010).



**Figura 1.** Mapas de localização da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande e da cidade de São José do Rio Preto. **A)** Mapa do estado de São Paulo e da Bacia, com destaque para a região da cidade de São José do Rio Preto – SP. **B)** Mapa da cidade de S. J. Rio Preto, com indicação dos pontos de coleta. O ponto 1 refere-se ao córrego Felicidade ( $20^{\circ}46'25.99''S$ ,  $49^{\circ}21'17.63''O$ ) e o ponto 2 refere-se ao rio Preto ( $20^{\circ}48'31.86''S$ ,  $49^{\circ}22'27.61''O$ ) (Mapa da cidade adaptado de Whitacker 2007 e mapa da bacia adaptado de Comitê da Bacia Hidrográfica Turvo/Grande 2010).

A terceira área de coleta refere-se ao criatório comercial de animais silvestres e exóticos “Reginaldo Uvo Leone”, na cidade de Tabapuã – SP (20°46'20.6"S, 49°21'18.9"W), onde foram coletados os animais controle do estudo (AC-ambiente controle). Os animais eram alimentados com ração de peixe (45% de proteína), e mantidos em lagos artificiais abastecidos com água de poços artesianos.

#### *CAPTURA DE ANIMAIS, SEXAGEM E MORFOMETRIA*

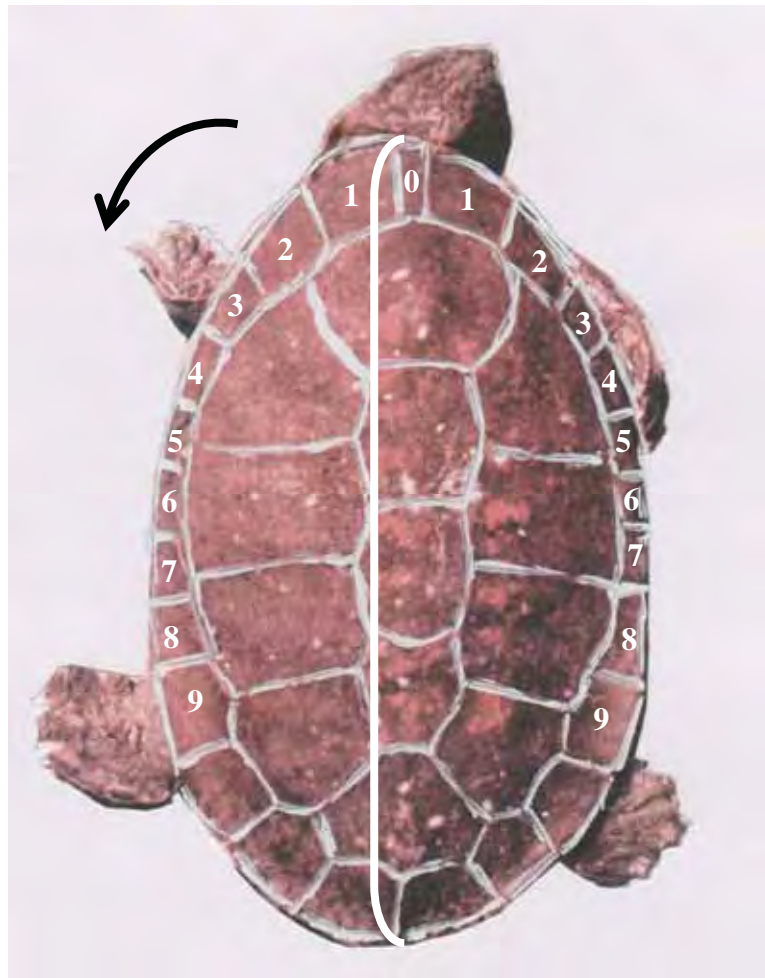
*Captura e Morfometria* - Para captura dos animais, foi utilizada uma armadilha cilíndrica tipo “covo”, medindo 150X60 cm. As armadilhas foram presas por arame galvanizado em árvores nas margens do rio e dos córregos, e em seu interior, foram colocadas iscas (carne bovina e peixe) presas por ganchos de arame galvanizado. Para todos os espécimes coletados foram tomadas duas medidas: o comprimento curvilíneo máximo da carapaça ( $CCC_{máx}$ ), em centímetros, do ponto anterior médio do escudo nugal até a extremidade posterior dos escudos supracaudais (Wyneken 2001), com auxílio de uma trena (0,1mm); e a massa corporal em gramas, utilizando balança com escala (10g-10Kg).

As atividades de coleta dos espécimes foram autorizadas e aprovadas pelo IBAMA/ICMBio (registro 2838725/nº 16488-1, nº16488-2, 16488-3) e pela comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (Protocolo FAMERP nº 5517/2008).

*Sexagem* - Os espécimes coletados foram caracterizados quanto ao sexo por meio de avaliação do tamanho da cauda, abertura da placa anal e concavidade do plastrão (Molina 1989).

Todos os espécimes capturados no rio e nos córregos foram marcados por perfurações nos escudos marginais, que indicam a ordem numérica e cronológica da captura com auxílio de furadeira manual. As perfurações foram feitas baseando-se no primeiro escudo nugal como ponto zero e os escudos marginais seguintes como número um, dois, três e assim sucessivamente. Para composição das dezenas e centenas, foram feitas

perfurações duplas ou triplas respectivamente, contando os escudos marginais direitos no sentido horário e os esquerdos no sentido anti-horário. Estas marcações, como são feitas em regiões ósseas, não sofrem cicatrização, impossibilitando assim a perda da marca, não são invasivas e não atrapalham a locomoção do animal (Figura 2). Este é o primeiro registro desse tipo de marcação em quelônios. Em seguida, após pesagem e sexagem, os animais foram devolvidos ao local de coleta.



**Figura 2.** Esquema de marcação dos animais capturados durante o estudo. A placa nuchal é considerada como a placa zero. Os animais com numeração acima de 10 foram marcados da seguinte maneira: perfuração na placa 1 nas placas marginais direitas (sentido horário) e o número 0 na placa zero; o animal número 11 foi marcado com uma perfuração na placa 1 no sentido horário e na placa 1 do sentido anti-horário. O mesmo processo foi feito para as centenas. As setas indicam o sentido horário (direita) e anti-horário (esquerda). A faixa branca indica a área de medida do comprimento curvilíneo máximo da carapaça ( $CCC_{max}$ ) (Foto de Luiz Dino Vizotto).

Os animais capturados foram agrupados conforme as indicações de Souza & Abe (2001) em relação ao período de reprodução da espécie, visto que este fator é de extrema importância para avaliação do índice de condição. Estes autores sugerem, pela presença de ovos no oviduto, que o período de nidificação ocorre de Fevereiro a Agosto. Já o período de acasalamento e incubação ocorre de Setembro a Janeiro, apontando para a ocorrência de sincronização com a estação chuvosa (Guix et al 1989; Souza & Abe, 2001).

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico STATISTICA 7.0 (StatSoft). A proporção sexual foi determinada pelas frequências de captura de espécimes nos períodos de Fev-Ago e Set-Jan para o total de machos e fêmeas coletados por meio do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

O índice de condição e a relação peso-comprimento foram estabelecidos pela mensuração do peso total e comprimento total, e os parâmetros **a** e **b** foram determinados pela transformação dos dados para  $\log(10)$  (Le Cren 1951). As curvas de crescimento obtidas pela análise de regressão entre peso e comprimento seguiram a equação:

$$\log\text{Peso} = \log(a) + \log\text{Comprimento}^b,$$

onde  $\log\text{Peso}$  é a variável dependente,  $\log\text{Comprimento}$  a variável independente, **a** é a constante de regressão ou grau de “engorda” e **b** é o coeficiente de regressão, que está relacionada com o tipo de crescimento dos indivíduos. A equação teórica de relação peso-comprimento foi seguida por:  $\text{Peso} = a \cdot \text{Comprimento}^b$ .

O parâmetro **b** é o expoente da forma aritmética da relação peso-comprimento e o declive da linha de regressão na forma logarítmica. Se **b=3** (crescimento isométrico), então espécimes pequenos na amostra em consideração tem a mesma forma e condição de espécies maiores. Se **b>3** (crescimento alométrico positivo), então espécimes grandes apresentam maior incremento em peso do que em comprimento; inversamente, se **b<3** (crescimento alométrico negativo), então espécimes grandes sofreram mudanças na forma do corpo para tornarem-se mais alongados ou espécimes



pequenos estão em melhores condições nutricionais no período da amostragem (Froese 2006).

Para testar as diferenças entre os parâmetros das curvas ajustadas para machos e fêmeas, foram realizadas análises de covariância (ANCOVA) aplicadas aos parâmetros das regressões lineares do comprimento e peso ( $\log_{10}$ ).

O índice de condição (K) foi estimado para cada espécime coletado por meio da expressão  $K = \text{Peso}/\text{Comprimento}^b$  (Le Cren, 1951), onde **b** é o coeficiente angular da relação peso-comprimento. Para comparação dos valores de K entre as áreas de coleta foram realizadas testes de ANOVA complementado por Tukey (*post hoc*). Também foram realizadas análises de correlação de Pearson para averiguação de possível relação da pluviosidade e temperatura do ar (médias mensais) com os valores de K para os sexos e área de coleta separadamente.

Em relação às diferenças estatisticamente significantes entre duas amostras independentes, foram utilizados os testes t-student para dados paramétricos, e Mann-Whitney, para não paramétricos. Para todas as análises realizadas foi considerado o nível de significância de  $\alpha = 0,05$  e as barras de erros dos gráficos representam  $\pm$  desvio padrão para duas ou mais amostras independentes, ou máximo e mínimo, quando as medianas foram avaliadas.

## Resultados

### CAPTURA E MORFOMETRIA

Na tabela 1 encontram-se detalhes das informações descritivas a respeito dos animais coletados no período de estudo separado pelas áreas avaliadas. No total, foram capturados 130 animais nas quatro áreas analisadas, sendo 80 fêmeas e 50 machos. Em relação ao peso, as fêmeas mostraram-se mais pesadas ( $p < 0,01$ ) e com maior comprimento em relação aos machos ( $p < 0,05$ ). Em relação ao peso, de maneira geral, não houve diferença entre os ambientes ( $F=0,17$ ;  $p=0,844$ ); no entanto, houve diferença estatisticamente significativa no tamanho dos animais entre as áreas de estudo ( $F=4,109$ ;

p=0,018), apresentando diferença significativa entre os machos do AC e CF (t-student; p=0,0138).

**Tabela 1.** Descrição dos espécimes coletados quanto à área, sexo, número amostral, peso e comprimento e relação estatística entre peso e comprimento.

|  | Ambiente Controle (AC)        |                     | Córrego Felicidade (CF)       |                        | Rio Preto (RP)                 |                     |
|--|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------|
|  | F                             | M                   | F                             | M                      | F                              | M                   |
| <b>Número amostral</b>                           | 21                            | 15                  | 48                            | 25                     | 11                             | 10                  |
| <b>Média Peso (g) ± DP</b>                       | 2320,00±<br>1018,052          | 1510,00<br>±496,847 | 2258,1<br>25<br>±973,4<br>77  | 1616,0<br>±753,9<br>78 | 2554,5<br>45±472<br>,109       | 1655,00<br>±388,308 |
| <b>Média Comprimento (cm) ± DP</b>               | 31,662<br>±4,356              | 28,973<br>±2,974    | 29,077<br>±4,249              | 26,62<br>±4,235        | 31,064<br>±1,988               | 27,890<br>±1,757    |
| <b>Comparação estatística entre pesos*</b>       | p=0,007 (fêmeas mais pesadas) |                     | p=0,005 (fêmeas mais pesadas) |                        | p=0,0001 (fêmeas mais pesadas) |                     |
| <b>Comparação estatística entre comprimento*</b> | p=0,046 (fêmeas maiores)      |                     | p=0,021 (fêmeas maiores)      |                        | p=0,001 (fêmeas maiores)       |                     |

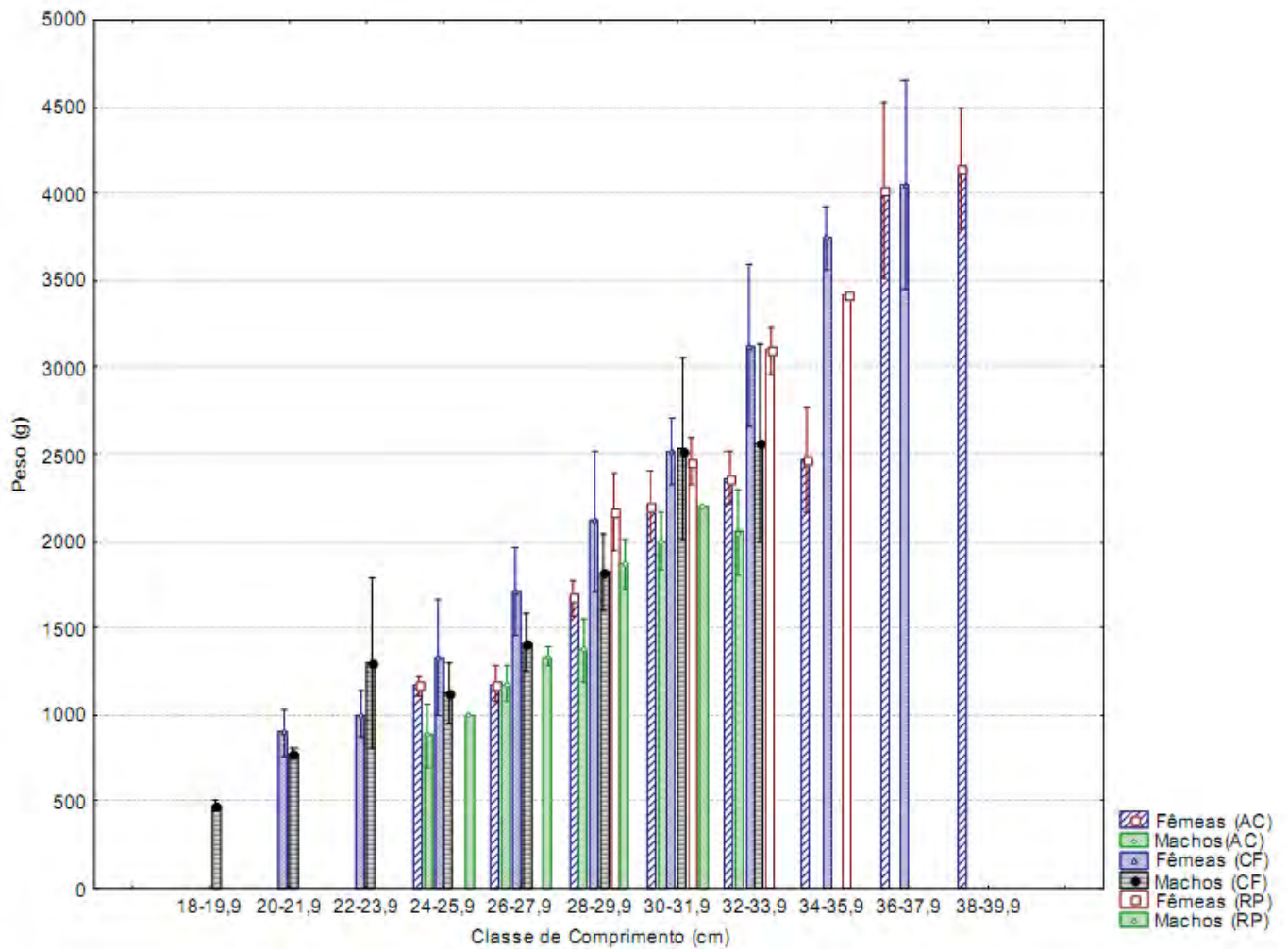
F: Fêmea

M: machos

DP: desvio padrão

\*: teste t-student

Na Figura 3, os dados de peso total (g) foram agrupados por classe de comprimento (cm). Observa-se que o peso dos animais aumenta em relação ao aumento do tamanho do corpo e a ocorrência de fêmeas maiores do que os machos principalmente nas classes de 34 a 39,9 cm corroboram dados da literatura em que fêmeas de *P.geoffroanus* apresentam tendência de serem maiores do que os machos (Gibbons & Lovich, 1990).



**Figura 3.** Gráfico da relação entre peso total (g) e classes de comprimento (cm) para as três áreas de estudo (AC – Área Controle, CF – córrego Felicidade, RP – rio Preto). Observa-se que o peso do corpo aumenta seguindo o padrão de crescimento do corpo. Destaca-se a ocorrência de apenas fêmeas nas classes 34 a 39,9 cm, confirmando dados da literatura de que fêmeas tendem a serem maiores do que os machos. As barras dos gráficos indicam a média do peso (g)  $\pm$  desvio padrão.

As proporções sexuais foram calculadas para CF e RP, e não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre a proporção de machos e fêmeas, que foi de 1,52:1 para CF ( $\chi^2=1.455$   $p=0.692$ ), e 1,1:1 para RP ( $\chi^2=1.047$   $p=0.3$ ).

### ÍNDICE DE CONDIÇÃO (K)

Os dados de peso e comprimento de cada espécime foram plotados em gráficos de dispersão, ajustando-se os parâmetros por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Os animais foram agrupados para teste das diferenças entre os parâmetros das curvas ajustadas para machos e fêmeas para cada período de análise, com a finalidade de verificar se havia diferença entre os coeficientes de regressão **b** e o parâmetro **a** (ANCOVA) (Froese 2006) entre os sexos e para cada área separadamente.

Apesar das fêmeas apresentarem, em sua grande maioria, maior peso e comprimento em relação aos machos, a análise de covariância (ANCOVA) indicou que não houve diferença entre os coeficientes angulares (**a**) e lineares (**b**) entre os sexos para CF (Fev-Ago), CF (Set-Jan) e AC (Set-Jan) ( $p > 0.05$ ). Deste modo, os sexos foram agrupados para avaliação dos valores de **b**. No entanto, esta mesma situação não foi encontrada para AC e RP no período de Fev-Ago ( $p < 0,05$ ), indicando assim, a necessidade de análise de **b** para cada sexo separadamente nestes casos. A tabela 2 apresenta as informações referentes às análises de regressão e valores dos coeficientes de regressão encontrados em cada situação.

**Tabela 2.** Relação dos dados gerados pelas regressões lineares para cada ambiente e período avaliado.

|                    | Fev-Ago                 |                          |                             |                                      | Set-Jan        |                 |                |                                 |
|--------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|---------------------------------|
|                    | R <sup>2</sup>          | a                        | b                           | K                                    | R <sup>2</sup> | a               | b              | K                               |
| Ambiente controle  | 0,935 (F);<br>0,857 (M) | -1,18 (F); -<br>1,150(M) | 3,0133(F);<br>2,956 (M)     | 0,99±0,07 (F);<br>1,04±0,06(M)       | 0,686 (M)      | -2,582<br>(M)   | 3.894<br>(M)   | 0,701±0,043                     |
| Córrego Felicidade | 0,963<br>(F/M)          | -1,427 (F/M)             | 3,2174<br>(F/M)             | 0,958±0,07 (F);<br>1,01±0,09 (M)     | 0,837<br>(F/M) | -0,811<br>(F/M) | 2.837<br>(F/M) | 1,162±<br>0,09 (F);<br>1,2±0,12 |
| Rio Preto          | 0,938 (F);<br>0,864 (M) | -0,725 (F);<br>-2.157(M) | 2.766 (F);<br>3,7132<br>(M) | 0,188±0,008 (F);<br>0,007±0,0006 (M) | *              | *               | *              | *                               |

(F): Fêmeas

(M): Machos

b: coeficiente de regressão

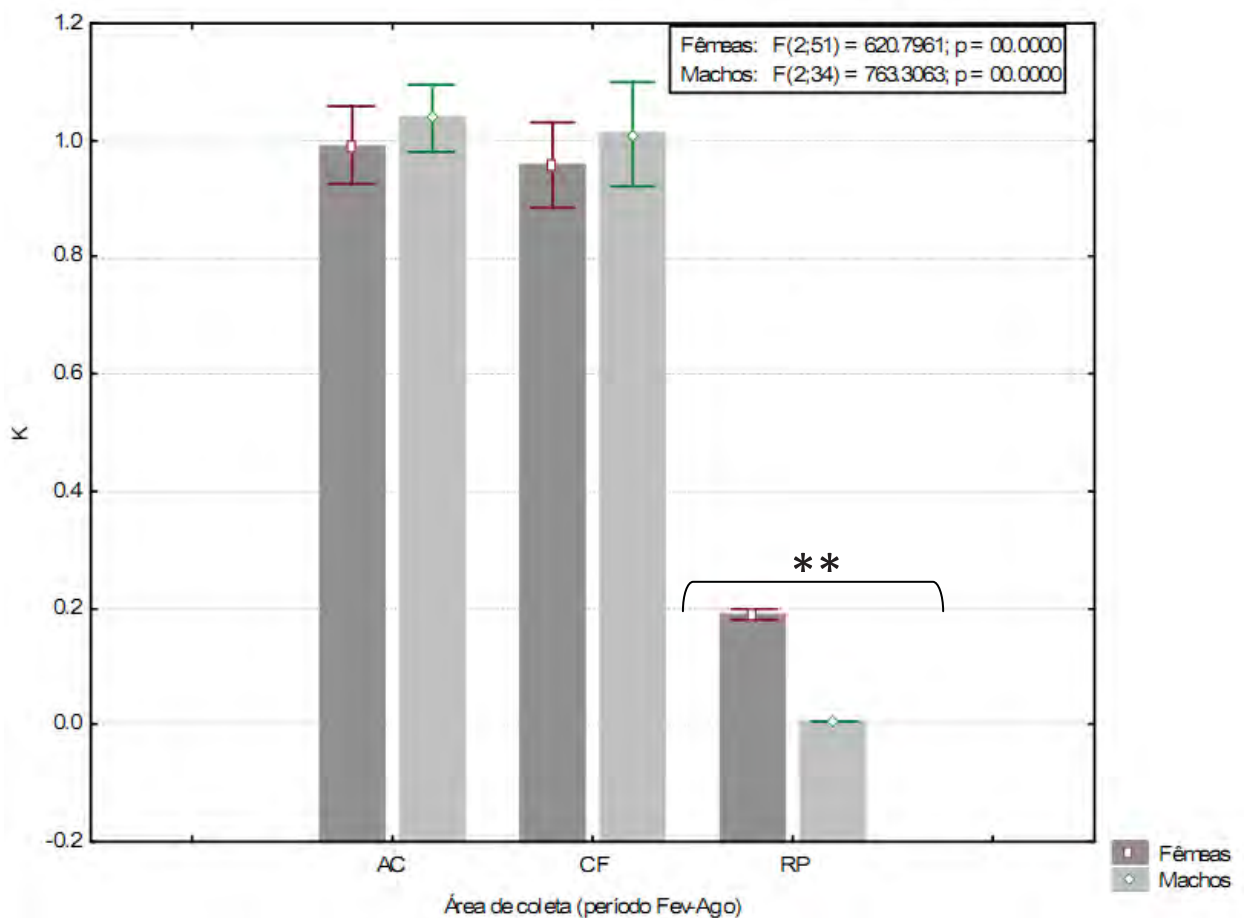
a: coeficiente angular

R<sup>2</sup>: ajuste dos pontos da reta de regressão

K: índice de condição

\*: não houve coleta de machos e fêmeas neste período

Com os valores de **b** para cada relação, o K foi calculado para cada espécime (tabela 2). Os maiores valores de K foram encontrados em AC seguido do CF e RP, respectivamente (Figura 4), mostrando que há diferença entre os períodos relacionados com reprodução e entre as áreas de coleta para machos e fêmeas, sugerindo influências fisiológicas e ambientais sobre a condição desta espécie nas áreas de estudo.

