



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

**Influência da sazonalidade e do sexo na hematologia,
na citoquímica e na bioquímica do estresse oxidativo e
metabólico de *Chelonoidis carbonarius* (Spix, 1824),
mantidos em cativeiro**

Gabriela Santos Castro

MESTRADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural



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

Gabriela Santos Castro

Influência da sazonalidade e do sexo na hematologia, na citoquímica e na bioquímica do estresse oxidativo e metabólico de *Chelonoidis carbonarius* (Spix, 1824), mantidos em cativeiro

São José do Rio Preto
2020

Gabriela Santos Castro

Influência da sazonalidade e do sexo na hematologia, na citoquímica e na bioquímica do estresse oxidativo e metabólico de *Chelonoidis carbonarius* (Spix, 1824), mantidos em cativeiro

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

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto
2020

	Castro, Gabriela Santos
C355i	Influência da sazonalidade e do sexo na hematologia, na citoquímica e na bioquímica do estresse oxidativo e metabólico de 'Chelonoidis carbonarius' (Spix, 1824), mantidos em cativeiro / Gabriela Santos Castro. -- São José do Rio Preto, 2020 125 f. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Claudia Regina Bonini-Domingos 1. Adaptações bioquímicas. 2. Ajustes fisiológicos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Gabriela Santos Castro

Influência da sazonalidade e do sexo na hematologia, na citoquímica e na bioquímica do estresse oxidativo e metabólico de *Chelonoidis carbonarius* (Spix, 1824), mantidos em cativeiro

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Tiago Lucena da Silva
Universidade Federal do Acre - Câmpus Floresta

Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
02 de julho de 2020

Dedicatória

Decido o resultado do meu trabalho de dois anos inteiramente e exclusivamente ao meu porto seguro, ao qual também chamo de mãe, a rainha da minha vida. Sem ela eu nunca chegaria aonde cheguei e nunca confiaria em mim. Ao melhor exemplo que eu poderia seguir e à melhor guerreira que eu poderia ter o privilégio de conviver.

Só tenho admiração por você. Te amo imensamente.

Agradecimentos Especiais

Nessa sessão eu gostaria de agradecer especialmente a algumas pessoas, pois elas foram fundamentais para a conclusão do meu trabalho.

Primeiramente, eu agradeço a Deus, ou como ultimamente o tenho chamado, a Olorum, assim como a Jesus (Oxalá) e a todos os meus Orixás e Guias que acompanham e me regem. Eu encontrei a espiritualidade em um momento essencial de minha vida, e esse momento coincidiu com o meu mestrado. Sou eternamente grata a todos por cuidarem de mim.

Agradeço a minha mãe por absolutamente tudo, por estar comigo nesse momento tão importante, por me manter firme e por acreditar em mim. Sem você eu jamais teria concluído essa etapa da minha vida, obrigada por estar comigo a todos os momentos.

Agradeço a minha orientadora Claudia Bonini, ao Danilo (Kexu) e ao Tiago por todo conhecimento compartilhado, por me ajudarem no meu crescimento profissional e por mostrarem como um profissional pesquisador deve ser. Vocês são exemplos para mim.

Agradeço a todos os meus amigos, àqueles que continuaram ao meu lado e, também, àqueles que por algum motivo, se afastaram. Dentro do meu grupo de amigos, agradeço ao meu “Grupo do Almoço”, sendo a Ana, o Cornu e a Lari, vocês fizeram muitos dos meus dias ficarem iluminados, obrigada a cada risada e a cada desabafo; Cornu e Ana, vocês foram essenciais para a conclusão do meu mestrado, uma vez que me ajudaram a lidar com o ambiente de trabalho que por vezes era difícil, levo vocês no coração. Agradeço ao “Só amor”, sendo o Alan e o Leo Queiroz, duas criaturas que sempre me apoiaram e estiveram comigo, mesmo de longe. Agradeço a todos os “Cupidões” por tudo, vocês me ajudaram de forma que não consigo explicar. Aos meus amigos “sem grupo” como o Leo de Castro, o Tiago, a Stephanie, a Ingrid, a Karine e a Claudinha.

Agradeço ao meu namorado Guilherme por todo apoio ao longo desses anos de mestrado, você foi uma luz que surgiu na minha vida. Agradeço a minha família Yakissoba, em especial a minha Cunha, por sempre me apoiarem e cuidarem de mim.

Reintero meus agradecimentos aos amores da minha vida, minha mãe, o Alan, o Leo de Castro e meu namorado Gui. Amo vocês.

Agradecimentos

Agradeço a todos os alunos do laboratório de Hemoglobinas e Doenças Hematológicas (LHGDH) e Centro de Estudo em Quelônios (CEQ) pela companhia e amparo nesse período de pesquisa. Em especial ao Lucas Ramos e a Naiara Seixas pela ajuda imensurável nas coletas de sangue dos jabutis e em algumas análises.

A UNESP por toda minha formação seja acadêmica, profissional ou como ser humano. Fazer parte de uma Universidade Pública de Qualidade definiu quem eu sou hoje e meus objetivos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Ao laboratório do Professor Luis Sebaka e da Professora Tercília pelo amparo e ajuda nas minhas análises.

Ao Zoológico de Catanduva pela parceria, por me permitir coletar as amostras de sangue e, portanto, poder realizar minha pesquisa.

Por fim, agradeço a cada um que cruzou meu caminho nesses dois anos e me ajudou direta ou indiretamente. Todo o ensinamento foi proveitoso.

*“Alice: Quanto tempo dura o eterno?
Coelho: Às vezes apenas um segundo.”*

“Entenda os seus medos, mas jamais deixe que eles sufoquem os seus sonhos.”
“Você não deve viver a vida como outras pessoas esperam que você viva; tem que ser sua escolha, pois quando estiver lutando, você estará sozinho...”

*“ Só podemos alcançar o impossível
Se acreditarmos que é possível ”*

(CARROLL, L. 1865 - Alice no País das Maravilhas)

RESUMO

As variações sazonais nos fatores bióticos e abióticos influenciam no metabolismo de répteis, principalmente por serem animais ectotérmicos. Assim, os organismos dependem de ajustes comportamentais, morfológicos, fisiológicos e bioquímicos para a manutenção da homeostase. Os ajustes ocorrem, também, em mudanças ambientais tidas como comuns, ou seja, sazonais; a sazonalidade do sudeste do Brasil consiste na divisão entre as estações seca e chuvosa. A avaliação de alterações biológicas decorrentes de potenciais efeitos sazonais é realizada por meio da utilização de biomarcadores. Alterações no estado fisiopatológico do organismo frente a mudanças ambientais são indicadas por esses biomarcadores, de forma a auxiliar no entendimento da biologia da espécie e como ela se ajusta fisiologicamente às condições ambientais. O objetivo do trabalho foi analisar se o sexo e a sazonalidade (estações seca e chuvosa) promovem interferências na resposta fisiológica de indivíduos de *Chelonoidis carbonarius* (espécie de jabuti com grande abrangência no território brasileiro) provenientes de cativeiro exemplar, de acordo com as normas impostas pelo IBAMA. A análise consistiu em marcadores bioquímicos do estresse oxidativo (enzimas Catalase, Glutathione Peroxidase, Glutathione S-Transferase e Superóxido Dismutase, e Lesão em Biomoléculas) e do metabolismo energético (Glicose, Colesterol e Triglicérides), hematológicos (Eritrócitos e Leucócitos totais, Hematócrito, Dosagem de Hemoglobina Circulante, VGM, CHGM, HGM, Oxihemoglobina e Metahemoglobina) e citoquímicos (Coloração de Prata, Coloração de Feulgen, Diferencial de Leucócitos e Razão Heterófilo por Linfócito). Como objetivos secundários, houve o estabelecimento de parâmetros de normalidade para a espécie estudada e a observação se há relação entre a resposta citoquímica e o mecanismo de ajustes fisiológicos dos indivíduos. Nos resultados observados, as fêmeas apresentaram maiores valores de Colesterol e Triglicérides, e os machos, de Hematócrito e Dosagem de Hemoglobina. As maiores diferenças encontradas foram provenientes das comparações entre as estações; a estação chuvosa apresentou maiores valores de GST, SOD, Triglicérides, Oxihemoglobina e Metahemoglobina, enquanto que na estação seca, os valores de GPx, Lesão oxidativa, Leucócitos totais, Dosagem de Hemoglobina e HGM foram maiores. Quando comparados o perfil das fêmeas ao longo da sazonalidade, foram encontradas diferenças apenas nos marcadores GPx (maior na estação seca) e Metahemoglobina (maior na estação chuvosa), evidenciando um comportamento referente ao “mito de hormese”, em que quase não há flutuação dos marcadores, uma vez que sempre se encontram elevados para lidar com as mudanças ambientais e comportamentais. Os machos, ao contrário, quando comparadas as estações, apresentaram diferenças nos marcadores das enzimas GST e SOD, do Triglicérides e da Metahemoglobina, maiores na chuva, enquanto a enzima GPx, a Lesão oxidativa, os Leucócitos totais, a Dosagem de Hemoglobina, o CHGM, o HGM e o Micronúcleo foram maiores na seca, evidenciando um Preparo para o Estresse Oxidativo (POS) ao aumentarem os níveis de antioxidantes a fim de lidar com as adversidades da estação mais estressora. Aliado aos resultados encontrados, observou-se uma relação da porcentagem de micronúcleo com a quantidade de lesão oxidativa e um aumento de nucléolos funcionais em estações com maiores atividades bioquímicas. Como conclusão, tem-se que: a estação seca é a mais estressora aos indivíduos *C. carbonarius* provenientes de cativeiro, evidência de que há influência da sazonalidade no metabolismo dos indivíduos, comprovado pela diferença nos ajustes fisiológicos de fêmeas (em hormese) e de machos (em POS); e também que há uma relação entre a resposta citoquímica e os resultados dos marcadores bioquímicos e hematológicos.

Palavras-chave: Estação seca. Estação chuvosa. Período reprodutivo. Adaptações bioquímicas. Ajustes fisiológicos.

ABSTRACT

Seasonal changes in biotic and abiotic factors influence the metabolism of reptiles, mainly because they are ectotherms. Thus, the organisms depend on behavioral, morphological, physiological and biochemical adjustments to maintain the homeostasis. Those adjustments also occur in environmental changes perceived as usual, that is, seasonal ones. The seasonality of southeastern Brazil consists of the dry and the rainy seasons. By using biomarkers, biological changes from potential seasonal effects can be evaluated. Those biomarkers indicate alterations in the physiopathological condition of the organism, caused by environmental changes, and help us to understand the biology of the species studied and its physiological adaptation to the environmental condition. This work aims to analyze whether the sex and the seasonality (dry and rainy seasons) interfere in the physiological response of individuals of *Chelonoidis carbonarius* (species of tortoise widely spread in the Brazilian territory) from exemplary captivity, according to the standards imposed by IBAMA. The analysis consisted of biochemical markers of oxidative stress (Catalase, Glutathion Peroxidase, Glutathione S-Transferase and Superoxide Dismutase enzymes, and Damage in Biomolecule) and of energy metabolism (Glucose, Cholesterol and Triglycerides), and also hematological (total Erythrocytes and Leukocytes, Hematocrit, Circulating Hemoglobin Dosage, MCV, MCHC, MCH, Oxyhemoglobin and Methemoglobin), and cytochemical markers (Silver Staining, Feulgen Staining, Differential Leukocyte Counts and Heterophil/Lymphocyte Ratio). Another objective was to set parameters of normality for the species studied and to observe if the cytochemical response and the mechanism of physiological adaptation are related to each other. In the results observed, the values of Cholesterol and Triglycerides were higher in females, and those of Hematocrit and Hemoglobin Dosage were higher in males. The major differences were found comparing the seasons; the rainy season presented higher values of GST, SOD, Triglycerides, Oxyhemoglobin and Methemoglobin, while in the dry season, the values of GPx, Oxidative damage, total Leukocytes, Hemoglobin Dosage and MCH were higher. Comparing the profile of the females along the seasonality, the only differences found were those in the GPx (higher in the dry season) and in the Methemoglobin (higher in the rainy season) markers, showing a behavior related to the "hormesis myth", in which there is almost no fluctuation of markers, once they are always elevated to deal with environmental and behavioral changes. The males, on the other hand, regarding the seasons, presented differences in the markers of GST and SOD enzymes, Triglycerides and Methemoglobin, which are higher in the rainy season, while GPx enzyme, Oxidative damage, total Leukocytes, Hemoglobin Dosage, MCHC, MCH and Micronucleus were higher in the dry season, which shows a Preparation for Oxidative Stress (POS); when the levels of antioxidants are elevated in order to deal with the adversities of the most stressful season. Along with the results found, a relation between the percentage of micronucleus and the quantity of oxidative damage, and also a higher amount of functional nucleoli in seasons of more biochemical activities could have been observed. The results show that: the dry season is the most stressful to individuals of *C. carbonarius* in captivity, showing that seasonality influences the metabolism of the individuals, which is proved by the differences in the physiological adaptations of females (in hormesis) and males (in POS); and also that there is a relation between the cytochemical response and the results of the biochemical and hematological markers.

Keywords: Dry season. Rainy season. Reproduction period. Biochemical adaptations. Physiological adjustments.

Lista de Ilustrações - Figuras

Figura 1: Reação da enzima Superóxido-Dismutase.	20
Figura 2: Formação de ERO nas mitocôndrias e defesas antioxidantes mitocondriais.	21
Figura 3: Papel do NADPH e da Glutathione na proteção das células contra derivados de oxigênio altamente reativos.....	21
Figura 4: Reação da enzima Glutathione-peroxidase (GPx).....	22
Figura 5: Reação de auto-oxidação da hemoglobina e liberação de metahemoglobina e ânion superóxido.	23
Figura 6: Reação do peróxido de hidrogênio com a oxihemoglobina e metahemoglobina.	23
Figura 7: Reação do peróxido de hidrogênio com FerriHb e OxiferriHb produzindo MetaHb.....	24
Figura 8: Prancha com as células sanguíneas de <i>Chelonoidis carbonarius</i> coradas com Panótico.....	30
Figura 9: Representante dos indivíduos <i>C. carbonarius</i> do Zoológico Municipal Missina Palmeira Zancaner de Catanduva (Interior de São Paulo).....	37
Figura 10: Filhote de <i>C. carbonarius</i> proveniente do recinto do Zoológico.....	38
Figura 11: Recinto do Zoológico evidenciando fonte de água, comida, abrigo, diferentes espécies convivendo no mesmo espaço e espaço disponível.....	38
Figura 12: Metodologia de coleta de sangue de jabutis segundo Silva et al. (2012).	39
Figura 13: Jabuti macho #09 evidenciando regiões de inchaço e vermelhidão.	39
Figura 14: Gráfico de temperatura média (A) e precipitação anual (B) do Estado de São Paulo – Estação 8367 - Catanduva.	41
Figura 15: Gráficos de precipitação (A), temperatura (B), umidade (C), insolação (D) e pressão (E) média no período da estação chuvosa do Estado de São Paulo – Estação 8367 - Catanduva.	42
Figura 16: Gráficos de precipitação (A), temperatura (B), umidade (C), insolação (D) e pressão (E) média no período da estação seca do Estado de São Paulo – Estação 8367 - Catanduva.	43
Figura 17: Cálculos para a obtenção dos níveis de glicose, colesterol e triglicérides em plasma sanguíneo.....	45
Figura 18: Princípio ativo da Glicose Liquiform (Ref.: 133) para análise de glicose no plasma sanguíneo.....	46
Figura 19: Princípio ativo da Colesterol Liquiform (Ref.: 76) para análise de colesterol no plasma sanguíneo.....	47
Figura 20: Princípio ativo da Triglicérides Liquiform (Ref.: 87) para análise de triglicérides no plasma sanguíneo.	47
Figura 21: Imagem microscópica representando o interior da Câmara de Neubauer.	48
Figura 22: Cálculos utilizados para determinação da concentração de oxihemoglobina, metahemoglobina e hemicromos.....	50
Figura 23: Cálculo da linearidade dos resultados da análise de glicose, colesterol e triglicérides sanguínea.....	115
Figura 24: Imagem da Câmara de Neubauer.	116
Figura 25: Imagem microscópica representando o interior da Câmara de Neubauer.	118

Lista de Ilustrações - Gráficos

Gráfico 1: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre fêmeas e machos, independente da estação do ano.	74
Gráfico 2: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre fêmeas e machos, na estação Chuvosa.	74
Gráfico 3: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre fêmeas e machos, na estação Seca.	75
Gráfico 4: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre as estações, considerando o grupo jabutis.	75
Gráfico 5: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre as estações, considerando apenas fêmeas.	76
Gráfico 6: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre as estações, considerando apenas machos.	76
Gráfico 7: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre fêmeas e machos, independente da estação do ano.	78
Gráfico 8: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre fêmeas e machos, na estação Chuvosa.	79
Gráfico 9: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre fêmeas e machos, na estação Seca.	79
Gráfico 10: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre as estações, considerando o grupo jabutis.	79
Gráfico 11: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre as estações, considerando apenas fêmeas.	79
Gráfico 12: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre as estações, considerando apenas machos.	80
Gráfico 13: Comparação dos marcadores de hematologia entre fêmeas e machos, independente da estação do ano.	83
Gráfico 14: Comparação dos marcadores de hematologia entre fêmeas e machos, na estação Chuvosa.	84
Gráfico 15: Comparação dos marcadores de hematologia entre fêmeas e machos, na estação Seca.	85
Gráfico 16: Comparação dos marcadores de hematologia entre as estações, considerando o grupo jabutis.	86
Gráfico 17: Comparação dos marcadores de hematologia entre as estações, considerando apenas fêmeas.	87
Gráfico 18: Comparação dos marcadores de hematologia entre as estações, considerando apenas machos.	88
Gráfico 19: Comparação dos marcadores citoquímicos entre fêmeas e machos, independente da estação do ano.	90
Gráfico 20: Comparação dos marcadores citoquímicos entre fêmeas e machos, na estação Chuvosa.	90
Gráfico 21: Comparação dos marcadores citoquímicos entre fêmeas e machos, na estação Seca.	91
Gráfico 22: Comparação dos marcadores citoquímicos entre as estações, considerando o grupo jabutis.	91
Gráfico 23: Comparação dos marcadores citoquímicos entre as estações, considerando apenas fêmeas.	92
Gráfico 24: Comparação dos marcadores citoquímicos entre as estações, considerando apenas machos.	92

Lista de Tabelas

Tabela 1: Caracterização dos grupos de estudo, quanto ao sexo e à estação.	37
Tabela 2: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre fêmeas e machos, nas estações Seca e Chuvosa.	56
Tabela 3: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre fêmeas e machos, dentro da estação chuvosa.	58
Tabela 4: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre fêmeas e machos, dentro da estação seca.	60
Tabela 5: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre as estações chuvosa e seca (em ambos os sexos).	62
Tabela 6: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre as estações chuvosa e seca (em fêmeas).	64
Tabela 7: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre as estações chuvosa e seca, em machos.	66
Tabela 8: Parâmetros de normalidade dos marcados bioquímicos, hematológicos e citoquímicos de indivíduos <i>C. carbonarius</i> saudáveis provenientes de cativeiro. Marcadores dependentes da sazonalidade.	68
Tabela 9: Parâmetros de normalidade dos marcados bioquímicos, hematológicos e citoquímicos de jabutis <i>C. carbonarius</i> saudáveis provenientes de cativeiro. Marcadores não dependentes da sazonalidade.	69

Lista de Apêndices

Apêndice A: Representação da média e do desvio padrão, entre as estações seca e chuvosa, dos indivíduos analisados.	105
Apêndice B: Valores de normalidade do hemograma de jabutis <i>C. carbonarius</i> sem diferenciação entre as estações do ano.	106
Apêndice C: Valores de normalidade do hemograma de jabutis <i>C. carbonarius</i> nas diferentes estações do ano.	107

Sumário

1 Introdução	16
1.1 Caracterização da espécie <i>Chenoloidis carbonarius</i>	17
1.2 Estresse oxidativo.....	18
1.3 Hemoglobina	23
1.4 Mito de Hormese	24
1.5 POS – Preparo para o Estresse Oxidativo	25
1.6 Influência do cativeiro para o bem-estar animal	25
1.7 Hematologia de Répteis	27
1.7.1 Sistema Circulatório.....	28
1.7.2 Coleta de amostra sanguínea	29
1.7.3 Células sanguíneas	29
1.7.3.1 Eritrócitos	31
1.7.3.2 Leucócitos	32
1.7.3.3 Linfócitos	32
1.7.3.4 Azurófilos.....	33
1.7.3.5 Monócitos.....	33
1.7.3.6 Basófilos.....	33
1.7.3.7 Heterófilos.....	34
1.7.3.8 Eosinófilos.....	34
1.7.3.9 Trombócitos	34
1.7.4 Reação Inflamatória	35
2 Objetivos.....	36
3 Metodologia.....	37
3.1 Animais estudados	37
3.2 Período e Local das coletas	40
3.3 Marcadores do Estresse Oxidativo	44
3.3.1 Catalase	44
3.3.2 Glutathione Peroxidase (GPx).....	44
3.3.3 Glutathione S-Transferase (GST).....	44
3.3.4 Superóxido Dismutase (SOD).....	44
3.3.5 Lesão em Biomoléculas (TBARS).....	45
3.4 Marcadores da Bioquímica Metabólica.....	45
3.4.1 Glicose.....	46
3.4.2 Colesterol	46
3.4.3 Triglicérides	47

3.5 Marcadores Hematológicos.....	48
3.5.1 Contagem Total de Eritrócitos e Leucócitos	48
3.5.2 Hematócrito.....	49
3.5.3 Dosagem de Hemoglobina Circulante.....	49
3.5.4 Índices Hematimétricos – Volume Globular Médio (VGM)	49
3.5.5 Índices Hematimétricos – Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM)	49
3.5.6 Índices Hematimétricos – Hemoglobina Globular Média (HGM).....	50
3.5.7 Dosagem de Oxihemoglobina, Metahemoglobina e Hemicromos	50
3.6 Marcadores Citoquímicos	51
3.6.1 Coloração por Prata.....	51
3.6.2 Coloração por Feulgen	51
3.6.3 Diferencial de Leucócitos por Panótico	51
3.6.4 Razão Heterófilo por Linfócito	52
4 Análises estatísticas	53
5 Resultados	54
5.1 Comparação entre fêmeas e machos independente da estação do ano.....	55
5.2 Comparação entre fêmeas e machos na estação chuvosa.....	57
5.3 Comparação entre fêmeas e machos na estação seca	59
5.4 Comparação entre estações seca e chuvosa.....	61
5.5 Comparação entre fêmeas na estação seca e chuvosa	63
5.6 Comparação entre machos na estação seca e chuvosa	65
5.7 Caracterização dos parâmetros de normalidade	67
5.7.1 Normalidade dos marcadores bioquímicos, hematológicos e citoquímicos de <i>C. carbonarius</i> provenientes de cativeiro.....	67
5.7.1.1 Normalidade dos marcadores dependentes da sazonalidade	68
5.7.1.2 Normalidade dos marcadores não dependentes da sazonalidade	69
6 Discussão	70
6.1 Análise da Bioquímica do Estresse Oxidativo	70
6.2 Análise da Bioquímica Metabólica	77
6.3 Análise Hematológica	81
6.4 Análise Citoquímica.....	89
7 Conclusão	93
Referências	95
APÊNDICE A – Média e desvio padrão de todos os indivíduos estudados	105
APÊNDICE B – Valores de normalidade do hemograma de jabutis <i>C. carbonarius</i>	106
APÊNDICE C – Valores de normalidade do hemograma de jabutis <i>C. carbonarius</i> nas diferentes estações do ano	107

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética (CEUA – IBILCE/UNESP).....	108
ANEXO B – Ensaio da Catalase	109
ANEXO C - Ensaio da Glutathione Peroxidase (GPx)	110
ANEXO D – Ensaio da Glutathione S-Transferase (GST)	111
ANEXO E - Protocolo de preparo de amostra e análise de Peroxidação Lipídica.....	113
ANEXO F – Análise Bioquímica – Dosagem de Glicose, Colesterol e Triglicérides	115
ANEXO G – Metodologia do Hemograma – Contagem Global de Células Sanguíneas.....	116
ANEXO H – Metodologia do Hemograma – Hematócrito	119
ANEXO I – Metodologia do Hemograma – Dosagem de Hemoglobina Circulante	120
ANEXO J – Metodologia do Hemograma – Contagem Diferencial de Leucócitos.....	121
ANEXO K - Oxihemoglobina, Metahemoglobina e Hemicromos.....	122
ANEXO L - Técnica AgNOR Impregnação por Íons Prata	123
ANEXO M - Reação de Feulgen.....	124

1 Introdução

Variações sazonais nos fatores bióticos e abióticos influenciam no metabolismo energético de répteis (BENNETT; DAWSON, 1976). Por serem animais ectotérmicos, alterações de temperatura e umidade podem causar importantes efeitos na estrutura e função das enzimas metabólicas, modificando de maneira profunda os processos fisiológicos e padrões de atividade, principalmente no que se refere ao ciclo reprodutivo. Fatores como disponibilidade de alimento, fotoperíodo e umidade também contribuem para as diferenças sazonais no metabolismo (BENNETT; DAWSON, 1976; HUEY, 1982; SOMERO, 2004; PITOL et al., 2008; WILLIARD; HARDEN, 2011).

De acordo com *Biomarkers Definitions Working Group* (2001), um biomarcador é uma característica objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. Assim, biomarcadores são utilizados em pesquisas pela capacidade de detecção do efeito de um agente tóxico em um indivíduo, permitindo avaliar as suas respostas fisiológicas a agentes agressores. Desse modo, os biomarcadores são capazes de inferir as consequências que o impacto ambiental tem na qualidade do ambiente e na vida dos indivíduos. São capazes de refletir o estado saudável do organismo em níveis de organização celular e/ou molecular, e apresentar uma rápida resposta ao estresse. Sendo assim, biomarcadores podem ser utilizados como indicadores precoces de alterações ambientais, auxiliando na tomada de decisões que evitem ou mitiguem danos ambientais, antes que esses se tornem irreversíveis (HINTON et al., 1992; SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Dessa forma, adaptações bioquímicas como alterações na estrutura, função, regulação e nos níveis de biomoléculas, assim como nas reações metabólicas, permitem que os organismos respondam efetivamente às alterações ambientais e mantenham condições adequadas no ambiente interno, preservando a homeostase (STOREY, 2004). Além disso, em condições de mudanças nos fatores abióticos, a maioria dos organismos depende de adaptações comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas a fim de combater as perturbações causadas na homeostase por um ambiente desfavorável, e, assim, ser capaz de sobreviver (SOMERO; LOCKWOOD; TOMANEK, 2016).

1.1 Caracterização da espécie *Chelonoidis carbonarius*

A Classe Reptilia abrange a Ordem Testudines, ou seja, os quelônios tanto de hábito terrestre, como de água doce e salgada, compreendendo os jabutis, cágados e tartarugas. Recentemente, o clado das tartarugas foi classificado como o clado de vertebrados mais ameaçado (UETZ; ETZOLD; CHENNA, 2018), do total de 251 espécies, 159 espécies (59,4%) estão classificadas em perigo (Extinta, Extinta na natureza, Criticamente em Perigo, Em Perigo e Vulnerável), de acordo com a classificação da “International Union for Conservation of Nature” (IUCN, 2019); 84 espécies (33,5%) estão classificadas como Criticamente em Perigo ou Em Perigo (TTGW, 2017). São animais de fácil identificação pelo fato de apresentarem características morfológicas singulares, como: crânio anapsida, bico córneo afiado, ausência de dentes (GOULART, 2004), e um casco formado pela fusão da carapaça com o plastrão, recoberto por escudos córneos (POUGH; JANIS; HEISER, 2013; SHAFFER, 2009). O casco, característica morfológica extremamente conservada, apresentou mudanças quase irrelevantes nessas espécies ao longo dos 200 milhões de anos de existência e é composto por duas partes: uma carapaça dorsal formada pela fusão das costelas, vértebras e diversos elementos de ossificação dérmica, revestida por escudos queratinizados ou pele semelhante a couro; e um plastrão ventral formado pela fusão de clavículas, interclavículas e costelas abdominais (gastrália). O alto valor adaptativo relacionado a presença do casco pode ser considerado um fator determinante para a baixa diversificação do grupo (POUGH; JANIS; HEISER, 2013).

A família Testudinidae é a segunda maior família da ordem Testudines em número de espécies (SBH, 2012). Abrange os quelônios conhecidos como jabutis, animais de hábito terrestre, onívoros e diurnos que passam o tempo em busca de alimento (JACOBSON, 2007). No Brasil, a família está representada por duas espécies: *Chelonoidis carbonarius* (SPIX, 1824), conhecido popularmente como “jabuti piranga”, e *Chelonoidis denticulatus* (LINNAEUS, 1766), conhecido como “jabuti-tinga” (SBH, 2012).

Os “jabutis pirangas” ou “jabuti-das-patas-vermelhas” (*Chelonoidis carbonarius*) possuem em média de 30 a 35 centímetros de comprimento, não excedendo 50 centímetros, e os machos normalmente são maiores que as fêmeas. A carapaça é forte e convexa, de cor cinza, marrom ou preta, com desenhos simétricos, vermelhos ou amarelados. O plastrão apresenta a mesma coloração escura, com forma côncava nos machos. A escama frontal geralmente é única. Durante a estação chuvosa apresenta seu período de maior atividade (RUEDA-ALMONACID et al., 2007). Pelo fato de consumir muitas espécies vegetais em sua

alimentação, atua como importante dispersor de semente (WANG et al., 2011). O período de reprodução decorre de agosto a janeiro, sendo mais comum entre setembro e novembro (VOGT, 2008). Ocorrem principalmente em áreas abertas e secas da Nicarágua, Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Peru, Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil, nos estados de Alagoas, Amazonas, Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima, Sergipe (PRITCHARD; TREBBAU, 1984; THE REPTILE DATABASE, 2015; TTGW, 2017).

1.2 Estresse oxidativo

O conceito de radicais livres consiste em átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons não pareados (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). O átomo de oxigênio (O), por apresentar dois elétrons desemparelhados na camada de valência, também é classificado como radical livre. Em sistemas biológicos, o O_2 , ao ser reduzido, origina espécies reativas de oxigênio (ERO) (HERMES-LIMA, 2004).

O estresse oxidativo consiste na superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$) (LÓPEZ-BAREA; PUEYO, 1998), e é definido como o desequilíbrio entre a produção de ERO e a ação das defesas antioxidantes no organismo (SIES, 1991). O radical livre superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é considerado altamente reativo, portanto sua formação também leva a produção do radical livre hidroxila ($\cdot OH$), ainda mais reativo (NELSON; COX, 2014). Esse desequilíbrio é conhecido por gerar danos em biomoléculas, como por exemplo, proteínas, enzimas, lipídeos de membrana e ácidos nucleicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2008; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; NELSON; COX, 2014), podendo, até mesmo, acarretar em morte celular (ALMEIDA et al., 2003).

A produção de ERO é parte integrante do metabolismo e é observada em diversas condições fisiológicas (VASCONCELOS et al., 2007). Diversas etapas na via de redução do oxigênio, em mitocôndrias, têm o potencial de produzir radicais livres altamente reativos, que são capazes de danificar as células (SILVA; FERRARI, 2011; NELSON; COX, 2014). Nas mitocôndrias, nos momentos de respiração ativa, de 0,1 a 4% do oxigênio utilizado na respiração formam ($O_2^{\cdot-}$), mais do que suficiente para gerar efeitos letais, a menos que o radical livre seja rapidamente descartado por meio das vias antioxidantes (NELSON; COX, 2014). Quando a mitocôndria encontra-se sob estresse oxidativo, existem mais elétrons disponíveis para entrar na cadeia respiratória do que aqueles que conseguem se ligar ao

oxigênio e resultar em água. Quando o suprimento de doadores de elétrons na forma NADP é equiparado com os aceptores de elétrons, existe menos estresse oxidativo e a produção de ERO é muito reduzida. Embora a superprodução de ERO seja obviamente prejudicial, baixos níveis de ERO podem ser usados pela célula animal como sinal de hipóxia, ou seja, suprimento ineficiente de oxigênio, desencadeando ajustes metabólicos (NELSON; COX, 2014).

Um estado com níveis intracelulares de ERO moderadamente elevados é referido como estresse oxidativo; o aumento da produção de ERO e de radicais livres provoca danos ao DNA, às proteínas, aos carboidratos e aos lipídios, comprometendo as funções celulares. Dentre os prejuízos ao metabolismo celular, pode ocorrer ruptura das fitas do DNA, aumento na concentração de cálcio intracelular livre, danos em transportadores de íons e peroxidação de lipídios. A intensidade desses danos dependerá da amplitude da geração de ERO, dos alvos celulares e da atividade dos sistemas de defesa antioxidante (VASCONCELOS et al., 2007). A fonte mais reconhecida de alterações mutagênicas no DNA é o dano oxidativo, sendo as ERO, principalmente o radical hidroxila, os responsáveis pela maioria dos danos oxidativos causados ao DNA (NELSON; COX, 2014). Os danos ao DNA incluem a formação de adutos ou ligações cruzadas de DNA e suas proteínas, assim como modificações das bases nitrogenadas, de modo a provocar alteração nas hélices do material genético, resultando em modificações na expressão gênica e favorecimento da aparição de doenças crônicas em mamíferos (LEE; KOO; MIN, 2004).

O estresse crônico pode causar danos teciduais e disfunção metabólica, resultando na morte do organismo (COSTANTINI et al., 2009). Dentre os danos celulares citados, pode ocorrer, também, a peroxidação lipídica, ou lesões em biomoléculas, considerada uma importante consequência do estresse oxidativo; os principais produtos de sua degradação consistem em cetonas e aldeídos, sendo o malondialdeído (MDA) tido como um importante indicador do estresse (VAN DER OOST et al., 2003; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010). A peroxidação lipídica altera a fluidez das membranas, o que provoca uma menor seletividade no transporte iônico e na sinalização transmembrana, prejudicando o transporte celular (DELL'ANNA et al., 2007).

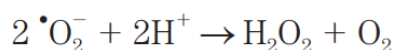
Ainda, as ERO inibem a ação das enzimas, assim como enzima Aminoacil-tRNA sintetase, que edita e corrige o RNA transportador, de modo que a sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica apresente erros, resultando em síntese de proteínas anômalas (LING; SÖLL, 2010). Associado ao fato das ERO também oxidarem os aminoácidos cisteína e metionina, provocando sérias alterações na estrutura e função proteica (ZHANG, 2010).

Para lidar com as ERO, organismos aeróbicos possuem em suas células um sistema de defesa antioxidante que incluem enzimas de detoxificação com capacidade de neutralizar o excesso de ERO produzidas, prevenindo danos à estrutura celular (RIGHETTI et al., 2014) e convertendo-as em produtos não reativos (NELSON; COX, 2014). Nesse contexto, encaixam-se algumas enzimas que previnem as células dos danos causados pelo excesso de ERO, sendo algumas dessas antioxidantes como a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT), a Glutathione Peroxidase (GPx); e a enzima de biotransformação, a Glutathione S-Transferase (ALMEIDA; BAINY, 2006).

No entanto, uma fração desses oxidantes escapa das defesas celulares, fazendo com que haja dano oxidativo no DNA, que pode variar em um grande e complexo conjunto de reações, desde a oxidação da desoxirribose e das bases nitrogenadas até na quebra das hélices do DNA. Ainda não há uma estimativa precisa da extensão desses danos, porém, sabe-se que a cada dia, o DNA de cada célula humana está sujeito a milhares de reações oxidativas (NELSON; COX, 2014). Aliado a isso, o dano oxidativo pode ser causado em ácidos graxos polinsaturados, componentes principais das membranas biológicas e considerados muito vulneráveis ao ataque de espécies reativas por possuírem muitas insaturações, o que gera o processo de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é capaz de alterar a fluidez das membranas biológicas e, portanto, alterar suas funções fisiológicas, podendo até mesmo acarretar em morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

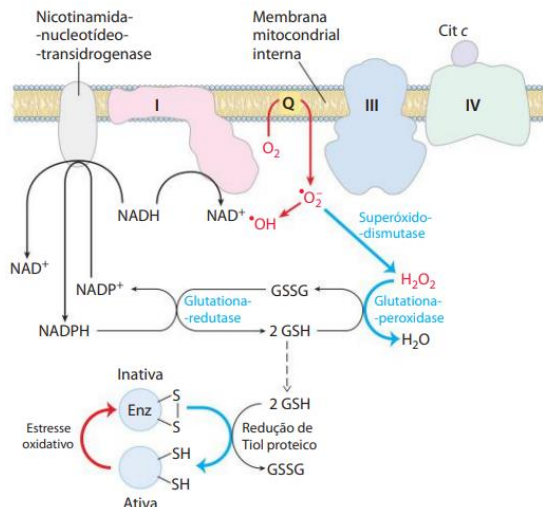
Para impedir o dano oxidativo induzido pelo ânion superóxido, as células têm diversas formas da enzima Superóxido Dismutase (SOD), cuja função é catalisar a reação representada pela figura 1. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) assim gerado torna-se inofensivo pela ação da Glutathione Peroxidase (GPx) (Figura 2). A Glutathione Redutase (GR) recicla a Glutathione oxidada (GSSG) em sua forma reduzida, utilizando elétrons do NADPH gerados na mitocôndria pela nicotinamida-nucleotídeo-transidrogenase. A Glutathione reduzida (GSH) também mantém os grupos sulfidril das proteínas em seu estado reduzido, impedindo alguns dos efeitos deletérios do estresse oxidativo (Figura 2). A nicotinamida-nucleotídeo-transidrogenase é crucial nesse processo, pois ela produz o NADPH, essencial para a atividade da Glutathione-Redutase (GR) (NELSON; COX, 2014).

Figura 1: Reação da enzima Superóxido-Dismutase.



Fonte: NELSON; COX, 2014.

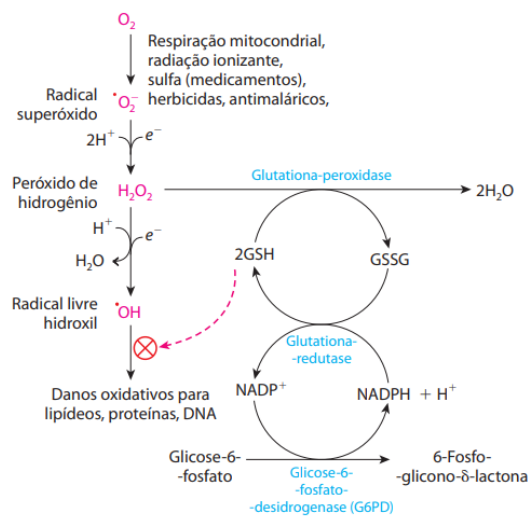
Figura 2: Formação de ERO nas mitocôndrias e defesas antioxidantes mitocondriais.



Fonte: NELSON; COX, 2014.

O NADPH, essencial em muitas vias biossintéticas pelo fato de transportar energia na forma de ligações químicas com elétrons, protege as células do dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e pelos radicais livres superóxido. Durante a detoxificação do H₂O₂, é convertido em H₂O pela Glutaciona Reduzida (GSH) sob a ação da Glutaciona-Peroxidase (GPx), e a Glutaciona Oxidada (GSSG) é convertida de volta à forma reduzida pela Glutaciona-Redutase (GR) e NADPH (Figuras 2 e 3). O H₂O₂ também é degradado a H₂O e O₂ pela Catalase, que também requer NADPH (NELSON; COX, 2014).

Figura 3: Papel do NADPH e da Glutaciona na proteção das células contra derivados de oxigênio altamente reativos.



Fonte: NELSON; COX, 2014, com modificações.

Os danos celulares resultantes são a peroxidação de lipídeos levando à degradação das membranas dos eritrócitos e a oxidação de proteínas e do DNA. A Glutathione Reduzida (GSH) protege a célula por destruir o peróxido de hidrogênio e os radicais livres hidroxil (NELSON; COX, 2014).

A Glutathione (GSH), presente em grande concentração na maioria dos grupos de seres vivos, desde bactérias até animais, é considerada como tampão redox, sendo formada pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina. A forma oxidada da Glutathione (GSSG) é produzida durante sua ação redox. Dentre as funções da Glutathione, tem-se: manutenção dos grupos sulfidrila das proteínas no estado reduzido, manutenção do ferro do grupo heme no estado ferroso, remoção de peróxidos tóxicos, formados frequentemente em condições de crescimento e metabolismo anaeróbico (NELSON; COX, 2014). Entretanto, a capacidade de tamponamento da glutathione depende essencialmente da atividade de enzimas que catalisam a transferência de elétrons entre a glutathione e outras moléculas (BERNDT; LILLIG; FLOHÉ, 2014). Dentre as enzimas que catalisam as reações de troca de elétrons entre a glutathione e diferentes alvos, estão a Glutathione Redutase (GR), Glutathione Peroxidases (GPx) e Glutathione S-Transferases (GST). Ademais, a Glutathione-S-Transferase (GST) utiliza a GSH a fim de detoxificar xenobióticos e neutralizar ERO (MANNERVIK, 1987). Os principais substratos da Glutathione-S-Transferase (GST) são xenobióticos eletrofílicos e produtos da oxidação de lipídeos, o que os tornam menos reativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Localizada no citosol e na matriz mitocondrial, divide com a catalase a função de detoxificar o peróxido de hidrogênio. Essa enzima possui papel importante dentro do sistema de defesa antioxidante, visto que previne a peroxidação lipídica (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A reação apresentada na figura 4 é catalisada pela Glutathione Peroxidase.

Figura 4: Reação da enzima Glutathione-peroxidase (GPx).



Fonte: NELSON; COX, 2014.

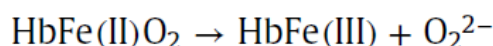
Estudos sobre estresse oxidativo têm maior foco em mamíferos e aves, com menor atenção para répteis, embora a sensibilidade desse grupo diante de fatores de degradação ambiental já tenha sido comprovada (COSTANTINI et al., 2009). Biomarcadores de estresse oxidativo têm especial atenção em estudos de biomonitoramento do impacto dos poluentes

por detectarem o desequilíbrio no balanço redox de sistemas biológicos (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

1.3 Hemoglobina

Embora a molécula de hemoglobina, quando oxigenada, seja considerada relativamente estável, ela é capaz de se auto-oxidar fisiologicamente e se tornar metahemoglobina, a uma taxa de 0,5% a 3%, por dia, em humanos. O ferro, na hemoglobina, é transportado no estado ferroso (FeII) na forma reduzida, que, quando oxidada para a forma férrica (FeIII) forma a metahemoglobina e libera, como produto, o ânion superóxido (Figura 5) (UMBREIT, 2007). A auto-oxidação da hemoglobina é quase inteiramente responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio dentro dos eritrócitos (UMBREIT, 2007; ZWIETEN; VERHOEVEN; ROSS, 2013).

Figura 5: Reação de auto-oxidação da hemoglobina e liberação de metahemoglobina e ânion superóxido.

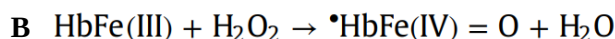
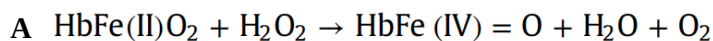


Fonte: VOSKOU et al., 2015.

O ânion superóxido produzido pela auto-oxidação da hemoglobina é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase (Figura 1) (RIFKIND; MOHANTY; NAGABABU, 2014).

O peróxido de hidrogênio pode reagir com a oxihemoglobina (Figura 6 – A) e a metahemoglobina (Figura 6 – B), produzindo ferrihemoglobina (FerriHb) [HbFe(IV) = O] e oxiferrihemoglobina (oxiferriHb) [$\bullet\text{HbFe(IV) = O}$], respectivamente (RIFKIND; MOHANTY; NAGABABU, 2014).

Figura 6: Reação do peróxido de hidrogênio com a oxihemoglobina e metahemoglobina.

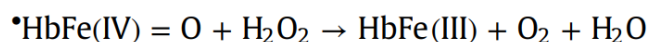
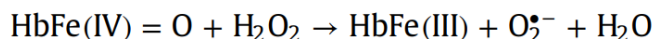


Fonte: VOSKOU et al., 2015.

Na figura 7, pode-se observar que FerriHb e OxiferriHb podem reagir, novamente, com o peróxido de hidrogênio e produzir ainda mais metahemoglobina (RIFKIND; MOHANTY; NAGABABU, 2014). O NADH, proveniente da glicólise, é o principal agente

reduzidor da metaHb, mantendo o ferro do grupo heme no estado ferroso (PERCY; LAPPIN, 2008).

Figura 7: Reação do peróxido de hidrogênio com FerriHb e OxiferriHb produzindo MetaHb.