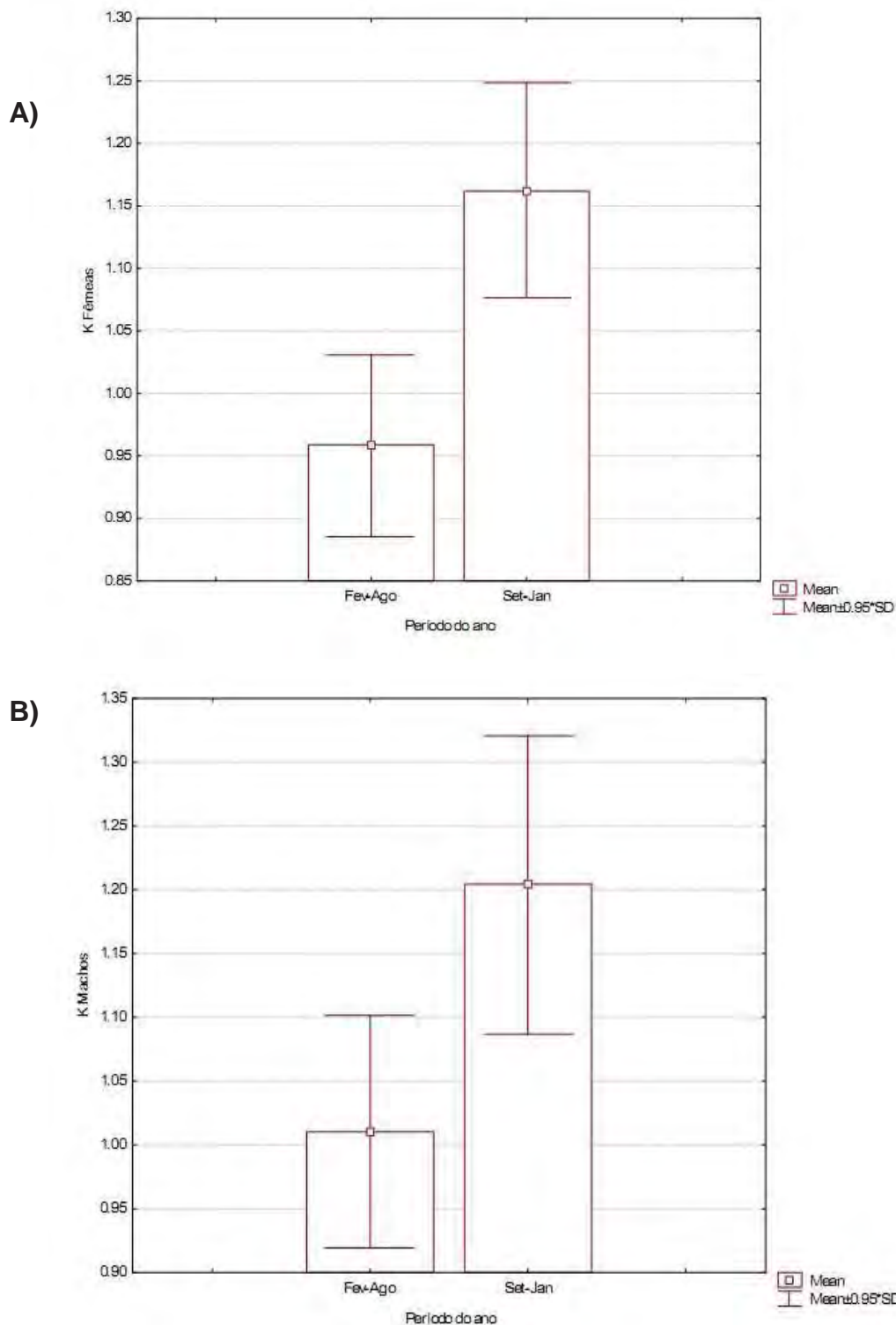


**Figura 4.** Comparação dos valores de K entre os três ambientes analisados no período de Fev-Ago entre machos e fêmeas. Observa-se que houve diferença estatisticamente significativa somente entre RP e as outras áreas (\*\*;  $p < 0,01$ ), não ocorrendo entre AC e CF, para ambos os sexos. AC: ambiente controle; CF: córrego Felicidade; RP: Rio Preto. As barras indicam a média dos valores de  $K \pm$  desvio padrão.

Os valores de K mostraram diferença estatisticamente significativa entre as fêmeas (AC, CF e RP) ( $p = 0,000$ ;  $F = 620,796$ ,  $gl = 2$ ) no

período de Fev-Ago, não ocorrendo diferença somente entre AC e CF. Houve diferença significativa entre os machos de CF, RP e AC ( $p=0,000$ ;  $F=763.306$ ,  $gl=2$ ) para o período de Fev-Ago (Figura 5), não havendo diferença somente entre AC e CF, como ocorreu entre as fêmeas para o mesmo período. Não foi possível fazer esta comparação para o período Set-Jan pelo fato de que o número amostral de machos do ambiente controle neste período foi de apenas três espécimes.

Quando o K das fêmeas são avaliados e comparados entre os períodos, há diferença significativa para valores médios de K CF(Fev-Ago) *versus* CF (Set-Jan) (t-student;  $p=0,0000$ ), sendo que o período com maior valor médio de K foi Set-Jan (Figura 5a). Este padrão também foi encontrado para machos quando da comparação entre os períodos em CF (Fev-Ago) *versus* CF (Set-Jan) (t-student;  $p=0,000194$ ), sendo o período de Set-Jan o de maiores valores médios de K, equivalente ao observado com as fêmeas (Figura 5b). Nas comparações de valores de K entre os sexos, não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores médios de K para machos e fêmeas de CF nos períodos Fev-Ago (t-student;  $p=0,0753$ ) e Set-Jan (t-student;  $p=0,269$ ).

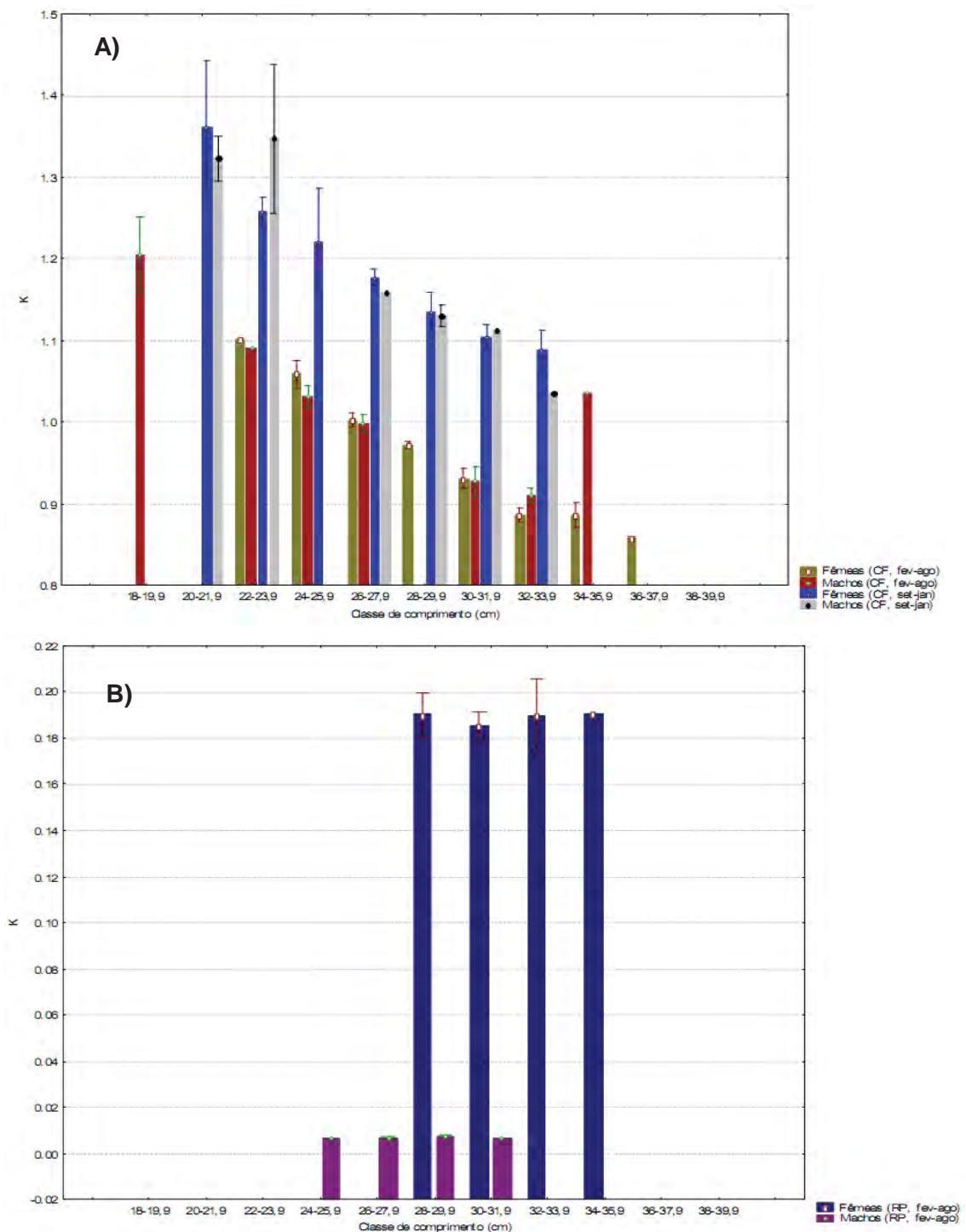


**Figura 5.** Comparação entre os valores de K de machos e fêmeas entre os dois períodos analisados. Em todas as comparações a diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ), sendo os valores de K maiores para ambos os sexos no período de Set-Jan. **A)** Fêmeas; **B)** Machos. As barras referem-se à média dos valores de K em cada período  $\pm$  desvio padrão.

Após a plotagem dos dados de K em relação à classe de comprimento e peso, observou-se que para fêmeas e machos em CF houve forte



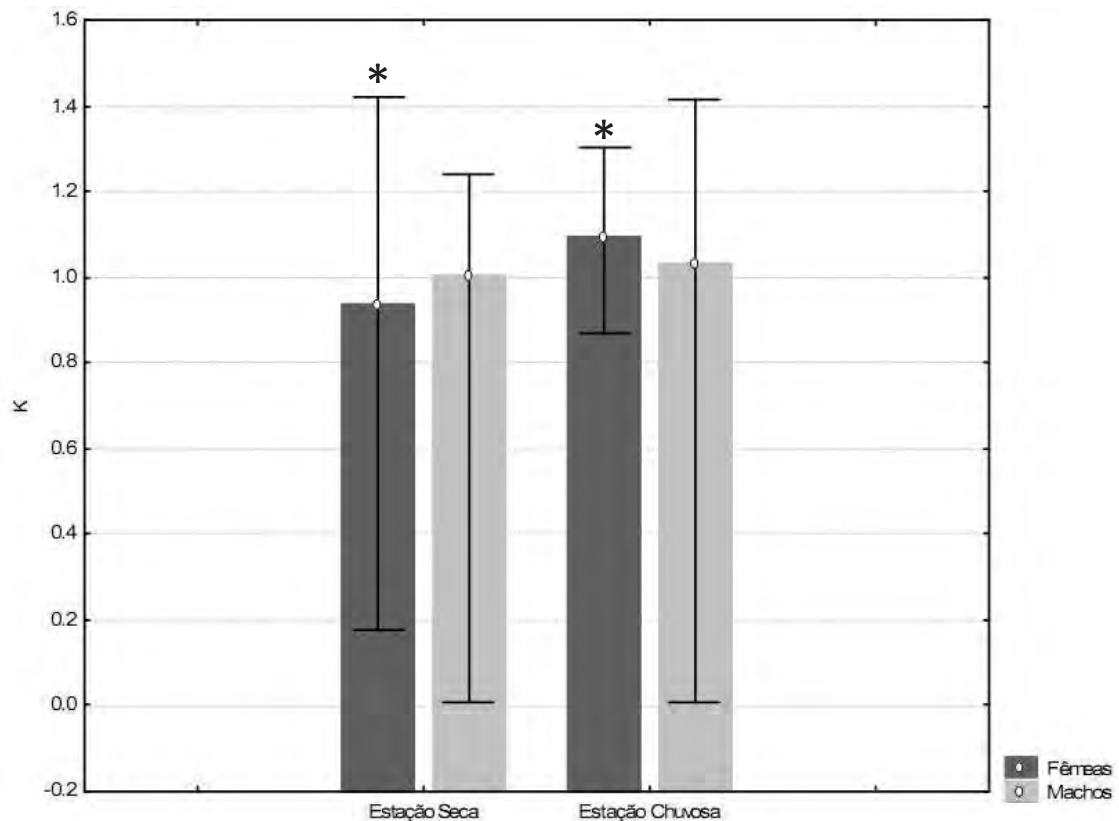
correlação inversa entre peso e tamanho no período de Fev-Ago, indicando que os maiores valores de K pertencem aos animais de menor peso e tamanho (Figura 7a) (Fêmeas CF Fev/Ago – comprimento:  $r = -0,9781$ ;  $p=0,0000$ ; peso:  $r = -0,8826$ ;  $p = 0,0000$  e machos CF (Fev/Ago – comprimento:  $r = -0,9729$ ;  $p=0,0000$ ; peso:  $r = -0,8397$ ,  $p = 0,0009$ ). Esta relação ocorre também em Set-Jan para as fêmeas (Set/Jan – comprimento:  $r = -0,9306$ ;  $p = 0,0000$ ; peso:  $r = -0,7508$ ;  $p = 0,0000$ ), mas não ocorre nos machos do mesmo período (comprimento:  $r = -0,5571$ ;  $p = 0,0944$ ) (Figura 6a). No entanto, a mesma situação não ocorreu nos animais do RP, indicando que nestes locais não há relação entre K, tamanho e peso (Figura 6b).



**Figura 6.** Relação entre K e as classes de comprimento entre machos e fêmeas. **A)** Córrego Felicidade, período Feb-Ago e Set-Jan. Observa-se que os maiores valores de K pertencem aos animais de menor comprimento. Além disso, a relação inversa do K e comprimento nos machos de Set-Jan não foi visualizada (barras cinzas - comprimento:  $r = -0,5571$ ;  $p = 0,0944$ ; **B)** Rio Preto, período Feb-Ago. Observa-se que não existe relação entre K e o comprimento em machos e fêmeas nesta área. As barras referem-se aos valores médios de  $K \pm$  desvio padrão.

Quando análises de correlação entre os valores de K, pluviosidade e temperatura do ar (médias mensais) foram realizadas, observou-se correlação entre os parâmetros citados em fêmeas de AC para o período de Fev-Ago, apresentando  $r = 0,575$ ;  $p = 0,006$  para pluviosidade média e  $r = 0,495$ ;  $p = 0,022$  para temperatura do ar. Esses resultados indicam a existência de relação entre os fatores abióticos com os valores de K para este grupo amostral.

Avaliando as medianas de K para machos e fêmeas, separados por estação chuvosa e seca, houve diferença significativa em fêmeas entre as duas estações (Mann-Whitney;  $p = 0,00006$ ); no entanto, esta diferença não foi observada para machos (Mann-Whitney;  $p = 0,16$ ) (Figura 7).



**Figura 7.** Avaliação dos valores de K para machos e fêmeas em relação à ocorrência de estação chuvosa e seca. Observa-se que para as fêmeas (barras cinza escuro) os valores de K aumentam com o aumento da pluviosidade (\*);  $p = 0,00006$ ). A estação chuvosa coincide como período de incubação e, portanto, liberação dos ovos da cavidade abdominal. No entanto, esta relação não foi observada nos machos (barras cinza claro), sugerindo que outros fatores estão associados com a condição destes animais.

Sendo assim, a partir da análise dos resultados, os animais de ambiente controle apresentaram condição equivalente aos animais do córrego Felicidade, apesar do K no ambiente controle ser numericamente maior do que o observado nos animais do córrego. Os mais baixos índices de condição foram detectados nos espécimes do rio Preto, indicando que estes animais possuem pior condição em relação aos animais de CF e de AC. Os resultados indicam também que os machos de CF e de AC apresentam melhor condição do que as

fêmeas; no entanto, esta relação é inversa para os animais do RP, indicando que há maior alteração das condições fisiológicas para esse sexo quando se trata do RP. Outra informação resultante das análises do K é que os maiores valores do índice de condição foram identificados no período de Set-Jan, que corresponde ao acasalamento e desova desta espécie nesta região.

Além disso, a temperatura do ar e pluviosidade mostraram relação com os valores de K em fêmeas do AC, sugerindo que para este grupo amostral fatores abióticos naturais como chuva e seca, exercem forte influência sobre a condição em situações onde não há interferência de contaminantes ambientais.

## **Discussão**

Neste estudo, demonstramos que estimativas de condição baseada na avaliação da relação peso-comprimento em *Phrynops geoffroanus* detectou diferenças na condição destes animais em relação ao sexo, período reprodutivo/não-reprodutivo e principalmente quanto à área de avaliação, indicando forte influência de estressores ambientais na fisiologia.

Na região de estudo, o maior impacto aos sistemas aquáticos reside na contaminação por efluentes urbanos e agrícolas não tratados. Somente 3,7% do seu território apresentam vegetação natural, alto risco de contaminação química de solos e águas e índice preocupante de qualidade de água para proteção da vida aquática. Esses indicadores foram resultantes da avaliação da Secretaria do Meio Ambiente do estado de São Paulo, em matas ciliares e análise química das águas superficiais, lençóis freáticos e solo de toda a bacia. Os dados da avaliação deste órgão informam que a bacia hidrográfica em questão é a área mais impactada por contaminação do estado de São Paulo (CBH-TG-UGRHI15 2010).

## **CAPTURA E MORFOMETRIA**

O dimorfismo sexual em Testudines geralmente se expressa pela diferença de porte entre os sexos, cauda mais longa e concavidade no plastrão dos machos, caracteres relacionados com o

comportamento reprodutivo (Berry & Shine 1980; Molina 1989). Fitch (1981) relatou que, os machos são geralmente maiores que as fêmeas nas espécies em que os machos lutam e/ou realizam inseminação forçada; e menores quando estes comportamentos estão ausentes. Berry & Shine (1980) relataram que nas espécies aquáticas de nado ativo, as fêmeas são maiores e os machos dificilmente conseguem subjugar-las, sendo que esta diferença no tamanho seria explicada no aumento do sucesso reprodutivo das fêmeas e da capacidade locomotiva dos machos, com conseqüente sucesso na localização das fêmeas. Há, portanto, um direcionamento da energia para reprodução e não para o crescimento corpóreo em machos. Desta forma, os machos devem ser menos pesados para facilitar a locomoção, localização e subjugação das fêmeas. Esta diferença no padrão corporal pode ser observada neste trabalho, visto que os machos mostraram-se menores e menos pesados do que as fêmeas, com nítido dimorfismo sexual como anteriormente relatado por Molina (1989) e Brites (2002).

Berry & Shine (1980), ao comparar dados da literatura para 75 espécies de Testudines, relataram que, 97% das fêmeas das famílias Cheloniidae, Chelidae, Emydidae e Trionychidae alcançam tamanho corpóreo maior que os machos. Sugere-se que maior tamanho corpóreo nas fêmeas proporcionaria maior espaço para o desenvolvimento dos ovos, como constatado em *Phrynops hilarii* (Astort, 1984) e *P.geoffroanus* (Souza; Abe, 2001. Brites, 2002). Para os machos, Astort (1984) sugere que a menor altura do casco estaria relacionada com a estabilidade sobre as fêmeas durante a cópula.

### ÍNDICE DE CONDIÇÃO

Sabe-se que o tamanho e forma do corpo das fêmeas de *P. geoffroanus* estão diretamente relacionados com a produção e manutenção dos ovos na cavidade abdominal, e que a nidificação dos ovos ocorre entre Fevereiro e Agosto (Astort 1984; Souza & Abe 2001). Uma das dificuldades na confirmação dos parâmetros do índice de condição é o fato de que além de haver diferenças na dieta dos animais em conteúdo de nutrientes, o papel reprodutivo das fêmeas e machos difere em muitas espécies animais (Trivers 1972). Deste modo, os espécimes coletados foram agrupados em dois períodos

relacionados diretamente com a reprodução: Fev-Ago (nidificação) e Set-Jan (acasalamento e desova).

Após a análise dos dados, pode-se observar que o valor de K é diferente entre os períodos que refletem momentos diferentes: nidificação, acasalamento e desova. Este índice aumenta no período de Set-Jan, tanto para machos quanto para fêmeas, sendo sempre maior para os machos. Estas mudanças no K devem-se, provavelmente, ao extenso gasto e esforço energético sofrido pelas fêmeas quanto à produção de ovos e vitelogênese, principalmente no período de Fev-Ago. Além disso, a relação inversa entre peso/comprimento e K sugere que o esforço fisiológico é maior quando há aumento do peso do corpo e possibilidade de aumentar o número de ovos a ser produzido, indicando que animais mais novos, e que não possuem maturação gonadal possuem maior condição por apresentarem menor depleção das reservas energéticas.

Apesar do consumo energético neste período, as fêmeas tendem a aumentar o estoque de lipídios (Moya-Laraño *et al* 2008) para produção e manutenção dos ovos, refletindo no aumento do peso corpóreo. A condição das fêmeas aumenta nos meses de Set-Jan, período que abrange o acasalamento e formação dos ninhos. Após a liberação dos ovos há diminuição do peso médio. Este resultado indica, portanto, que as modificações no índice de condição em fêmeas e machos estão associadas principalmente com as mudanças fisiológicas provocadas pela maturação sexual, relacionando-se com modificações gonadais e presença de ovos.

No que se refere aos espécimes do RP no período de Fev-Ago, esta relação entre peso-comprimento e K não foi observada. As observações destacadas nos resultados para a relação RP no período de Fev-Ago, sugerem a influência de outros fatores sob a condição dos animais destas áreas, possivelmente exercendo maior influência do que aquelas associadas à maturidade sexual. Pode-se sugerir que esta influência seja exercida pela presença de contaminantes como metais pesados existentes no RP (Maschio 2009).

Informações a respeito da situação de baixa condição em machos e o reflexo disto na reprodução são praticamente inexistentes, principalmente tratando-se de quelônios como cágados e tartarugas. Sabe-se

que fêmeas em piores condições investem menos energia na maturação; mas em relação à disponibilidade de reservas, o gasto é muito maior (Lambert & Dutil 2000). Assim, a energia despendida em reprodução por estas fêmeas pode aumentar o risco de mortalidade (Dutil & Lambert 2000), inclusive pelo comportamento de desova no ambiente terrestre, que força as fêmeas à saída da água para busca de áreas para construção dos ninhos. Já para os machos, estas afirmações são mais difíceis de serem feitas. No entanto, baseando-se nos resultados encontrados neste trabalho e no comportamento reprodutivo de *P. geoffroanus*, pode-se inferir que a redução da condição possivelmente esteja associada com o gasto das reservas energéticas associadas com a atividade reprodutiva, principalmente no que diz respeito à busca pelas fêmeas e locomoção.

Os resultados encontrados em relação à correlação entre os valores de K e fatores abióticos como temperatura do ar, pluviosidade e estação chuvosa e seca sugerem que estes parâmetros estão relacionados com o K, visto que no período de maior temperatura e maior intensidade de chuvas, os valores de K aumentam. A correlação entre os dois parâmetros meteorológicos foi identificada somente em AC possivelmente porque em locais controlados, os fatores associados à condição restringem-se à alimentação, reprodução, temperatura e umidade, pois não existem estressores ambientais, como poluentes. Sendo assim, pode-se inferir que a flutuação do K associado à chuva e temperatura seja a condição natural da espécie, quando em boas condições ambientais.