Fonte: VOSKOU et al., 2015.

Hemoglobinas instáveis tendem a auto-oxidação, desnaturação e precipitação na forma de hemicromos, que são estruturas geradas como produtos intermediários da desnaturação oxidativa da hemoglobina, desde a metaHb até da completa dissociação e liberação do grupo heme e dos átomos de ferro (RACHMILEWITZ et al., 2005).

1.4 Mito de Hormese

O mito de Hormese, ou hormese mitocondrial, consiste na teoria de que o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) dentro das mitocôndrias resultaria em uma resposta adaptativa na qual há aumento da resistência ao estresse, ocasionando, em longo prazo, a redução do estresse oxidativo (RISTOW; ZARSE, 2010). Trata-se de um fenômeno biológico de ajuste que o organismo sofre a partir de estímulos subpatogênicos/subletais (SILVA; FERRARI, 2011). A hormese é capaz de aumentar a expressão de enzimas do sistema antioxidante na tentativa de se defender contra os radicais livres, resultando em menores taxas de morte celular, ou seja, aumento da longevidade do indivíduo (RATTAN; DEMIROVIC, 2010).

A teoria da hormese mitocondrial postula que, em células com funcionamento normal, uma carga específica de oxidantes no equilíbrio redox é benéfica (TAPIA, 2006; GONÇALVES, 2014). Dessa forma, o organismo consegue se adaptar a um limiar de estresse que seria capaz de gerar benefícios ao seu desempenho (GONÇALVES, 2014). O ambiente é capaz de influenciar no estresse sofrido pelo organismo, de forma que ele consegue se adaptar ao estímulo e produzir uma resposta (GONÇALVES, 2014).

Assim sendo, é necessário haver uma relação entre a respiração celular, o aumento da formação de ERO e a indução do sistema antioxidante para haver aumento na longevidade (RISTOW; SCHMEISSER, 2011). Em pequenas quantidades as ERO causam efeitos benéficos ao organismo, porém em doses elevadas o efeito deletério ainda pode prevalecer (RISTOW; SCHMEISSER, 2011; GONÇALVES, 2014).

1.5 POS – Preparo para o Estresse Oxidativo

Os radicais livres e as espécies reativas sempre foram considerados ameaça frequente e deletéria aos componentes celulares em sistemas biológicos, sendo, ou produtos de um processo accidental de escape de elétrons na cadeia fosforilativa, ou produtos indesejados de reações fisiológicas. Tal visão é fundamentada pela associação entre acúmulo de biomoléculas oxidadas em quadros patológicos (HERMES-LIMA, 2004). Porém, atualmente, sabe-se que as espécies reativas apresentam um importante papel na sinalização celular (DI MEO et al., 2016). Processos como diferenciação celular, resposta imune e autofagia dependem da participação das ERO (SENA; CHANDEL, 2012).

A teoria da preparação para o estresse oxidativo (POS – sigla em inglês – “Preparation for Oxidative Stress”) foi um conceito proposto em 1998 por Hermes-Lima, Storey e Storey, cujo princípio derrubava a hipótese até então defendida no ramo da pesquisa. Anteriormente à proposição dessa teoria, acreditava-se que haveria menor geração de ERO, e, portanto, menor atividade antioxidante quando indivíduos fossem submetidos a situações de privação de O₂. No entanto, essa teoria propõe que a maior atividade das enzimas antioxidantes em situações de privação de oxigênio é considerada uma importante resposta adaptativa para lidar com o estresse causado pela reoxigenação. Portanto, esse fenômeno teria como definição o aumento da capacidade antioxidante endógena durante a privação de oxigênio em animais resistentes a flutuações de disponibilidade e consumo de oxigênio. Segundo essa hipótese, o sistema antioxidante é induzido a partir de um mecanismo antecipatório (chamado de “preparo”) para ser capaz de lidar com o efeito potencialmente danoso (ou seja, o estresse oxidativo) da reoxigenação (HERMES-LIMA; STOREY; STOREY, 1998).

Portanto, o mecanismo de ativação do POS, em organismos expostos a privação de oxigênio, ocorre a partir da superprodução de espécies reativas (principalmente provenientes das mitocôndrias) induzida pela hipóxia. Dessa forma, o aumento das defesas do sistema antioxidante durante a hipóxia seria uma resposta ao estresse causado pelo dano oxidativo que já ocorre durante a hipóxia, não somente na reoxigenação (WELKER et al., 2013).

1.6 Influência do cativeiro para o bem-estar animal

Existem leis no Brasil que garantem a conservação das espécies de seres vivos, sendo a Lei de Proteção à Fauna – Lei nº 5.197 de 31 de janeiro de 1967 – essencial por reconhecer a fauna silvestre como patrimônio da União, da população brasileira e por proibir a caça e a captura de espécies, assim como o comércio de animais silvestres (BRASIL, 1967).

A Lei de Crimes Ambientais – Lei nº 9.605 de 12 de fevereiro de 1998 – define que matar, perseguir, caçar, apanhar, utilizar, vender espécimes da fauna silvestre brasileira (nativa ou em rota migratória), assim como seus ninhos, abrigos e criadouros naturais, sem a autorização de órgãos competentes, é crime, sujeito a detenção e multa. Porém, cabe ressaltar que não é crime o abate do animal quando realizado em caso de extrema necessidade, para saciar a fome ou por populações tradicionais, que utilizam esse recurso como uma de suas fontes de proteína (BRASIL, 1998).

Segundo a Instrução Normativa 169 do IBAMA, os Jardins Zoológicos são empreendimentos autorizados e se constituem de coleção de animais silvestres mantidos vivos, em cativeiro ou semiliberdade, e expostos à visitação pública, cujo fim destina-se à ciência, à conservação, à educação e à sociedade (IBAMA, 2008). O documento apresenta as normas necessárias para a criação das mais variadas espécies de animais. Em se tratando de répteis, o documento instaura ser necessário: a presença de um local de solário e local sombreado, fácil acesso à água, piso de areia, terra, grama, folhiço, troncos, pedras ou suas combinações, de modo a favorecer os mais diversos habitats. Quanto a, especificamente, indivíduos da Ordem Testudines e Família Testudinidae, o documento aponta uma normativa referente à densidade populacional máxima de ocupação dos recintos, sendo que animais com comprimento de carapaça até 10 centímetros devem possuir como Densidade Ocupacional (DO) até 10 animais a cada metro quadrado (m^2), animais com comprimento de 10 a 20 centímetros devem possuir uma DO de até 10 animais a cada 4 metros quadrados, e, por fim, animais com comprimento acima de 20 centímetros devem possuir até um animal a cada dois metros quadrados; e uma normativa referente à necessidade de vegetação no recinto.

A Sociedade de Zoológicos e Aquários do Brasil (SZB) regulamenta e instaura altos padrões de ética, de modo a cada vez mais elevar o nível dos zoológicos brasileiros. Os zoológicos devem implementar e manter os mais altos padrões de bem-estar animal, sempre respeitando as cinco liberdades animais: liberdade de fome e sede, liberdade de incômodos, liberdade de feridas, doenças e dor, liberdade de expressar padrões normais de comportamento e liberdade de medo e estresse. Devem incentivar e promover a conservação e a sobrevivência das espécies, assim como incentivar as pesquisas e promover educação (MELLOR et al., 2015).

Segundo Barros (2013), zoológicos e aquários devem atuar nos quatro pilares de ação: educação, lazer, pesquisa e conservação. A partir do momento em que a redução das populações naturais está aumentando a cada dia, juntamente com a acelerada perda e descaracterização de ambientes naturais, programas (como zoológicos) que atuam na

manutenção de populações demográficas e geneticamente sustentáveis em cativeiro são de extrema importância na conservação das espécies.

No entanto, locais de cativeiro podem ser estressantes para quelônios, tanto quanto ambientes naturais que sofreram ação antrópica, principalmente por poluição (CASE, LEWBART; DOERR, 2005). Portanto, animais de cativeiro (provenientes de zoológicos) não podem ser considerados grupo controle, pois, apesar de receberem todos os cuidados necessários, possuem uma área limitada para viver, deslocamento restrito, bem como a coexistência de indivíduos de espécies diferentes em uma mesma área, consistindo em fatores de estresse capazes de afetar o comportamento e a fisiologia do animal (BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017).

1.7 Hematologia de Répteis

O estado de saúde de um réptil pode ser determinado a partir de exames físicos, assim como hematológicos em associação a caracteres bioquímicos (MACHADO et al., 2006). Os estudos fisiológicos são necessários para se determinar os valores de normalidade da espécie e sua utilização como ferramenta diagnóstica para a realização de um manejo adequado e conservação (MACHADO et al., 2006). Desse modo, estudos com esses animais, relacionados com o meio em que vivem, são fundamentais para o entendimento da dinâmica biológica dessas espécies (GOULART, 2004).

Estudos hematológicos são realizados a partir de amostras de sangue periférico dos animais. Consiste em um procedimento pouco invasivo, porém a dor e a probabilidade de infecção devem ser consideradas (NARDINI et al., 2013). A análise de parâmetros hematológicos se faz presente na avaliação da saúde dos indivíduos silvestres, pois fornece informações sobre seu estado fisiológico e sobre as condições ambientais, de modo que pode ser utilizado como biomarcador para análise do impacto ambiental (VALDIVIA et al., 2007). A hematologia de animais silvestres, de vida livre ou mantidos em cativeiro, é necessária, uma vez que é possível entender a dinâmica da espécie e prever possíveis diagnósticos (ZAGO, 2010; BERGAMINI, 2011). Portanto, alterações quantitativas e qualitativas nas respostas fisiológicas podem ser detectadas, como em anemia, parasitemia, doenças inflamatórias, desordens e alterações fisiológicas (CAMPBELL, 2006).

Dentre as funções do tecido sanguíneo, destaca-se o transporte de gases, nutrientes e resíduos do metabolismo, assim como a proteção contra agentes invasores (STACY et al., 2011). Em quelônios, cerca de 95% das células sanguíneas são eritrócitos, o restante (5%) são leucócitos e trombócitos. As células sanguíneas são utilizadas como marcadores, pois

circulam por todo o corpo do animal e, assim, são capazes de demonstrar a resposta a determinados agentes estressores (PITOL et al., 2008).

Análises bioquímicas do sangue são muito utilizadas para avaliar o estado fisiológico de animais, porém a bioquímica clínica de répteis ainda não é tão estudada quanto a de mamíferos (CAMPBELL, 2006; SILVESTRE et al., 2013; CAMPBELL, 2015). Desse modo, os dados de patologia clínica podem ajudar a avaliar a saúde, o diagnóstico da doença e o prognóstico para os quelônios (INNIS; KNOTEK, 2020).

Répteis são animais ectotérmicos, possuem dependência com o meio para a manutenção da temperatura e regulação do metabolismo, portanto fatores externos como luz, calor e umidade são importantes para o funcionamento de todos os órgãos e do sistema imune (KOLESNIKOVAS, 1997; GOULART, 2004). Parâmetros hematológicos e bioquímicos são influenciados por estação do ano, idade, sexo, “status” de saúde, localização geográfica, estado fisiológico e período reprodutivo, os quais dificultam a interpretação dos resultados (CAMPBELL, 2006; CAMPBELL, 2015).

Nos quelônios, as células sanguíneas são nucleadas (eritrócitos e leucócitos). Os eritrócitos são células grandes, com formato ovoide ou elíptico com núcleo posicionado no centro. Os leucócitos, responsáveis pela defesa do organismo, são classificados em linfócitos, monócitos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e azurófilos (GOULART, 2004).

A determinação de perfis hematológicos e bioquímicos de animais de cativeiro é essencial para a avaliação da saúde no ambiente ao qual estão submetidos (TROIANO et al., 2001).

1.7.1 Sistema Circulatório

Em relação à fisiologia do sistema circulatório dos quelônios, sabe-se que o sistema circulatório dos tetrápodes apresenta dois tipos de circulação distintos: a circulação sistêmica e a pulmonar. A circulação sistêmica tem como objetivo transportar sangue oxigenado, proveniente dos pulmões, do coração para os tecidos do organismo, e, ainda, apresenta maior pressão sanguínea. A circulação pulmonar transporta sangue desoxigenado, proveniente do corpo, do coração para os pulmões (para ser novamente oxigenado), e apresenta pressão sanguínea inferior quando comparada à circulação sistêmica. As duas circulações trabalham em série, ou seja, o sangue flui do coração para os pulmões, volta ao coração e depois é direcionado ao corpo. A morfologia do coração das tartarugas permite, em situações específicas como em condições de mergulho, a capacidade de transferir sangue entre os

circuitos pulmonar e sistêmico, uma vez que o ventrículo não é completamente separado (POUGH; JANIS; HEISER, 2013).

1.7.2 Coleta de amostra sanguínea

O tecido mais utilizado para estudos em vertebrados é o tecido sanguíneo. Quando realizada corretamente, a coleta de sangue pode ser bem menos invasiva do que de outros tecidos. No caso de estudos com DNA, pequenas amostras sanguíneas são necessárias, enquanto estudos de perfis hematológicos e bioquímicos necessitam de uma quantidade de amostra um pouco maior (SILVA et al., 2012).

O volume sanguíneo de répteis consiste em cerca de 5% a 8% do peso corporal, portanto apenas 10% desse volume podem ser coletados sem comprometimento à saúde do animal (cerca de 1% do peso corporal) (SYKES; KLAPHAKE, 2015). O anticoagulante mais utilizado em hematologia de quelônios é a heparina (de sódio ou lítio), uma vez que o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) causa hemólise (JACOBSON, 1993; GOULART, 2004).

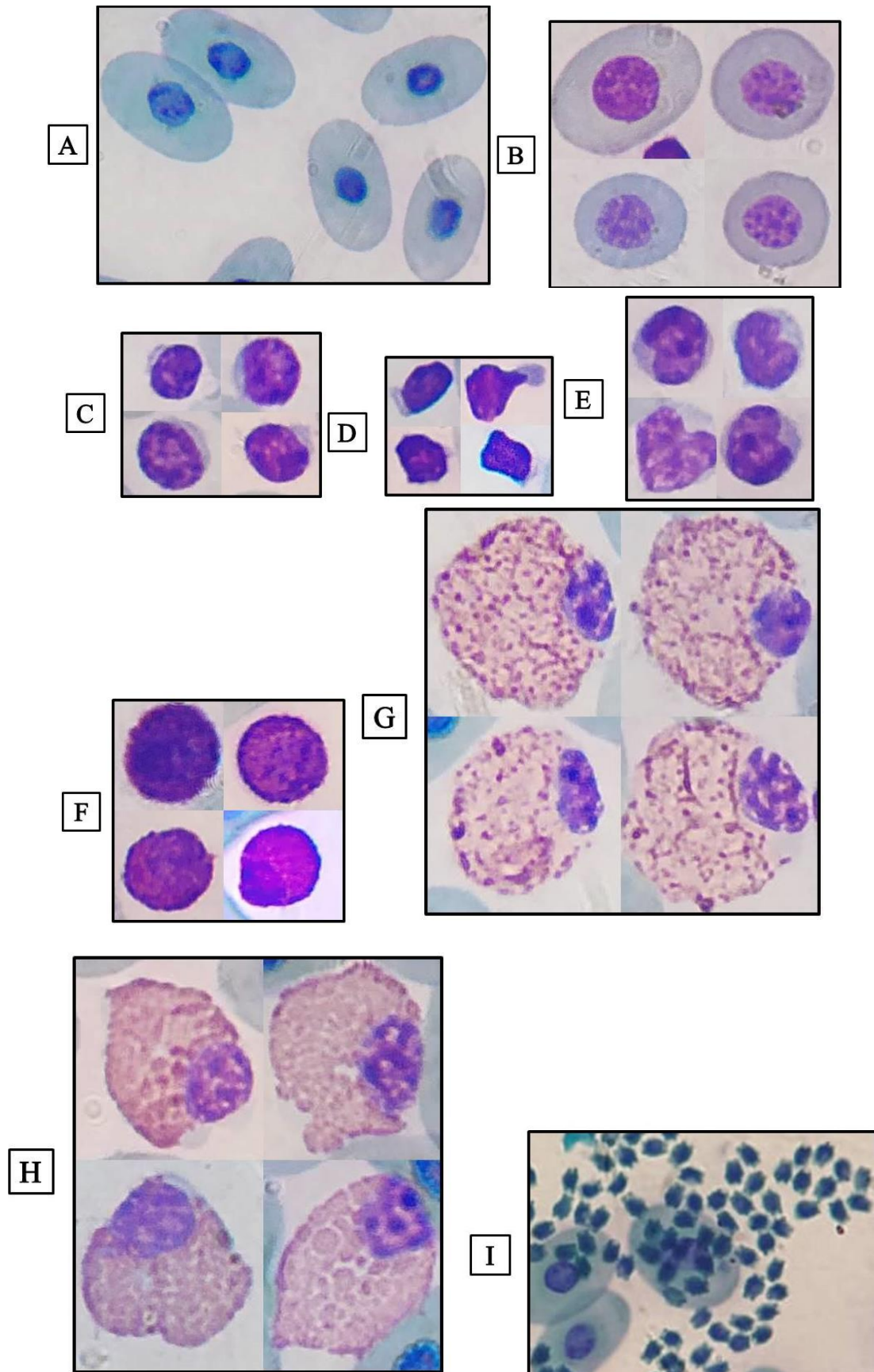
Para quelônios, foram descritos diversos locais de coleta, como coração, jugular, veia femoral, veia margino-costal, sino occipital e veia cloacal (LOYD; MORRIS, 1999; BARROWS et al., 2004; SILVA et al., 2012). O melhor local para a punção difere de acordo com a espécie estudada, seu tamanho e seu estado de saúde. Independente do local escolhido, após a coleta, deve ser mantida uma pressão no local para coagulação e manutenção da homeostase (SYKES; KLAPHAKE, 2015).

O sistema linfático encontra-se muito próximo do sistema sanguíneo, de forma que a contaminação por linfa em amostras de sangue pode ser recorrente. A contaminação por linfa é difícil de ser determinada, porém existem alguns indícios que podem sugerir contaminação: baixa quantidade de eritrócitos totais, ausência de policromatófilos (portanto sem existência de regeneração celular) e grande porcentagem de linfócitos na contagem diferencial de leucócitos (SYKES; KLAPHAKE, 2015).

1.7.3 Células sanguíneas

As células sanguíneas encontradas no sangue periférico de quelônios são classificadas em eritrócitos, leucócitos e trombócitos (ZHANG et al., 2011). O detalhamento das células sanguíneas de *C. carbonarius* está representado na figura 8.

Figura 8: Prancha com as células sanguíneas de *Chelonoidis carbonarius* coradas com Panótico.



Legenda: Células observadas em lâminas de esfregaço simples de sangue periférico de *Chelonoidis carbonarius* coradas em Panótico, objetiva de 100x sob óleo de imersão em microscópio de luz. (A) Eritrócitos maduros; (B) Policromatófilos; (C) Linfócitos, (D) Azurófilos, (E) Monócitos, (F) Basófilos, (G) Heterófilos; (H) Eosinófilos e (I) Trombócitos. Fonte: Elaborada pela autora

1.7.3.1 Eritrócitos

Os eritrócitos (Figura 8 A) de répteis são morfologicamente similares aos de outros vertebrados não mamíferos (peixes, anfíbios e aves). Apresentam núcleo e são maiores do que os eritrócitos de mamíferos (STACY et al., 2011) e menores do que os de anfíbios (CAMPBELL, 2006). Eritrócitos maduros de quelônio apresentam forma de elipse, núcleo oval e central, contendo densa cromatina (SAINT-GIRONS, 1970; FRYE, 1991; CAMPBELL, 2006; ZHANG et al., 2011; CAMPBELL, 2015).

Sua produção ocorre, majoritariamente, na medula óssea a partir de células da linhagem progenitora eritróide, porém, também podem ser geradas em diferentes sítios hematopoiéticos como fígado e baço, quando necessário (FALCE, 2009). Podem, também, originar-se de células adultas circulantes, a partir de mitose, sendo considerado um mecanismo normal em répteis (FRYE, 1991; SYKES; KLAPHAKE, 2015).

Policromatófilos (estágios iniciais de maturação em eritrócitos – Figura 8 B) são menores que eritrócitos maduros, possuem formato arredondado, com grandes núcleos redondos, com cromatina menos densa e citoplasma basofílico (CAMPBELL, 2006; STACY et al., 2011; CAMPBELL, 2015). São menores quando comparados aos policromatófilos de mamíferos e, durante o processo de maturação, aumentam de tamanho (STACY et al., 2011). Representam cerca de 1% do total da contagem global de glóbulos vermelhos periféricos em répteis saudáveis. Consistem em um número baixo quando comparado aos mamíferos e aves, provavelmente pelo fato de apresentar um ritmo lento de produção e ciclagem dos eritrócitos, cuja vida útil é de 600 a 800 dias em quelônios, e por sua baixa taxa metabólica (STACY et al., 2011; NARDINI et al., 2013; CAMPBELL, 2015).

Com o hemograma, pode-se analisar o volume globular médio dos eritrócitos (VGM), a contagem total de eritrócitos e sua morfologia (CAMPBELL, 2006; STRIK et al., 2007; CAMPBELL, 2015; BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017). O volume globular médio é adquirido a partir da realização do hematócrito, enquanto a contagem total de eritrócitos realiza-se a partir da diluição do sangue com uma solução Natt & Herrick e contagem em câmara de Newbauer (BONINI-DOMINGOS, OLIVEIRA, 2017).

1.7.3.2 Leucócitos

Os leucócitos podem ser divididos em dois grandes grupos: os fagócitos e os linfócitos. Os linfócitos são responsáveis pela resposta imune adaptativa, em que há a produção de anticorpos específica ao antígeno, conferindo a memória imunológica. Os fagócitos são responsáveis pela resposta imune inata, e podem ser divididos em granulócitos (eosinófilos, heterófilos, basófilos) e monócitos. Os grânulos citoplasmáticos apresentam origem lisossomal, ou seja, apresentam diversas enzimas como lipases, proteases, carboidrases, entre outras (HOFFBRAND; MOSS, 2018).

Os leucócitos são divididos em granulócitos, que incluem os heterófilos, os eosinófilos e os basófilos (Figuras 8 G, H e F, respectivamente); e agranulócitos, representados por linfócitos, monócitos e azurófilos (Figuras 8 C, E, D). Tanto heterófilos quanto eosinófilos possuem grânulos citoplasmáticos acidófilos, enquanto o basófilo apresenta grânulos citoplasmáticos basofílicos (CAMPBELL, 2006; STACY et al, 2011; ZHANG, 2011; CAMPBELL, 2015).

No entanto, a classificação das células brancas de quelônios apresenta variações entre os estudos, algumas são mais difíceis de serem identificadas e classificadas corretamente devido a mudanças morfológicas ao longo do estágio de maturação celular (STACY et al., 2011). A leucocitose consiste na resposta dos organismos às condições ambientais, seja devido a processos infecciosos (em resposta a microrganismos patogênicos ou poluentes), a estresses crônicos ou a traumatismos, resultantes de longos períodos de seca, a altas ou a baixas temperaturas ou hipóxia (PITOL et al., 2008).

A análise completa dos leucócitos (leucograma) se dá por meio da contagem total e diferencial de leucócitos, assim como a análise morfológica (CAMPBELL, 2006; STRIK et al., 2007; CAMPBELL, 2015; BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017).

1.7.3.3 Linfócitos

Os linfócitos de quelônios (Figura 8 C) possuem morfologia semelhante aos linfócitos de aves e mamíferos (STACY et al, 2011). O núcleo é grande e arredondado, ocupando quase todo o volume celular (pouco visível o citoplasma), não apresentam grânulos e o citoplasma é basofílico. A cromatina é fortemente concentrada, resultando em um núcleo bem corado (SAINT-GIRONS, 1970; CAMPBELL, 2006; CAMPBELL, 2015). Variam de 15% a 40% da porcentagem total de células brancas (dependendo das condições ambientais) e são responsáveis pela resposta imune a vírus (GOULART, 2004); em alguns répteis a porcentagem de linfócitos presentes no sangue periférico pode ser próximo a 80%

(CAMPBELL, 2015). O aumento no número de linfócitos pode decorrer de processos inflamatórios ou infecciosos, cicatrização de feridas, parasitismo e doenças virais. A redução de linfócitos pode estar associada à desnutrição (STACY et al., 2011). Assim como os linfócitos de mamíferos, essas células em répteis podem ser classificadas em células B e T, responsáveis pela produção de imunoglobulinas e desencadeamento das respostas imunes (STACY et al., 2011; CAMPBELL, 2015). Fatores externos (como sazonalidade) e internos (como sexo e hibernação) podem influenciar o número de linfócitos presente no sangue periférico; normalmente fêmeas apresentam mais linfócitos do que machos (CAMPBELL, 2015).

1.7.3.4 Azurófilos

Os azurófilos (Figura 8 D) são exclusivos da ordem reptilia (STACY et al., 2011). Possuem tamanho e função semelhantes aos monócitos e linfócitos, podendo ser diferenciados de acordo com a forma irregular e o núcleo com cromatina mais densa, configurando uma coloração mais aparente (FALCE, 2009; STACY et al., 2011). Representam de 2% a 5% e sua função ainda não está totalmente esclarecida, porém acredita-se que estão envolvidos nas respostas inflamatórias (SILVA et al., 2009).

1.7.3.5 Monócitos

Possuem morfologia semelhante aos monócitos de aves e mamíferos (STACY et al., 2011). O núcleo é oval e possui menos cromatina condensada, resultando em um aspecto mais pálido quando comparado ao núcleo de um linfócito (FALCE, 2009). Os monócitos (Figura 8 E) variam de 3% a 20% do total de leucócitos, combatem bactérias e infecções crônicas (BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017) e são os elementos celulares menos vulneráveis a variações sazonais (GOULART, 2004). Altas taxas de monócitos no sangue estão relacionadas a inflamações crônicas e infecções por bactérias e parasitas. Para uma defesa eficaz do tecido lesionado, os monócitos necessitam se diferenciar em macrófagos (STACY et al., 2011).

1.7.3.6 Basófilos

Os basófilos (Figura F) são leucócitos granulócitos pequenos, apresentam formato arredondado e grânulos citoplasmáticos basofílicos, podendo até mesmo camuflar o núcleo (FRYE, 1991; CAMPBELL, 2006). A função dos basófilos em répteis ainda não é muito bem conhecida, porém o aumento do percentual de basófilos pode estar associado a infecções

virais e hemoparasitoses (CAMPBELL, 2006). Os basófilos variam de 5% a 25% da contagem total (GOULART, 2004).

1.7.3.7 Heterófilos

De forma geral, os heterófilos (Figura 8 G) de répteis são homólogos aos neutrófilos de aves e mamíferos e são os granulócitos mais comuns no sangue periférico (STRIK et al., 2007; FRYE, 1991; STACY et al., 2011). Apresentam núcleo arredondado e muitos grânulos citoplasmáticos alongados. A morfologia dos heterófilos pode variar em um mesmo indivíduo, principalmente quanto a qualidade da coloração dos grânulos, e acredita-se que seja evidência de diferentes estágios de maturação, uma vez que essas células atingem o estágio de maturação na corrente sanguínea (ALLEMAN et al., 1999; SALAKIJI, 2002; BOUNOUS, 1996). Os heterófilos combatem infecções bacterianas (PITOL et al., 2008), estão relacionados com doenças inflamatórias e parasitemia (CAMPBELL, 2015) e representam de 20% a 40% da contagem total de células brancas (PITOL et al., 2008). Comumente apresentam diferenças sazonais na contagem diferencial de suas células (CAMPBELL, 2015).

1.7.3.8 Eosinófilos

Os eosinófilos (Figura 8 H) dos répteis se assemelham morfologicamente aos dos mamíferos, possuem citoplasma eosinofílico, núcleo único, ovalado e localizado na periferia da célula (STACY et al., 2011). São similares aos heterófilos quanto ao tamanho e à presença de grânulos citoplasmáticos, diferindo no formato, sendo que os grânulos dos eosinófilos são arredondados (FRYE, 1991; WILKINSON, 2004; CAMPBELL, 2006; CAMPBELL, 2015). Os eosinófilos possuem função principalmente relacionada à parasitemia; sua contagem relativa varia de 7% a 20% (GOULART, 2004). O número de eosinófilos é influenciado por fatores sazonais. Os valores podem aumentar em casos de parasitismo e estimulação imune inespecífica (STRIK et al., 2007).

1.7.3.9 Trombócitos

Os trombócitos (Figura 8 I) de répteis apresentam núcleo e formato elíptico e fusiforme. Realizam o controle da hemostasia, ou seja, participam do mecanismo de coagulação, assim como possuem a capacidade de se diferenciarem em eritrócitos e de realizar fagocitose, atuando ativamente na defesa do organismo (CAMPBELL, 2015). A observação de trombócitos em lâminas de esfregaço simples é rara, uma vez que o sangue é

coletado em tubos contendo anticoagulantes. No entanto, quando analisadas em sangue fresco (sem utilização de anticoagulantes), pode-se observar o fenômeno de trombocitopenia, que consiste na redução da quantidade de trombócitos circulantes, e normalmente em répteis, esse fenômeno é associado ao excesso de utilização dessas células ou à deficiência na sua produção, em que pode ser observada, também, formação de coágulos intravascular (FALCE, 2009).

1.7.4 Reação Inflamatória

A resposta inflamatória ocorre sempre que fatores quimiotáticos para células inflamatórias são liberados. As causas mais comuns são microrganismos parasitas (e suas toxinas), trauma físico e químico, morte de células por insuficiência circulatória e reações imunológicas. A taxa da resposta inflamatória depende da temperatura nos animais ectotérmicos como répteis, anfíbios e peixes; enquanto que nos endotérmicos, como em mamíferos e aves, ela é mais consistente e previsível (CAMPBELL, 2015).

O processo inflamatório começa com a fase aguda. A inflamação aguda causa dilatação capilar, aumento do fluxo sanguíneo na área afetada e aumento do diâmetro do lúmen dos capilares, o que permite que grandes proteínas séricas (como fibrinogênio e imunoglobulinas normalmente confinadas em circulação) cheguem aos tecidos afetados. Os leucócitos migram ativamente para o tecido afetado, sendo que as principais células do sangue incluem heterófilos, monócitos, linfócitos e trombócitos (CAMPBELL, 2015).

Os heterófilos são normalmente as primeiras células a chegarem ao local em que se necessita da resposta inflamatória. Quando os heterófilos chegam ao local da inflamação, eles são ativados, levando à fagocitose do agente invasor. O agente ingerido inicia uma cascata de eventos celulares que consiste desde a liberação de enzimas hidrolíticas (derivadas de grânulos citoplasmáticos) até a formação de ERO e outros fatores quimiotáticos, ocasionando, ao final da resposta, a desintegração geral da célula (CAMPBELL, 2015).

Um bom indicador para analisar respostas inflamatórias, ajustes fisiológicos e estresse crônico consiste em realizar a razão de heterófilos por linfócitos encontrados no sangue periférico a partir da contagem diferencial dos leucócitos. A razão indica que, a partir do momento que há um aumento da quantidade de heterofilos, há uma diminuição da quantidade de linfócitos circulantes (SIEGEL, 1908).

2 Objetivos

- Comparar os valores obtidos dos marcadores da bioquímica do estresse oxidativo, da bioquímica metabólica, dos marcadores hematológicos e citoquímicos de indivíduos *Chelonoidis carbonarius* provenientes de cativeiro, entre as estações seca e chuvosa, bem como entre machos e fêmeas;
- Verificar efeito sexo-específico da sazonalidade sobre os marcadores investigados.
- Estabelecer se há relação direta entre o perfil morfofuncional da série vermelha e leucocitária com a fisiologia do estresse oxidativo e metabólico de *Chelonoidis carbonarius* provenientes de cativeiro.
- Postular parâmetros de normalidade para condições de cativeiro a partir de uma população de *Chelonoidis carbonarius*, machos e fêmeas, provenientes de zoológico.

3 Metodologia

3.1 Animais estudados

Foram utilizados 15 animais para o estudo, todos provenientes do Zoológico Municipal “Missina Palmeira Zancaner” de Catanduva, Região Noroeste do Estado de São Paulo. O grupo foi constituído por jabutis adultos da espécie *Chelonoidis carbonarius*, sendo 10 machos e cinco fêmeas; a caracterização dos grupos encontra-se representada na Tabela 1. Os animais foram marcados no casco com esmalte (Figura 9) para que todas as análises ocorressem com os mesmos indivíduos. Para o estudo, foram utilizados todos os espécimes adultos de *C. carbonarius* do recinto. O tamanho e peso de cada indivíduo encontra-se no Apêndice A, de modo que pode ser observado que foram utilizados indivíduos de tamanho e peso semelhantes, todos adultos. No recinto existem alguns espécimes filhotes (Figura 10), o que comprova que os indivíduos apresentam comportamento de reprodução e estão bem ajustados ao recinto.

Tabela 1: Caracterização dos grupos de estudo, quanto ao sexo e à estação.

Indivíduo, sexo e estação.	Massa (Kg)	Comp. do casco (cm)	Largura do casco (cm)
<i>C. carbonarius</i> Fêmeas – Estação Chuvosa	6,00 ± 0,70	41,10 ± 1,81	37,00 ± 2,12
<i>C. carbonarius</i> Machos – Estação Chuvosa	6,25 ± 4,52	42,00 ± 10,70	37,75 ± 9,95
<i>C. carbonarius</i> Fêmeas – Estação Seca	6,16 ± 0,91	40,90 ± 1,88	36,70 ± 2,77
<i>C. carbonarius</i> Machos – Estação Seca	6,71 ± 4,58	41,75 ± 10,53	37,35 ± 9,32

Legenda: Representação da média e do desvio padrão da massa (em quilos) e do comprimento e largura do casco (em centímetros). Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 9: Representante dos indivíduos *C. carbonarius* do Zoológico Municipal Missina Palmeira Zancaner de Catanduva (Interior de São Paulo).



Legenda: A marcação dos indivíduos foi realizada no casco, com esmalte, a fim de garantir que as análises ocorressem com os mesmos indivíduos. Fonte: Autoria própria.

Figura 10: Filhote de *C. carbonarius* proveniente do recinto do Zoológico.



Legenda: A presença de indivíduos filhotes de *C. carbonarius* no recinto comprova a existência de comportamento sexual entre os indivíduos do recinto. Fonte: Autoria própria.

Os indivíduos *C. carbonarius* compartilham o recinto com indivíduos *Chelonoidis denticulatus*, e, muitas vezes, com outras espécies de animais como gatos, pombas e cutias (Figura 11 – A e E). O local apresenta-se devidamente higienizado, com abrigos, fonte de água e espaço suficiente, de acordo com a norma do IBAMA de 2008 (Figura 11). A coleta foi realizada após autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IBILCE/UNESP, nº. 197/2018 (Anexo A).

Figura 11: Recinto do Zoológico evidenciando fonte de água, comida, abrigo, diferentes espécies convivendo no mesmo espaço e espaço disponível.



Legenda: No recinto existe a coexistência de espécimes *C. carbonarius* com *C. denticulatus* e, por vezes, gatos, pombas e cutias (E). Fonte: Autoria própria.

A coleta de sangue ocorreu no recinto em que os animais se encontram, segundo metodologia descrita por Silva et al. (2012). O local de coleta foi higienizado com água destilada e álcool 70% e a punção foi realizada na veia margino-costal (Figura 12). A

quantidade de amostra coletada foi inferior ou igual a 1% do peso do corpo do animal, de modo a mitigar os danos causados pela extração de sangue. Os procedimentos se iniciaram por volta das 9h00 da manhã e se estenderam até as 11h00, em que as temperaturas são mais amenas.

Figura 12: Metodologia de coleta de sangue de jabutis segundo Silva et al. (2012).



Legenda: Punção da veia margino-costal após higienização com água destilada e álcool 70%. Fonte: Arquivos CEQ, 2019.

O macho #09 (Anexo A) apresentou hemorragia na segunda coleta, apesar de não apresentar mudanças bruscas de comportamento. As regiões das pernas apresentavam inchaço e vermelhidão (Figura 13); após a tentativa de coleta e posterior hemorragia, o indivíduo foi direcionado ao ambulatório e recebeu os devidos cuidados com administração de antibiótico e vitamina intravenosa. Os dados do jabuti #09 não foram considerados no presente estudo.

Figura 13: Jabuti macho #09 evidenciando regiões de inchaço e vermelhidão.



Legenda: Os dados do indivíduo não foram utilizados no estudo. Fonte: Autoria própria.

O sangue foi acondicionado em tubos identificados com anticoagulante heparina sódica e mantido sob refrigeração até a utilização, que não excedeu 24 horas, para evitar

degradação da amostra. Foram realizados o hemograma completo e a separação das alíquotas de plasma e hemolisado de papa de eritrócitos para análises bioquímicas de estresse oxidativo e bioquímica metabólica; as alíquotas foram guardadas em freezer -80°C até o momento das análises.

3.2 Período e Local das coletas

As coletas foram realizadas na estação chuvosa (Abril de 2019) e seca (Julho de 2019). A partir dos dados meteorológicos disponibilizados pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2019), a estação seca, na região de Catanduva (SP) ocorre entre os meses de Maio até Setembro, a partir da qual se inicia a estação chuvosa, de Outubro a Abril. A figura 14 (A e B) representa a temperatura média e precipitação pluviométrica anual da região de Catanduva; foram utilizados esses dados para a separação da estação seca e chuvosa na região. As figuras 15 e 16 (A, B, C, D e E) representam a precipitação, temperatura, umidade, insolação e pressão média das estações chuvosa e seca, respectivamente. O período reprodutivo dessa espécie ocorre de setembro a janeiro, compreendendo majoritariamente o período quente de estação chuvosa.

Segundo a classificação dos domínios climáticos proposta por Köppen-Geiger, a região de Catanduva representa uma região de clima tropical e pode ser definida como “Am”, caracterizando-se por possuir clima megatérmico (temperaturas superiores à 18°C) e chuvas de verão (Figura 14) (ALVARES et al., 2014).

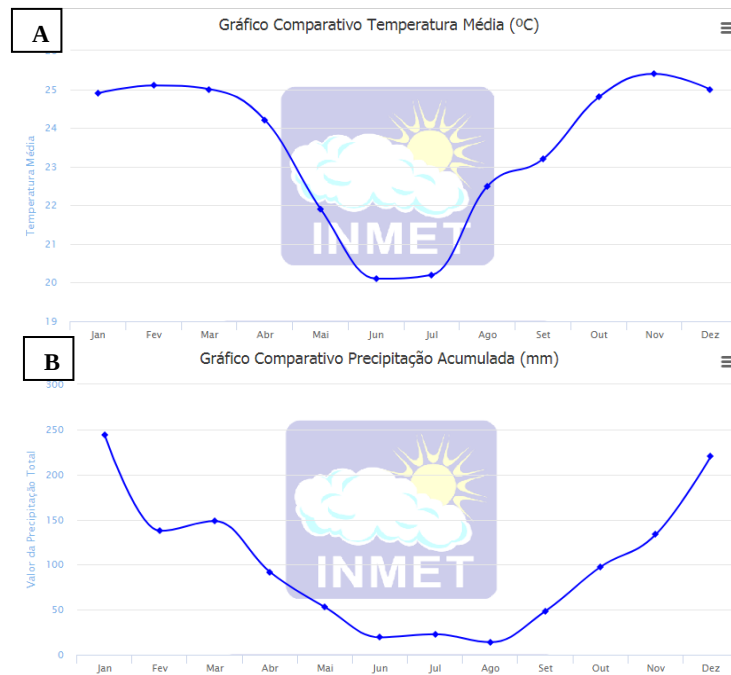
A precipitação média é caracterizada pela duração e intensidade média das chuvas em determinado período, representa a quantidade de água caída por unidade de tempo, normalmente expressa em milímetros por hora (VAREJÃO-SILVA, 2001). A precipitação, na região de Catanduva, foi maior no período da estação chuvosa, de acordo com os dados do INMET (2019).

A insolação consiste no número de horas as quais, durante o dia, o sol é completamente visível para um observador localizado na superfície terrestre, em um local com horizonte sem obstrução. Portanto, é o intervalo total de tempo em que o sol não esteve oculto por nuvens ou fenômenos atmosféricos de qualquer natureza (VAREJÃO-SILVA, 2001). A insolação, na região de Catanduva, foi maior no período da estação chuvosa, de acordo com os dados do INMET (2019).

Os experimentos foram realizados em diferentes estações do ano, porém com manutenção dos cuidados rotineiros no zoológico, a fim de identificar possíveis interferências

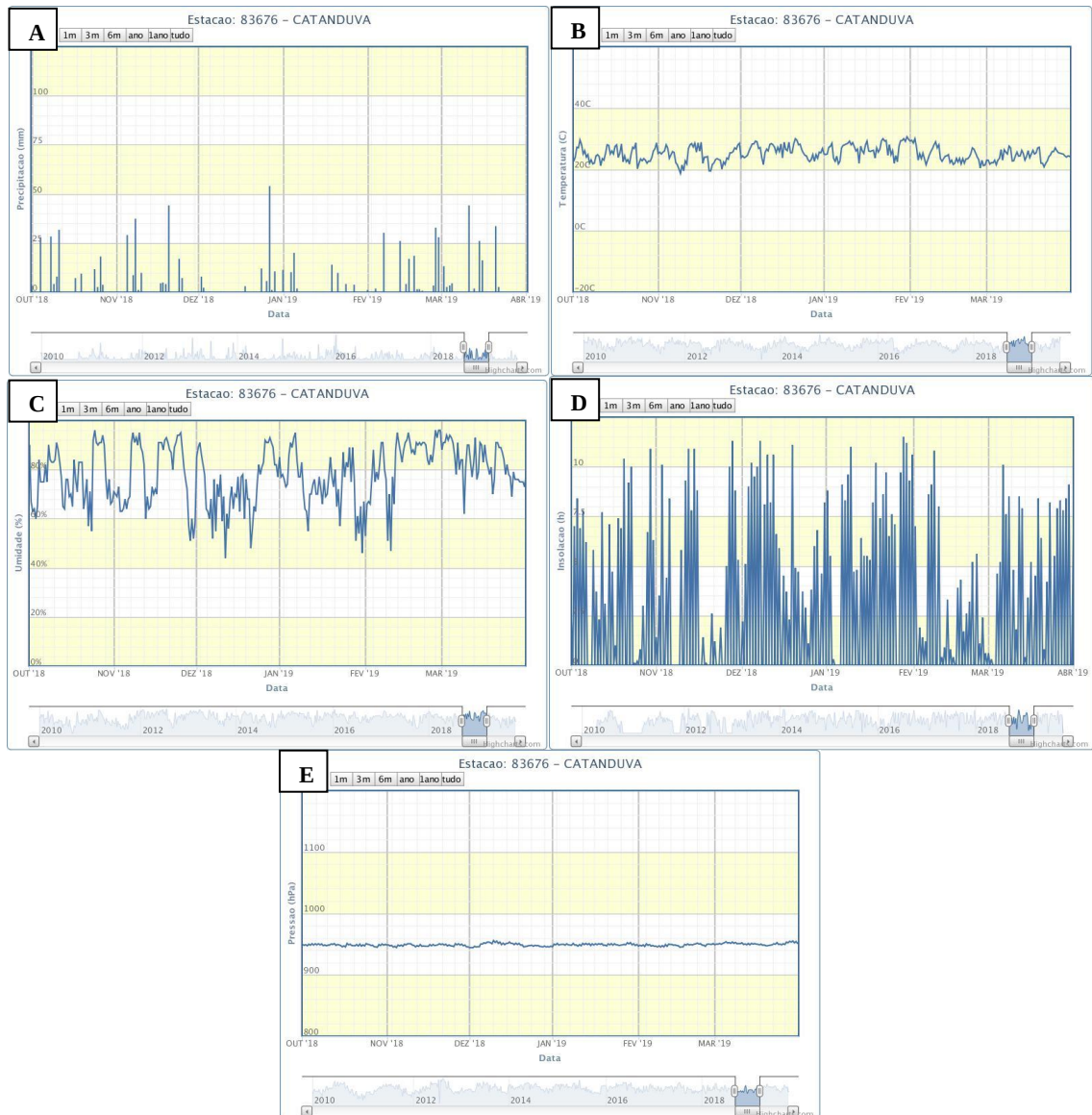
ambientais (quanto à estação do ano) e sexuais (quanto ao sexo biológico), e de estabelecer parâmetros de bem-estar animal regidos pelo zoológico.

Figura 14: Gráfico de temperatura média (A) e precipitação anual (B) do Estado de São Paulo – Estação 8367 - Catanduva.