Os maiores valores de K associados à estação chuvosa para fêmeas é mais um fator importante para auxiliar na influência da associação do K com a reprodução. Como observado por Guix *et al* (1989) e Souza & Abe (2001), há sincronia entre a desova e incubação com a estação chuvosa e forte pressão de seleção para esta ocorrência (Alho & Pádua, 1982). A estação mais quente e chuvosa, associada à liberação dos ovos, pode auxiliar, portanto, na melhora da condição em fêmeas. No entanto, a mesma situação não foi observada nos machos. Pode-se sugerir que estes fatores são menos relevantes e pouco influentes na condição destes espécimes, refletindo a existência de diferenças sazonais e fisiológicas importantes entre machos e fêmeas e direcionamento diferenciado das demandas energéticas entre os sexos. Desse modo, outros



fatores estão associados com as mudanças nos valores de K de machos de *P. geoffroanus*. Esta diferença entre a condição dos sexos baseados em mudanças de temperatura e pluviosidade também ocorre em outras espécies de animais como em gastrópodos, como *Achatina fulica* (Albuquerque *et al* 2009) e em mamíferos ruminantes (*Antidorcas marsupialis* – Turner *et al.*, 2011).

A poluição do RP associado à alteração do perfil do rio pela construção de barreiras em sua margem podem ser os fatores determinantes para a baixa condição nos machos e fêmeas desta área. Além do aumento da atividade metabólica para detoxificação dos contaminantes presentes na água (Hochacka & Putz, 2001), há maior consumo energético por parte das fêmeas para busca de áreas para desova; e por parte dos machos, maior esforço metabólico para busca das fêmeas para cópula. Cabe salientar que pela modificação do leito e margem do RP, praticamente toda a área de desova na região urbana foi perdida, destruindo ninhos existentes e impedindo novas desovas. Este cenário indica importante impacto da ação humana sob as populações destas áreas; contudo, o reflexo desta situação nesta população ainda não pode ser avaliado, já que a alteração no perfil do rio é recente.

Os resultados encontrados em animais coletados em área urbana, objeto deste estudo, refletem as análises físico-químicas realizadas nos recursos hídricos da Bacia do Turvo/Grande por Campanha *et al.* (2010), que afirmam que estas áreas encontram-se altamente degradadas, afetadas principalmente pelo lançamento de efluentes domésticos *in natura*. Os autores destacam que os córregos Felicidade e rio Preto, apresentaram concentração dos parâmetros avaliados em desacordo com os valores admissíveis pela Resolução CONAMA 357/05. O rio Preto é um dos corpos aquáticos mais impactados da bacia, contaminados por efluentes domésticos da cidade de São José do Rio Preto e cidades vizinhas, seguido pelo Córrego Felicidade, contaminado por efluente agrícola e urbano. O impacto ambiental encontrado pelas análises físico-químicas são coerente com a diferença nos índices de condição para *P. geoffroanus* observados no presente estudo.

Apesar das mudanças em condição refletida neste estudo, nenhuma alteração morfológica foi detectada nos animais coletados, como observado por Piña *et al* (2009), ao avaliar a concentração tecidual de metais pesados em espécimes de *P. geoffroanus* em área altamente impactada por

contaminantes. Sugere-se que esta espécie é resistente a estressores ambientais, mostrando, inclusive, grande biomassa e alta densidade populacional nestes locais (Souza & Abe, 2000; Piña *et al* 2009).

Em muitas espécies de peixes, como por exemplo, *Oreochromis niloticus*, os baixos índices de condição em locais poluídos estão diretamente associados com o aumento da fecundidade como resposta aos altos índices de mortalidade (Lein & de Vries 1998; Scoppettone & Rissler, 2000). O aumento da fecundidade é uma resposta adaptativa de uma população frente a mudanças no ambiente, assegurando a preservação e não a eliminação da espécie, na tentativa de manter relativa estabilidade da população no espaço e no tempo (Khallaf *et al* 2003). No presente estudo, nenhuma análise a respeito da taxa de fecundidade em *P. geoffroanus* foi realizada; no entanto, esta pode ser uma relação verdadeira para esta espécie em ambientes impactados, pelo grande número de espécimes existentes nestas áreas, inclusive na bacia Turvo/Grande, e pela forte indicação de relação das mudanças nos índices de condição associadas à reprodução. Possivelmente, a diminuição dos índices de condição reflita os gastos energéticos na tentativa de manter o equilíbrio populacional frente à ampla flutuação ambiental.

Deste modo, pode-se concluir que a avaliação da condição em espécimes de *P. geoffroanus* no córrego Felicidade e no rio Preto reflete o impacto das alterações ambientais causadas por contaminação e influência antropogênica, indicando alterações nas condições fisiológicas destes organismos, especialmente com aquelas associadas à reprodução, visto que os índices foram significativamente alterados quando os períodos foram comparados, indicando influência sazonal neste parâmetro. Além disso, o índice de condição em *P. geoffroanus* mostrou-se coerente com as características de contaminação das áreas de captura, refletindo o gradiente de contaminação existente evidenciado por análises físico-químicas dos corpos d'água avaliados.

Para entender a ecologia de qualquer espécie, deve-se entender como as variações ambientais influenciam na sua fisiologia e história de vida (Getz 2011). Este trabalho foi o primeiro a avaliar este índice em cágados do Brasil e indica que populações de *P. geoffroanus* de áreas impactadas pelo homem apresentam mudanças em sua condição fisiológica e bem-estar. Sabendo-se que o grupo taxonômico à qual pertence esta espécie

ainda é controverso e qual é a real amplitude da poluição ambiental sob a sua capacidade reprodutiva, os resultados deste trabalho sugerem a necessidade de atenção e monitoramento das áreas de ocorrência da espécie, em especial as impactadas pelo homem.

### Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Dr. Luis Dino Vizotto pela permissão de uso da imagem da espécie e pelas importantes sugestões. Este estudo teve auxílio financeiro do CNPq-Brasil (bolsa de estudo de Doutorado à LPRV (MCT/CNPq nº27/2007 – 143419/2008-0) e do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH).

### Referências

Albuquerque, F.S., Peso-Aguiar, M.C., Assunção-Albuquerque, M.J.T., Gálvez, L. (2009) Do climate variables and humana density affect *Achatina fulica* (Bowditch) (Gastropoda: Pulmonata) Shell length, total weight and condition factor? *Brazilian Journal of Biology*, 69, 879-885

Alho, C.J.R., Pádua, L.F.M. (1982) Reproductive parameters and nesting behaviour of the Amazon turtle *Podocnemis expansa* (Testudinata, Pelomedusidae) in Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, 60, 97-103

Ardia, D. (2006) Geographic variation in the trade-off between nestling growth rate and body condition in the tree swallow. *Condor*, 108, 601-611

Astort, E.D. (1984) Dimorfismos sexual secundario de *Phrynops (Phrynops) hilarii* (D. y. B., 1835) y su conducta reproductora en cautiverio (Testudines-Chelidae). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" e Instituto Nacional de Investigaciones de las Ciencias Naturales*, 13, 107-113

Barbieri, P.R.B., Rao, V.B., Franchito, S.H. (2010) Estudo do início e fim da estação chuvosa na região Sudeste do Brasil. *INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais* ([HTTP://www.inpe.br](http://www.inpe.br))

Barton, B.A., Morgan, J.D., Vijayan, M.M. (2002) Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*, (ed S.M. Adam), pp. 111-148. American Fisheries Society, Bethesda

Bérnilis, R. S. (2011). *Brazilian reptiles – List of species*. <http://www.sbherpetologia.org.br>

Berry, J.F., Shine, R. (1980) Sexual size dimorphism and sexual selection in turtles (Order Testudines). *Oecologia*, 44, 185-191

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*. PhD Thesis, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos

Campanha, M.B., Melo, C.A., Moreira, A.B., Ferrarese, R.F.M.S., Tadini, A.M., Garbin, E.V., Bisinoti, M.C. (2010) Variabilidade espacial e temporal de parâmetros físico-químicos nos rios Turvo, Preto e Grande no estado de São Paulo, Brasil. *Química Nova*, 33, 1831-1836

Comitê da Bacia Hidrográfica Turvo/Grande, Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 15 (CBH-TG-UGTHI-15). *Relatório da situação dos recursos hídricos*. [http://www.comitetg.com.br/tg/index.php/documentos/cat\\_view/42-planos-e-estudos](http://www.comitetg.com.br/tg/index.php/documentos/cat_view/42-planos-e-estudos), pp. 1-32

Dutil, J.-D, Lambert, Y. (2000) Natural mortality from poor condition in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57, 826-836

Fitch, H.S. (1981) Sexual size differences in reptiles. *Miscellaneous Publication Museum of Natural History University of Kansas*, 70, 1-72

Froese, R. (2006) Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 241-253

Getz, W.M. (2011) Biomass transformation webs provide a unified approach to consumer-resource modeling. *Ecology Letters*, 14, 113-124

Gibbons, J.W., Lovich, J.E. (1990) Sexual dimorphism in turtles with emphasis on the slider turtle (*Trachemys scripta*). *Herpetology Monographies*, 4, 1-29

Green, A.J. (2000) Sexual dimorphism in morphometry and allometry in the marbled teal *Marmaronetta angustirostris*. *Journal of Avian Biology*, 31, 345-350

Guix, J.C., Salvatti, M., Peroni, M.A., Lima-Verde, J.S. (1989) Aspectos da reprodução de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Testudines, Chelidae). *Grupo de Estudos de Ecológicos, Série Documentos*, 1, 1-19

Hailey, A. (2000) Assessing body mass condition in the tortoise *Testudo hermanni*. *Herpetological Journal*, 10, 57-61

Hochachka, P.W., Lutz, P.L. (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 130, 435-459

Jennings, N., Smith, R.K., Hackländer, K., Harris, S., White, P.C.L. Variation in demography, condition and dietary quality of hares, *Lepus europeus*, from high-density and low-density populations. *Wildlife Biology*, 12, 179-189

Khallaf, E., Galal, M., Authman, M. (2003) The biology of *Oreochromis niloticus* in a polluted canal. *Ecotoxicology*, 12, 405-416

Labrada-Martagón, V., Méndez-Rodríguez, L.C., Gardner, S.C., Cruz-Escalona, V.H., Zenteno-Savín, T. (2010) Health indices of the green turtle (*Chelonia mydas*) along the Pacific Coast of Baja California Sur, Mexico. II. Body Condition Index. *Chelonian Conservation and Biology*, 9, 173-183

Lambert, Y., Dutil, J.-D. (2000) Energetic consequences of reproduction in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning level of somatic energy reserves. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57, 815-825

Le Cren, D.J. (1951) The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Animal Ecology*, 20, 201-219

Li, Z.H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Randak, T. Physiological condition status and muscle-based biomarkers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), after long-term exposure to carbamazepine. *Journal of Applied Toxicology*, 30, 197-203, 2009.

Lein, G.M., DeVries, D.R. (1998) Paddlefish in the Alabama River Drainage: population characteristics and the adult spawning migration. *Transactions of the American Fisheries Society*, 127, 441-454

Marzluff, J.M. (2001) Worldwide urbanization and its effects on birds. *Avian Ecology and Conservation in an Urbanization World* (eds J.M. Marzluff, R. Bowman & R. Donnelly), pp.19-47. Kluwer Academic Press, Dordrecht, the Netherlands.

Maschio, L.R. (2009) *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*. PhD Thesis, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto

Molina, F.B. (1989) *Observações sobre a biologia e comportamento de Phrynops geoffroanus (Schweigger, 1812) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Chelidae)*. MS Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo

- Moya-Laraño, J., Macías-Ordóñez, R., Blanckenhorn, W.U., Fernández-Montraveta, C. (2008) Analysing body condition: mass, volumen or density? *Journal of Animal Ecology*, 77, 1099-1108
- Molina, F.B. (1996) Mating behavior of captive Geoffroy's side-necked turtles, *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). *Herpetological Natural History*, 4, 155-160.
- Piña, C.I., Lance, V.A., Ferronato, B.O., Guardia, I., Marques, T.S., Verdade, L.M. (2009) Heavy metal contamination in *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) in a River Basin, São Paulo, Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 771-775
- Pritchard, P.C.H., Trebbau, P. (1984) *The turtles of Venezuela*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Athens, Ohio, USA.
- Rodrigues, M. T. (2005) The conservation of brazilian reptiles: challenges of a megadiverse country. *Conservation Biology*, 19, 659-664
- Rhodin, A.G.J., Mittermeier, R.A. (1983) Description of *Phrynops williamsi*, a new species of chelid turtle of the South American *P. geoffroanus* complex. (ed A. Rhodin & K.Miyata) *Advances in Herpetology and Evolutionary Biology – essays in honor of E.E. Williams*. Museum of Comparative Zoology, Cambridge
- Rueda-Almonacid, J.V., Carr, J.L., Mittermeier, R.A., Rodríguez-Mahecha, J.V., Mas, R.B., Vogt, R.C., Rhodin, A.G.J., Ossa-Velásquez, Rueda, J.N., Mittermeier, C.G. (2007) *Las Tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico*. Conservación Internacional, Serie Guías Tropicales de Campo, pp.533
- Sandeman, L.R., Yaragina, N.A., Marshall, C.T. Factors contributing to inter- and intra-annual variation in condition of cod *Gadus morhua* in the Barents Sea. *Journal of Animal Ecology*, 77, 725-734
- Scopettone, G.G., Rissler, P. (2000). Reproductive longevity and fecundity associated with nonannual spawning in Cui-ui. *Transactions of the American Fisheries Society*, 129, 658-669
- Souza, F.L., Abe, A.S. (2001) Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting an urban river in southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 36, 57-62
- Stevenson, R.D., Woods, W.A. (2006) Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*, 46, 1169-1190
- Trivers, R.L. (1972) Parental investment and sexual selection. *Sexual Selection and the Descent of Man* (ed. B. Campbell), pp. 136-179. Aldine Publishing Co., Chicago, Illinois

Turner, W., Versfeld, W.D., Kilian, J.W., Getz, W.M. (2011) Synergistic effects of seasonal rainfall, parasites and demography on fluctuations in springbox body condition. *Journal of Animal Ecology*, doi: 10.1111/j.365-2656.2011.01892.x

Vanzolini, P.E. (1994) On the distribution of certain South American Turtles (Testudines: Testudinidae & Chelidae). *Smitshoniana Herpetological Information Service*, 97, 1-10

Whitacker, A.M. (2007) Inovações tecnológicas, mudanças nos padrões locais e na configuração em cidades médias. *Scripta Nova*, 11, 2007.

Wyneken, J. (2001). *The anatomy of sea turtles*. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA Technical Memorandum), National Marine Fisheries Services

Zago, C.E.S., Silva, T.L., Silva, M.I.A., Venancio, L.P.R., Mendonça, P.P., Falleiros-Junior, L.R., Vizotto, L.D., Taboga, S.R., Bonini-Domingos, C.R., Azeredo-Oliveira, M.T.V., Oliveira, C. (2010) Morphological, morphometric and ultrastructural characterization of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) blood cells, in different environments. *Micron*, 41, 1005-1010



---

**CAPÍTULO 3 - ESTIMATIVA DA ESTRUTURA GENÉTICA E  
HISTÓRIA DEMOGRÁFICA DE *PHRYNOPS GEOFFROANUS*  
(SCHWEIGGER 1812): INFLUÊNCIA DA OCUPAÇÃO HUMANA**

**ARTIGO A SER SUBMETIDO A REVISTA CONSERVATION BIOLOGY (FATOR DE  
IMPACTO: 4.8)**



**Estimativa da estrutura genética e história demográfica de *Phrynops geoffroanus* (SCHWEIGGER 1812): influência da ocupação humana**

Larissa Paola Rodrigues Venancio<sup>1</sup>, Tiago Lucena da Silva<sup>1</sup>, Maria Isabel Afonso da Silva<sup>1</sup>, Vinicius Augusto Gobbe Moschetta<sup>1</sup>, Jéssica Basílio Bacchi<sup>1</sup>, Tayrone Luiz Coltro Pereira<sup>1</sup>, Nathalia Rossigalli Alves Costa<sup>1</sup>, Elisabete Cristina Silva<sup>2,3</sup>, Patricia Ianella<sup>2</sup>, Samuel Rezende Paiva<sup>2</sup>, Claudia Regina Bonini Domingos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP/IBILCE, Campus de São José do Rio Preto-SP.

<sup>2</sup>: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa/Cenargen-Brasília-DF.

<sup>3</sup>: Universidade de Brasília – Brasília-DF.

**Resumo**

Entender a estrutura de populações e a diversidade genética é crucial para conservação da vida selvagem e determinar a integridade de populações naturais. Uma causa relevante para a perda da biodiversidade é a modificação de habitats naturais, afetando processos dinâmicos como seleção natural, fluxo gênico e deriva genética, aumentando a possibilidade de extinção devido à erosão genética e processos demográficos estocásticos. O cágado sul-americano, *Phrynops geoffroanus* (SCHWEIGGER 1812), conhecido popularmente como “cágado-de-barbelas”, apresenta ampla distribuição geográfica, abrangendo desde a Amazônia Colombiana até o Sudeste do Brasil, Uruguai e Nordeste da Argentina. Esta espécie pertence a um complexo de espécies que é objeto de grande controvérsia taxonômica, ainda não completamente esclarecida; além disso, esta espécie é ainda pouco estudada em termos ecológicos e principalmente genéticos. Neste trabalho foram avaliadas 12 microssatélites com a finalidade de elucidar a estrutura genética e história demográfica de populações pertencentes à bacia hidrográfica mais poluída e impactada da região sudeste brasileira, uma das áreas mais populosa e industrialmente desenvolvidas do Brasil. Os dados indicam baixa estruturação genética entre as áreas amostradas, baixo grau de consanguinidade intrapopulacional e alto fluxo gênico. Apesar da pouca diferenciação genética entre as populações, observou-se alta subestruturação genética intrapopulacional, provavelmente devido ao intenso fluxo gênico com outras áreas de sub-bacia e, principalmente, devido ao impacto da ocupação humana e modificação do leito do rio. Essa interferência pode estar iniciando processos de formação de barreiras físicas, diferenciando possíveis demes existentes por toda a extensão da área. Análises demográficas indicam também mudanças no equilíbrio mutação-deriva, como indicativo de eventos de gargalo da garrafa recentes, que podem ter sido mascarados, como por exemplo, pelo pequeno tempo de alterações e história natural da espécie. Essas observações indicam que, apesar da adaptação desta espécie a áreas impactadas, a alteração do

habitat natural realizada pela ação humana pode ser refletida na estrutura genética dessas populações, indicando atenção para conservação não somente desta espécie pouco conhecida, mas de toda a comunidade pertencente a estas áreas.

**Palavras-chave:** *Phrynops geoffroanus*, microssatélites, estrutura de populações, demografia, conservação, evolução.

## Introdução

A modificação de habitats naturais pelo homem é uma importante causa da perda de biodiversidade (MEFFE; CARROL, 1997; MARZLUFF, 2001; CLARK et al. 2010), afetando processos dinâmicos como seleção natural, fluxo gênico e deriva genética, aumentando a possibilidade de extinção devido à erosão genética e processos demográficos estocásticos (FRANKHAM et al., 2002). Como a diversidade genética pode aumentar as chances de sucesso de uma espécie à variações ambientais, a perda de alelos é um fator importante que pode reduzir a habilidade de adaptação a novos desafios evolutivos (WRITE, 1978).

Conhecer a estrutura da população e a diversidade genética é crucial para preservação efetiva da vida selvagem devido a sua importância na determinação da integridade e viabilidade de populações naturais. Além disso, esses parâmetros podem revelar mais processos atuando em populações e espécies, como, por exemplo, de que maneira a estrutura genética de espécies de ampla distribuição é formada e mantida, e se há grupos genéticos crípticos existentes dentro do táxon (TAMMELEHT et al., 2010).

Marcadores genéticos moleculares podem prover informações importantes sobre a distribuição geográfica da diversidade genética (e processos causais associados) de espécies cuja observação na natureza é dificultada, por exemplo, pelo comportamento e/ou pela dificuldade de acessar o seu habitat (TZIKA et al., 2008), como por exemplo, espécies de ambiente aquático.

O cágado sul-americano, *Phrynops geoffroanus* (SCHWEIGGER 1812), conhecido popularmente como “cágado-de-barbelas”,

apresenta ampla distribuição geográfica, abrangendo desde a Amazônia Colombiana até Sudeste do Brasil, Uruguai e Nordeste da Argentina (PRITCHARD; TREBBAU 1984). *P. geoffroanus* é uma espécie integrante do chamado “Complexo *Phrynops*”, que é um complexo de espécies cuja taxonomia ainda não foi completamente esclarecida. Vários autores sustentam este táxon como uma superespécie, suscetível a ser fracionada em várias entidades específicas; já outros autores, sustentam que esta é uma espécie politípica com várias subespécies diferentes (RUEDA-ALMONACID et al., 2007). Apesar da ampla distribuição geográfica da espécie, estudos com interesse na história natural são praticamente inexistentes e, grande parte das informações biológicas foram derivadas de estudos de espécimes cativas (GUIX et al 1989; MOLINA, 1996).

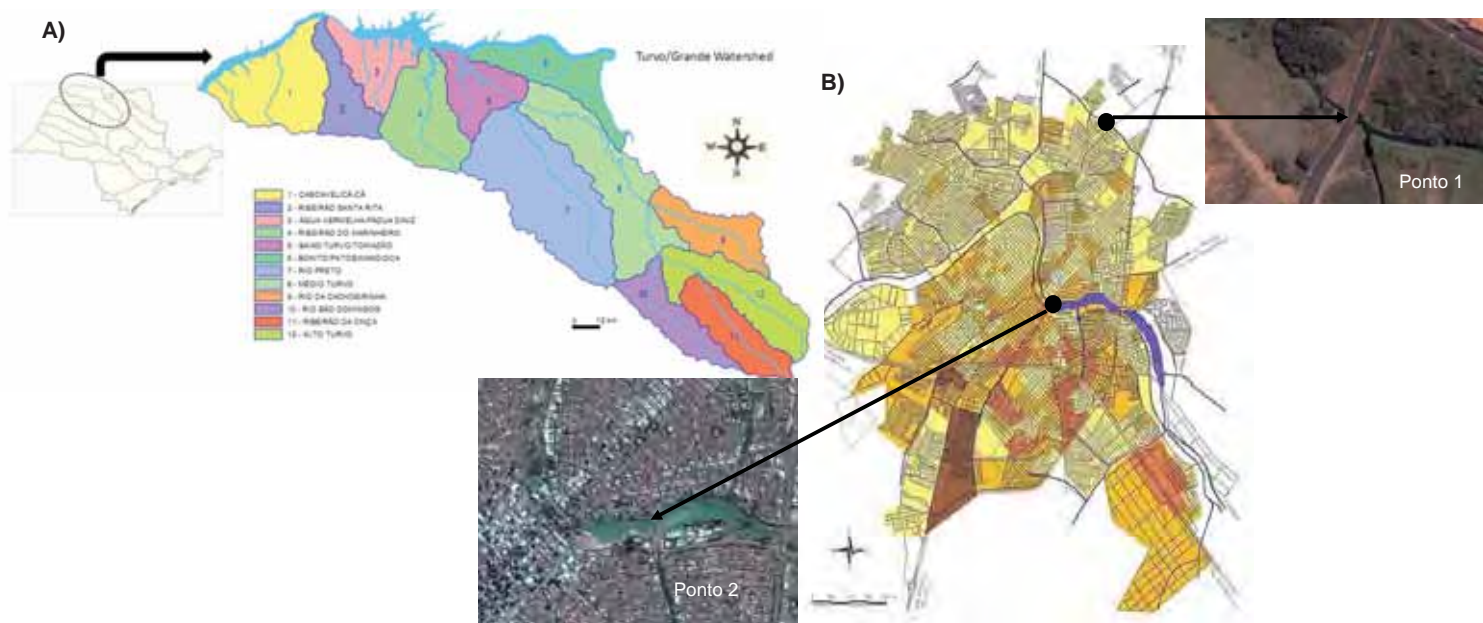
*P. geoffroanus* é uma espécie pouco conhecida não somente em termos de ecologia básica, mas principalmente em estrutura genética populacional. Estudos com ferramentas moleculares são importantes, não somente para auxiliar no entendimento de processos biogeográficos e fenômenos populacionais atuantes na modelagem da estrutura genética e demográfica deste táxon, mas também para avaliar os eventuais efeitos do impacto antropogênico na diversidade genética da espécie a fim de auxiliar a implementação de programas efetivos de conservação (ESCALONA et al., 2009). Assim, pode-se evitar a perda de variação genética e fixação de alelos deletérios, com conseqüente depressão endogâmica e redução do potencial adaptativo (CORNEUT; LUIKART, 1996).