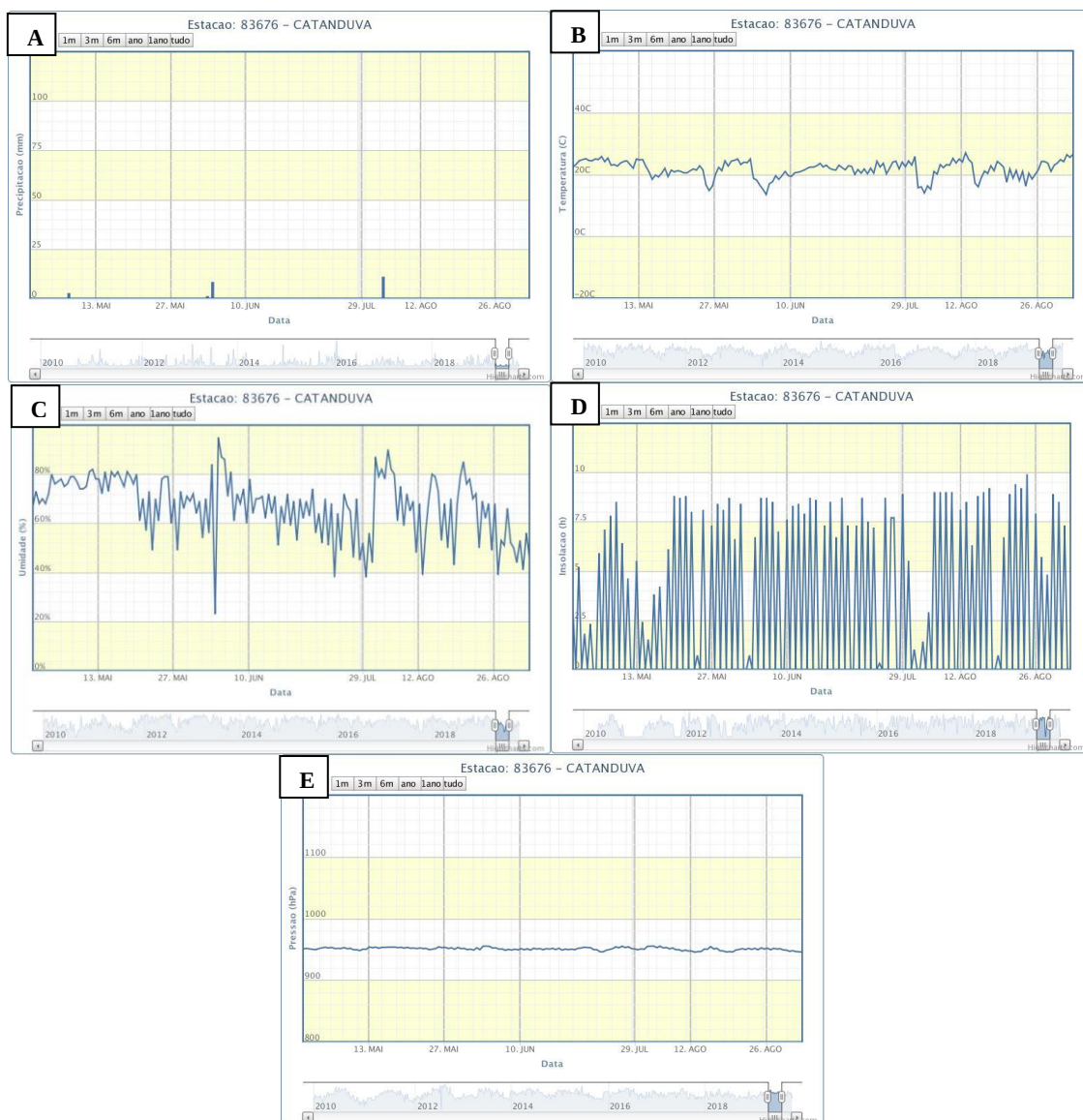
Fonte: INMET, 2019. Disponível em: < <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/graficosClimaticos>>.

Figura 15: Gráficos de precipitação (A), temperatura (B), umidade (C), insolação (D) e pressão (E) média no período da estação chuvosa do Estado de São Paulo – Estação 83676 - Catanduva.



Fonte: INMET, 2019. Disponível em: < http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_conv_graf>.

Figura 16: Gráficos de precipitação (A), temperatura (B), umidade (C), insolação (D) e pressão (E) média no período da estação seca do Estado de São Paulo – Estação 83676 - Catanduva.



Fonte: INMET, 2019. Disponível em: < http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_conv_graf>.

3.3 Marcadores do Estresse Oxidativo

3.3.1 Catalase

Como marcador antioxidante, foi analisada a atividade enzimática da catalase. As amostras de sangue foram diluídas 50 vezes em água destilada e sua atividade aferida pelo método de Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, por meio do decréscimo de absorbância em 240 nm. Os resultados foram expressos em U/mL de hemolisado.

3.3.2 Glutationa Peroxidase (GPx)

A análise da enzima Glutationa Peroxidase (GPx) foi realizada pela técnica de Sies et al. (1979), baseando-se na medida do decréscimo de absorbância a 340 nm, promovido durante a redução da glutathione oxidada (GSSG). A redução é catalisada pela glutathione reductase (GR) em presença de NADPH. Os resultados foram expressos em U/mL de hemolisado.

3.3.3 Glutationa S-Transferase (GST)

A atividade da enzima Glutationa S-Transferase (GST) foi avaliada segundo o método de Keen, Habig e Jakoby (1976), observando o aumento da absorbância em 340nm e monitorando a formação do conjugado 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida (GSH) catalisado pela Glutationa S-Transferase (GST). Os resultados foram expressos em U/mL de hemolisado.

3.3.4 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) foi mensurada utilizando um Kit-WST de reações (Sigma, Aldrich) seguindo protocolo proposto por Freitas et al. (2017). Para isso foi utilizando o sal de tetrazólio altamente solúvel em água de Dojindo, WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2Htetrazolium, monosodium salt) que produz um formazol solúvel em água após a redução com ânion superóxido. A taxa de redução do O₂ está linearmente relacionada à atividade da xantina oxidase e é inibida pela SOD. A absorvância a 440 nm é proporcional à quantidade de ânion superóxido, assim, a atividade de SOD foi tida como atividade de inibição e quantificada medindo a diminuição do desenvolvimento de cor a 440 nm. Os resultados foram expressos em U/mL de hemolisado.

3.3.5 Lesão em Biomoléculas (TBARS)

A dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) avalia o nível de lesão oxidativa em biomoléculas (principalmente por oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular). É um método amplamente utilizado na determinação de lesões causadas pelo estresse oxidativo, uma vez que quantifica o rompimento das biomembranas a partir da reação com as ERO. O método é baseado na reação do malondialdeído (MDA) e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e temperatura elevada, capaz de formar um complexo com absorção máxima em 535 nm (UCHIYAMA; MIHARA, 1978). Os resultados foram expressos em picomol por microlitro de plasma (pmol/mL de plasma).

3.4 Marcadores da Bioquímica Metabólica

As análises de concentração bioquímica de glicose, colesterol e triglicérides foram determinadas a partir do sistema enzimático (metodologia de Coloração Enzimática de Trinder), descrito pela LabTest Diagnósticos S.A. em seu manual de uso do kit comercial de Glicose Liquiform (Ref.: 133), Colesterol Liquiform (Ref.: 67) e Triglicérides Liquiform (Ref.: 87), respectivamente.

A partir dos resultados obtidos pela leitura em espectrofotômetro, realizou-se os seguintes cálculos para a determinação dos níveis de glicose, colesterol e triglicérides em plasma, expressos em mg/dL (Figura 17).

Figura 17: Cálculos para a obtenção dos níveis de glicose, colesterol e triglicérides em plasma sanguíneo.

Glicose (mg/dL) = Absorbância do Teste x Fator	
Fator de Calibração =	$\frac{100}{\text{Absorbância do Padrão}}$
Colesterol (mg/dL) = Absorbância do Teste x Fator	
Fator de Calibração =	$\frac{200}{\text{Absorbância do Padrão}}$
Triglicérides (mg/dL) = Absorbância do Teste x Fator	
Fator de Calibração =	$\frac{200}{\text{Absorbância do Padrão}}$

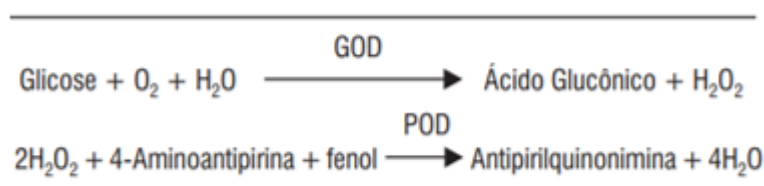
Fonte: LabTest Diagnóstica R.A.

3.4.1 Glicose

A análise da glicose (Figura 18) parte-se do princípio de que a glicose-oxidase catalisa a oxidação da glicose, resultando em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio que, por sua vez, reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, por meio de uma reação de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina de cor vermelha, cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose na amostra.

Deve-se utilizar 1,0 mL de Reagente 1 (tampão fosfato 30mmol/L; Glicose Oxidase 12.500 U/L; Peroxidase 800 U/L; 4-aminoantipirina 290 µmol/L; fenol 1mmol/L; azida sódica 7,5 mmol/L e surfactantes; pH 7,5) e 0,01 mL de Reagente Padrão (100 mg/dL de glicose) para definir a leitura do padrão e 0,01 mL de plasma das amostras para determinação da concentração de glicose na amostra a ser estudada. A amostra é lida sob comprimento de onda 505nm. Os resultados foram expressos em miligrama por decilitro (mg/dL).

Figura 18: Princípio ativo da Glicose Liquiform (Ref.: 133) para análise de glicose no plasma sanguíneo.



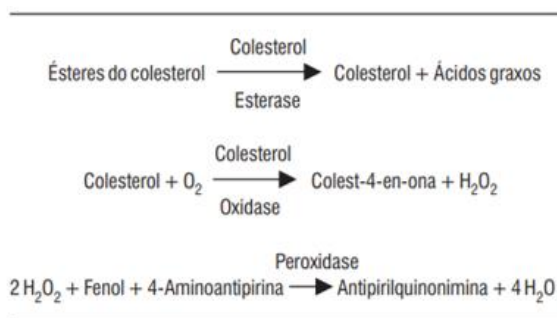
Fonte: LabTest Diagnóstica R.A.

3.4.2 Colesterol

Na análise do colesterol (Figura 19), os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase em colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase em colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina, que possui absorbância máxima em 500nm, cuja intensidade da coloração vermelha será diretamente proporcional à concentração de colesterol no sangue.

Deve-se utilizar 1,0 mL de Reagente 1 (tampão 50 mmol; fenol 24,0 mmol/L; colato de sódio 500 µmol/L; azida sódica 15 mmol/L; 4-aminoantipirina 500 µmol/L; colesterol esterase 250 U/L e peroxidase 1000 U/L; pH 7,0) com 0,01 mL de Reagente Padrão (200 mg/dL de colesterol) e com 0,01 mL de plasma das amostras para definição da concentração de glicose na amostra a ser estudada. Os resultados foram expressos em miligrama por decilitro (mg/dL).

Figura 19: Princípio ativo da Colesterol Liquiform (Ref.: 76) para análise de colesterol no plasma sanguíneo.



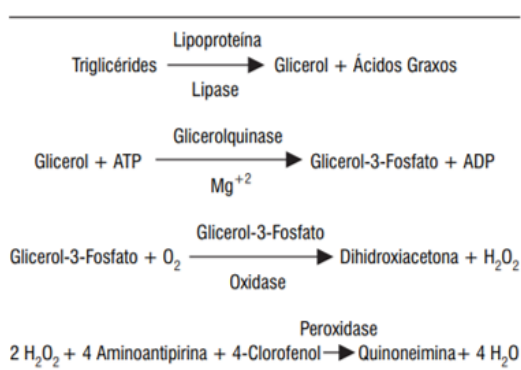
Fonte: LabTest Diagnóstica R.A.

3.4.3 Triglicérides

Para a quantificação dos níveis de triglicérides (Figura 20), a lipoproteína lipase provoca a hidrólise dos triglicérides liberando glicerol, que será convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Esse é oxidado em dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio, na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máxima absorbância em 505nm, cuja intensidade da coloração vermelha é diretamente proporcional à concentração de triglicérides no sangue.

Deve-se reagir 1,0 mL de Reagente 1 (tampão 50 mmol/L; acetato de magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 5 mmol/L; 4-aminoantipirina 300 µmol/L; ATP 1,0 mmol/L; lipase da lipoproteína 1400 U/L; glicerolquinase 1000 U/L e azida sódica 7 mmol/L; pH 6,9) com 0,01 mL de Reagente Padrão (200 mg/dL de triglicérides) e com 0,01 mL de plasma das amostras para definição da concentração de glicose na amostra a ser estudada. Os resultados foram expressos em miligrama por decilitro (mg/dL).

Figura 20: Princípio ativo da Triglicérides Liquiform (Ref.: 87) para análise de triglicérides no plasma sanguíneo.



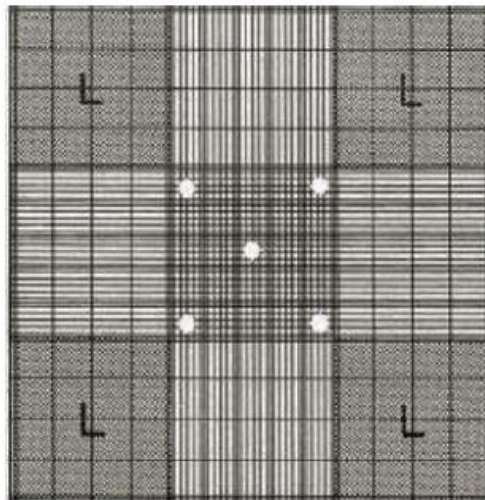
Fonte: LabTest Diagnóstica R.A.

3.5 Marcadores Hematológicos

3.5.1 Contagem Total de Eritrócitos e Leucócitos

Devido à presença de núcleo nas células vermelhas e nos trombócitos, a contagem celular dos répteis deve ser realizada de forma manual e não automatizada (FRYE, 1991), uma vez que não existe equipamentos automatizados para esse grupo. Seus métodos permitem calcular o número estimado de células de um determinado volume de amostra. A técnica consiste em colocar uma solução contendo amostra de sangue diluída na solução Natt and Herrick (1952). Em instantes, os elementos sedimentam no fundo da câmara, o qual é todo quadriculado, permitindo realizar os cálculos necessários para a contagem das células, obtendo resultados expressos em μL . A figura 21 apresenta os quadrantes em que são realizadas as contagens; nos quadrantes de letra L contam-se os leucócitos totais, enquanto que nos quadrantes com os círculos brancos contam-se os eritrócitos totais. Os resultados foram expressos em $10^3/\mu\text{L}$.

Figura 21: Imagem microscópica representando o interior da Câmara de Neubauer.



Legenda: Imagem microscópica representando o interior da Câmara de Neubauer, onde é realizada a contagem das células sanguíneas. Os quadrantes representados pela letra L são utilizados para contagem de leucócitos, enquanto que os quadrantes com os círculos brancos são utilizados para a contagem de eritrócitos. Fonte: Adaptado de BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017.

3.5.2 Hematócrito

O hematócrito representa um modo simples para verificar relação entre os glóbulos vermelhos, os glóbulos brancos e as plaquetas com o volume de plasma, ou seja, determinar a porcentagem de células no sangue (BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017).

A determinação do hematócrito foi realizada pela técnica do microhematócrito, que consiste no preenchimento, por sangue, de um tubo capilar 75 x 1,0 mm, posteriormente vedado em uma de suas extremidades e submetido à centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm, a temperatura ambiente. Em seguida, o volume de células foi obtido a partir da leitura do microcapilar em um cartão de referência de hematócrito. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

3.5.3 Dosagem de Hemoglobina Circulante

A dosagem de hemoglobina circulante fornece a concentração de hemoglobina total do sangue a partir do método de cianometahemoglobina. Assim, a hemoglobina e todos os seus derivados são transformados em cianometahemoglobina por um reativo especial à base de cianeto e, em seguida, é quantificada por espectrofotometria (comprimento de onda a 540 nm) (BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017). Os resultados foram expressos em grama por decilitro (g/dL).

3.5.4 Índices Hematimétricos – Volume Globular Médio (VGM)

Indica o volume médio de eritrócitos expresso em fentolitros (fL). É obtido dividindo-se o volume globular contido em um mm³ de sangue (fornecido pelo hematócrito) pelo número de eritrócitos presentes no mesmo volume (obtido pela contagem). Então, $VGM = (Ht \times 10) \div H$ (milhões/ μL) (BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017). Os resultados foram expressos em fentolitro (fL).

3.5.5 Índices Hematimétricos – Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM)

Designa o índice médio da porcentagem de hemoglobina por eritrócito. O cálculo consiste em dividir o resultado da dosagem de hemoglobina pelo hematócrito, relacionando assim a hemoglobina à unidade de volume do eritrócito. O resultado geralmente é expresso em g/dL, como indica a fórmula: $CHGM = (Hb \times 100) \div (Ht)$ (BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017). Os resultados foram expressos em grama por decilitro (g/dL).

3.5.6 Índices Hematimétricos – Hemoglobina Globular Média (HGM)

Indica a quantidade total de hemoglobina expressa em picogramas (pg). É obtida relacionando-se o resultado da dosagem de hemoglobina ao número de eritrócitos existentes no mesmo volume. Então, $HGM = (Hb \times 10) \div H$ (milhões/ μL) (BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017). Os resultados foram expressos em picograma (pg).

3.5.7 Dosagem de Oxihemoglobina, Metahemoglobina e Hemicromos

Para medir a concentração de oxihemoglobina, metahemoglobina e hemicromos, primeiramente, foi avaliada a concentração de hemoglobina circulante pelo método de Drabkin, e, posteriormente, o sangue foi centrifugado e a papa de eritrócitos foi lisada em água ultra pura para que a concentração de hemoglobinas final fosse de 20 μM (concentração de hemoglobinas padrão de seres humanos). Posteriormente, essa solução foi lida por espectrofotometria nos comprimentos de onda 577 nm, 630 nm e 560 nm. Os cálculos para a determinação da concentração de oxihemoglobina, metahemoglobina e hemicromos estão expressos na figura 22 (WINTERBOURN, 1990; BAYER et al., 2016).

Figura 22: Cálculos utilizados para determinação da concentração de oxihemoglobina, metahemoglobina e hemicromos.

$$\begin{aligned} [\text{Oxyhemoglobin}] &= 119A_{577} - 39A_{630} - 89A_{560} \\ [\text{Methemoglobin}] &= 28A_{577} + 307A_{630} - 55A_{560} \\ [\text{Hemichrome}] &= -133A_{577} - 114A_{630} \end{aligned}$$

Fonte: Bayer et al., 2016.

O cálculo descrito por Winterbourn (1990) e Bayer et al. (2016) não foi capaz de expressar o valor de hemicromos presentes nas amostras de jabutis, por estarem abaixo do limite de detecção da mesma.

3.6 Marcadores Citoquímicos

3.6.1 Coloração por Prata

A coloração por impregnação de íons prata tem como objetivo corar os nucléolos ou corpúsculos nucleolares das células estudadas, desse modo, quanto maior o tamanho dos corpúsculos, assim como quanto maior a quantidade encontrada, maior a atividade metabólica do grupo celular estudado. As regiões organizadoras nucleolares (RONs) também são conhecidas como AgNORs, pelo fato de serem reativas com a prata, uma vez que destaca proteínas ligadas ao RNA ribossômico (CHACUR et al., 2015). Por esse motivo, essa técnica é muito utilizada como bioindicador da saúde do organismo (TAVARES; AZEREDO-OLIVEIRA, 1997).

As lâminas de esfregaço simples foram preparadas a partir de amostras de sangue total e coradas pela técnica de Impregnação por Nitrato de Prata (AgNOR). As lâminas de esfregaço foram tratadas com uma gota de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1,0 mL para cada 100 mL de solução total). Sobre essa gota foram adicionadas duas gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50%. A incubação foi realizada na estufa a 60°C de 4 a 7 minutos, a partir do monitoramento da coloração. Posteriormente as lâminas foram lavadas com água destilada e secas ao ar livre; a análise se deu por microscopia de luz (Nikon Eclipse, Modelo E200), sob óleo de imersão com aumento de 100 vezes (HOWELL; BLACK, 1980). Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de células que apresentaram um nucléolo, dois nucléolos ou três ou mais nucléolos.

3.6.2 Coloração por Feulgen

A coloração de Feulgen permite avaliar quantitativa e qualitativamente a presença de micronúcleos, uma vez que a Reação de Feulgen tem o objetivo de corar apenas regiões que possuem DNA (MELLO; VIDAL, 1978; POLETTA et al., 2008). O teste é amplamente utilizado no monitoramento de danos causados aos indivíduos estudados. O resultado foi expresso em porcentagem (%).

3.6.3 Diferencial de Leucócitos por Panótico

A contagem diferencial de leucócitos permite, a partir da análise de esfregaços sanguíneos corados com Panótico ou Giemsa, identificar a variedade de leucócitos e estabelecer suas proporções relativas. O objetivo é obter o valor percentual de cada tipo leucocitário no sangue circulante.

A contagem foi realizada em lâminas de esfregaços sanguíneos simples fixados e corados com corante Panótico Rápido, por microscopia de luz (Nikon Eclipse, Modelo E200), sob óleo de imersão com aumento de 100 vezes. Contou-se, ao total, 100 leucócitos, diferenciando-os em linfócitos, monócitos, azurófilos, basófilos, heterófilos e eosinófilos. O resultado foi expresso em porcentagem (%).

3.6.4 Razão Heterófilo por Linfócito

A razão heterófilo por linfócito é capaz de expressar diversas condições a que o organismo está sendo submetido. No presente estudo optou-se por utilizar a razão como indicativo de estresse. A partir dos valores obtidos por meio da contagem diferencial de leucócitos, foi calculado o índice de estresse, obtido a partir da divisão no número absoluto de heterófilos pelo de linfócitos. A razão de heterófilos por linfócitos indica uma condição de estresse crônico, a partir do momento que há um aumento da quantidade de heterófilos em razão da diminuição de linfócitos (SIEGEL, 1908). Quanto mais próximo de 1 o valor resultate, maior o índice de estresse.