Neste estudo, marcadores moleculares microssatélites foram utilizados para avaliar a estrutura genética de populações selvagens de *P. geoffroanus*, coletados em áreas impactadas por poluentes químicos e orgânicos, de origem antropomórfica e por barreiras físicas decorrentes da construção de represas, com o objetivo de avaliar o impacto que esses fatores podem ter sobre a diversidade genética desta tartaruga de água doce sul-americana.

## **Material e Métodos**

A) *Coleta de amostras, extração de DNA e geração de dados moleculares*

Espécimes de *Phrynos geoffroanus* foram capturados em duas áreas da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande, região Noroeste do estado de São Paulo (Sudeste do Brasil) (Figura 1). As áreas de coleta localizam-se no perímetro urbano da cidade de São José do Rio Preto - SP, e são elas: Córrego Felicidade (CF) (20°46'25.99"S, 49°21'17.63"O) e rio Preto (RP) (20°47'09.82"S, 49°22'26.24"O). Para captura dos animais, foi utilizada uma armadilha cilíndrica tipo "covo", medindo 150X60 cm. As armadilhas foram presas por arame galvanizado em árvores nas margens do rio e dos córregos, e em seu interior, foram colocadas iscas (carne bovina e peixe) presas por ganchos de arame galvanizado. As atividades de coleta dos espécimes foram autorizadas e aprovadas pelo IBAMA/ICMBio (registro 2838725/nº 16488-1, nº16488-2, 16488-3) e pela comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (Protocolo FAMERP nº 5517/2008).



**Figura 1.** Mapas de localização da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande e da cidade de São José do Rio Preto. **A)** Mapa do estado de São Paulo e da Bacia, com destaque para a região da cidade de São José do Rio Preto – SP. **B)** Mapa da cidade de S. J. Rio Preto, com indicação dos pontos de coleta. O ponto 1 refere-se ao córrego Felicidade ( $20^{\circ}46'25.99''S$ ,  $49^{\circ}21'17.63''O$ ) e o ponto 2 refere-se ao rio Preto ( $20^{\circ}48'31.86''S$ ,  $49^{\circ}22'27.61''O$ ) (Mapa da cidade adaptado de Whitacker(2007) e mapa da bacia adaptado de Comitê da Bacia Hidrográfica Turvo/Grande 2010).

Amostras de sangue (~1mL) foram coletados de cada espécime, seguindo método descrito por Silva et al. (2012), e posteriormente armazenados em tubos contendo EDTA como anticoagulante. O DNA das amostras foi extraído até aproximadamente 3 horas após a coleta, visto a rápida coagulação do sangue.

Os espécimes coletados foram caracterizados quanto ao sexo por meio de avaliação do tamanho da cauda, abertura da placa anal e concavidade do plastrão (MOLINA, 1989). Foram coletados 36 fêmeas e 13 machos nas duas áreas amostradas, totalizando 49 espécimes de *Phrynops geoffroanus*.

O DNA genômico total foi extraído utilizando o protocolo fenol-clorofórmio descrito por Sambrook et al., (1989), e ressuspendido em ~60µL de tampão TE. A concentração de DNA foi avaliada com espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000), a integridade avaliada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, e posteriormente estocados a -20°C.

Protocolos de reações em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados para amplificação individual de 19 pares de oligonucleotídeos iniciadores de microssatélites com repetição dinucleotídica originalmente desenvolvidos para *Podocnemis unifilis* e *Podocnemis expansa* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Informações gerais a respeito dos 19 locos testados, como tipo de repetição, tamanho esperado, marcação, espécie onde o marcador foi isolado e condições de amplificação em *Phrynos geoffroanus*.

| Microsatélite | Repetição   | Tamanho esperado | Marcação | Taq polimerase  | Temp. annealing | [MgCl <sub>2</sub> ] | Espécie de Origem                          |
|---------------|---|------------------|----------|-----------------|-----------------|----------------------|--|
| PE1075        | (AC) <sub>11</sub>  | 247-283bp        | FAM      | Promega         | 52°C            | 2,0mM                | <i>Podocnemis expansa</i> <sup>(2)</sup>   |
| Puni2C11      | (CT) <sub>17</sub>  | 200-400bp        | HEX      | Qiagen          | 52°C            | —                    | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup>  |
| Pod79         | (CT) <sub>13</sub> (CA) <sub>16</sub>                                   | 220-260bp        | HEX      | Qiagen          | 56°C            | —                    | <i>Podocnemis expansa</i> <sup>(3)</sup>   |
| Puni1C9       | (GA) <sub>17</sub>  | 200-350bp        | FAM      | Promega         | 54°C            | 2mM                  | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup>  |
| Puni1C3       | (GA) <sub>8</sub>   | 200-400bp        | HEX      | Promega         | 52°C            | 3,5mM                | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup>  |
| Puni1D9       | (GA) <sub>12</sub>  | 200-300bp        | FAM      | Promega         | 58°C            | 2,0mM                | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup>  |
| Puni2E7       | (GA) <sub>5</sub> GC(GA) <sub>8</sub>                                   | 100-300bp        | FAM      | Promega         | 52°C            | 3,5mM                | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup>  |
| Puni2F6       | (CT) <sub>8</sub> T(CT) <sub>10</sub>                                   | <b>EXCLUÍDO</b>  | HEX      | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b>      | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup>  |
| Pod147        | (GT) <sub>16</sub> (A) <sub>20</sub>                                    | 200-300bp        | HEX      | Qiagen          | 60°C            | —                    | <i>Podocnemis expansa</i> <sup>(3)</sup>   |
| Pod62         | (GT) <sub>13</sub> (TA) <sub>3</sub>                                    | <b>EXCLUÍDO</b>  | FAM      | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b>      | <i>Podocnemis expansa</i> <sup>(3)</sup>   |
| Puni1B11      | (GA) <sub>7</sub> GG(GA) <sub>9</sub>                                   | 265-287bp        | FAM      | Qiagen          | 54°C            | —                    | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup>  |
| Puni2D10      | (GA) <sub>8</sub>   | 140-170bp        | HEX      | Qiagen          | 62°C            | —                    | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup>  |
| Pod1          | (CA) <sub>12</sub>  | <b>EXCLUÍDO</b>  | FAM      | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b>      | <i>Podocnemis expansa</i> <sup>(3,4)</sup> |
| Pod128        | (GT) <sub>23</sub> (GC) <sub>8</sub>                                    | <b>EXCLUÍDO</b>  | HEX      | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b>      | ambas <sup>(3)</sup>                       |
| Puni1B2       | (GA) <sub>17</sub>  | 300-400bp        | FAM      | Qiagen          | 52°C            | —                    | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup>  |
| PE519         | (CT) <sub>7</sub> (CA) <sub>8</sub> (CG) <sub>2</sub> (CA) <sub>8</sub> | <b>EXCLUÍDO</b>  | HEX      | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b>      | <i>Podocnemis expansa</i> <sup>(5)</sup>   |
| Puni1F10      | (CT) <sub>8</sub>   | 150-250bp        | FAM      | Qiagen          | 52°C            | —                    | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup>  |
| Puni2A9       | (GA) <sub>8</sub>   | 100-300bp        | FAM      | Promega         | 52°C            | 1,5mM                | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup>  |
| PE344         | (AG) <sub>13</sub>  | <b>EXCLUÍDO</b>  | FAM      | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b> | <b>EXCLUÍDO</b>      | <i>Podocnemis expansa</i> <sup>(5)</sup>   |

(1) FANTIN et al., 2007; (2) VALENZUELA, 2000; (3) SITES et al., 1999; (4) VALENZUELA, 2001; (5) VALENZUELA, 1999.

As reações de amplificação para parte dos marcadores foram estabelecidas utilizando 3ng de DNA genômico, 2 $\mu$ M de cada par de oligonucleotídeo iniciador, 2,5 $\mu$ L de 2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix, 5X Q-Solution e água em um volume final de 5 $\mu$ L, e as temperaturas otimizadas por reações de gradiente de temperatura. Para os marcadores que não puderam ser amplificados com QIAGEN® Multiplex PCR, foram testados com o seguinte protocolo: 9ng de DNA genômico, 2 $\mu$ M de cada oligonucleotídeo iniciador, tampão 10X, dNTPs 2.5mM, MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0.5 U de Taq Promega e água em um volume final de 10 $\mu$ L. As concentrações ideais de MgCl<sub>2</sub> foram padronizadas para cada marcador e otimizado nestas condições (Tabela 1). O protocolo de ciclagem foi o seguinte: desnaturação inicial de 95°C por 15 min (QIAGEN) ou 94°C por 5 min (Promega), seguidos por 40 ciclos de 94°C por 30s, 56-62°C por 1 min, 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 30m. Os alelos foram genotipados em sequenciador automático ABI3100 (Applied Biosystems), e analisados manualmente utilizando o programa Genemapper v4.1 (Applied Biosystems). Após genotipagem, os fragmentos foram atribuídos a categorias de alelos de acordo com o seu tamanho, por meio do programa FLEXBIN (AMOS et al., 2007).

## *B) Análise de Dados*

### *1) Diversidade genética dentro de localidades*

O número de alelos por população e locos, heterozigidade observada ( $H_O$ ), heterozigidade esperada ( $H_E$ ), e alelos privados foram calculados utilizando o programa GenAEx 6.1 (PEAKALL; SMOUSE, 2005). A riqueza alélica ( $R_A$ ) foi calculada como descrito por El Mousadik e Petit (1996), por meio do programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2001).

A avaliação do desequilíbrio de ligação par a par entre locos foi testada utilizando o programa GENEPOP versão 4.0 (ROUSSET, 2008), e os níveis de significância foram avaliados usando procedimento de aleatorização da cadeia de Markov (GUO; THOMPSON, 1992) com 10.000 passos de



dememorização, 1.000 lotes e 5.000 iterações por lotes. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram testados com o programa ARLEQUIN versão 3.5.1.2, utilizando teste exato baseado no procedimento descrito por Guo e Thompson (1992), com 100.000 passos de dememorização (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Para avaliar a presença de alelos nulos, foi utilizado o programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004).

## 2) *Diversidade genética entre localidades*

A estrutura interpopulacional foi avaliada por meio de cálculos de valores de  $F_{st}$  (WEIR; COCKERHAM, 1994), e calculado com o programa FSTAT. A subdivisão populacional e estrutura foi avaliada por meio da análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) implementado no GenAEx. As estimativas do número de migrantes por geração ( $Nm = (1-F_{st})/4F_{st}$ ) (WRIGHT, 1969) foi realizado com GENEPOP.

O método de agrupamento bayesiano implementado pelo programa STRUCTURE 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000) foi aplicado para identificação de agrupamentos genético entre todo o grupo de dados. O método empregado constituiu do teste de sete *clusters* ( $k=7$ ; um até sete), em cinco corridas independentes (iterações), sem utilização de informação populacional prévia. A probabilidade posterior dos dados [ $\text{LnPr}(x/kK)$ ] para cada valor de  $k$  foi inferido com iterações MCMC (algoritmo cadeia de Markov Monte Carlo) de 10.000 cada e *burn-in* de 100.000, utilizando o modelo de ancestralidade compartilhada (*admixture ancestry model*) e frequência de alelos correlacionado entre amostras, que considera as frequências semelhantes entre as populações devido à migração ou ancestralidade, em que alguns alelos estão em desequilíbrio de ligação. O verdadeiro  $k$  é selecionado utilizando o valor máximo do log *likelihood* [ $\text{LnPr}(x/kK)$ ] da probabilidade posterior a partir de um dado  $\Delta k$  (EVANNO et al., 2005).

Foram realizados também testes de atribuição individual para calcular a probabilidade de que genótipos multilocus individuais derivem de populações alternativas (PAETKAU et al., 1995), utilizando método Bayesiano pelo programa GENECLASS 2 (PIRY et al., 2004).

### 3) Análises demográficas

A história demográfica baseada em microssatélites foi avaliada utilizando dois métodos: 1) o teste de sinal de Wilcoxon foi utilizado para examinar se populações exibem maior nível de heterozigosidade do que predito em uma população em equilíbrio mutação-deriva. Este teste é mais sensível para detectar efeitos de gargalo de garrafa (*bottlenecks*) que ocorreram aproximadamente na última 2-4  $N_e$  gerações, tendo mais poder estatístico para detectar gargalos mais recentes (por exemplo, 0.2-1 $N_e$  gerações atrás). 2) um teste *mode-shift* (LUIKART et al., 1998) que detecta distorção na distribuição L esperada de frequências alélicas. Este teste é mais apropriado para detectar declínios populacionais que tenham ocorrido mais recentemente (em poucas dezenas de gerações (LUIKART et al., 1998, CORNUET; LUIKART, 1996). A deficiência de heterozigosidade, excesso de heterozigosidade e os testes *mode-shift* foram realizados por meio do programa BOTTLENECK 1.2.02 (PIRY et al., 1999). Foram realizados 5.000 simulações em 2 populações sob o modelo de IAM (*infinite allele model*) (ESTOUP et al., 1995a,b; CORNUET; LUIKART, 1996). Os valores de  $p$  do teste de Wilcoxon foram utilizados para evidência de gargalos e o nível de significância foi de 0.05.

## Resultados e Discussão

### 1) Estatísticas intrapopulacionais

Dezenove pares de oligonucleotídeos iniciadores de microssatélites originalmente desenvolvidos para *Podocnemis expansa* e *Podocnemis unifilis* foram submetidos à PCR; destes, 12 apresentaram sucesso na amplificação em *Phrynops geoffroanus* e foram utilizados para estimar a estrutura da população da espécie em estudo (Tabela 1).

A avaliação global do conjunto de microssatélites utilizando o MICRO-CHECKER revelou não haver nenhuma evidência de erro de genotipagem devido ao padrão de bandas “gagas” (*stuttering*) ou perdas de

alelos grandes, mas evidenciou que alelos nulos podem estar presentes nos locos Pod147 (Córrego Felicidade - CF) e Puni2C11 (Rio Preto - RP).

A média do número de alelos por locos foi de 7.833 em CF e 5.917 em RP. Do total de 92 alelos, 59 foram privados; sendo que estes foram mais comuns em CF, com destaque para Puni1F10 (sete alelos privados) e Pod147 (13 alelos privados).

A diversidade alélica observada por população foi de 5.917 (RP) a 7.833 (CF) (média=6.875), e a riqueza alélica ( $R_A$ ) foi de 5.57 (RP) e 6.11 (CF). A heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) mostrou-se elevada para as duas localidades amostradas (média entre CF e RP = 0.688), indicando, de modo geral, que altos níveis de diversidade genética estão presentes entre as áreas. Estes dados estão apresentados na Tabela 2. Nenhuma diferença significativa em  $R_A$  e  $H_E$  foi identificada entre as localidades (ANOVA,  $p = 0.233$ ), e as duas medidas mostraram alta correlação ( $R^2 = 0.7274$ ,  $p < 0.01$ ).

**Tabela 2.** Informações gerais a respeito das estatísticas intrapopulacionais inferidas dos dados de microssatélites para as duas áreas amostradas.

| Local de coleta | N  | Diversidade alélica* |       | Diversidade genética* |       | AP*    | $F_{is}$ * |
|-----------------|----|----------------------|-------|-----------------------|-------|--------|------------|
|                 |    | $A_{ob}$             | $R_A$ | $H_O$                 | $H_E$ |        |            |
| Rio Preto       | 16 | 5.917                | 5.57  | 0.768                 | 0.698 | 18 (8) | -0.104     |
| Felicidade      | 33 | 7.833                | 6.11  | 0.719                 | 0.678 | 41 (9) | -0;061     |

N: tamanho amostral;  $A_{ob}$ : média de número de alelos observados por locos;  $R_A$ : riqueza alélica;  $H_O$ : heterozigosidade observada;  $H_E$ : heterozigosidade esperada; AP: número de alelos privados por localidade (número de locos);  $F_{is}$ : coeficiente de consanguinidade de Weir e Cockerham (1984). \*: calculados com GenALex; \*: calculado com FSTAT

O teste de probabilidade para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) identificou sete locos que se mostraram significativamente fora do EHW ( $\alpha=0.05$ ). O maior número de locos fora do equilíbrio de EHW pertence à RP (significante para seis dos 12 locos estudados). Os locos em desvio de EHW em comum nas duas populações amostradas são: Puni1C3, Puni2E7 e Pod147. Pearse et al. (2006), avaliando a estrutura populacional sob condições de não-equilíbrio em 18 populações de *Podocnemis expansa*, identificou desvio do EHW para o loco Pod147 em sete das populações amostradas. Avaliando todos os

pares de locos entre as populações, pode-se verificar desequilíbrio de ligação (DL) entre Puni2A9 e Puni2D10 ( $p= 0.022$ ); no entanto, foi observado ocorrência de DL em outros locos em cada área de coleta.

Vários estudos têm revelado diferenças na extensão e no grau de DL entre populações resultantes de diferenças da história e na demografia de populações (AMARAL et al., 2008; LI; MERILÄ, 2011). Endogamia e subestruturação populacional (ou estratificação) aumentam os níveis de DL em uma população (PELTONEN et al., 2000). No caso da subdivisão populacional, associações estatísticas entre locos que não são fisicamente ligados podem ocorrer (PRITCHARD; ROSENBER, 1999). Essa associação ocorre porque a subdivisão da população permite que as frequências alélicas variem entre segmentos de populações como resultado da deriva genética ou efeito de fundador (SLATKIN; 1991).

Os testes exatos para deficiência e excesso de heterozigotos por população, baseado em estimativas de  $F_{is}$ , realizados pelo Genepop, indicam que dois locos em CF e três locos em RP apresentam déficit de heterozigoto; três locos em CF e cinco locos em RP apresentam excesso de heterozigotos. O loco coincidente para o déficit de heterozigotos em CF e RP foi Pod147 e os coincidentes para excesso são Puni2A9 e Puni2E7. Estes resultados encontrados em *Phrynops geoffroanus* para o loco Puni2E7 foi equivalentes ao encontrado por Fantin et al. (2007), que desenvolveu e avaliou este marcador em *Podocnemis unifilis*.

## 2) Diferenciação genética entre localidades

Geralmente, o grau de estrutura genética em uma espécie distribuída continuamente é dependente de 1) a ocorrência de um mosaico de subpopulações delimitadas por efetivas barreiras físicas para o fluxo gênico como montanhas, rios e estradas; ou ecológicas, como especialização pré-habitat, (MUSIANI et al., 2007); e 2) um único grupo genético com nenhuma fronteira definida ou subdivisão clara onde o fluxo gênico entre partes distantes da população podem ser restritas somente pela capacidade limitada de dispersão (EPPERSON, 2003).

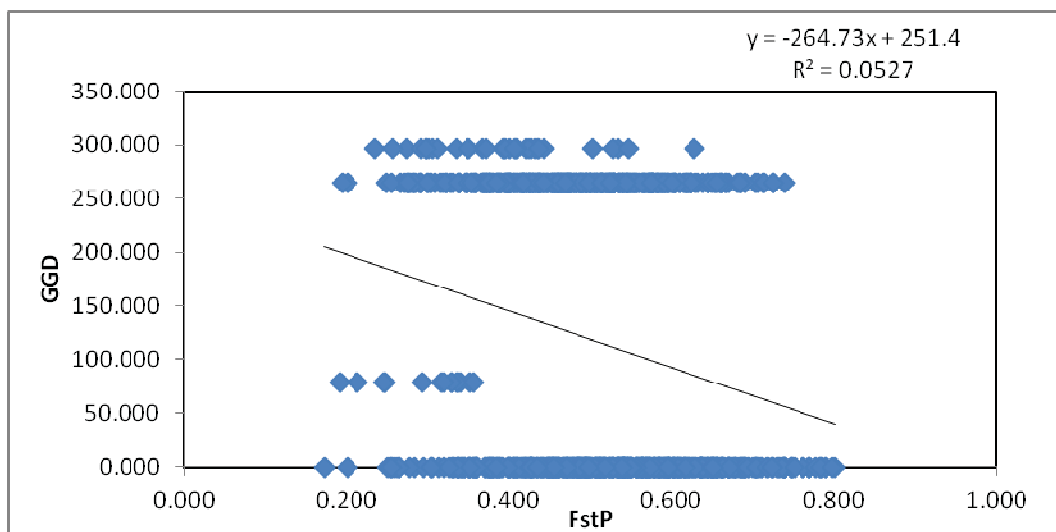
Avaliando a diferenciação genética entre as localidades, o valor de  $F_{st}$  global entre as duas populações foi de 0.018 (IC 95% 0.004-0.033), indicando existência de fluxo gênico entre as localidades amostradas e baixa estrutura genética entre as áreas. A avaliação da estimativa de migrantes após correção por tamanho (Nm) (Genepop) indicou em 3.7 migrantes. Resultado semelhante também foi observado quando da detecção de migrantes de primeira geração realizado pelo GENECLASS, resultando em três indivíduos com probabilidade abaixo de 0.01.

De acordo com Kimura e Maruyama (1971), quando Nm assume valores maiores do que quatro entre localidades, as áreas podem ser consideradas pertencentes a uma única população panmítica, enquanto que Nm menor do que um indica que as localidades são diferenciadas. Hedrick (2005) sugere que um único migrante por geração é suficiente para prevenir a diferenciação completa das populações ideais, independentemente do seu tamanho. Deste modo, pode-se inferir a existência de fluxo gênico entre CF e RP, concordando com os padrões detectados pela estatística  $F$  e com o perfil geográfico das áreas, já que CF é tributário do RP.

As análises de distância geográfica e genética entre as localidades apontam para uma correlação fraca ( $r^2 = 0.0545$ ;  $p > 0.01$ ) (Figura 2), indicando baixa diferenciação entre as localidades que abrangem a área geográfica estudada (cerca de 6 Km entre os pontos de coleta, seguindo o percurso do rio e do córrego). O padrão de baixa estruturação genética entre populações separadas geograficamente é descrito para quelônios da Bacia Amazônica como *Podocnemis expansa* (PEARSE et al., 2006) e *Podocnemis sextuberculata* (SILVA et al., 2011), assim como para outras espécies, como por exemplo, peixe-boi (*Trichechus inunguis*, CANTANHEDE et al., 2005) e pirarucu (*Arapaima gigas*; HRBEK et al., 2005).

Há poucas informações na literatura a respeito da capacidade migratória de *Phynops geoffroanus*. Souza e Abe (2001) sugere que, devido à baixa taxa de recaptura (2.4%) em coletas realizadas mensalmente durante um ano, possivelmente a espécie apresenta alta capacidade de mobilidade. Condição semelhante foi observado nas coletas no CF e RP; durante todo o período de coleta, houve recaptura de somente dois animais. Os resultados de análise de diferenciação genética entre localidades contribuem para a afirmação

destes autores e com a nossa observação em relação ao sucesso de recaptura. Contudo, para confirmar esta observação, faz-se necessária a avaliação da estruturação entre maior número de indivíduos e áreas da bacia hidrográfica.