4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no *software Statistica 9.0* (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), enquanto os gráficos foram realizados no *software GraphPad Prisma* versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). As análises foram realizadas com a retirada dos outliers e extremos. A normalidade dos dados foi verificada usando *Normal Probability Plots of Residuals*. Para as comparações entre os sexos, foi adotado o *General Linear Model* (GLM), no formato ANOVA. Para as comparações entre os períodos do ano, foi adotado o GLM no formato ANOVA para medidas repetidas. Os dados que não apresentaram distribuição linear dos resíduos (mesmo após transformação em logaritmo na base 10 e na base 2) foram comparados a partir do teste de Mann Whitney (para dados não paramétricos e não pareados). Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

A caracterização dos parâmetros de normalidade dos marcadores avaliados foi expressa em média (intervalo de confiança de 95%) na elaboração dos valores de referência.

5 Resultados

Os dados foram agrupados nas categorias: marcadores bioquímicos, hematológicos e citoquímicos. Os marcadores bioquímicos foram a dosagem das enzimas Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione S-Transferase (GST) e Superóxido Dismutase (SOD) analisadas em hemolisado de papa de eritrócitos e, em plasma sanguíneo, a avaliação das lesões em biomembranas (TBARS), a dosagem de Glicose, de Colesterol e de Triglicérides. Os marcadores hematológicos consistiram na Contagem Total de Eritrócitos, na Contagem Total de Leucócitos, no Hematócrito, na Dosagem de Hemoglobina Circulante, nos cálculos dos índices hematimétricos, sendo o Volume Globular Médio (VGM), a Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM), a Hemoglobina Globular Média (HGM), a Dosagem de Oxihemoglobina e Metahemoglobina, todos realizados em sangue total. Os marcadores citoquímicos foram a Porcentagem de Nucléolos a partir da coloração por Prata, a Porcentagem de Micronúcleos pela coloração de Feulgen, o Diferencial de Leucócitos e a Razão Heterófilo por Linfócito pela coloração de Panótico, todos a partir de lâminas de esfregaço sanguíneo simples.

As comparações foram realizadas, primeiramente, entre os sexos (fêmeas e machos) considerando todas as estações (Tabela 2), a fim de determinar se há diferença nas respostas bioquímicas, hematológicas e citoquímicas; também, dentro de cada estação: chuvosa (Tabela 3) e seca (Tabela 4).

Posteriormente, foram realizadas comparações entre as estações do ano (seca e chuvosa) tanto considerando o grupo jabutis (sem diferenciação de sexo - Tabela 5) quanto apenas no grupo das fêmeas (Tabela 6) e apenas no grupo dos machos (Tabela 7), para inferir se há diferenças nas respostas bioquímicas, metabólicas e citoquímicas ao longo das estações do ano, ou seja, se há interferência das mudanças sazonais/ambientais.

A partir deste momento, os dados serão expressos em tópicos: Comparação entre fêmeas e machos (considerando as duas estações); Comparação entre fêmeas e machos dentro da estação chuvosa; Comparação entre fêmeas e machos dentro da estação seca; Comparação entre as estações seca e chuvosa (considerando o grupo jabutis, sem diferenciação de sexo); Comparação entre as estações seca e chuvosa no grupo das fêmeas e Comparação entre as estações seca e chuvosa no grupo dos machos.

5.1 Comparação entre fêmeas e machos independente da estação do ano

A partir da comparação entre os sexos (independente da estação do ano), esperava-se que os indivíduos com sexo biológico diferente apresentassem diferenças estatísticas no comportamento bioquímico analisado. Esperava-se que as fêmeas apresentassem maiores níveis de Glicose, Colesterol, Triglicérides (pelo fato de estocarem e gastarem energia para o comportamento sexual), maiores valores de razão heterófilo/linfócito, juntamente com maiores valores de lesão em biomembranas (TBARS), maiores dosagens das enzimas antioxidantes (CAT, GPx, SOD) e de biotransformação (GST), a fim de combater os danos oxidativos gerados pelo TBARS. Esperava-se, ainda, maior porcentagem de micronúcleo e maior atividade nucleolar no grupo das fêmeas, uma vez que se acreditava anteriormente ao estudo, que as fêmeas, pelo gasto energético no comportamento sexual, sofressem maior estresse.

No entanto, por meio da comparação entre os sexos (fêmeas e machos, sem separação entre estações seca e chuvosa – Tabela 2), percebe-se que não houve diferença nos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, porém houve diferença nos marcadores da bioquímica metabólica, nos marcadores hematológicos e citoquímicos.

A dosagem de colesterol ($254,56 \pm 72,94$ x $194,29 \pm 66,94$; $p=0,03$), triglicérides ($505,78 \pm 358,03$ x $129,92 \pm 58,11$; $p=0,001$) e a porcentagem de basófilos ($19,90 \pm 10,17$ x $12,73 \pm 6,35$; $p=0,0323$) foram maiores no grupo das fêmeas, enquanto o hematócrito ($26,45 \pm 7,11$ x $21,1 \pm 4,90$; $p=0,0014$), a dosagem de hemoglobina ($6,65 \pm 2,28$ x $4,58 \pm 1,40$; $p=0,0003$) e a porcentagem de eosinófilos ($10,47 \pm 5,73$ x $4,40 \pm 2,91$; $p=0,0048$) foram maiores nos machos.

Tabela 2: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre fêmeas e machos, nas estações Seca e Chuvosa.

Comparação entre Fêmeas e Machos (Estação Seca e Chuvosa)			
	Fêmeas	Machos	P
Marcadores Bioquímicos			
CAT – Catalase (U/mL)	5237,68 ± 1738,54	6300,96 ± 4078,98	p=0,79
GPx - Glutathione Peroxidase (U/mL)	17,87 ± 6,71	22,98 ± 10,05	p=0,28
GST - Glutathione S-Transferase (U/mL)	7,14 ± 1,27	7,11 ± 1,62	p=0,56
SOD – Superóxido Dismutase (U/mL)	5344,00 ± 1202	5397,16 ± 880,24	p=0,71
TBARS - Lesão em Biomoléculas (pmol/mL de plasma)	2946,00 ± 557,30	3141,47 ± 463,47	p=0,19
Glicose (mg/dL)	51,16 ± 16,63	61,42 ± 20,91	p=0,43
Colesterol (mg/dL)	254,56 ± 72,94	194,29 ± 66,94	p=0,03 *
Triglicérides (mg/dL)	366,00 ± 93,31	129,92 ± 58,11	p=0,001 *
Marcadores Hematológicos			
Eritrócitos totais (10 ³ µL)	637 ± 144,26	780,78 ± 325,53	p=0,15
Leucócitos totais (10 ³ µL)	275,4 ± 125,1	206,78 ± 82,19	p=0,07
Hematócrito (%)	21,1 ± 4,90	26,45 ± 7,11	p=0,0014 *
Dosagem de Hemoglobina Total (g/dL)	4,58 ± 1,40	6,65 ± 2,28	p=0,0003 *
VGM (fL)	354,61 ± 134,36	388,20 ± 168,49	p=0,49
CHGM (g/dL)	22,63 ± 3,26	27,81 ± 18,64	p=0,91
HGM (pg)	76,82 ± 39,36	103,13 ± 59,94	p=0,21
Oxihemoglobina (µM)	24,83 ± 12,54	25,51 ± 9,22	p= 0,90
Metahemoglobina (µM)	90,25 ± 63,40	62,84 ± 36,40	p= 0,15
Marcadores Citoquímicos			
Coloração de Prata (%)			
1 Nucléolo	52,30 ± 15,54	61,00 ± 13,56	p= 0,12
2 Nucléolos	38,00 ± 13,04	30,44 ± 10,59	p= 0,11
3 ou mais Nucléolos	9,70 ± 7,81	9,44 ± 5,97	p= 0,86
Coloração de Feulgen (%)			
Micronúcleo	5,01 ± 1,69	5,56 ± 4,64	p= 0,64
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)			
Basófilos	19,90 ± 10,17	12,73 ± 6,35	p= 0,032333 *
Eosinófilos	4,40 ± 2,91	10,47 ± 5,73	p= 0,004822 *
Heterófilos	10,90 ± 8,27	11,89 ± 8,04	p= 0,81
Azurófilo	14,00 ± 5,47	10,68 ± 5,85	p= 0,13
Linfócitos	46,40 ± 10,09	48,94 ± 7,61	p= 0,38
Monócitos	4,40 ± 1,34	5,26 ± 2,68	p= 0,41
Razão Heterófilo/Linfócito (un)	0,26 ± 0,20	0,24 ± 0,16	p= 0,74

Legenda: VGM - Volume Globular Médio (fL), CHGM - Concentração de Hemoglobina Média (g/dL) e HGM - Hemoglobina Globular Média (pg). Valores expressos em média ± desvio padrão. Teste estatístico: *General Linear Model* (GLM) no formato ANOVA. Teste estatístico para hematócrito (dados não lineares e não paramétricos): Mann-Whitney. Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Comparação entre fêmeas e machos na estação chuvosa

Na comparação entre os sexos dentro da estação chuvosa (período reprodutivo da espécie estudada), esperava-se que as fêmeas apresentassem maiores níveis de Glicose, Colesterol, Triglicérides (devido ao gasto de energia para o comportamento sexual), maiores valores de razão heterófilo/linfócito, juntamente com maiores valores de lesão em biomembranas (TBARS), maiores dosagens das enzimas antioxidantes (CAT, GPx, SOD) e de biotransformação (GST), a fim de combater os danos oxidativos gerados pelo TBARS. Esperava-se, ainda, maior porcentagem de micronúcleo e maior atividade nucleolar no grupo das fêmeas, uma vez que se acreditava anteriormente ao estudo, que as fêmeas, pelo gasto energético no comportamento sexual, sofressem maior estresse no período chuvoso.

No entanto, em se tratando da comparação entre os sexos dos indivíduos na estação chuvosa (Tabela 3), percebe-se que não houve diferença na resposta da bioquímica do estresse oxidativo, na bioquímica metabólica e no perfil citoquímico, porém houve no perfil hematológico.

O hematócrito ($26,5 \pm 8,95$ x $18,4 \pm 5,31$; $p=0,019$) e a dosagem de hemoglobina ($5,58 \pm 1,12$ x $3,67 \pm 0,66$; $p=0,000067$) foram maiores nos machos, de forma que, pode-se inferir que na estação chuvosa, os machos investem mais na porcentagem de volume de células por plasma (hematócrito) e na dosagem de hemoglobina circulante do que as fêmeas.

Tabela 3: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre fêmeas e machos, dentro da estação chuvosa.

Comparação entre Fêmeas e Machos (Estação Chuvosa)			
	Fêmeas	Machos	P
Marcadores Bioquímicos			
CAT – Catalase (U/mL)	5757,04 ± 2438,396	6575,70 ± 4590,434	p=0,71
GPx - Glutathione Peroxidase (U/mL)	13,19 ± 5,87	17,66 ± 8,03	p=0,57
GST - Glutathione S-Transferase (U/mL)	7,63 ± 1,70	8,41 ± 1,15	p=0,30
SOD – Superóxido Dismutase (U/mL)	5831,58 ± 1199,15	5584,80 ± 997,75	p=0,89
TBARS - Lesão em Biomoléculas (pmol/mL de plasma)	2755,70 ± 680,37	2882,63 ± 467,50	p=0,51
Glicose (mg/dL)	55,93 ± 16,11	64,59 ± 27,47	p=0,70
Colesterol (mg/dL)	259,69 ± 79,98	199,96 ± 81,00	p=0,22
Triglicérides (mg/dL)	644,83 ± 398,45	286,75 ± 114,05	p=0,07
Marcadores Hematológicos			
Eritrócitos totais (10 ³ uL)	672 ± 163,11	876,5 ± 375,57	p=0,19
Leucócitos totais (10 ³ µL)	222,2 ± 124,20	181,4 ± 71,63	p=0,30
Hematócrito (%)	18,4 ± 5,31	26,5 ± 8,95	p=0,0190 *
Dosagem de Hemoglobina Total (g/dL)	3,67 ± 0,66	5,58 ± 1,12	p=0,000067 *
VGM (fL)	289,763 ± 101,372	319,94 ± 99,64	p=0,61
CHGM (g/dL)	20,6568 ± 3,16	27,28 ± 24,48	p=0,86
HGM (pg)	58,31 ± 19,05	81,34 ± 60,42	p=0,51
Oxihemoglobina (µM)	30,96 ± 15,05	29,52 ± 10,83	p= 0,85
Metahemoglobina (µM)	133,16 ± 66,56	82,28 ± 41,49	p= 0,11
Marcadores Citoquímicos			
Coloração de Prata (%)			
1 Nucléolo	55,40 ± 15,01	62,40 ± 14,08	p= 0,35
2 Nucléolos	35,20 ± 11,25	27,70 ± 8,66	p= 0,16
3 ou mais Nucléolos	9,40 ± 8,20	9,90 ± 6,47	p= 0,97
Coloração de Feulgen (%)			
Micronúcleo	4,50 ± 2,00	3,14 ± 2,12	p= 0,31
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)			
Basófilos	17,60 ± 3,36	12,50 ± 6,41	p= 0,15
Eosinófilos	5,00 ± 2,73	9,30 ± 5,35	p= 0,13
Heterófilos	9,00 ± 10,31	12,80 ± 9,17	p= 0,54
Azurófilo	13,40 ± 5,59	10 ± 5,49	p= 0,22
Linfócitos	51,00 ± 8,27	49,70 ± 7,25	p= 0,93
Monócitos	4,00 ± 1,22	5,70 ± 2,94	p= 0,30
Razão Heterófilo/Linfócito (un)	0,19 ± 0,25	0,26 ± 0,18	p= 0,66

Legenda: VGM - Volume Globular Médio (fL), CHGM - Concentração de Hemoglobina Média (g/dL) e HGM - Hemoglobina Globular Média (pg). Valores expressos em média ± desvio padrão. Teste estatístico: *General Linear Model* (GLM) no formato ANOVA. Teste estatístico para hematócrito (dados não lineares e não paramétricos): Mann-Whitney. Fonte: Elaborado pela autora.

5.3 Comparação entre fêmeas e machos na estação seca

Na comparação entre os sexos dos indivíduos dentro da estação seca, ou seja, no período não reprodutivo da espécie, não era esperada diferença estatística no comportamento bioquímico analisado. Porém, no que tange a comparação entre os sexos dos indivíduos dentro da estação seca (Tabela 4), percebe-se que não houve diferença estatística na resposta da bioquímica do estresse oxidativo, porém houve diferença na bioquímica metabólica e no perfil da hematologia. A dosagem de triglicérides ($505,78 \pm 358,03$ x $129,92 \pm 58,11$; $p=0,0007$) foi muito maior no grupo das fêmeas, enquanto a dosagem de hemoglobina ($7,85 \pm 2,69$ x $5,48 \pm 1,38$; $p=0,03$) e a porcentagem de eosinófilos ($11,77 \pm 6,18$ x $3,80 \pm 3,27$; $p=0,0209$) foram maiores nos machos.

Tabela 4: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre fêmeas e machos, dentro da estação seca.

Comparação entre Fêmeas e Machos (Estação Seca)			
	Fêmeas	Machos	P
Marcadores Bioquímicos			
CAT – Catalase (U/mL)	4718,31 ± 424,91	5995,70 ± 3678,389	p=0,99
GPx - Glutathione Peroxidase (U/mL)	22,55 ± 3,46	28,88 ± 8,95	p=0,16
GST - Glutathione S-Transferase (U/mL)	6,11 ± 1,54	6,05 ± 1,08	p=0,93
SOD – Superóxido Dismutase (U/mL)	4855,91 ± 1103,826	5188,69 ± 728,38	p=0,50
TBARS - Lesão em Biomoléculas (pmol/mL de plasma)	3137,12 ± 380,75	3429,07 ± 246,23	p=0,10
Glicose (mg/dL)	46,38 ± 17,47	57,91 ± 10,40	p=0,43
Colesterol (mg/dL)	249,42 ± 74,23	187,99 ± 51,16	p=0,09
Triglicérides (mg/dL)	505,78 ± 358,03	129,92 ± 58,11	p=0,000739 *
Marcadores Hematológicos			
Eritrócitos totais (10 ³ µL)	602 ± 130,98	674,44 ± 235,73	p=0,54
Leucócitos totais (10 ³ µL)	328,6 ± 112,64	235 ± 87,89	p=0,10
Hematócrito (%)	23,8 ± 2,77	26,4 ± 5,16	p=0,08
Dosagem de Hemoglobina Total (g/dL)	5,48 ± 1,38	7,84 ± 2,69	p=0,03 *
VGM (fL)	419,46 ± 140,81	464,058 ± 201,01	p=0,60
CHGM (g/dL)	22,72 ± 3,68	28,40 ± 10,34	p=0,55
HGM (pg)	95,32 ± 47,59	127,34 ± 52,19	p=0,27
Oxihemoglobina (µM)	18,70 ± 5,79	21,06 ± 4,12	p= 0,39
Metahemoglobina (µM)	47,34 ± 3,61	41,24 ± 6,91	p= 0,09
Marcadores Citoquímicos			
Coloração de Prata (%)			
1 Nucléolo	49,20 ± 17,15	59,25 ± 13,63	p= 0,26
2 Nucléolos	40,80 ± 15,385	33,87 ± 12,31	p= 0,38
3 ou mais Nucléolos	10,00 ± 8,36	8,87 ± 5,66	p= 0,77
Coloração de Feulgen (%)			
Micronúcleo	5,52 ± 1,34	8,26 ± 5,28	p= 0,28
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)			
Basófilos	22,20 ± 14,42	13,00 ± 6,67	p= 0,12
Eosinófilos	3,80 ± 3,27	11,77 ± 6,18	p= 0,020999 *
Heterófilos	12,80 ± 6,22	10,88 ± 6,97	p= 0,61
Azurófilo	14,60 ± 5,94	11,44 ± 6,48	p= 0,38
Linfócitos	41,80 ± 10,37	48,11 ± 8,34	p= 0,23
Monócitos	4,80 ± 1,48	4,77 ± 2,43	p= 0,98
Razão Heterófilo/Linfócito (un)	0,32 ± 0,15	0,22 ± 0,14	p= 0,24

Legenda: VGM - Volume Globular Médio (fL), CHGM - Concentração de Hemoglobina Média (g/dL) e HGM - Hemoglobina Globular Média (pg). Valores expressos em média ± desvio padrão. Teste estatístico: *General Linear Model* (GLM) no formato ANOVA. Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 Comparação entre estações seca e chuvosa

Considerando que os jabutis são animais ectotérmicos e respondem fisiologicamente às mudanças abióticas do meio, esperava-se que os indivíduos apresentassem diferenças estatísticas em quase todos os marcadores analisados na comparação entre as estações seca e chuvosa. Vale ressaltar que a estação seca apresenta características estressoras como: baixas temperaturas e baixa precipitação. Esperava-se, portanto, que a estação seca fosse mais estressora e apresentasse maiores níveis de TBARS, juntamente com maiores níveis de todas as enzimas antioxidantes (CAT, GPx, SOD) e de biotransformação (GST), assim como maior porcentagem de micronúcleo e nucléolos ativos. Em relação à estação chuvosa, por ser a com maior atividade dos indivíduos, esperava-se maiores níveis de oxihemoglobina, metahemoglobina, glicose, colesterol e triglicérides.

Entretanto, quanto à comparação entre as estações do ano (seca e chuvosa considerando o grupo jabutis, sem diferenciação entre machos e fêmeas – Tabela 5), percebe-se que houve diferença estatística na resposta de todos os parâmetros analisados (bioquímicos, hematológicos e citológicos). A atividade das enzimas Glutathione S-Transferase (GST – $8,15 \pm 1,35$ x $6,07 \pm 1,20$; $p=0,0011$) e Superóxido Dismutase (SOD – $5667,05 \pm 1032,13$ x $5069,84 \pm 853,68$; $p=0,0043$), e a dosagem de triglicérides ($406,11 \pm 290,26$ x $264,16 \pm 276,49$; $p=0,0024$), assim como as dosagens de oxihemoglobina ($30,00 \pm 11,86$ x $20,21 \pm 4,70$; $p=0,0085$) e metahemoglobina ($99,24 \pm 54,67$ x $43,42 \pm 6,52$; $p=0,0014$), foram maiores na estação chuvosa. A atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx – $26,62 \pm 7,93$ x $16,17 \pm 7,49$; $p=0,0002$), a dosagem das lesões em biomembranas (TBARS – $3324,80 \pm 320,92$ x $2840,32 \pm 525,92$; $p=0,0046$), a contagem de leucócitos totais ($268,42 \pm 104,04$ x $195,00 \pm 90,01$; $p=0,0084$), a dosagem de hemoglobina circulante ($7,00 \pm 2,54$ x $4,94 \pm 1,34$; $p=0,0007$), a concentração de hemoglobina globular média (CHGM – $26,37 \pm 8,83$ X $25,07 \pm 19,96$; $p=0,0004$), a hemoglobina globular média (HGM – $115,90 \pm 51,25$ x $73,67 \pm 50,76$; $p=0,0031$) e a porcentagem de micronúcleo ($7,28 \pm 4,42$ x $3,59 \pm 2,11$; $p=0,0033$) foram maiores na estação seca.

Tabela 5: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre as estações chuvosa e seca (em ambos os sexos).