**Figura 2.** Teste de Mantel para averiguação da dependência entre distância geográfica e distância genética entre os indivíduos coletados e área de coleta. GGD: Distância geográfica. FstP: distância genética [ $F_{st}/(1-F_{st})$ ]. O coeficiente de regressão indica a não existência de relação entre distância genética e geográfica, indicando que os indivíduos não apresentam isolamento por distância.

Avaliando os dados de diversidade genética entre as localidades, os valores elevados dos índices que a descrevem indicam que o impacto da contaminação ambiental e da alteração do perfil do leito do rio ainda não afetou consideravelmente as populações avaliadas (ELLSTRAN; ELAM, 1993). O perfil de alta diversidade genética foi descrito em outras espécies de tartarugas de água doce que sofrem algum tipo de impacto antrópico, como *Podocnemis expansa* (PEARSE et al., 2006) e *Podocnemis unifilis* (ESCALONA et al., 2009), e esta condição pode indicar variabilidade histórica nas condições ambientais que poderiam ter encoberto recentes eventos de gargalo genético (*bottleneck effect*) devido à longevidade da espécie e sobreposição de gerações (VALENZUELA, 2000; GARZA; WILLIAMSON, 2001; ESCALONA et al. 2009).

Além disso, distúrbios ecológicos muito recentes não reduzem a diversidade genética dentro de poucas gerações, a menos que leve a perda populacional catastrófica (LIN et al., 2012).

### 3) *Relacionamento genético entre localidades, testes de redução de população e considerações gerais*

A análise de AMOVA sugere baixa diferenciação genética ( $\theta_{st}=0.065$ ,  $p=0.001$ ) entre as populações, com apenas 7% da variação sendo explicada por diferenças interpopulacionais e 93% sendo explicada pela variação dentro da população. No entanto, este resultado sugere a existência de diferenciação genética entre grupos de indivíduos, visto que o valor de  $\theta_{st}$  foi maior que 0.05 e o valor de  $p$  significativo (WRIGHT, 1931).

Quando os dados foram avaliados por algoritmos de agrupamento Bayesiano (STRUCTURE), foi identificada alta subestruturação, como sugere os dados de variância molecular, indicando cinco populações subdivididas entre as avaliadas ( $k = 5$ ), não agrupando indivíduos por área de coleta. Este resultado aparentemente não possui explicação óbvia; no entanto, esta observação pode ser justificada pelas alterações no leito do rio, como por exemplo, o represamento do rio Preto e processos avançados de assoreamento nos seus tributários, como é o caso do córrego Felicidade. Estes processos de alteração estão estabelecendo importantes barreiras físicas ao longo do percurso do rio, dificultando a migração dos animais, como, por exemplo, retorno de espécimes para a área do lago artificial após o ponto do represamento, influenciando na diferenciação genética de possíveis sub-grupos populacionais existentes antes dessas alterações e nos que estão sendo recentemente formados devido à formação de barreiras físicas.

Testes demográficos utilizando BOTTLENECK foram realizados para avaliar se as populações se encontram em equilíbrio entre mutação e deriva genética (*mutation-drift equilibrium*) segundo metodologia descrita por Cornuet e Luikart (1996). O modelo de IAM (*infinite allele model*; WATTERSON 1984), indicou a existência de excesso de heterozigidade em RP e CF (teste de Wilcoxon-sign rank;  $p = 0.00049$ ); no entanto, não mostrou alteração na distribuição L-shaped. Apesar do teste de Wilcoxon sugerir a

possibilidade de ocorrência de eventos recentes de gargalo genético, esta inferência não foi confirmada pelo modelo de distribuição de alelos, sugerindo a possibilidade de mudanças no equilíbrio mutação-deriva sem declínio populacional, haja vista que não há sinais de erosão genética, como avaliado pela riqueza alélica. Deve-se considerar também o tempo de alterações no ambiente natural dessas áreas, como contaminação por despejo orgânico e industrial, represamento e processos de assoreamento. É preciso considerar também a história natural do animal, como, por exemplo, o tempo de vida, que dificultaria a identificação de eventos de declínio populacional no momento; além da influência da amostragem.

Os dados de  $F_{is}$  indicam a não ocorrência de consanguinidade intrapopulacional, e, portanto, a ocorrência de acasalamentos ao acaso ( $CF=-0.061$ ;  $RP=-0.104$ ). Este resultado sugere a existência de número elevado de indivíduos nas áreas, em especial no RP, dificultando o acasalamento entre espécimes aparentados. O número elevado de indivíduos poderia explicar em parte a existência de mudanças no equilíbrio mutação-deriva sem declínio populacional.

Outra observação importante a respeito da densidade populacional está no fato de que as áreas amostradas apresentam intensa contaminação por efluentes domésticos e industriais (CAMPANHA et al., 2010). Sabe-se que populações de *P.geoffroanus* apresentam maior densidade nestas áreas devido à alta concentração de materiais orgânicos em decomposição que favorece a alimentação. A alta densidade populacional da espécie e grande biomassa sugere que estes animais são altamente resistentes e adaptados a ambientes contaminados não somente por despejo orgânico, mas poluídos com altas concentrações de metais pesados (PIÑA et al., 2009), como é o caso das duas áreas amostradas.

## Conclusões

Este é o primeiro trabalho a avaliar a diversidade genética e estrutura populacional de *Phrynops geoffroanus*, uma espécie de quelônio endêmica da América do Sul.



A manutenção da diversidade entre populações é reconhecida como um problema central da conservação (HUGHES et al. 1997), e o diagnóstico da estrutura baseada em marcadores genéticos neutros é geralmente correlacionada com variações demográficas ou ecológicas entre populações e/ou adaptação local (CRANDALL et al., 2000).

Os resultados deste estudo preliminar de genética de populações em *P.geoffroanus* apresentam implicações para a conservação desta espécie ainda pouco conhecida. Apesar dos resultados não indicarem perda relevante da diversidade genética em relação à diversidade gênica e riqueza alélica, apresentam uma “assinatura” de vulnerabilidade genética provocada por alterações demográficas, que podem influenciar na integridade genética.

Os dados gerados indicam influência das alterações físicas, ocasionadas pelo processo de represamento e assoreamento nas populações, das áreas amostradas. O processo de alteração do leito do rio implica em modificações de curso d'água, construção de barreiras nas encostas, ocasionando a perda de indivíduos adultos e, em especial, na destruição de ninhos e áreas de desova, influenciando diretamente no número de indivíduos em fase reprodutiva e de novas gerações.

As questões aqui levantadas refletem o impacto da atuação e da modificação gerada pelo homem sobre as populações naturais e seus habitats e concordam com outros trabalhos que identificaram a influência, como por exemplo, da agricultura e do desenvolvimento residencial e urbano na estrutura de genética de populações (ROW et al., 2010; ROW et al., 2011).

O tempo de alteração na área estudada ainda é muito pequeno para modificações evolutivas importantes, mas os dados refletem desvios no equilíbrio entre mutação e deriva genética que ainda não podem ser quantificados, mas que podem resultar em modificações no *fitness* (GAUTSCHI et al. 2002; BEHEREGARY et al., 2003) e aumento da probabilidade de extinção (FRANKHAM 1998; SACCHERI et al., 1998). Estudos abrangendo um número amostral mais expressivo e de toda a bacia hidrográfica em questão, além de estudos ecológicos e comportamentais mostram-se necessários para a conservação, não somente da espécie, mas de toda a comunidade associada a essas áreas intensamente impactadas pelo homem.

## Referências

AMARAL, A.J. et al. Linkage disequilibrium decay and haplotype block structure in the pig. **Genetics**, v.179, p.569-579, 2008.

AMOS, W. et al. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.10-14, 2007.

BEHEREGARAY, L.B.; CIOFI, C.; CACCONE, A. et al. Genetic divergence, phylogeography and conservation units of giant tortoises from Santa Cruz and Pinzon, Galapagos Islands. **Conservation Genetics**, v.4, p.31-46, 2003.

CAMPANHA, et al. Variabilidade espacial e temporal de parâmetros físico-químicos nos rios Turvo, Preto e Grande no estado de São Paulo, Brasil. **Química Nova**, v.33, p.1831-1836, 2010.

CANTANHEDE, A.M. et al. Phylogeography and population genetics of the endangered Amazonian manatee, *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia, Sirenia). **Molecular Ecology**, v.14, p.401-413, 2005.

CLARK, R.W., et al. Roads, interrupted dispersal, and genetic diversity in timber rattlesnakes. **Conservation Biology**, v.24, n.4, p.1059-1069, 2010.

CORNEUT, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v.144, p.2001-2014, 1996.

COMITÊ DA BACIA HIDROGRÁFICA TURVO/GRANDE, UNIDADE DE GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS 15 (CBH-TG-UGTHI-15). **Relatório da situação dos recursos hídricos**. [http://www.comitetg.com.br/tg/index.php/documentos/cat\\_view/42-planos-e-estudos](http://www.comitetg.com.br/tg/index.php/documentos/cat_view/42-planos-e-estudos), pp. 1-32, 2010.

CRANDALL, K.A. et al. Considering evolutionary process in conservation biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v.15, p.290-295, 2000.

EL MOUSADIK, A.; PETIT, R.J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.832-839, 1996.

ELLSTRAN, N.C.; ELAM, D.R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology System**, v.24, p.217-242, 1993.

EPPERSON, B.K. **Geographical genetics**: monographs in population biology. Princeton University Press, 2003, 38p.

ESCALONA, T. et al. Population genetics of the endangered South American freshwater turtle, *Podocnemis unifilis*, inferred from microsatellite DNA data. **Conservation Genetics**, v.10, p.1683-1696, 2009.

ESTOUP, A. et al. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera, Apidae) in Europe. **Molecular Ecology**, v.5, p.19-31, 1995a.

ESTOUP, A. et al. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). **Molecular Biology and Evolution**, n.12, p.1074-1084, 1995b.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p.564-567, 2010.

FANTIN, C. et al. Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.1235-1238, 2007.

FRANKHAM, R. Inbreeding and extinction: Island populations. **Conservation Biology**, v.12, p.665-675, 1998.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge University Press, 2002.

GARZA, C.; WILLIAMSON, E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v.10, p.305-318, 2001.

GAUTSCHI, B. et al. Increased frequency of scale anomalies and loss of genetic variation in serially bottlenecked populations of the dice snake, *Natrix tessellate*. **Conservation Genetics**, v.3, p.235-245, 2002.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em <<http://www.unil.ch/lizea/software/fstat.html>>

GUIX, J.C. et al. Aspectos da reprodução de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Testudines, Chelidae). **Grupo de Estudos de Ecológicos, Série Documentos**, v.1, p.1-19, 1989.

GUO; S.W.; THOMPSON, E.A. A Monte Carlo method for combined segregation and linkage analysis. **American Journal of Human Genetics**, v.51, n.5, p.1111-1126, 1992.

HEDRICK, P.W. **Genetics of Population**. 3.ed. Jones and Bartlett Publishers, 2005, 737p.

HRBEK, T. et al. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. **Animal Conservation**, v.8, n.297-308, 2005.

HUGHES, J.B.; DAILY, G.C.; EHRLICH, P.R. Population diversity, its extent and extinction. **Science**, v.278, p.689-692, 1997.

KIMURA, M.; MARUYAMA, T. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. **Genetics Research**, v.18, p.125-131, 1971.

LI, M.-H; MERILÄ, J. Population differences in levels of linkage disequilibrium in the wild. **Molecular Ecology**, v.20, p. 2916-2928, 2011.

LIN, L.-H. et al. Genetic structure and demographic history should inform conservation: Chinese cobras currently treated as homogenous show population divergence. **Plos ONE**, v.7, n.4, p.e36334, 2012.

LUIKART, G. et al. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**, v.89, p.238-247, 1998.

MARZLUFF, J.M. Worldwide urbanization and its effects on birds. **Avian Ecology and Conservation in an Urbanization World** (eds J.M. Marzluff, R. Bowman & R. Donnelly). Kluwer Academic Press, Dordrecht, the Netherlands, 19-47p. 2001.

MEFFE, G.K.; CARROL, C. **Principles of conservation biology**. Sinauer, 1997.

MOLINA, F.B. Observações sobre a biologia e comportamento de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Chelidae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

MUSIANI, M. et al. Differentiation of tundra/taiga and boreal coniferous Forest wolves: genetics, coat colour and association with migratory caribou. **Molecular Ecology**, v.16, 4149-4170, 2007.

PAETKAU, D. et al. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v.4, p.347-354, 1995.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University. Disponível em <<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenALEX/>>

PEARSE, D. et al. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). **Molecular Ecology**, v.15, p.985-1006, 2006.

PELTONEN, L.; PALOTIE, A.; LANGE, K. Use of population isolates for mapping complex traits. **Nature Reviews Genetics**, v.1, p.182-190, 2000.

PIÑA, C. I. et al. Heavy metal contamination in *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) in a river basin, São Paulo, Brazil. **Bulletin of Environment and Contamination Toxicology**, v.83, 771-775, 2009.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v.90, p.502-503.

PIRY, S. et al. GENECLASS 2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. **Journal of Heredity**, v.95, p.536-539, 2004.

PRITCHARD, J.K.; ROSENBERG, N.A. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. **American Journal of Human Genetics**, v.65, p.220-228, 1999.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000.

PRITCHARD, P.C.H.; TREBBAU, P. **The turtles of the Venezuela**. Society for the study of amphibians and reptiles contributions on Herpetology, 1984.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for windows and linux. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.103-106, 2008.

ROW, J.R.; BLOUIN-DEMERS, G.; LOUGHEED, S.C. Habitat distribution influences dispersal and fine-scale genetic population structure of eastern foxsnakes (*Mintonius gloydi*) across a fragmented landscape. **Molecular Ecology**, v.19, p.5157-5171, 2010.

ROW, J.R. et al. Approximate bayesian computation reveals the factors that influence genetic diversity and population structure of foxsnakes. **Journal of Evolutionary Biology**, v.24, p.2364-2377, 2011.

RUEDA-ALMONACID, J.V. et al. Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. **Conservation International**, 2007.

SACCHERI, I. et al. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. **Nature**, v.392, p.491-494, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. 2.ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SILVA, T.J. et al. Population genetics analysis of *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemidae): lack of population structure in the central Amazon Basin. **Genetics and Molecular Research**, v.10, n.3, p.1393-1402, 2011.

SILVA, T.L et al. Blood sampling in Testudinidae and Chelidae. **Herpetological Review**, v.43, n.1, p.64-65, 2012.

SITES, J.W. et al. Population genetic structure in the giant Amazon River turtle (*Podocnemis expansa*): inferences from two classes of molecular markers. **Chelonian Conservation and Biology**, n.36, p.85-102, 1999.

SLATKIN, M. Inbreeding coefficients and coalescence times. **Genetical Research**, v.58, p.167-175, 1991.

SOUZA, F.L.; ABE, A.S. Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting an urban river in southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.36, n.1, p.57-62, 2001.

TAMMELEHT, E. Genetic structure in large, continuous mammal populations: the example of brown bears in northwestern Eurasia. **Molecular Ecology**, v.19, p.5359-5370, 2010.

TZIKA, A.C. et al. Population structure of an endemic vulnerable species, the Jamaican boa (*Epicrates subflavus*). **Molecular Ecology**, v.17, p.533-544, 2008.

VALENZUELA, N. Multiple paternity in sideneck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. **Molecular Ecology**, v.9, p.99-106, 2000.

VALENZUELA, N. Genetic differentiation among nesting beaches in the highly migratory giant river turtle (*Podocnemis expansa*) from Colombia. **Herpetologica**, v.57, p.48-57, 2001.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.535-538, 2004.

WATTERSON, G.A. Allele frequencies after a bottleneck. **Theoretical of Population Biology**, v.26, p.387-407, 1984.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-1370, 1984.

WHITACKER, A.M. Inovações tecnológicas, mudanças nos padrões locacionais e na configuração em cidades médias. **Scripta Nova**, v.11, 2007.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**. The theory of gene frequencies. University of Chicago Press, 1969.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v.16, p.97-159, 1931

WRITE, S. **Evolution and the genetics of populations**. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, 1978.





---

**CAPÍTULO 4 - CORRELAÇÃO NEGATIVA ENTRE HETEROZIGOSIDADE E *FITNESS* EM *PHRYNOPSIS GEOFFROANUS* (SCHWEIGGER 1812): IMPACTO DAS MUDANÇAS ECOLÓGICAS SOBRE A DIVERSIDADE GENÉTICA E A CONDIÇÃO.**

**ARTIGO A SER SUBMETIDO A REVISTA BMC GENETICS (FATOR DE IMPACTO: 2.4)**

**Correlação negativa entre heterozigosidade e *fitness* em *Phrynops geoffroanus* (SCHWEIGGER 1812): impacto das mudanças ecológicas sobre a diversidade genética e a condição.**

Larissa Paola Rodrigues Venancio<sup>1</sup>, Tiago Lucena da Silva<sup>1</sup>, Maria Isabel Afonso da Silva<sup>1</sup>, Vinicius Augusto Gobbe Moschetta<sup>1</sup>, Jéssica Basílio Bacchi<sup>1</sup>, Tayrone Luiz Coltro Pereira<sup>1</sup>, Nathalia Rossigalli Alves Costa<sup>1</sup>, Patricia Ianella<sup>2</sup>, Elisabete Cristina Silva<sup>2,3</sup>, Claudia Regina Bonini Domingos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP/IBILCE, Campus de São José do Rio Preto-SP.

<sup>2</sup>: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa/Cenargen-Brasília-DF.

<sup>3</sup>: Universidade de Brasília – Brasília-DF.

**Resumo**

A relação entre diversidade genética e *fitness* possui implicações na biologia evolutiva e da conservação. Este relacionamento tem sido amplamente investigado em nível individual em estudos de correlação heterozigosidade-*fitness* (CHF). De modo geral, efeitos gerados pela endogamia e/ou efeitos locais de locos únicos tem sido utilizados como explicações para a correlação. Neste trabalho foi investigada a correlação entre heterozigosidade individual e vários aspectos do desempenho fisiológico de cágado-de-barbelas (*Phrynops geoffroanus*). Neste contexto foi avaliado o fator de condição, que se baseia na relação entre peso e tamanho dos indivíduos e a avaliação de diversos elementos associados à capacidade antioxidante e de detoxificação. Foram genotipados 49 animais com 12 microssatélites. A relação entre heterozigosidade e *fitness* mostrou-se negativa, possivelmente por codominância e vantagem de alelos recessivos devido a mudanças ecológicas recentes nas áreas amostradas, refletindo a influência da atividade humana sobre essas populações.

**Palavras-chave:** microssatélites, correlação heterozigosidade-*fitness* (CHF), correlação negativa entre CHF, *Phrynops geoffroanus*

## Introdução

A influência da diversidade genética no *fitness* em indivíduos e populações mostra implicação para biologia evolutiva e da conservação. A correlação heterozigosidade-*fitness* (CHF) tem sido usada para o estudo do relacionamento entre diversidade genética e traços relacionados com o *fitness* em nível individual em uma variedade de organismos (COLTMAN; SLATE, 2003; CHAPMAN et al., 2009).

O impacto da heterozigosidade no *fitness* tem uma longa história na biologia evolutiva. Charles Darwin (1876) notou que indivíduos com altos níveis de heterose podem apresentar “vigor do híbrido”, e estudos desde então suportam esta ideia (CHAPMAN et al., 2009). Contudo, ainda não é claro como atua a força do efeito da heterozigosidade no *fitness* de populações naturais (CHAPMAN et al., 2009; SZULKIN et al., 2010).

A CHF é comumente explicada pelo efeito de endogamia em todo o genoma (hipótese do efeito geral) ou por efeitos localizados em um único loco (hipótese do efeito local/direto) (DAVID, 1998; HANSSON; WESTERBERG, 2002). A endogamia causa a redução na heterozigosidade individual pelo genoma, e assim, aumenta o risco da expressão de alelos deletérios recessivos e diminui a ocorrência do efeito benéfico da vantagem do heterozigoto. Este fenômeno é conhecido como depressão endogâmica (CHARLESWORTH; WILLIS et al., 2009). Neste caso, espera-se que a relação entre heterozigosidade e *fitness* seja positiva.

O fenômeno oposto, depressão exogâmica, geralmente ocorre quando a progênie produzida por cruzamento entre indivíduos de populações geneticamente diferenciadas apresenta o *fitness* reduzido do que aquela originada entre cruzamentos de indivíduos da mesma população. O declínio no *fitness* neste caso pode ser atribuído à quebra de complexos gênicos coadaptados ou favorecimento de interações epistáticas negativas (LYNCH, 1991). Deste modo, o que se observa é efeito negativo da heterozigosidade no *fitness* (MARSHALL; SPALTON, 2000; NEFF, 2004).

Apesar do número crescente de trabalhos avaliando CHF, revisões indicam que essas avaliações tendem a ser fracas e inconsistentes (COLTMAN; SLATE, 2003; CHAPMAN et al., 2009; SZULKIN et al., 2010).

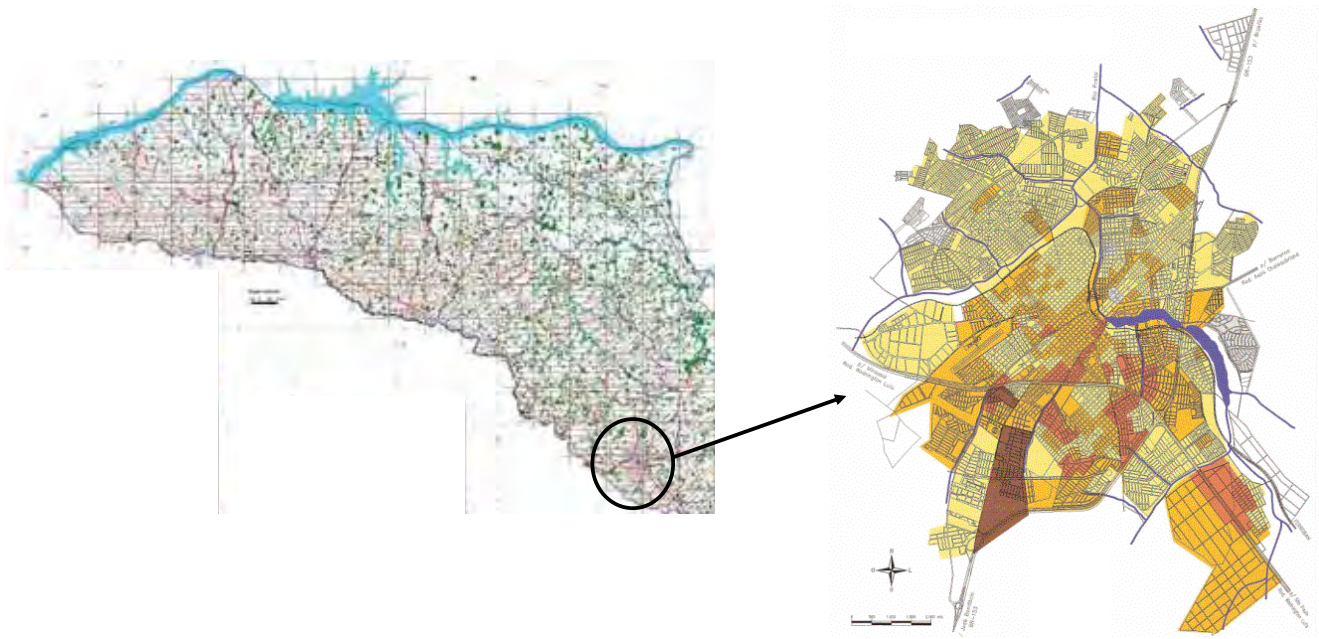
Provavelmente, isto se deve a variações na base genética de traços importantes (como, por exemplo, se são traços poligênicos) ou devido a variações na frequência e história de endogamia na população estudada (SZULKIN et al., 2010). Nota-se também que a história de vida e traços comportamentais podem também apresentar plasticidade fenotípica (POSTMA; VAN NOORDWIJK, 2005). A plasticidade pode gerar variações intra e inter-individuais que podem obscurecer o impacto da heterozigosidade (WETZEL et al., 2012).