Comparação entre Estações (Machos e Fêmeas)			
	Chuva	Seca	P
Marcadores Bioquímicos			
CAT – Catalase (U/mL)	6302,82 ± 3924,88	5627,93 ± 2964,03	p=0,61
GPx - Glutathione Peroxidase (U/mL)	16,17 ± 7,49	26,62 ± 7,93	p=0,000251 *
GST - Glutathione S-Transferase (U/mL)	8,15 ± 1,35	6,07 ± 1,20	p=0,001140 *
SOD – Superóxido Dismutase (U/mL)	5667,05 ± 1032,13	5069,84 ± 853,68	p=0,004303 *
TBARS - Lesão em Biomoléculas (pmol/mL de plasma)	2840,32 ± 525,92	3324,80 ± 320,92	p=0,004635 *
Glicose (mg/dL)	61,70 ± 24,02	53,79 ± 13,91	p=0,53
Colesterol (mg/dL)	219,87 ± 83,03	209,93 ± 65,11	p=0,41
Triglicérides (mg/dL)	406,11 ± 290,26	264,16 ± 276,49	p=0,002410 *
Marcadores Hematológicos			
Eritrócitos totais (10 ³ µL)	808,33 ± 328,99	648,57 ± 201,92	p=0,08
Leucócitos totais (10 ³ µL)	195 ± 90,01	268,42 ± 104,04	p=0,008424 *
Hematócrito (%)	23,8 ± 8,67	25,53 ± 4,58	p=0,37
Dosagem de Hemoglobina Total (g/dL)	4,94 ± 1,34	7,00 ± 2,54	p=0,000734 *
VGM (fL)	309,88 ± 97,65	448,13 ± 177,36	p=0,051
CHGM (g/dL)	20,29 ± 2,65	26,37 ± 8,83	p=0,000411 *
HGM (pg)	73,67 ± 50,76	115,90 ± 51,25	p=0,003123 *
Oxihemoglobina (µM)	30,00 ± 11,86	20,21 ± 4,70	p= 0,008500 *
Metahemoglobina (µM)	99,24 ± 54,67	43,42 ± 6,52	p= 0,001470 *
Marcadores Citoquímicos			
Coloração de Prata (%)			
1 Nucléolo	60,07 ± 14,27	55,38 ± 15,24	p= 0,56
2 Nucléolos	30,20 ± 9,89	36,53 ± 13,40	p= 0,10
3 ou mais Nucléolos	9,73 ± 6,79	9,30 ± 6,51	p= 0,75
Coloração de Feulgen (%)			
Micronúcleo	3,59 ± 2,11	7,28 ± 4,42	p= 0,003372 *
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)			
Basófilos	14,20 ± 5,99	16,28 ± 10,60	p= 0,44
Eosinófilos	7,86 ± 4,99	8,92 ± 6,52	p= 0,40
Heterófilos	11,53 ± 9,37	11,57 ± 6,53	p= 0,90
Azurófilo	11,13 ± 5,57	12,57 ± 6,25	p= 0,25
Linfócitos	50,13 ± 7,33	45,85 ± 9,26	p= 0,13
Monócitos	5,13 ± 2,58	4,78 ± 2,08	p= 0,81
Razão Heterófilo/Linfócito (un)	0,24 ± 0,20	0,25 ± 0,14	p= 0,75

Legenda: VGM - Volume Globular Médio (fL), CHGM -Concentração de Hemoglobina Média (g/dL) e HGM - Hemoglobina Globular Média (pg). Valores expressos em média ± desvio padrão. Teste estatístico: *General Linear Model* (GLM) no formato ANOVA para medidas repetidas (dados pareados). Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 Comparação entre fêmeas na estação seca e chuvosa

Considerando que as fêmeas da espécie *C. carbonarius* apresentam maior atividade e gasto energético no período reprodutivo, que coincide com a estação chuvosa, esperava-se encontrar diferença em quase todos os parâmetros analisados. Esperava-se, portanto, que a estação chuvosa, por ser a estação com maior atividade dos indivíduos, apresentasse maiores níveis de oxihemoglobina, metahemoglobina, glicose, colesterol e triglicérides. No entanto, a estação seca aparentava ser mais estressora e apresentaria maiores níveis de TBARS, juntamente com maiores níveis de todas as enzimas antioxidantes (CAT, GPx, SOD) e de biotransformação (GST), assim como maior porcentagem de micronúcleo e nucléolos ativos.

Porém, quanto à comparação entre as estações do ano apenas para o grupo das fêmeas (Tabela 6), percebe-se que houve diferença na resposta do mecanismo de estresse oxidativo, mais especificamente apenas na atividade da Glutathione Peroxidase (GPx – $22,55 \pm 3,46 \times 13,19$ 5,87; $p=0,0413$), que foi maior na estação seca e, quanto ao perfil hematológico, na dosagem da metahemoglobina ($133,16 \pm 66,56 \times 47,34 \pm 3,61$; $p=0,0463$), maior na estação chuvosa. Nos outros parâmetros não houve diferença.

Tabela 6: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre as estações chuvosa e seca (em fêmeas).

Comparação entre Estações (Fêmeas)			
	Chuva	Seca	P
Marcadores Bioquímicos			
CAT – Catalase (U/mL)	4954 ± 1054	4852 ± 215,10	p=0,84
GPx - Glutathione Peroxidase (U/mL)	13,19 ± 5,87	21,40 ± 1,44	p=0,041535 *
GST - Glutathione S-Transferase (U/mL)	7,62 ± 1,70	6,65 ± 0,45	p=0,26
SOD – Superóxido Dismutase (U/mL)	5831,58 ± 1199,15	4855,91 ± 1103,83	p=0,12
TBARS - Lesão em Biomoléculas (pmol/mL de plasma)	2755,70 ± 680,37	3137,12 ± 380,75	p=0,21
Glicose (mg/dL)	55,93 ± 16,11	53,82 ± 5,32	p=0,82
Colesterol (mg/dL)	259,69 ± 79,98	249,42 ± 74,23	p=0,56
Triglicérides (mg/dL)	396,48 ± 61,82	335,42 ± 115,92	p=0,35
Marcadores Hematológicos			
Eritrócitos totais (10 ³ µL)	672 ± 163,11	602 ± 130,98	p=0,58
Leucócitos totais (10 ³ µL)	222,2 ± 124,20	328,6 ± 112,64	p=0,20
Hematócrito (%)	18,4 ± 5,31	23,8 ± 2,77	p=0,18
Dosagem de Hemoglobina Total (g/dL)	3,67 ± 0,66	5,48 ± 1,38	p=0,09
VGM (fL)	289,763 ± 101,37	382,26 ± 82,35	p=0,26
CHGM (g/dL)	20,65 ± 3,16	24,60 ± 2,05	p=0,06
HGM (pg)	58,31 ± 19,05	95,32 ± 47,59	p=0,25
Oxihemoglobina (µM)	30,96 ± 15,05	18,70 ± 5,79	p= 0,09
Metahemoglobina (µM)	133,16 ± 66,56	47,34 ± 3,61	p= 0,046380 *
Marcadores Citoquímicos			
Coloração de Prata (%)			
1 Nucléolo	55,40 ± 15,01	49,20 ± 17,15	p= 0,58
2 Nucléolos	35,20 ± 11,25	40,80 ± 15,385	p= 0,31
3 ou mais Nucléolos	9,40 ± 8,20	10,00 ± 8,36	p= 0,93
Coloração de Feulgen (%)			
Micronúcleo	4,50 ± 2,00	5,52 ± 1,34	p= 0,12
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)			
Basófilos	17,60 ± 3,36	22,20 ± 14,42	p= 0,48
Eosinófilos	5,00 ± 2,73	3,80 ± 3,27	p= 0,34
Heterófilos	9,00 ± 10,31	12,80 ± 6,22	p= 0,60
Azurófilo	13,40 ± 5,59	14,60 ± 5,94	p= 0,71
Linfócitos	51,00 ± 8,27	41,80 ± 10,37	p= 0,16
Monócitos	4,00 ± 1,22	4,80 ± 1,48	p= 0,33
Razão Heterófilo/Linfócito (un)	0,19 ± 0,25	0,32 ± 0,15	p= 0,52

Legenda: VGM - Volume Globular Médio (fL), CHGM - Concentração de Hemoglobina Média (g/dL) e HGM - Hemoglobina Globular Média (pg). Valores expressos em média ± desvio padrão. Teste estatístico: *General Linear Model* (GLM) no formato ANOVA para medidas repetidas (dados pareados). Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 Comparação entre machos na estação seca e chuvosa

Considerando que os jabutis machos gastam energia no comportamento sexual quanto à disputa por parceiras sexuais e cópula, era esperado que houvesse maiores níveis de Glicose, Colesterol e Triglicérides na estação chuvosa, ao passo que a atividade das enzimas do balanço redox e os níveis de lesão de biomembranas, assim como a porcentagem de micronúcleos e nucléolos ativos, fossem maiores na estação seca.

No entanto, quanto à comparação entre as estações do ano no grupo dos machos (Tabela 7), percebe-se que houve diferença na resposta em todos os parâmetros analisados (bioquímica do estresse oxidativo, bioquímica metabólica e perfil hematológico).

A estação chuvosa apresentou maiores valores de atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST – $8,41 \pm 1,15$ X $6,05 \pm 1,08$; $p= 0,0018$) e da Superóxido Dismutase (SOD – $5584,40 \pm 997,75$ x $5188,69 \pm 728,38$; $p=0,0220$), maior dosagem de triglicérides ($286,75 \pm 114,05$ x $129,92 \pm 58,11$; $p=0,0025$) e de metahemoglobina ($82,28 \pm 41,49$ x $41,24 \pm 6,91$; $p=0,0155$).

Enquanto a estação seca apresentou maiores valores de atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx – $28,88 \pm 8,95$ x $17,66 \pm 8,03$; $p=0,0027$), da dosagem de lesões em biomoléculas (TBARS – $3429,07 \pm 246,23$ x $2882,63 \pm 467,50$; $p=0,0147$), da contagem de leucócitos totais ($235,00 \pm 87,89$ x $181,40 \pm 71,63$; $p=0,0030$), da dosagem de hemoglobina circulante ($7,84 \pm 2,69$ x $5,58 \pm 1,12$; $p=0,0005$), da concentração de hemoglobina globular média (CHGM – $28,40 \pm 10,34$ x $27,28 \pm 24,48$; $p=0,0051$), da hemoglobina globular média (HGM – $127,34 \pm 52,19$ x $81,34 \pm 60,42$; $p= 0,0073$) e da porcentagem de micronúcleos ($8,26 \pm 5,28$ x $3,14 \pm 2,12$; $p=0,0052$).

Tabela 7: Comparação dos marcadores hematológicos, bioquímicos e citoquímicos entre as estações chuvosa e seca, em machos.

Comparação entre Estações (Machos)			
	Chuva	Seca	P
Marcadores Bioquímicos			
CAT – Catalase (U/mL)	5415,69 ± 1307,98	5995,70 ± 3678,38	p=0,57
GPx - Glutathione Peroxidase (U/mL)	14,75 ± 3,49	28,88 ± 8,95	p=0,002768 *
GST - Glutathione S-Transferase (U/mL)	8,45 ± 1,21	6,05 ± 1,08	p=0,001883 *
SOD – Superóxido Dismutase (U/mL)	5922,03 ± 338,91	5188,69 ± 728,38	p=0,022044 *
TBARS - Lesão em Biomoléculas (pmol/mL de plasma)	2954,05 ± 434,15	3429,07 ± 246,23	p=0,014750 *
Glicose (mg/dL)	64,59 ± 27,47	57,91 ± 10,40	p=0,58
Colesterol (mg/dL)	199,96 ± 85,91	187,99 ± 51,16	p=0,55
Triglicérides (mg/dL)	286,75 ± 114,05	129,92 ± 58,11	p=0,002512 *
Marcadores Hematológicos			
Eritrócitos totais (10 ³ µL)	918,33 ± 372,82	674,44 ± 235,73	p=0,10
Leucócitos totais (10 ³ µL)	169,11 ± 63,82	235,00 ± 87,89	p=0,003009 *
Hematócrito (%)	27,66 ± 8,66	27,55 ± 3,87	p=0,96
Dosagem de Hemoglobina Total (g/dL)	5,87 ± 0,66	7,01 ± 1,01	p=0,000533 *
VGM (fL)	319,93 ± 105,68	411,62 ± 106,59	p=0,14
CHGM (g/dL)	20,38 ± 2,69	25,13 ± 1,23	p=0,005126 *
HGM (pg)	64,67 ± 15,94	127,34 ± 52,19	p=0,007353 *
Oxihemoglobina (µM)	29,52 ± 10,83	21,06 ± 4,12	p= 0,06
Metahemoglobina (µM)	83,92 ± 43,67	41,24 ± 6,91	p= 0,015523 *
Marcadores Citoquímicos			
Coloração de Prata (%)			
1 Nucléolo	62,40 ± 14,08	59,25 ± 13,63	p= 0,90
2 Nucléolos	27,70 ± 8,66	33,87 ± 12,31	p= 0,25
3 ou mais Nucléolos	9,90 ± 6,47	8,87 ± 5,66	p= 0,47
Coloração de Feulgen (%)			
Micronúcleo	3,22 ± 2,23	8,26 ± 5,28	p= 0,005286 *
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)			
Basófilos	12,50 ± 6,41	13,00 ± 6,67	p= 0,83
Eosinófilos	9,30 ± 5,35	11,77 ± 6,18	p= 0,23
Heterófilos	12,80 ± 9,17	10,88 ± 6,97	p= 0,56
Azurófilo	10 ± 5,49	11,44 ± 6,48	p= 0,25
Linfócitos	49,70 ± 7,25	48,11 ± 8,34	p= 0,50
Monócitos	5,70 ± 2,94	4,77 ± 2,43	p= 0,57
Razão Heterófilo/Linfócito (un)	0,26 ± 0,18	0,22 ± 0,14	p= 0,59

Legenda: VGM - Volume Globular Médio (fL), CHGM - Concentração de Hemoglobina Média (g/dL) e HGM - Hemoglobina Globular Média (pg). Valores expressos em média ± desvio padrão. Teste estatístico: *General Linear Model* (GLM) no formato ANOVA para medidas repetidas (dados pareados). Fonte: Elaborado pela autora.

5.7 Caracterização dos parâmetros de normalidade

Dentre os objetivos do presente trabalho, consta-se a caracterização de valores de referência ou normalidade para as análises obtidas. Como observado pelos resultados apresentados, houve diferença em alguns parâmetros quando comparados os sexos e as estações do ano. Dessa forma, optou-se por separar os parâmetros de normalidade de indivíduos *C. carbonarius* provenientes de cativeiro, entre machos e fêmeas, e entre as estações seca e chuvosa, quando existia essa respectiva diferença. Em oposição, para os parâmetros que não apresentaram diferenças, foi determinado o valor de referência/normalidade para o grupo jabutis.

5.7.1 Normalidade dos marcadores bioquímicos, hematológicos e citoquímicos de *C. carbonarius* provenientes de cativeiro

A definição dos valores de referência/normalidade foi expressa a partir da média e intervalo de confiança de 95%, sendo representada a média com os valores mínimos e máximos entre parênteses. Esses valores expressam o resultado esperado para jabutis *C. carbonarius* provenientes de cativeiro, com índices de bem-estar animal e, portanto, considerados saudáveis.

Sabe-se que o ideal seria definir os valores de referência para animais de vida livre, porém, levando em conta que são animais de difícil acesso (por viverem no interior de matas) e que a maioria dos animais que recebem atendimento veterinário são provenientes de cativeiro (desde zoológicos até criação de animais pets), reiteramos a importância da definição de valores de normalidade para indivíduos saudáveis de cativeiro.

Vale ressaltar que os valores aqui expressos dependem da localidade e da estação do ano aos quais os indivíduos estão submetidos; no presente estudo os jabutis são provenientes de um cativeiro adequado, apresentam aspectos de saúde e vivem em uma localidade com grande separação entre as estações seca e chuvosa.

Os marcadores que apresentam influência da estação do ano estão expressos na tabela 8. Aqueles que não apresentam influência da estação do ano estão representados na tabela 9. Quando os marcadores sofrem influência do sexo, a representação foi diferente (grupo de machos e grupo de fêmeas), enquanto aqueles marcadores que não sofrem influência do sexo biológico foram agrupados na categoria “jabutis”.

5.7.1.1 Normalidade dos marcadores dependentes da sazonalidade

Tabela 8: Parâmetros de normalidade dos marcados bioquímicos, hematológicos e citoquímicos de indivíduos *C. carbonarius* saudáveis provenientes de cativeiro. Marcadores dependentes da sazonalidade.

Normalidade de <i>C. carbonarius</i> nas estações Chuvosa e Seca		
	Chuva	Seca
Jabutis		
Marcadores Hematológicos		
Oxihemoglobina (μM)	29,60 (20,77 – 38,44)	21,06 (17,88 – 24,23)
Machos		
Marcadores Bioquímicos		
GPx - Glutational Peroxidase (U/mL)	14,75 (12,06 – 17,43)	28,88 (21,99 – 35,76)
GST - Glutational S-Transferase (U/mL)	8,45 (7,51 – 9,39)	6,05 (5,22 – 6,88)
SOD – Superóxido Dismutase (U/mL)	5922,03 (5661,51 – 6182,54)	5188,69 (4628,81 – 5748,58)
TBARS - Lesão em Biomoléculas (pmol/mL de plasma)	2954,05 (2620,33 – 3287,77)	3429,08 (3239,81 – 3618,34)
Triglicérides (mg/dL)	284,52 (191,71 – 377,32)	129,92 (85,25 – 174,59)
Marcadores Hematológicos		
Leucócitos totais ($10^3 \mu\text{L}$)	169,11 (120,05 – 218,17)	235 (167,43 – 302,56)
Dosagem de Hemoglobina Total (g/dL)	5,87 (5,37 – 6,38)	7,01 (6,23 – 7,79)
CHGM (g/dL)	20,38 (18,31 – 22,45)	25,13 (24,18 – 26,08)
HGM (pg)	64,67 (52,41 – 76,92)	127,34 (87,22 – 167,46)
Metahemoglobina (μM)	83,92 (50,35 – 117,49)	41,24 (35,92 – 46,55)
Marcadores Citoquímicos		
Coloração de Feulgen (%)		
Micronúcleo	3,22 (1,50 – 4,94)	8,26 (4,20 – 12,32)
Fêmeas		
Marcadores Bioquímicos		
GPx - Glutational Peroxidase (U/mL)	13,19 (5,89 – 20,49)	21,40 (19,61 – 23,20)
Marcadores Hematológicos		
Metahemoglobina (μM)	133,20 (50,51 – 215,80)	47,35 (42,86 – 51,83)

Legenda: Valores expressos em média (intervalo de confiança de 95%). Os valores que não apresentaram diferenças entre os sexos foram agrupados em “Jabutis”, enquanto aqueles que diferiram foram separados em “Machos” e “Fêmeas”. Fonte: Elaborado pela autora.

5.7.1.2 Normalidade dos marcadores não dependentes da sazonalidade

Tabela 9: Parâmetros de normalidade dos marcados bioquímicos, hematológicos e citoquímicos de jabutis *C. carbonarius* saudáveis provenientes de cativeiro. Marcadores não dependentes da sazonalidade.

Normalidade Jabutis <i>C. carbonarius</i>	
Jabutis	
Marcadores Bioquímicos	
CAT - Catalase (U/mL)	5419,08 (4560,91 – 6277,25)
Glicose (mg/dL)	58,62 (51,51 – 65,73)
Colesterol (mg/dL)	215,61 (186,50 – 244,71)
Marcadores Hematológicos	
Eritrócitos totais ($10^3 \mu\text{L}$)	739,46 (629,41 – 849,51)
Hematócrito (%)	25,28 (22,69 – 27,88)
VGM (fL)	355,14 (313,37 – 396,92)
Razão Heterófilo/Linfócito (un)	0,24 (0,17 – 0,31)
Marcadores Citoquímicos	
Coloração de Prata (%)	
1 Nucléolo	58,63 (51,91 – 65,35)
2 Nucléolos	33,14 (28,36 – 37,93)
3 ou mais Nucléolos	9,40 (6,78 – 12,03)
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)	
Basófilos	15,32 (11,99 – 18,64)
Heterófilos	11,39 (8,25 – 14,52)
Azurófilo	11,92 (9,57 – 14,27)
Linfócitos	47,74 (44,54 – 50,93)
Monócitos	4,88 (3,94 – 5,82)
Machos	
Marcadores Citoquímicos	
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)	
Eosinófilos	10,55 (7,62 – 13,48)
Fêmeas	
Marcadores Bioquímicos	
GST - Glutationa S-Transferase (U/mL)	7,14 (6,22 – 8,05)
SOD – Superóxido Dismutase (U/mL)	5344 (4484 – 6204)
TBARS - Lesão em Biomoléculas (pmol/mL de plasma)	2946 (2548 – 3345)
Triglicérides (mg/dL)	366 (299,20 – 432,70)
Marcadores Hematológicos	
Leucócitos totais ($10^3 \mu\text{L}$)	275,40 (185,90 – 364,90)
Dosagem de Hemoglobina Total (g/dL)	4,58 (3,57 – 5,58)
CHGM (g/dL)	22,63 (20,30 – 24,97)
HGM (pg)	76,82 (48,66 – 105)
Marcadores Citoquímicos	
Coloração de Feulgen (%)	
Micronúcleo	5,01 (3,79 – 6,22)
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)	
Eosinófilos	4,40 (2,31 – 6,48)

Legenda: Valores expressos em média (intervalo de confiança de 95%). Os valores que não apresentaram diferenças entre os sexos foram agrupados em “Jabutis”, enquanto aqueles que diferiram foram separados em “Machos” e “Fêmeas”. Fonte: Elaborado pela autora.

6 Discussão

6.1 Análise da Bioquímica do Estresse Oxidativo

A maioria dos estudos que relata sobre os ajustes ao estresse oxidativo está limitada ao estresse induzido em laboratório ou ao estresse agudo; no entanto, as tensões ambientais e os ajustes fisiológicos são constantes (VENANCIO, 2013).

A enzima catalase é uma hemoproteína com função de metabolizar o peróxido de hidrogênio (proveniente do meio ou da ação da enzima superóxido dismutase) em água e oxigênio molecular (RIGHETTI et al., 2014). Na comparação da expressão da enzima catalase, não foram encontradas diferenças estatísticas nem na comparação dos sexos (Gráficos 1, 2 e 3), nem na comparação das estações do ano (Figuras 4, 5 e 6). Dessa forma, pode-se inferir que a atividade dessa enzima é constante tanto em machos quanto em fêmeas de *C. carbonarius* mantidos em cativeiro, nas diferentes estações do ano. Normalmente, a ação da enzima catalase e da superóxido dismutase aumentam em associação à elevação dos níveis de lesões em biomoléculas (COSTA et al., 2008), porém esse resultado não foi encontrado no presente trabalho.

A enzima Glutathione S-Transferase tem função antioxidante secundária, a partir da remoção de compostos tóxicos provenientes da peroxidação lipídica, cuja ação está envolvida na metabolização de endobióticos e xenobióticos (HERMES-LIMA; STOREY, 1993). A expressão da Glutathione S-Transferase não diferiu entre os sexos (Gráficos 1, 2 e 3), porém foi maior na estação chuvosa (Gráfico 4), principalmente em machos na estação chuvosa (Gráfico 6). Oliveira (2015), analisando lagartos, encontrou diferenças entre os sexos, e a atividade da enzima foi maior em fêmeas durante a estação seca, resultado oposto aos encontrados no presente trabalho. A GST, juntamente com a GPx, atua principalmente no reparo do dano oxidativo causado em lipídeos (SPICKETT, 2013), ou seja, suas atividades estão relacionadas com maiores dosagens de TBARS, porém, apenas a enzima GPx aumentou com maiores danos oxidativos na estação seca (Gráficos 4 e 6), enquanto a GST teve maior atividade na estação chuvosa, período de menores danos oxidativos.