Neste trabalho o efeito da heterozigosidade foi avaliado em vários aspectos do desempenho fisiológico de cágado-de-barbelas (*Phrynops geoffroanus*). Neste contexto foi avaliado o fator de condição, que se baseia na relação entre peso e tamanho dos indivíduos e a avaliação de diversos elementos associados à capacidade antioxidante e de detoxificação.

## Material e Métodos

### 1) Área de estudo de amostras

Espécimes de *Phrynops geoffroanus* foram capturados em duas áreas da Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande, região Noroeste do estado de São Paulo (Sudeste do Brasil) (Figura 1). As áreas de coleta localizam-se no perímetro urbano da cidade de São José do Rio Preto - SP, e são elas: Córrego Felicidade (CF) (20°46'25.99"S, 49°21'17.63"O) e rio Preto (RP) (20°47'09.82"S, 49°22'26.24"O). Para captura dos animais, foi utilizada uma armadilha cilíndrica tipo "covo", medindo 150X60 cm. As armadilhas foram presas por arame galvanizado em árvores nas margens do rio e dos córregos, e em seu interior, foram colocadas iscas (carne bovina e peixe) presas por ganchos de arame galvanizado.



**Figura 1.** Região Noroeste do estado de São Paulo e Bacia Hidrográfica Turvo/Grande. Em destaque, a cidade de São José do Rio Preto.

As atividades de coleta dos espécimes foram autorizadas e aprovadas pelo IBAMA/ICMBio (registro 2838725/nº 16488-1, nº16488-2, 16488-3) e pela comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (Protocolo FAMERP nº 5517/2008).

Os espécimes coletados foram caracterizados quanto ao sexo por meio de avaliação do tamanho da cauda, abertura da placa anal e concavidade do plastrão (MOLINA, 1989). Foram coletados 36 fêmeas e 13 machos nas duas áreas amostradas, totalizando 49 espécimes de *Phrynops geoffroanus*.

Todos os espécimes capturados foram marcados por perfurações nos escudos marginais, que indicam a ordem numérica e cronológica da captura com auxílio de furadeira manual. As perfurações foram feitas baseando-se no primeiro escudo nugal como ponto zero e os escudos marginais seguintes como número um, dois, três e assim sucessivamente. Estas marcações, como são feitas em regiões ósseas, não sofrem cicatrização, impossibilitando assim a perda da marca, não são invasivas e não atrapalham a locomoção do animal.

## 2) *Microssatélites e análise de dados*

Amostras de sangue (~1mL) foram coletados de cada espécime, seguindo método descrito por Silva et al. (2012), e posteriormente armazenados em tubos contendo EDTA como anticoagulante. O DNA das amostras foi extraído até aproximadamente 3 horas após a coleta, visto a rápida coagulação do sangue.

O DNA genômico total foi extraído utilizando o protocolo fenol-clorofórmio descrito por Sambrook et al., (1989), e ressuspenso em ~60µL de tampão TE. A concentração de DNA foi avaliada com espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000), a integridade avaliada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, e posteriormente estocados a -20°C.

Protocolos de reações em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados para amplificação individual de 12 pares de oligonucleotídios iniciadores de microssatélites com repetição dinucleotídica originalmente desenvolvidos para *Podocnemis unifilis* e *Podocnemis expansa* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Informações gerais a respeito dos 12 locos testados, como tipo de repetição, tamanho esperado, marcação, espécie onde o marcador foi isolado e condições de amplificação em *Phrynos geoffroanus*.

| Microsatélite | Repetição                             | Tamanho esperado | Marcação | Taq polimerase | Temp. annealing | [MgCl <sub>2</sub> ] | Espécie de Origem                         |
|---------------|---------------------------------------|------------------|----------|----------------|-----------------|----------------------|---|
| PE1075        | (AC) <sub>11</sub>                    | 247-283bp        | FAM      | Promega        | 52°C            | 2,0mM                | <i>Podocnemis expansa</i> <sup>(2)</sup>  |
| Puni2C11      | (CT) <sub>17</sub>                    | 200-400bp        | HEX      | Qiagen         | 52°C            | —                    | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup> |
| Puni1C9       | (GA) <sub>17</sub>                    | 200-350bp        | FAM      | Promega        | 54°C            | 2mM                  | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup> |
| Puni1C3       | (GA) <sub>8</sub>                     | 200-400bp        | HEX      | Promega        | 52°C            | 3,5mM                | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup> |
| Puni1D9       | (GA) <sub>12</sub>                    | 200-300bp        | FAM      | Promega        | 58°C            | 2,0mM                | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup> |
| Puni2E7       | (GA) <sub>5</sub> GC(GA) <sub>8</sub> | 100-300bp        | FAM      | Promega        | 52°C            | 3,5mM                | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup> |
| Pod147        | (GT) <sub>16</sub> (A) <sub>20</sub>  | 200-300bp        | HEX      | Qiagen         | 60°C            | —                    | <i>Podocnemis expansa</i> <sup>(3)</sup>  |
| Puni1B11      | (GA) <sub>7</sub> GG(GA) <sub>9</sub> | 265-287bp        | FAM      | Qiagen         | 54°C            | —                    | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup> |
| Puni2D10      | (GA) <sub>8</sub>                     | 140-170bp        | HEX      | Qiagen         | 62°C            | —                    | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup> |
| Puni1B2       | (GA) <sub>17</sub>                    | 300-400bp        | FAM      | Qiagen         | 52°C            | —                    | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup> |
| Puni1F10      | (CT) <sub>8</sub>                     | 150-250bp        | FAM      | Qiagen         | 52°C            | —                    | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup> |
| Puni2A9       | (GA) <sub>8</sub>                     | 100-300bp        | FAM      | Promega        | 52°C            | 1,5mM                | <i>Podocnemis unifilis</i> <sup>(1)</sup> |

(1) FANTIN et al., 2007; (2) VALENZUELA, 2000; (3) SITES et al., 1999



As reações de amplificação para parte dos marcadores foram estabelecidas utilizando 3ng de DNA genômico, 2µM de cada par de oligonucleotídeo iniciador, 2,5µL de 2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix, 5X Q-Solution e água em um volume final de 5µL. Para os marcadores que não puderam ser amplificados com QIAGEN® Multiplex PCR, foram testados com o seguinte protocolo: 9ng de DNA genômico, 2µM de cada oligonucleotídeo iniciador, tampão 10X, dNTPs 2.5mM, MgCl<sub>2</sub> 25mM, 0.5 U de Taq Promega e água em um volume final de 10µL. As concentrações ideais de MgCl<sub>2</sub> foram padronizadas para cada marcador otimizado nestas condições (Tabela 1). O protocolo de ciclagem foi o seguinte: desnaturação inicial de 95°C por 15 min (QIAGEN) ou 94°C por 5 min (Promega), seguidos por 40 ciclos de 94°C por 30s, 56-62°C por 1 min, 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 30m. Os alelos foram genotipados em sequenciador automático ABI3100 (Applied Biosystems), e analisados manualmente utilizando o programa Genemapper v4.1 (Applied Biosystems). Após genotipagem, os alelos foram “binados”, isto é, os fragmentos foram atribuídos a categorias de alelos de acordo com o seu tamanho, por meio do programa FLEXBIN (AMOS et al., 2007).

O número de alelos por população e locos, heterozigidade observada ( $H_o$ ), heterozigidade esperada ( $H_e$ ), e alelos privados foram calculados utilizando o programa GenAIEx 6.1 (PEAKALL; SMOUSE, 2005). (maiores detalhes no Capítulo 4 da Tese).

### 3) *Fator de condição e análise bioquímica de enzimas de detoxificação e capacidade antioxidante*

O fator de condição (avaliação do *fitness*) e a relação peso-comprimento foram estabelecidos pela mensuração do peso total e comprimento total, e os parâmetros **a** e **b** foram determinados pela transformação dos dados para log(10) (LE CREN, 1951). As curvas de crescimento obtidas pela análise de regressão entre peso e comprimento seguiram a equação:

$$\log\text{Peso} = \log(a) + \log\text{Comprimento}^*b,$$

onde  $\log\text{Peso}$  é a variável dependente,  $\log\text{Comprimento}$  a variável independente,  $a$  é a constante de regressão ou grau de “engorda” e  $b$  é o coeficiente de regressão, que está relacionada com o tipo de crescimento dos indivíduos. A equação teórica de relação peso-comprimento foi seguida por:  $\text{Peso} = a \cdot \text{Comprimento}^b$ . (Maiores detalhes Capítulo 3 da Tese).

Para os ensaios ecotoxicológicos, foi utilizado fígado, cérebro e sangue periférico dos animais eutanaziados de acordo com os procedimentos recomendados pelo COBEA. Para análise de AChE (acetilcolinesterase), amostras de tecido cerebral foram homogeneizadas (1:4, w-vol) em um tampão Tris a 0.1M, pH 8.0, e centrifugados por 30 min a 30,000g. A atividade de AChE foi medida e então caracterizada seguindo a metodologia previamente descrita (ELLMAN et al., 1961). Para análise de GST (glutathione S-transferase) (KEEN et al., 1976), G6PDH (Glicose 6-fosfato desidrogenase) (GLOCK; MCLEAN, 1953) e atividade EROD (Etoxiresorufina-O-deetilase, referente à atividade do citocromo P450) (BURKE; MAYER, 1974) (com modificações) amostras do fígado foram homogeneizadas (1:4, w/v) em tampão Tris 20 mM (pH 7.4), sucrose 0.5 mM, KCl 0.15 mM e 1 mM de inibidor de protease (PMSF). As amostras foram então centrifugadas a 9,000g for 20 min a 4°C, e o fase superior foi coletada e centrifugada mais uma vez a 50,000g for 1h. A fração citosólica foi então coletada de análise de GST e G6PDH, enquanto que a atividade EROD foi medida no pellet, que foi ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de tampão Tris 100 mM, pH 7.5 contendo EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 100 mM e 20% glicerol.

O nível de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (YAGI, 1976) (com modificações) no plasma foi usado para avaliar a peroxidação lipídica. O método é baseado na reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e alta temperatura para formar um complexo com absorção máxima de 535nm. A quantidade de TBARS em cada amostra é obtida em ng/mL.

O potencial antioxidante da amostra foi determinada de acordo com sua equivalência a um potencial antioxidante conhecido, o trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), um análogo sintético da vitamina E solúvel em água. Este é um método colorimétrico baseado na reação entre ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic-acid)) com persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), produzindo um radical cation  $\text{ABTS}^{*\cdot}$ , cromóforo verde-

azulado, com absorvância máxima 645, 734 and 815nm de comprimento de onda. A adição de amostras contendo este cátion reduz o mesmo novamente em ABTS e a descoloração é avaliada a 734nm. Os resultados finais foram expressos em nM, correspondente a concentração de antioxidantes equivalentes aos trolox da amostra estudada, chamado de TEAC (RE et al., 1999) (Maiores detalhes no Capítulo 2 da Tese).

#### 4) *Análise estatística de CHF*

A heterozigiosidade loco-por-loco ( $H_0$ ) foram comparados usando teste não-paramétrico para duas amostras independentes (*Mann-Whitney*). As variáveis tamanho total (cm), peso (g), fator de condição (K), índice hepatossomático (IHS), atividade EROD, GST, G6PDH, AChE, TBARS e TEAC foram correlacionados com diversidade genética de locos individuais das populações. Para as comparações que revelaram correlação significativa, foi utilizado modelos de regressão linear. As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA® 8.0, e nível de significância  $\alpha=0,05$ .

## **Resultados**

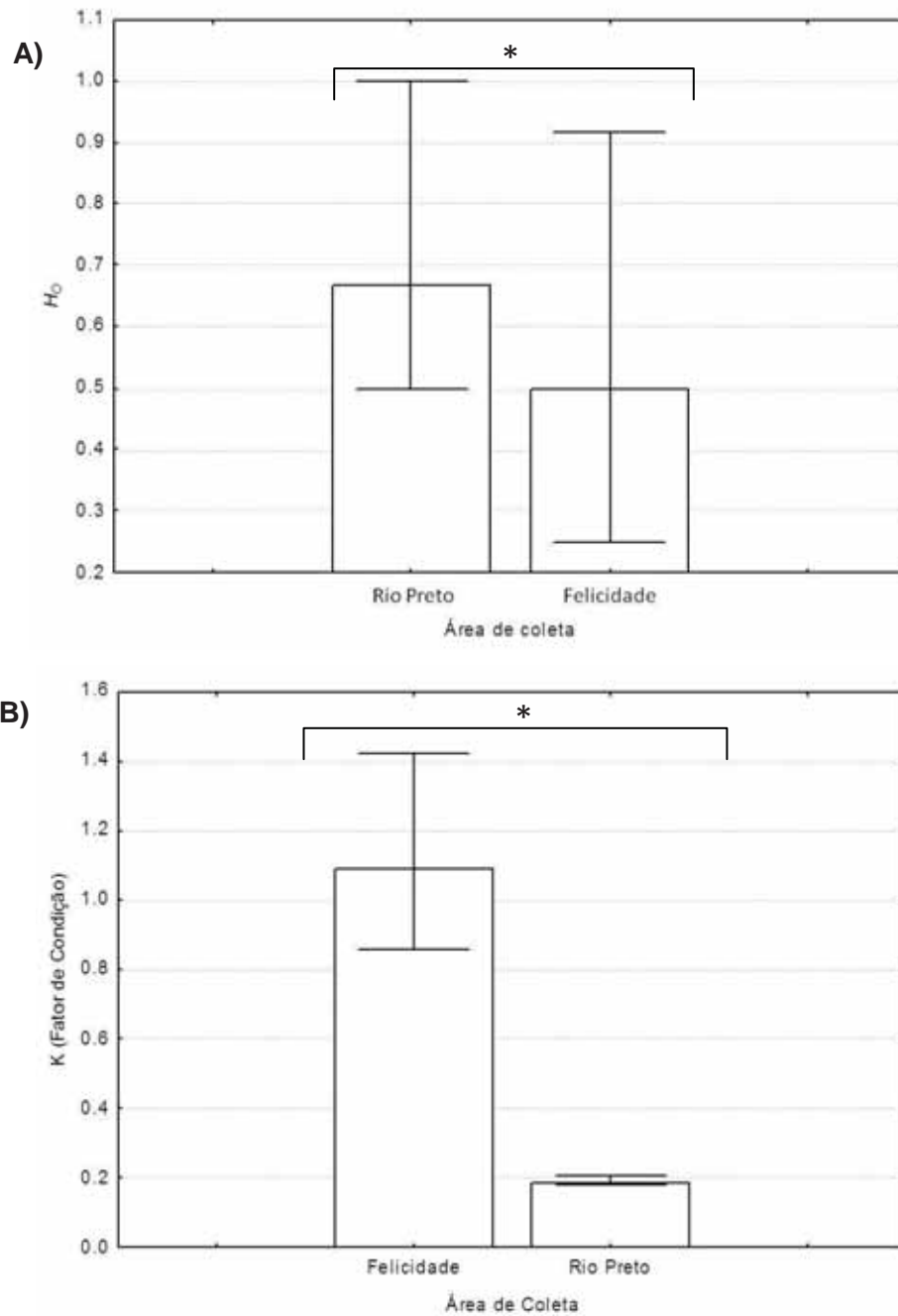
A Tabela 2 apresenta os dados gerais das análises bioquímicas, índices morfométricos e resultados de análise de microssatélites realizados em espécimes de *Phrynosops geoffroanus* para avaliação da correlação heterozigiosidade-*fitness* nas duas populações avaliadas.

**Tabela 2.** Valores de média para todos os elementos avaliados no estudo para as duas áreas analisadas neste estudo. O IHS e atividade das enzimas foram avaliados somente no Córrego Felicidade (animais abatidos).

| Área de Coleta            | $H_o$ | Tamanho total (cm) | Peso (g) | K     | IHS  | EROD | GST  | G6PDH | AChE  | TBARS  | TEAC |
|---------------------------|-------|--------------------|----------|-------|------|------|------|-------|-------|--------|------|
| <b>Córrego Felicidade</b> | 0,768 | 28,3               | 2245     | 1,076 | 5,18 | 0,85 | 2,73 | 34,62 | 55,05 | 564,67 | 1,98 |
| <b>Rio Preto</b>          | 0,719 | 30,24              | 2351,9   | 0,186 | -    | -    | -    | -     | -     | -      | -    |

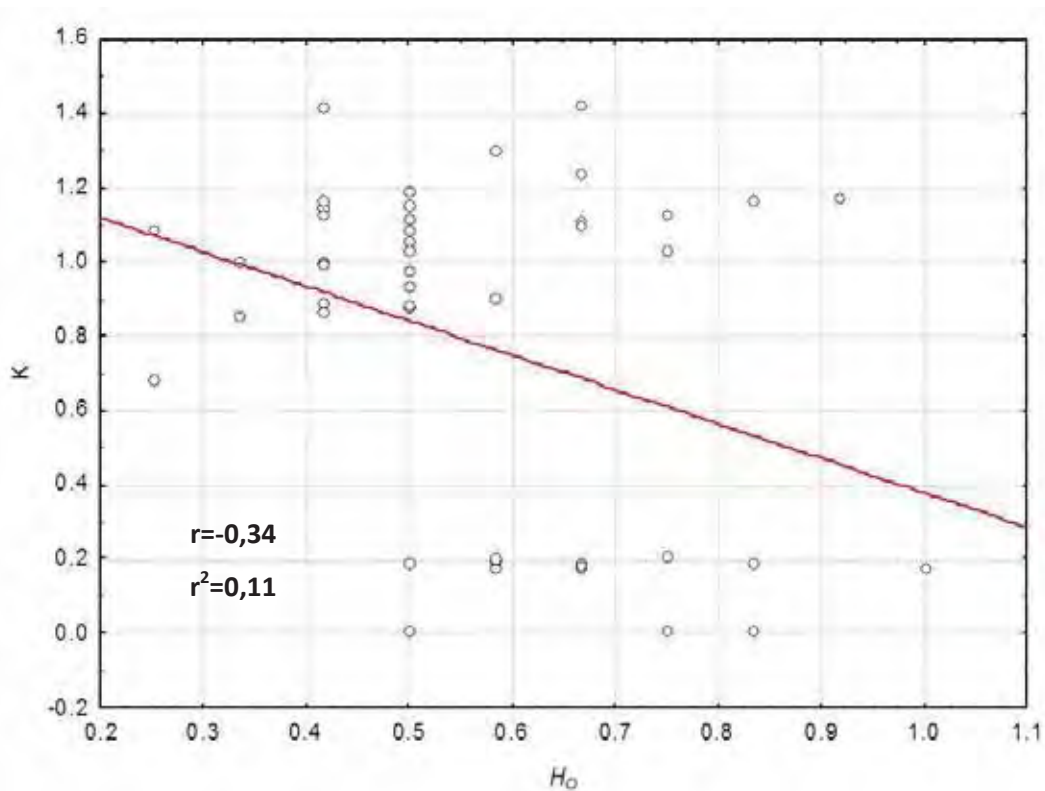
$H_o$ : heterozigossidade observada; cm: centímetros; g: gramas; K: fator de condição, IHS: índice hepatossomático (%); EROD: Etoxi-resorufina-O-deetilase (pmol resorufina/min/mg proteína), GST: glutathione S-transferase (U/mg proteína); G6PDH: glicose 6-fosfato desidrogenase (U/mg proteína), AChE: acetilcolinesterase (U/mg proteína); TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (ng/mL); TEAC: capacidade antioxidante equivalentes ao trolox (nM).

As análises comparativas entre amostras independentes utilizando dados individuais entre CF e RP indicam que existem diferenças entre as duas áreas no que diz respeito à  $H_0$ , com RP apresentando os valores de  $H_0$  (Mann-Whitney,  $p=0,006$ ) (Figura 1A). No entanto, comparações dos valores de fator de condição, indicam que CF apresenta os maiores valores deste índice (Mann-Whitney;  $p<0.01$ ) (Figura 1B), refletindo o gradiente de contaminação existente entre RP e CF, visto que RP apresenta os maiores índices de contaminação orgânica e química em relação ao córrego (CAMPANHA et al., 2010).



**Figura 1. A)** Avaliação dos valores de  $H_0$  entre CF e RP; **B)** Avaliação dos valores de K (fator de condição) entre as duas áreas estudadas. O asterisco indica que há diferença estatística significativa entre as áreas (Teste *Mann-Whitney*,  $p < 0,05$ ).

Os testes univariados realizados não apresentaram correlação entre heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e peso do corpo ( $p=0,7749$ ), tamanho do corpo ( $p=0,89$ ), atividade EROD ( $p=0,4348$ ), GST ( $p=0,084$ ), AChE ( $p=0,2310$ ), G6PDH ( $p=0,3228$ ), TBARS ( $p=0,5046$ ), TEAC ( $p=0,6066$ ) e IHS ( $p=0,2669$ ). Entretanto, apresentou fraca correlação negativa com K ( $r=-0,3417$ ;  $p=0,0175$ ). Análises de regressão entre  $H_o$  como variável independente e K como variável dependente indicam que as variações deste índice dependem 11% de  $H_o$  ( $r^2=0,1167$ ;  $p=0,017$ ) (Figura 2).



**Figura 2.** Análise de correlação entre fator de condição (K), uma avaliação do *fitness* individual, e heterozigosidade observada ( $H_o$ ) de cada indivíduo avaliado no estudo. (r: coeficiente de correlação;  $r^2$ : coeficiente de regressão).

Os testes de correlação entre  $H_o$  e K para sexos separados indicam a existência de correlação fraca e negativa em fêmeas ( $r=-0,3348$ ;  $p=0,04$ ). Análise de regressão indica que, neste sexo, as variações de K

dependem, como para a análise da população toda, 11% de  $H_0$  ( $r^2=0.112$ ;  $p=0.049$ ). Contudo, a avaliação desta relação nos machos mostrou a não ocorrência dessa relação ( $r=0.069$ ;  $p=0.82$ ).

## Discussão

Este trabalho é o primeiro a avaliar a correlação heterozigosidade-*fitness* em espécimes de *P. geoffroanus*, uma espécie de cágado endêmica da América do Sul. Observou-se correlação negativa entre heterozigosidade de vários locos e a condição de cágado-de-barbelas e, que esta relação indica dependência com o sexo.

Geralmente, espera-se que a heterozigosidade de todo o genoma inferida por meio de marcadores neutros como os microssatélites 1) seja reflexo de endogamia individual, e 2) covarie positivamente com o *fitness*, gerando correlações entre heterozigosidade-*fitness* (CHF) positivas (SZULKIN; DAVID, 2011). No entanto, o resultado do contínuo endogamia-exogamia, a depressão exogâmica, é esquecida: após certo grau de heterozigosidade, os heterozigotos tendem a apresentar *fitness* menores do que os homozigotos. A depressão exogâmica ocorre quando há alguma quebra de complexos gênicos co-adaptados e/ou introgressão de genes não adaptados localmente, refletindo em CHF negativas (LYNCH; WALSH, 1998). Significa dizer, portanto, que a heterozigosidade nem sempre é benéfica (KÜPPER et al., 2010).

A depressão exogâmica pode ocorrer por meio de adaptações locais como, por exemplo, quando ocorre fluxo de imigrantes em uma população, indivíduos com genomas misturados tendem a ter maior proporção de alelos que não tenham sido selecionados no contexto local (KAWECKI; EBERT, 2004). Apesar da existência de fluxos gênicos entre as populações estudadas, não se sabe qual é a capacidade migratórias dos espécimes entre todas as áreas da bacia, implicando na dificuldade de confirmar a existência e influência da carga genética de outras populações nas que foram avaliadas.

Poucos estudos relatam a ocorrência de CHF negativa, e isso se deve a vários motivos: 1) questões de endogamia e seus efeitos em



populações naturais são mais comumente relatados na literatura. Isto provavelmente se deve ao fato de que CHF negativo pode ser subestimado por não apresentarem uma interpretação óbvia; 2) a depressão exogâmica pode não ser tão comum como a depressão endogâmica, e certamente, a escala que a depressão exogâmica ocorre (dentro de populações, entre populações, subespécies, etc.) pode ser táxon-específico, dificultando sua observação (EDMANDS, 2007).

Na ausência de depressão exogâmica e vantagem do homocigoto (*underdominance*), locos sob seleção direcional podem produzir sinais de CHF negativo via codominância ou vantagem do alelo recessivo (MÜELLER et al., 2011). Estes mecanismos são importantes como causa de CHF de vários locos de populações de grande tamanho efetivo são sujeitas a mudanças ecológicas recentes ou forte seleção flutuante (BELL, 2010; MÜELLER et al., 2011). Cágado-de-barbelas tem mostrado sinais de adaptação a locais altamente impactados por poluentes orgânicos e inorgânicos (SOUZA; ABE, 2001; BRITES; 2002), inclusive suportando os maiores índices de concentração de metais em répteis descrito na literatura (PIÑA et al., 2009). Além disso, efeitos dependentes da densidade causados pela heterogeneidade de hábitat (DHONDT et al., 1992) podem resultar em seleção flutuante nas populações destas áreas.

Ao avaliar a CHF levando em consideração o sexo, pode-se observar efeito negativo estatisticamente significativo somente nas fêmeas; no entanto, as análises de correlação em machos também indicam correlação negativa, porém não significativo ( $p > 0,05$ , dados não apresentados), sugerindo que a correlação entre heteroziguidade e *fitness* neste sexo também é negativa. A análise não mostrou significância possivelmente devido a amostragem de machos, que foi inferior em relação ao número de fêmeas.

Em vista das condições da área e o impacto antropogênico que as populações desta espécie estão sofrendo, torna-se difícil afirmar qual condição evolutiva tem direcionado essa relação negativa entre heteroziguidade e *fitness*. Contudo, a condição de mudanças ecológicas recentes, como alterações no leito do rio devido ao represamento e presença de contaminantes ambientais, pode indicar reflexo de codominância e vantagem de alelo recessivo.

Para confirmação deste dado, é necessário aumentar o número amostral de indivíduos e locos genotipados, associando marcadores neutros e funcionais, isto é, marcadores que estão localizados em regiões expressas do genoma. Marcadores neutros refletem fenômenos gerais afetando o genoma como um todo (como endogamia ou exogamia), enquanto que marcadores funcionais podem ser pressionados, possivelmente devido a seleção atuante nele (OLANO-MARIN et al., 2011a,b). Associado a isso, faz-se necessária também análises de outros componentes do *fitness*, como tamanho da ninhada, tamanho dos ovos, sucesso de eclosão dos ovos e sobrevivência (WETZEL et al., 2012).

### **Conclusões**

Os dados gerados sugerem a existência de correlação negativa entre heterozigosidade e *fitness* nas populações de cágado-de-barbelas analisadas, possivelmente por codominância e vantagem de alelos recessivos devido a mudanças ecológicas recentes nas áreas amostradas, refletindo a influência da atividade humana sobre essas populações.

Na perspectiva conservacionista, entender como as populações perdem o *fitness* é importante para elaborar estratégias de manejo (JAQUIÉRY et al., 2009). Como os efeitos gerais da heterozigosidade são complexos, isto é, efeitos negativos e positivos podem ocorrer simultaneamente, e são dependentes do contexto (diferem entre os sexos, ambientes, traços e locos) é difícil prever a heterozigosidade ótima para indivíduos de diferentes locos em diferentes perfis ambientais (OLANO-MARIN et al., 2011). Essas observações indicam a necessidade do conhecimento de marcadores moleculares de várias espécies em associação com avaliações ecológicas a fim de averiguar o impacto das alterações ambientais no *fitness* das espécies a fim de auxiliar na persistência das populações naturais.

### **Referências**

AMOS, W. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.10-14, 2007.

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. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002, 220p.

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin-direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v.2, p.583-588, 1974.

CAMPANHA, et al. Variabilidade espacial e temporal de parâmetros físico-químicos nos rios Turvo, Preto e Grande no estado de São Paulo, Brasil. **Química Nova**, v.33, p.1831-1836, 2010.

CHAPMAN, J.R. et al. A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal population. **Molecular Ecology**, v.18, p.2746-2765, 2009.

CHARLESWORTH, D.; WILLIS, J.H. The genetics of inbreeding depression. **Nature Reviews Genetics**, v.10, p.783-796, 2009.

COLTMAN, D.W.; SLATE, J. Microsatellite measures of inbreeding: a meta analysis. **Evolution**, v.53, p.971-983, 2003.

DAVID, P. Heterozygosity-fitness correlations: new perspectives on old problems. **Heredity**, v.80, p.531-537, 1998.

DHONDT, A.A.; KEMPENAERS, B.; ADRIAENSEN, F. Density-dependent clutch size caused by habitat heterogeneity. **Journal of Animal Ecology**, v.61, p.643-648, 1992.

EDMANDS, S. Between a rock and a hard place: evaluation the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. **Molecular Ecology**, v.16, p.463-475, 2007.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemistry Pharmacology**, v.4, p.88-95, 1961

FANTIN, C. et al. Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.1235-1238, 2007

GLOCK, G. E., MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase of rat liver. **Biochemistry Journal**, v.55, p.400-408, 1953.

HANSON, B.; WESTERBERG, L. On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. **Molecular Ecology**, v.11, p.2467-2474, 2002.

JAQUIÉRY, J.; GUILLAUME, F.; PERRIN, N. Predicting the deleterious effects of mutation load in fragmented population. **Conservation Biology**, v.23, p.207-218, 2009.

KAWECKI, T.J.; EBERT, D. Conceptual issues in local adaptation. **Ecology Letters**, v.7, p.1225-1241, 2004.

KEEN, J. H., HABIG, W. H., JAKOBY, W. B. Mechanisms for the several activities of the glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v.251, p.6183-6188, 1976.

KÜPPER, C. et al. Heterozygosity-fitness correlations of conserved microsatellite markers in Kentish plovers *Charadrius alexandrinus*. **Molecular Ecology**, v.19, p.5172-5185, 2010.

LUQUET, E. et al. Heterozygosity-fitness correlations among wild populations of European tree frog (*Hyla arborea*) detect fixation load. **Molecular Ecology**, v.20, p.1877-1887, 2011.

LE CREN, D.J. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v. 20, p.201-219, 1951.

LYNCH, M. The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. **Evolution**, v.45, p.622-629, 1991.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sinauer associates, 1998.

MARSHALL, T.C.; SPALTON, J.A. Simultaneous inbreeding and outbreeding depression in reintroduced Arabian oryx. **Animal Conservation**, v.3, p.241-248, 2000.

MOLINA, F.B. Observações sobre a biologia e comportamento de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em cativeiro (Reptilia, Testudines, Chelidae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

MÜLLER, J.C. et al. Linking genetic mechanisms of heterozygosity-fitness correlations to footprints of selection at single loci. **Evolutionary Ecology**, v.25, p.1-11, 2011.

NEFF, B.D. Stabilizing selection on genomic divergence in a wild fish population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.2381-2385, 2004.

OLANO-MARIN, J.; MUELLER, J.C.; KEMPENAERS, B. Heterozygosity and survival in blue tits (*Cyanistes caeruleus*): contrasting effects of presumably functional and neutral loci. **Molecular Ecology**, v.20, p.4028-4041, 2011.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University. Disponível em <<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenALEX/>>

PIÑA, C. I. et al. Heavy metal contamination in *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) in a river basin, São Paulo, Brazil. **Bulletin of Environment and Contamination Toxicology**, v.83, 771-775, 2009.

POSTMAN, E.; VAN NOORDWIJK, A.J. Genetics variation for clutch size in natural populations of birds from a reaction norm perspective. **Ecology**, v.86, p.2344-2357, 2005.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237 (1999)

SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.F.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, ed.2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SITE, J.W. et al. Conservation genetics of the giant amazon river turtle (*Podocnemis expansa*; Pelomedusidae) – inferences from two classes of molecular markers. **Chelonian Conservation and Biology**, v.3, n.3, p.454-463, 1999.

SOUZA, F.L., ABE, A.S. Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting an urban river in southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.36, 57-62, 2001.

SZULKIN, M. BIERNE, N., DAVID, P. Heterozygosity-fitness correlations: a time for reappraisal. **Evolution**, v.64, p.1202-1217, 2010.

VALENZUELA, N. Multiple paternity in sideneck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. **Molecular Ecology**, v.9, p.99-106, 2000.

WETZEL, D.P.; STEWART, I.R.K.; WESTNEAT, D.F. Heterozygosity predicts clutch and egg size but not plasticity in a house sparrow population with no evidence on inbreeding. **Molecular Ecology**, v.21, p.406-420, 2012.

YAGI, K. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* **15**, 212-216 (1976)



---

**DISCUSSÃO GERAL**

O principal objetivo deste estudo foi avaliar o papel da influência da atividade humana, como a contaminação ambiental e modificações do hábitat, como direcionadores de mudanças fisiológicas, bioquímicas e de diversidade genética entre populações de cágado-de-barbelas em uma das bacias hidrográficas mais impactadas do sudeste brasileiro. Este é o primeiro trabalho avaliando todos estes aspectos concomitantemente em populações naturais endêmicas do Brasil e utilizando como objeto de estudo a espécie *Phrynops geoffroanus*.

Entender como é o impacto da ação do homem nas populações naturais é de fundamental importância para preservar o potencial evolutivo de populações ameaçadas, pois diversidade genética elevada confere o potencial de adaptação a forças seletivas (GILLESPIE; GUTTMAN, 1989). Entretanto, várias alterações em uma pequena escala temporal, como aquelas ocasionadas pelo homem, podem interferir na condição e variabilidade genética, reduzindo a viabilidade (*fitness*) de populações naturais (STANTON et al., 2000; MAES et al., 2005).

#### *Por que Phrynops geoffroanus?*

Estudos anteriores avaliando a espécie em questão apontaram para a existência de resposta em nível celular e molecular de *P. geoffroanus* ao impacto ambiental, principalmente em relação à poluição química e orgânica (ZAGO et al., 2010a,b).

No entanto, a alta densidade populacional em áreas com registro de contaminantes químicos e orgânicos em diferentes regiões, sugere que a espécie se adapta facilmente a essas condições (PIÑA et al., 2009). Contudo, o reflexo dessas modificações do hábitat na estrutura genética dessas populações ainda não havia sido investigado, direcionando, então, os objetivos deste estudo ecotoxicológico evolutivo.

Além desses fatores, é importante salientar o pouco conhecimento científico existente sobre esta espécie de cágado, tanto ecológico



como genético, sendo essa espécie alvo de controvérsia taxonômica. Deste modo, este estudo também teve por intenção contribuir para incrementar o conhecimento sobre a biologia da espécie.

*Phrynops geoffroanus e controle do dano oxidativo*

A fim de analisar o impacto da contaminação química e orgânica na espécie de estudo, foram realizadas análises ecotoxicológicas visando avaliar a ação de alguns dos principais componentes envolvidos com a proteção ao estresse oxidativo e metabolismo de detoxificação de fase I e II, e capacidade antioxidante, como descrito no Capítulo 1 desta Tese.

A primeira fase do metabolismo adiciona grupos funcionalmente reativos, envolvendo oxidação, redução ou hidrólise (GOEPTAR et al., 1995). Para a maioria dos compostos xenobióticos as reações de fase I são catalizadas por monooxygenases microssomais, como por exemplo, citocromo P450, citocromo b<sub>5</sub> e NADPH citocromo P450 redutase. As citocromo P450 compreendem uma grande família de heme proteínas; são proteínas de membrana que predominantemente estão localizadas no retículo endoplasmático do fígado (BUCHELI; FENT, 1995), mas também podem ser encontrados em várias outras organelas e tecidos.

A principal característica desses sistemas é a habilidade em facilitar a excreção de certos compostos pela fase I do metabolismo, transformando xenobióticos lipofílicos em compostos mais solúveis em água (BUCHELI; FENT, 1995). A indução dessas enzimas é iniciada pela ligação de um xenobiótico específico a um complexo de proteínas que compreende o receptor Ah citosólico (AhR – *aryl hydrocarbon receptor*) e a proteína *heat shock* 90 (HSP 90). O complexo AhR então liga-se a *aryl hydrocarbon nuclear transferase* (ARNT) e migra para o núcleo celular. No núcleo da célula, ARNT liga-se a um sítio de reconhecimento no DNA *upstream* aos genes do citocromo P450, também conhecidos como elementos reguladores de xenobióticos (XRE) ou elementos responsivos a dioxinas (DRE). Fatores de transcrição podem ter desta forma amplo acesso à região promotora do gene CYP1A.

Consequentemente, a síntese de mRNA é aumentada, resultando na elevação dos níveis da proteína (STEGEMAN; HAHN, 1994).

A segunda fase do metabolismo envolve a conjugação de compostos xenobióticos ou seus metabólitos com um ligante endógeno. Essas reações compreendem a adição de grandes grupos químicos polares, ou compostos como açúcares e aminoácidos (LECH; VODICNIK, 1985). O mais importante grupo polar adicionado pelas enzimas de fase II é a glutationa (GSH) para compostos eletrofílicos (GEORGE, 1994). O mecanismo de indução da fase II é semelhante à da fase I, isto é, a regulação desses processos é mediada também pelo AhR (HAYES; PULFORD, 1995). A conjugação de compostos eletrofílicos (ou metabólitos da fase I) com GSH é catalizada pelas glutationa S-transferases (GSTs), uma família multigênica de enzimas diméricas e multifuncionais. O papel mais importante das GSTs é a defesa contra o dano oxidativo e produtos de peroxidação de DNA e lipídios (GEORGE, 1994).

Comparado com muitos pássaros e mamíferos, vertebrados ancestrais (peixes, anfíbios e répteis) são tolerantes a disponibilidade variável de oxigênio. Muitas espécies de peixes e tartarugas representam o grupo de vertebrados mais tolerantes à anóxia, sobrevivendo à falta completa de oxigênio por períodos prolongados (BICKLER; BUCK, 2007). Atualmente, a literatura apresenta uma gama de informações sobre as respostas e os mecanismos adaptativos que permitem longos períodos de submergência anóxica em tartarugas de água doce como *Chrysemys picta picta* e *Trachemys scripta elegans* (WILLMORE; STOREY, 1997; HERMES-LIMA et al., 2001; HOCHACHKA; LUTZ, 2001; LUTZ; MILTON, 2004; WILLMORE; STOREY, 2005; STOREY, 2007; KRIVORUCHKO; STOREY, 2010; PAMENTER et al., 2011).

As espécies de tartarugas tolerantes à hipóxia/anóxia são animais aeróbicos que dependem do oxigênio para suas funções normais. Mas estes animais são também anaeróbicos facultativos, e portanto, que possuem elementos que permitem a manutenção das funções orgânicas em níveis mínimos em situações de nenhuma disponibilidade de oxigênio. A baixa taxa metabólica e a manutenção de níveis suficientemente altos de ATP são os principais elementos que permitem à tolerância desses animais à ausência de oxigênio (BICKLER; BUCK, 2007).

Entretanto, o retorno à condição aeróbia, ou seja, o retorno da respiração quando da submersão, gera uma situação potencialmente perigosa de superprodução de ERO. Esta situação é análoga ao que ocorre em órgãos de mamíferos sujeitos à isquemia e reperfusão. A diferença fundamental entre, por exemplo, um coração humano isquêmico e uma tartaruga sob anoxia é que estas desenvolveram mecanismos específicos que permitem a sobrevivência a este tipo de estresse. Os mecanismos associados a esta proteção estão intimamente relacionados com aqueles envolvidos na diminuição da produção de ERO e a grande capacidade antioxidante (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002; STOREY, 2007; GORR et al., 2010).

Em estudos com tartarugas dulcícolas tolerantes à anóxia/hipóxia, a atividade de várias enzimas antioxidantes foi monitorada em fígado, encéfalo, coração, rins, músculo vermelho e branco. A exposição à anóxia leva a significativa diminuição na atividade destas enzimas. O coração é o órgão que mais se destaca durante o estresse da anóxia com 31-67% de diminuição na atividade de três enzimas (CAT, GR, GST). No entanto, a atividade da GSH-sintetase é três vezes maior na musculatura branca em condições de anoxia, assim como a atividade da GR no fígado e na musculatura vermelha (WILLMORE; STOREY, 2005, 2007).

Após as informações citadas acima é paradoxal pensar que os órgãos de tartarugas apresentam alta atividade de enzimas antioxidantes e altos níveis de GSH. Na verdade, a atividade destas enzimas, apesar de ser alterada pela condição de anóxia, alcança níveis muito maiores quando comparados com outros vertebrados não-mamíferos e mamíferos, mesmo quando a taxa metabólica é extremamente baixa. Significa dizer, portanto, que mesmo com a diminuição da atividade de algumas enzimas antioxidantes e dos níveis de GSH, a atividade remanescente ainda é suficiente para proteger os tecidos do dano oxidativo durante a reoxigenação (WILLMORE; STOREY, 2005, 2007).

Após avaliação bioquímica das atividades EROD (referente ao citocromo P450), GST, AChE (acetilcolinesterase), índices morfométricos (fator de condição e índice hepatossomático), G6PDH (glicose 6-fosfato desidrogenase), TBARS (peroxidação lipídica) e TEAC (capacidade antioxidante), observou-se, nos espécimes de ambiente urbano avaliados nesse estudo, resposta destes elementos quando comparados à espécimes de ambiente

controlado. Esses resultados indicam a influência de efluentes domésticos e industriais no metabolismo de detoxificação e estresse oxidativo. No entanto, apesar do aumento da atividade EROD e o efeito da atividade da GST, os valores médios de GST na área urbana estão dentro daqueles esperados em condição de hipóxia descritos na literatura. Esta observação sugere que o aumento da GST em resposta à produção de ERO pela presença de poluentes, aumenta a rede de defesa antioxidante, controlando os danos oxidativos causados pela hipóxia e pela reperfusão.

Desta maneira, pode-se inferir que o elevado controle do dano oxidativo para proteção dos tecidos contra os efeitos da hipóxia empenham papel fundamental para o suporte desses organismos em áreas altamente contaminadas, controlando os efeitos dos radicais livres gerados pelo metabolismo de detoxificação. No entanto, os índices morfológicos indicam a existência de resposta fisiológica, sugerindo que espécies de área contaminada, apesar de adaptadas, demandam maior esforço fisiológico para o controle da homeostase, como observado pelos menores valores de fator de condição. Sendo assim, pode-se sugerir que a elevada capacidade antioxidante o elemento fundamental para conferir adaptação destes animais a áreas altamente contaminadas por poluentes químicos e orgânicos.

#### *Investigando a condição como reflexo do bem-estar animal em áreas contaminadas*

No Capítulo 2, com o intuito de estimar a condição, que reflete a aptidão (*fitness*) individual do animal (GREEN, 2000), foi avaliada a relação matemática entre peso e comprimento, que indicam alterações na forma do corpo e no incremento em peso, que permitem inferências sobre a saúde e o bem-estar animal. Os dados gerados indicam diferenças em condição que estão associadas à área de avaliação, mas também ao sexo e período reprodutivo, indicando forte influência de estressores ambientais na fisiologia dos espécimes analisados.

Os resultados gerados sugerem que as intensas flutuações na condição das fêmeas analisadas estão em associação com o período de nidificação, acasalamento e desova, apresentando os menores valores nos períodos de produção de ovos e vitelogênese. Além disso, a relação inversa entre peso/comprimento e K sugere que o esforço fisiológico é maior quando há aumento do peso do corpo e possibilidade de aumentar o número de ovos a ser produzido, indicando que animais mais novos, e que não possuem maturação gonadal possuem maior condição por apresentarem menor depleção das reservas energéticas. Isto indica que modificações no fator de condição em fêmeas e machos estão associadas principalmente com as mudanças fisiológicas provocadas pela maturação sexual, relacionando-se com modificações gonadais e presença de ovos.

A observação mais relevante desta análise é que o fator de condição refletiu diretamente as análises físico-químicas e o gradiente de contaminação das áreas avaliadas. Campanha et al., (2010) afirmam que estas áreas encontram-se altamente degradadas, afetadas principalmente pelo lançamento de efluentes domésticos *in natura*. Os autores destacam que os córregos Felicidade e rio Preto, apresentaram concentração dos parâmetros avaliados em desacordo com os valores admissíveis pela Resolução CONAMA 357/05. O rio Preto é um dos corpos aquáticos mais impactados da bacia, contaminados por efluentes domésticos da cidade de São José do Rio Preto e cidades vizinhas, seguido pelo Córrego Felicidade, contaminado por efluente agrícola e urbano. Além do impacto por poluentes, observa-se também a influência das modificações no hábitat provocadas pelo represamento do rio. No entanto, sugere-se que a espécie seja resistente a estressores ambientais, mostrando, inclusive, grande biomassa e alta densidade populacional nestes locais (BRITES, 2002; SOUZA; ABE, 2000; PIÑA et al., 2009).

Deste modo, o fator de condição mostrou-se um parâmetro importante para detectar influência sazonal e modificações ambientais no bem-estar e saúde dos espécimes estudados.

*Microssatélites e estrutura genética de populações*

Para avaliar a influência das atividades humanas na diversidade genética de populações, marcadores moleculares do tipo microssatélite foram analisados em indivíduos amostrados nas duas áreas de coleta (córrego Felicidade e rio Preto), e os resultados foram apresentados no Capítulo 3.

No entanto, não existem na literatura marcadores moleculares descritos para a *P.geoffroanus*, apontando, então, a necessidade de identificar regiões no genoma desta espécie para a realização deste tipo de estudo. Para tanto, como proposta inicial, foram construídas duas bibliotecas genômicas parciais com repetições dinucleotídicas (CA<sub>15</sub>, CT<sub>15</sub>) enriquecidas com microssatélites por meio da técnica de hibridização seletiva para a espécie de interesse. Foram gerados aproximadamente 500 clones recombinantes que foram submetidos à sequenciamento direto. Entretanto, a técnica de hibridização seletiva mostrou-se pouco eficiente para o isolamento de microssatélites para cágado-de-barbelas, resultando em um número elevado de clones redundantes, ou sem regiões repetitivas, ou ainda sequencias desprovida das características previamente estabelecidas (motivos repetidos por no mínimo três vezes o tamanho mínimo de 10 bases da sequencia de microssatélite).

Mesmo com essas dificuldades, foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores a partir dos clones recombinantes; no entanto, não foi possível inclui-los na análise por problemas na amplificação dos dois locos, como excesso de bandas inespecíficas, o que resultou na dificuldade em genotipá-los.

Deste modo, foram utilizados pares de oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos para duas outras espécies de quelônio brasileiro: *Podocnemis unifilis* e *P. expansa* (SITES et al., 1999; FANTIN et al., 2007). A utilização de microssatélites entre espécies relacionadas depende da conservação dos sítios de anelamento dos iniciadores dentro da região flanqueadora, a fim de possibilitar a amplificação e a manutenção do tamanho das repetições (WEBER, 1990). A presença de regiões flanqueadoras altamente conservadas foi demonstrada para alguns microssatélites em cetáceos (SCHLÖTTERER et al., 1991), em tartarugas marinhas (FITZSIMMONS et al.,

1995), em jacarés sul-americanos (ZUCOLOTO et al., 2006) e tartarugas dulcícolas (ALACS et al., 2009). Os estudos de amplificação cruzada de microssatélites permitiram confirmar a possibilidade de amplificação de microssatélites utilizando pares de iniciadores para PCR de espécies que divergiram cerca de 470 milhões de anos atrás.

Os resultados do estudo de genética de populações indicaram a não ocorrência de duas populações panmíticas, mas que a estrutura genética entre as localidades é semelhante. Esta pequena diferenciação genética deve-se especialmente a ocorrência expressiva de fluxo gênico entre as áreas, impedindo a diferenciação genética das duas populações. Contudo, a análise de estrutura intrapopulacional indicou a existência de agrupamentos populacionais, sugerindo subestruturação genética dentro das populações estudadas.

De maneira geral, os dados sugerem que, apesar da alta diversidade genética apresentada, há sinais de vulnerabilidade genética provocada por alterações demográficas. Esse impacto na demografia possivelmente tenha ocorrido pelo processo de contaminação, modificação do leito do rio (represamento), e assoreamento. O processo de alteração do leito do rio implica em modificações de curso d'água, construção de barreiras nas encostas, ocasionando a perda de indivíduos adultos e, em especial, na destruição de ninhos e áreas de desova, influenciando diretamente no número de indivíduos em fase reprodutiva e de novas gerações. A perda de hábitat é um dos elementos chave e determinante para processos de extinção (SAX; GAINES, 2003; EWERS; DIDHAM et al., 2006; BROOK et al., 2008), podendo apresentar implicações imediatas em alguns casos, mas geralmente necessita de um período de tempo razoável para que populações em declínio desapareçam em consequência de alterações ambientais (KUUSSAARI et al., 2009).

#### *Heterozigosidade-fitness*

A interação entre diversidade genética e *fitness* é um elemento chave para o processo evolutivo e entender esse processo para conservação de espécies é fundamental (DESALLE; AMATO, 2004). O Capítulo 4 desta tese

teve como objetivo estimar a correlação entre o nível médio de heterozigosidade e *fitness* nos indivíduos das populações avaliadas.

Os resultados sugerem a existência de correlação negativa entre heterozigosidade e *fitness*. Esta situação pode ser explicada por 1) ocorrência de depressão exogâmica, isto é, introgressão de genes não adaptados localmente (LYNCH; WALSH, 1998), 2) codominância ou vantagem do alelo recessivo. Estas situações ocorrem quando populações de grande tamanho efetivo são sujeitas a mudanças ecológicas recentes ou forte seleção flutuante (BELL, 2010; MÜELLER et al., 2010).

O perfil da correlação entre heterozigosidade e *fitness* reflete o perfil de mudanças estruturais e ecológicas nas populações estudadas, indicando a importante influência do homem na biologia de populações naturais.

#### *Considerações Finais*

Este estudo não provê somente dados de biomarcadores de contaminação, mas a utilização de métodos integrados com a finalidade de avaliar o impacto acumulativo da exposição a contaminantes orgânicos e não-orgânicos e modificações em hábitat por meio do estudo de genética de populações e efeitos evolutivos. Além disso, os dados gerados aqui acrescentam importantes informações a respeito da biologia da espécie avaliada.

As perguntas aqui levantadas indicam a necessidade de inclusão de maior número de sítios de referência para avaliação e confirmação dos padrões de estrutura genética e indução de elementos do metabolismo de detoxificação em condições ambientais diferentes, dentro de toda a bacia hidrográfica. Contudo, pode-se verificar que a espécie apresenta alta capacidade antioxidante que permite sua sobrevivência em ambientes altamente contaminados por poluentes químicos e orgânicos, mas que a diversidade genética pode estar sendo afetada pelas modificações ecológicas no hábitat. O conhecimento das causas e processos do relacionamento entre estressores ambientais e seus efeitos é importante para o manejo efetivo e restauração do dano a ecossistemas aquáticos e as comunidades associadas.





---

**CONCLUSÕES**

- 1) Os sistemas relacionados com a biotransformação de xenobióticos e capacidade antioxidante em *Phrynosops geoffroanus* foram responsivos a presença de contaminantes orgânicos e químicos presentes no ambiente pelo despejo de efluentes domésticos e industriais em comparação com espécimes de ambiente controlado;
- 2) A atividade de GST e G6PDH mostrou-se mais elevada no ambiente urbano, indicando aumento da capacidade antioxidante e controle do dano oxidativo causado pela presença de poluentes;
- 3) A elevada capacidade antioxidante naturalmente existente em espécies hipóxia-tolerantes, como é o caso de *P. geoffroanus*, confere proteção ao dano oxidativo provocado pelos metabólitos gerados pelos sistemas de biotransformação de xenobióticos, e é indicativo de elemento primordial para a adaptação desta espécie a ambientes degradados;
- 4) A condição, indicativo de bem-estar e saúde animal, é dependente da área amostrada, gradiente de contaminação, período reprodutivo, pluviosidade, temperatura e sexo em *P. geoffroanus*. Portanto, machos e fêmeas apresentam recrutamento e gasto energéticos diferenciados;
- 5) A partir da avaliação da estrutura genética entre populações do rio Preto e do córrego Felicidade, baseada em microsatélites, constatou-se que não há diferenciação genética entre as duas populações, devido ao extenso fluxo gênico entre elas e elevada diversidade genética;
- 6) Com a análise de estruturação intrapopulacional, observa-se a existência de cinco agrupamentos genéticos, que reflete as alterações no hábitat gerados pelo represamento e assoreamento nas áreas estudadas, que estão iniciando processos de separação (barreira) de sub-populações existentes;

- 7) A avaliação histórica e demográfica não indica evento de gargalo da garrafa;
- 8) A correlação negativa entre heterozigosidade-*fitness* reflete as mudanças ecológicas recentes associadas à contaminação ambiental e represamento;
- 9) *P. geoffroanus* apresenta adaptação à contaminação ambiental, mas modificações ecológicas e possível perda do hábitat estão alterando a diversidade genética das populações estudadas.



---

## REFERÊNCIAS

ALACS, E.A. et al. Development of microsatellite markers in the Australasian snake-necked turtle *Chelodina rugosa* and cross-species amplification. **Molecular Ecology Resources**, v.9, p.350-353, 2009.

BARKER, J.S.F. et al. Genetic diversity of asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. **Animal Genetics**, v.28, p.103-115, 1997.

BELFIORE, N.M.; ANDERSON, S.L. Genetic patterns as a tool for monitoring and assessment of environmental impacts: the example of genetic ecotoxicology. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 51, p.465-479, 1998.

BELL, G. Fluctuating selection: the perpetual renewal of adaptation in variable environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences**, v.365, p.87-97, 2010.

BICKHAM, J.W. et al. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v.463, p.33-51, 2000.

BICKHAM, J.W.; SMOLEN, M.J. Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. **Environmental Health Perspectives**, v.102, p.25-28, 1994.

BICKLER, P.E.; BUCK, L.T. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. **Annu. Rev. Physiol.**, v.69, p.145-170, 2007.

BODIN, N. et al. Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C: Toxicology and Pharmacology**, v.138, n.4, p.411-427, 2004.

BOLGER, T., CONNOLLY, P.L. The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. **Journal of Fish Biology**, v.34, p.171-182, 1989.

BOWEN, B.W. Natal homing in juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). **Molecular Ecology**, v.13, p.3797-3808, 2005.

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. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, 2002, 196p.

BROOK, B.W. et al. Synergies among extinction drivers under global change. **Trends Ecology and Evolution**, v.23, p.453-460, 2008.

BROWN, M.C.; GUTTMAN, S.; GLENN, T.C. Development and use of microsatellite DNA loci for genetic ecotoxicological studies of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Ecotoxicology**, v.10, p.233-238, 2001.

BUCHELI, T.D.; FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.**, v.25, p.201-268, 1995.

CAMPANHA, M.B., ET AL. Variabilidade espacial e temporal de parâmetros físico-químicos nos rios Turvo, Preto e Grande no estado de São Paulo, Brasil. **Química Nova**, v.33, p.1831-1836, 2010.

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

DESALLE, R; AMATO, G. The expansion of conservation genetics. **Nature Reviews**, v.5, p.702-712, 2004.

ELLEGREN, H. et al. Fitness loss and germline mutations in barn swallows breeding in Chernobyl. **Nature**, v. 389, p.593-596, 1997.

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Genetics Reviews**, v.5, p.435-445, 2004.

EWERS, R.M.; DIDHAM, R.K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biology Review**, v.81, p.117-142, 2006.

FANTIN, C. et al. Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.1235-1238, 2007.

FERRONATO, B.O. *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) em ambiente antrópico: perfil hematológico e microbiota oral. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada, 2008, 67p.

FITZSIMMONS, N.N.; MORITZ, C.; MOORE, S.S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular and Biological Evolution**, v.12, n.3, p.432-440, 1995.

GEORGE, S.G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds), **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular perspectives**, Lewis Publishers, CRC press, pp.37-85, 1994.

GILLESPIE, R.B.; GUTTMAN, S.I. Effects of contaminants on the frequencies of allozymes in populations of the central stoneroller. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.8, p.309-317, 1989.

GOEPTAR, A.R.; SCHEERENS, H.; VERMEULEN, N.P.E. Oxygen reductase and substrate reductase activity of cytochrome P450. **Crit. Rev. Toxicol.**, v.25, p.25-65, 1995.

GORR, T.A. et al. Hypoxia tolerance in animals: biology and application. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.83, n.5, p.733-752, 2010.

GREEN, A.J. Sexual dimorphism in morphometry and allometry in the marbled teal *Marmaronetta angustirostris*. **Journal of Avian Biology**, v. 31, p.345-350, 2000.

HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v.30, p.445-600, 1995.

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic change in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.133, p.537-556, 2002.

HUGHS, C.R.; QUELLER, D.C. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozymes polymorphism. **Molecular Ecology**, v.2, p.131-137, 1993.

JENSEN, M.P. et al. Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. Non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. **Molecular Ecology**, v.15, n.9, p.2567-2575, 2006.

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.

JHA, A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, p.1-15, 2008.

KANDPAL, R.P.; KANDPAL, G.; WEISSMAN, M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.91, p.88-92, 1994.

KIM, K.-S. et al. Cross-species amplification of bovidae microsatellites and low diversity of the endangered korean goral. **Journal of Heredity**, v.95, n.6, p.521-525, 2004.

KUUSSAARI, M. et al. Extinction debt: a challenge for biodiversity conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v.24, n.10, 2009.

LA TORRE FERNANDO, R., FERRARI, L., SALIBIÁN, A. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. **Chemosphere**, v. 59, n.4, p.577-583, 2005.

LECH, J.J.; VODICNIK, M.J. Biotransformation. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds). **Fundamentals of Aquatic Toxicology** **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. Hemisphere Publishing Corporation, pp.526-557, 1985.

LEMA, T.; FERREIRA, M.T.S. Contribuição aos conhecimento dos Testudines do Rio Grande do Sul (Brasil): lista sistemática comentada (Reptilia). **Acta Biologica Leopoldinensia**, v.12, n.5, p.291-300. 1990.



LI, Z.H. et al. Physiological condition status and muscle-based biomarkers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), after long-term exposure to carbamazepine. **Journal of Applied Toxicology**, v.30, p.197-203, 2009.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sinauer associates, 1998.

MAES, G.E. et al. The catadromous european eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. **Aquatic Toxicology**, v.73, p.99-114, 2005.

MARZLUFF, J.M. Worldwide urbanization and its effects on birds. **Avian Ecology and Conservation in an Urbanization World** (eds J.M. Marzluff, R. Bowman & R. Donnelly). Kluwer Academic Press, Dordrecht, the Netherlands, 19-47p. 2001.

MCCORD, W.P.; JOSEPH-OUNI, M.; LAMAR, W.W. A Taxonomic reevaluation of *Phrynops* (Testudines: Chelidae) with the description of two new genera and a new species of *Batrachemys*. **Revista de Biologia Tropical**, v.49, n.2, p.715-764, 2001.

MEDINA, M. CORREA, J.A.; BARATA, C. Micro-evolution due to pollution: possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. **Chemosphere**, v.67, p.2105-2114, 2007.

MEYERS-SCHÖNE, L.; WALTON, B.T. Turtles as monitors of chemical contaminants in the environment. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, v.135, p.93-153, 1994.

MÜLLER, J.C. et al. Linking genetic mechanisms of heterozygosity-fitness correlations to footprints of selection at single loci. **Evolutionary Ecology**, v.25, p.1-11, 2011.

PIÑA, C. I. et al. Heavy metal contamination in *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) in a river basin, São Paulo, Brazil. **Bulletin of Environment and Contamination Toxicology**, v.83, 771-775, 2009.

PFEIFER, S. DORIS, S. DIPPNER, J.W. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. **Journal of Marine Biology and Ecology**, v.320, n.15, p.93-103.2005.

POUGH, F.H.; JANIS, M.C.; HEISER, B.J. **A vida dos vertebrados**. 3ª ed: Atheneu, 2003.

PRETTI, C.; COGNETTI-VARRIALE, A.M. The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v.11, p.299-303, 2001.

PRITCHARD, P.C.H.; TREBBAU, P. **The turtles of Venezuela**. Fundación de Internados Rurale, 1984, 401p.

RODRIGUES, M.T. Conservação dos répteis brasileiros: os desafios para um país megadiverso. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p.87-94, 2005.

ROSS, K. et al. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p.671-679, 2002.

SARKAR, A et al. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v.15, p.333-340, 2006.

SAX, D.F.; GAINES, S.D. Species diversity: from global decreases to local increases. **Trends Ecology e Evolution**, v.18, p.561-566, 2003.

SCHLÖTTERER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. **Nature**, v.354, p.63-65, 1991.

SITES, J.W. et al. Population genetic structure in the giant Amazon River turtle (*Podocnemis expansa*): inferences from two classes of molecular markers. **Chelonian Conservation and Biology**, n.36, p.85-102, 1999.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. Brazilian reptiles – List of species, 2011. Disponível em: <[www.sbherpetologia.org.br](http://www.sbherpetologia.org.br)>. Acesso em: 30 de Maio 2012.

SOUZA, F.L., ABE, A.S. Population structure and reproductive aspects of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting an urban river in southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v.36, p.57-62, 2001.

STANTON, M.L.; ROY, B.A.; THIEDE, D.A. Evolution in stressful environments. I. Phenotypic variability, phenotypic selection, and response to selection in five distinct environmental stress. **Evolution**, v.54, p.93-111, 2000.

STATON, J.L. et al. Ecotoxicology and population genetics: the emergence of "phylogeographic and evolutionary ecotoxicology". **Ecotoxicology**, v.10, p.217-222, 2001.

STEGEMANN, J.J.; HAHN, M.E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (eds). **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Lewis Publishers, CRC press, pp.87-206, 1994.

STOREY, K.B. Anoxia tolerance in turtles: metabolic regulation and gene expression. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.147A, p.263-276, 2007.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v.10, p.967-981, 2000.

TURTLE TAXONOMY WORKING GROUP (RHODIN, A.G.J., VAN DIJK, P.P., IVERSON, J.B., Shaffer, H.B). **Turtles of the World, 2011 Update**: Annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. Chelonian Research Monographs, v.5, p.85-164. Available at: <http://www.iucn-fts.org/checklist/>, 2011.

VITUOSEK, P.M. et al. Human domination of earth's ecosystems. **Science**, v.277, p.494-499, 1997.

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. **Genomics**, v.7, p.524-530, 1990.

WELLS, P.G. et al. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants – exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, n.10, p.799-804, 2001.

WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. Purification and properties of the glutathione S-transferase from the anoxia-tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. **FEBS Journal**, v.272, p.3602-3614, 2005.

WILLMORE, G.W.; STOREY, K.B. Purification and properties of glutathione reductase from liver of the anoxia-tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. **Mo. Cell. Biochem.**, v.297, p.139-149, 2007.

ZAGO, C.E.Z. 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, 2010a.

ZAGO, C.E.Z. et al. Hemoglobin polymorphism and hematological profile of Geoffroy's side-necked turtle (*Phrynops geoffroanus*, Testudines) in the northwestern region of São Paulo State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.2, p.721-726, 2010b.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.1-16, 2002.

ZUCOLOTO, R.B. et al. Cross-species microsatellite amplification in South American Caimans (*Caiman* spp and *Paleosuchus palpebrosus*). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.1, p.75-78, 2006.



---

**ANEXOS**

A) Documento de Aprovação para experimentação animal pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto



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

## B) Licença para atividade com finalidade científica concedida pelo IBAMA (2008-2009)



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

|  |  |                                     |
|--|--|-------------------------------------|
| <b>Número:</b> 16488-1   | <b>Data da Emissão:</b> 19/08/2008 10:08 | <b>Data de Validade:</b> 19/08/2009 |
| <b>Dados do titular</b>  |  |                                     |
| Registro no Ibama: 2838725   | Nome: Larissa Paola Rodrigues Verissimo  | CPF: 326.516.086-80                 |
| 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 aproveitamento 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 de, colidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao ensino, à pesquisa ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério da 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 <a href="http://www.ibama.gov.br/sisbio">www.ibama.gov.br/sisbio</a> . Em caso de material consignado, consulte: <a href="http://www.ibama.gov.br/sisbio">www.ibama.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.  |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros de 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, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.  |

#### Equipe

| # | Nome                                      | Função                  | CPF            | Doc. Identidade    | Nacionalidade |
|---|---|-------------------------|----------------|--------------------|---------------|
| 1 | Aline Femandes Chessa                     | Pesquisadora            | 346.405.456-60 | 33749356-X ssp-SP  | Brasileira    |
| 2 | Maria Terçilia Vieira de Azeredo Oliveira | Pesquisadora            | 018.731.028-95 | 7842186-X ssp-SP   | Brasileira    |
| 3 | Claudia Regina Bonini Domingos            | Orientadora da Pesquisa | 042.642.668-39 | 7806225 SSP-SP     | Brasileira    |
| 4 | Italo Cristiano Ribeiro                   | Pesquisador             | 308.534.358-08 | 40109487z SSP-SP   | Brasileira    |
| 5 | Tiago Luciano da Silva                    | Pesquisador             | 329.612.378-10 | 433137782 ssp-SP   | Brasileira    |
| 6 | Carlos Eduardo Saranz zargo               | Pesquisador             | 246.376.236-12 | 21233597 ssp-SP    | Brasileira    |
| 7 | Josué Rodrigues dos Santos                | Pesquisador             | 586.317.698-16 | 0246965 ssp-SP     | Brasileira    |
| 8 | Maria Isabel Afonso da Silva              | Pesquisador             | 074.584.878-90 | 8.838.693 SSPMG-MG | Brasileira    |

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

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

#### Atividades X Táxons

| # | Atividade   | Táxons                                 |
|---|---|--|
| 1 | Captação de animais silvestres in situ                    | <i>Phrynops geoffroanus</i>            |
| 2 | Coleta/transporte de amostras biológicas in situ          | <i>Phrynops geoffroanus</i>            |
| 3 | Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ | <i>Phrynops geoffroanus</i> (Gêdo, 25) |
| 4 | Marcação de animais silvestres in situ                    | <i>Phrynops geoffroanus</i>            |

\* Qtd. 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](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 23948844



Página 1/3

### C) Licença para atividade com finalidade científica concedida pelo IBAMA (2009-2012)



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 |
| <b>Dados do titular</b>   |                                   |
| Nome: Larissa Paula Rodrigues Venancio  | CPF: 326.516.068-80               |
| Título do Projeto: Cágado-de-barbeias ( <i>Phrynosoma gottschalki</i> - Testudina - Chelonia) como modelo para ecotoxicologia evolutiva: relacionamento entre contaminação ambiental, condição e variabilidade genética |                                   |
| Nome da Instituição: UNESP CAMPUS S. J. R. PRETO  | CNPJ: 48.031.916/0011-04          |

#### Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade                        | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|---|------------------|---------------|
| 1 | Análise de ERDD                               | 09/2009          | 12/2009       |
| 2 | Análise de Estratos                           | 09/2009          | 12/2009       |
| 3 | Coleta de amoças e amostras de sangue         | 10/2009          | 10/2010       |
| 4 | Construção das bibliotecas genômicas parciais | 11/2009          | 06/2010       |
| 5 | Aclimatação de microsatélites                 | 02/2010          | 10/2010       |

De acordo com o art. 33 da Lei 154/2006, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

#### Observações e ressalvas

|   |  |
|---|--|
| 1 | As atividades de campo deverão ser realizadas em paisagem natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o desocultamento de recursos hídricos e minerais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura matéri e cultura popular, presente e passa de objetos 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 autorizações previstas em outros instrumentos legais, bem como do cumprimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.  |
| 3 | Esta autorização 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 <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços online - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte: <a href="http://www.ibama.gov.br/sisbio">www.ibama.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.  |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão cuidar por métodos de coleta e manuseio de captura direcionada, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo e outros grupos, e empregará esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em situação in situ.  |
| 6 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre posse e controle do patrimônio genético existente no território nacional, na propriedade continental e na zona econômica exclusiva, ou do conhecimento (nacional) associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.   |
| 7 | Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador deverá contactar a administração dessa unidade e fim ao CNFR/IBAMA AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso de infra-estrutura de unidade.  |
| 8 | As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies baseadas em listas oficiais de abrangência nacional, estaduais ou municipais de espécies ameaçadas de extinção, extirpadas ou ameaçadas de extirpação.  |

#### Equipe

| # | Nome                                   | Função                  | CPF            | Doc. Identidade     | Nacionalidade |
|---|--|-------------------------|----------------|---------------------|---------------|
| 1 | Ilene Ferraz Chessa                    | Pesquisadora            | 346.418.456-81 | 33140355-X-esp-SP   | Brasileira    |
| 2 | Maria Fátima Viana de Azeredo Oliveira | Pesquisadora            | 218.791.026-95 | 7842188-X-esp-SP    | Brasileira    |
| 3 | Cláudia Regina Bonini Domingos         | Orientadora de Pesquisa | 042.842.068-38 | 7602295-8SP-SP      | Brasileira    |
| 4 | Raio Cristiano Ribeiro                 | Pesquisador             | 386.534.588-08 | 40104487-X-SP-SP    | Brasileira    |
| 5 | Yago Luciano da Silva                  | Pesquisador             | 329.812.376-10 | 23513782-SP-SP      | Brasileira    |
| 6 | Carlos Eduardo Saravá Zago             | Pesquisador             | 246.376.234-12 | 21233591-esp-SP     | Brasileira    |
| 7 | José Roberto dos Santos                | Pesquisador             | 346.317.698-16 | 2048766-esp-SP      | Brasileira    |
| 8 | Márcia Isabel Azeite da Silva          | Pesquisador             | 274.584.676-30 | 8.836.593-SSP/MS-MS | Brasileira    |
| 9 | Vinícius Augusto Gomes Muzetta         | Pesquisador             | 388.971.228-90 | 46918448-1          | Brasileira    |

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

| # | Município             | UF | Descrição do local                                      | Tipo        |
|---|-----------------------|----|---|-------------|
| 1 | SP                    | SP | Córrego Felicidade - Fozes e Rio Preto (S.J. Rio Preto) | Fozes de UC |
| 2 | SÃO JOSÉ DO RIO PRETO | SP | Córrego Felicidade - Fozes e Rio Preto                  | Fozes de UC |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Abaixo do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Site/ICMBio no Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 97868443



Página 1/3