A enzima Superóxido Dismutase tem como função metabolizar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, uma molécula que apresenta menos capacidade de oxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) e que posteriormente será metabolizada pela enzima catalase (RIGHETTI et al., 2014). A expressão da enzima Superóxido Dismutase não apresentou diferença quando comparados os sexos (nem mesmo dentro das estações,

comprovando que esses animais, machos e fêmeas, respondem similarmente aos estressores ambientais – Gráficos 1, 2 e 3). Porém, quando comparadas as estações, houve um aumento significativo na expressão da enzima na estação chuvosa (Gráfico 4), mais especificamente nos machos da estação chuvosa (Gráfico 6). A SOD é considerada a linha de frente do sistema antioxidante (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2015), ou seja, é uma das primeiras enzimas antioxidantes a agir, porém a maior atividade foi vista contrariamente ao momento de maior dano oxidativo, ou seja, a atividade foi maior na chuva.

Para a comparação da lesão em biomoléculas, não houve diferença significativa entre machos e fêmeas, porém houve diferença quando comparadas as estações do ano: os jabutis apresentaram maiores níveis de lesão na estação seca, mais especificamente os machos. Pode-se inferir que machos e fêmeas apresentam a mesma resposta aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), porém apresentam maiores níveis durante a estação seca.

Quase não houve diferença nas respostas enzimáticas ao estresse oxidativo entre machos e fêmeas, do que se depreende que ambos respondem similarmente às condições ambientais de estresse. Houve diferenças nas expressões das enzimas quando comparadas as estações do ano, de forma que se pode concluir que as estações agem como estressores aos jabutis, uma vez que são animais ectotérmicos e respondem fisiologicamente às mudanças ambientais.

Hipotetizamos os resultados encontrados na bioquímica do sistema antioxidante por meio de duas teorias: preparo para o estresse oxidativo e mito de hormese.

Ao se analisar o comportamento bioquímico dos machos, primeiramente, acreditamos que se trataria de um preparo para o estresse oxidativo, uma vez que houve aumento da atividade antioxidante na estação chuvosa para lidar com os danos oxidativos causados na estação seca. Porém, para ser considerado POS, é necessário haver uma indução do sistema antioxidante a partir de níveis de ERO (HERMES-LIMA et al., 2015). Ou seja, o aumento na geração de ERO durante períodos de privação de oxigênio é responsável pela ativação de fatores de transcrição responsáveis pela regulação da expressão e pela atividade das enzimas antioxidantes (WELKER et al., 2013), o que consistiria no mecanismo de controle molecular do POS (HERMES-LIMA et al., 2015). Portanto, o aumento na formação de ERO resultaria na oxidação de biomoléculas (proteínas, lipídeos de membrana, DNA) que ativariam os fatores de transcrição do sistema redox. Essa transcrição aumentaria a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes, contribuindo para manter as respostas ao POS. A resposta ao POS consiste em uma manutenção por um tempo maior do que a extinção do estresse, sendo

considerado um importante mecanismo de resposta ao estresse oxidativo (HERMES-LIMA et al., 2015). Importante ressaltar que o mecanismo de POS consiste em uma mitigação dos danos causados pelas ERO (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002).

A partir do critério criado por Moreira et al. (2016) para considerar que uma espécie apresenta mecanismo de POS, para ser POS-positiva, a espécie deve apresentar aumento no nível de qualquer antioxidante de qualquer magnitude em qualquer tecido na fase de privação de oxigênio, enquanto que será considerada POS-neutra se não apresentar nenhuma mudança. O estudo de revisão de Hermes-Lima et al. (2015) sobre a ocorrência de POS em diversas espécies de animais que foram submetidos a estresse como hipóxia, anoxia, desidratação e congelamento, sendo a maioria analisada em condições controladas em laboratório, verificou que os exemplos de animais que são POS positivo estão distribuídos nos seguintes grupos: Anthozoa (Corais), Polychaeta (Anelídeos), Molusca (Bivalves e Gastrópodes), Arthropoda (Crustáceos - decapoda, cracas e malacostraca; Insetos – dípteras; tardígradas), Actinopterygii, Dipnoi, Anfíbios (Sapos), Répteis (Serpentes e Tartarugas) e Mamíferos (Roedores).

A prevalência de indivíduos POS-positivos ocorre, especialmente, em espécies que passam por estivação, ou seja, períodos secos muito longos, ocasionando a diminuição da oferta de recursos disponíveis no ambiente, principalmente para serpentes, peixes pulmonados e anuros (MOREIRA et al., 2016). A ocorrência generalizada do mecanismo POS no reino animal é considerada indicativo de um mecanismo chave na adaptação do metabolismo redox dos organismos frente a condições ambientais desfavoráveis (MOREIRA et al., 2020).

A maioria dos estudos de POS é realizada em laboratório, onde as condições ambientais são controladas, portanto é difícil quantificar esse fenômeno na natureza (HERMES-LIMA et al., 2015; MOREIRA et al., 2016) e existem pouquíssimos estudos nessa vertente, sendo o de Moreira et al. (2020) o primeiro nesse quesito. Os experimentos laboratoriais permitem controle rigoroso das variáveis estudadas, porém, a avaliação de animais diretamente no ambiente no qual vivem está sujeita a interferências externas que não podem ser controladas, enfraquecendo os resultados observados em experimentação laboratorial (SPICER, 2014). Ambos, experimentação laboratorial e investigações de campo, são complementares, sendo que, os resultados observados em indivíduos no campo podem diferir quanto aos observados em laboratório, uma vez que o estresse ao qual estão submetidos difere, tornando, portanto, os resultados observados em campo particularmente relevantes para a interpretação ecológica (CALISI; BENTLEY, 2009). Portanto, nessa

perspectiva, é coerente pensar que os resultados de POS positivos, em natureza e em cativeiro, sejam mais discretos do que em estudos de laboratório.

Porém, como pode ser observado pela tabela 7 e pelo gráfico 6, os machos de *C. carbonarius* apresentaram aumento da atividade da enzima GPx no momento de maior dano oxidativo (seca), enquanto as maiores atividades de GST e SOD foram na estação chuvosa. Para se determinar que os machos sejam POS-positivos, recomendamos avaliar outras enzimas antioxidantes, ou, considerando que o POS em ambiente natural seja mais discreto, os machos podem ser considerados POS positivos.

No entanto, existe uma explicação alternativa para organismos que não apresentam POS (ou seja, não são POS positivos): os altos níveis constitutivos de antioxidantes endógenos seriam capazes de controlar e/ou evitar as lesões oxidativas causadas pela produção excessiva de espécies reativas (HERMES-LIMA, ZENTENO-SAVÍN, 2002). Dessa forma, pode-se relacionar, claramente, que as fêmeas de *C. carbonarius* apresentam-se em hormese, uma vez que não houve flutuações na atividade antioxidante e nos danos oxidativos causados. Sendo assim, elas apresentam altos níveis das enzimas do sistema antioxidante e, portanto, são capazes de lidar com os danos oxidativos causados, ou seja, não há aumento do TBARS (Tabela 6 e Gráfico 5). O estudo de Pickering (2013) relatou que, em células de mamíferos expostas ao estresse crônico (a partir de baixas quantidades de compostos oxidantes), as respostas adaptativas podem se potencializar e se estender, porém, quando expostas a níveis mais elevados de oxidantes por pouco tempo, não ocorre adaptação. Dessa forma, consideramos que as fêmeas de *C. carbonarius*, ao longo de sua existência evolutiva, sempre lidaram com estresse maior que o dos machos (por exemplo, no comportamento sexual) e, portanto, ao lidarem com ERO em níveis sempre elevados, responderam fisiologicamente por hormese.

Animais considerados tolerantes a condições extremas apresentam um sistema antioxidante eficiente e poucas flutuações no consumo de oxigênio (WELKER, 2009). Neste trabalho, destacamos a quase inexistência de flutuações quando comparadas as respostas antioxidantes de machos e fêmeas. O aumento, quando observado, nas atividades dessas enzimas analisadas evidencia a tentativa de combater os possíveis danos que seriam causados às biomoléculas (DNA, proteínas e membranas lipídicas).

Outro ponto importante a se ressaltar é que a maioria dos estudos do metabolismo redox é realizada em tecidos diferentes ao tecido sanguíneo (o que, necessariamente, implicaria a morte do organismo) e, portanto, os resultados levantados no presente trabalho podem ser menos expressivos do que se fossem realizados em tecidos hepático, muscular,

cardíaco, nervoso, entre outros. Evidenciamos a necessidade de realizar análises no tecido sanguíneo (uma vez que não é necessário o abate do indivíduo e, portanto, realizar estudos da fisiologia de espécies ameaçadas de extinção, tanto em ambiente natural quanto em cativeiro) e comparações com experimentações laboratoriais.

Gráfico 1: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre fêmeas e machos, independente da estação do ano.

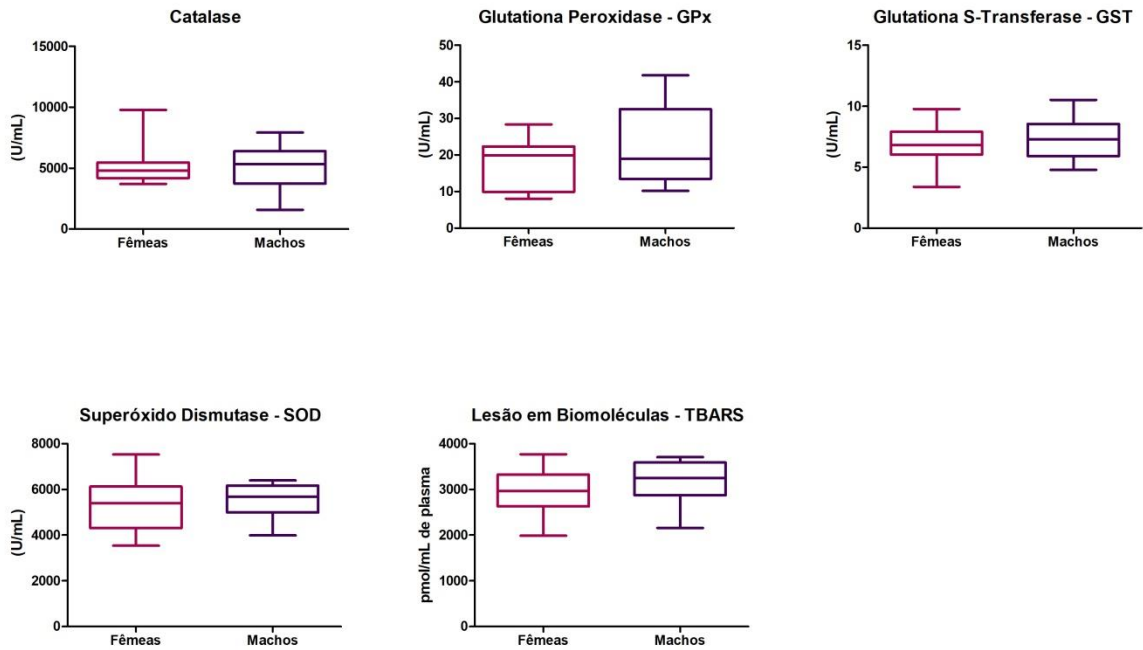


Gráfico 2: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre fêmeas e machos, na estação Chuvosa.

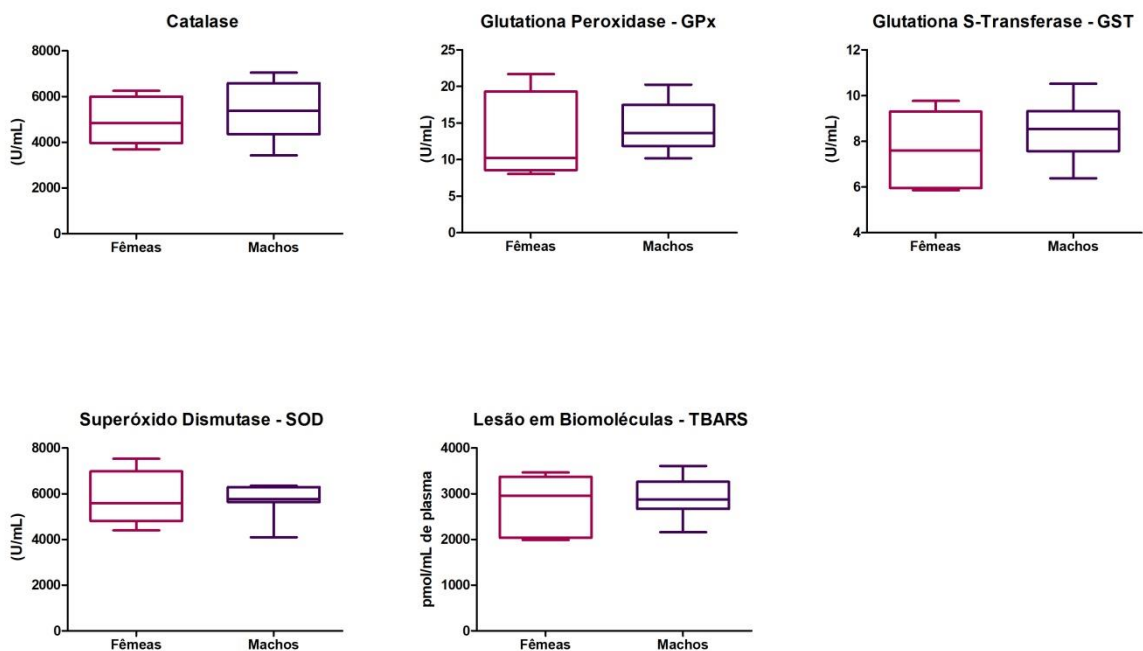


Gráfico 3: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre fêmeas e machos, na estação Seca.

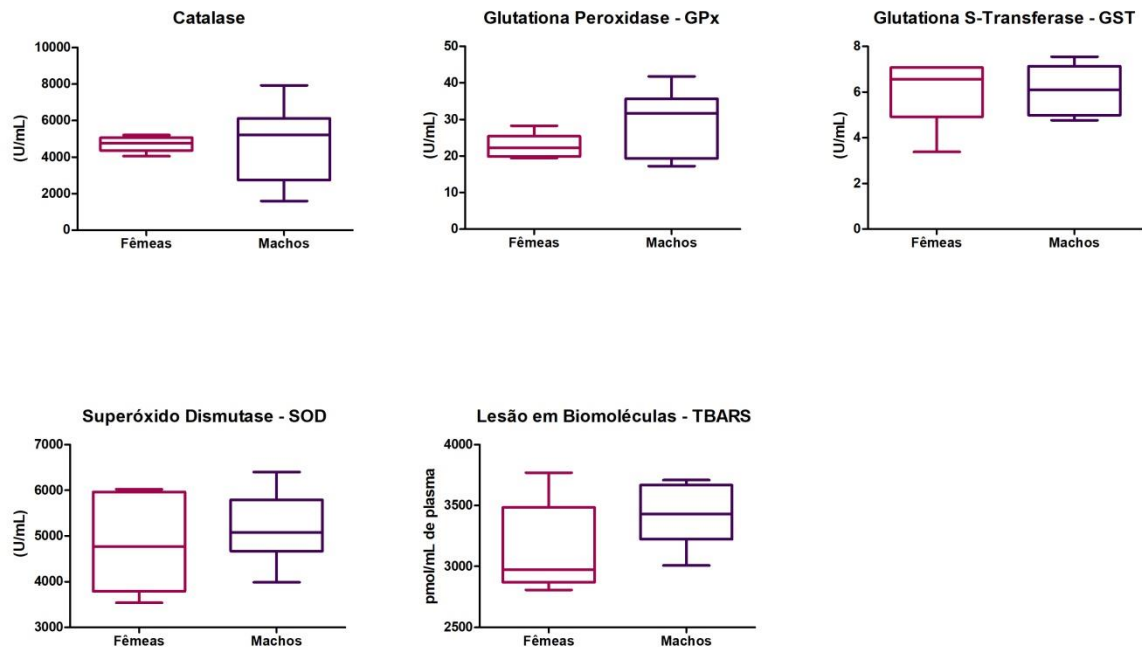


Gráfico 4: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre as estações, considerando o grupo jabutis.

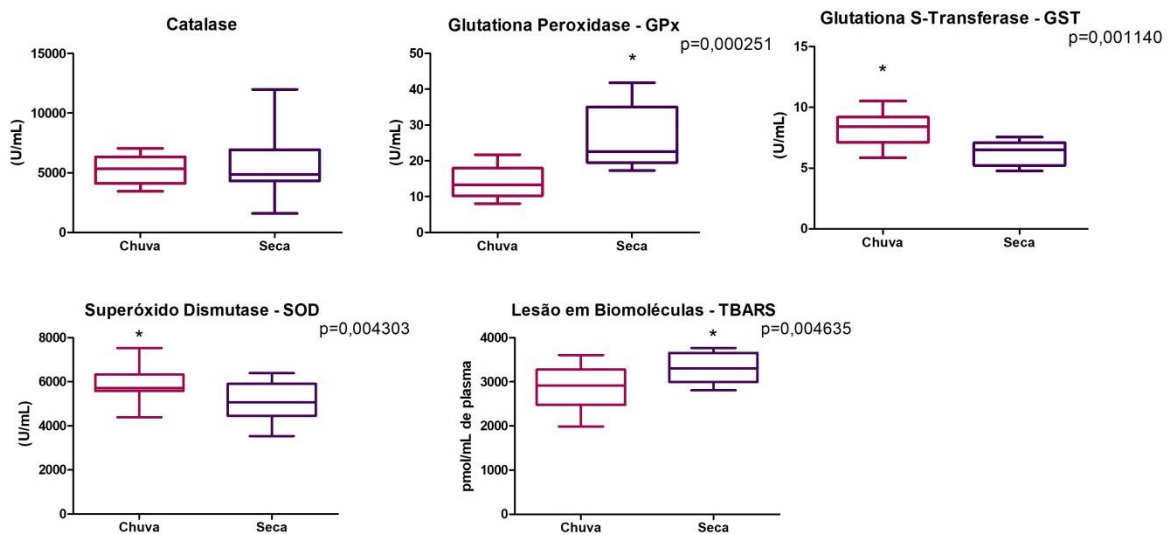


Gráfico 5: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre as estações, considerando apenas fêmeas.

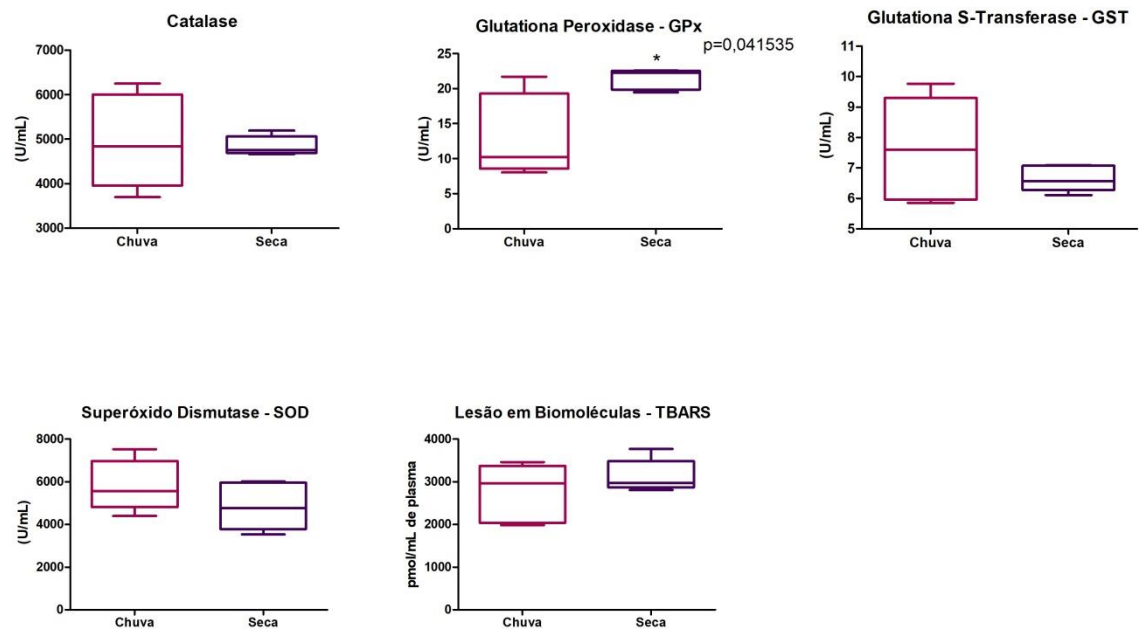
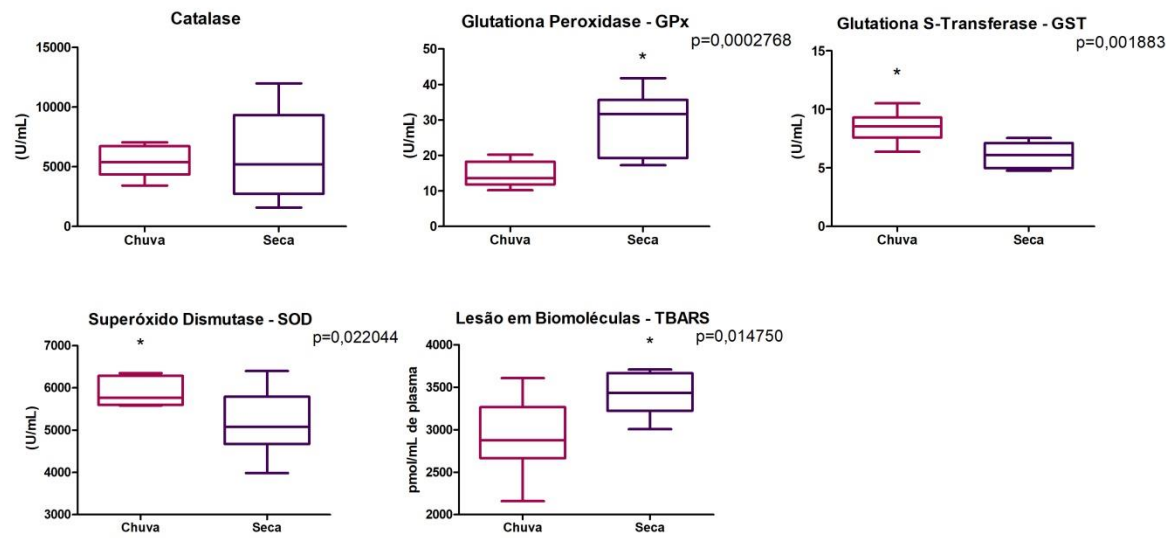


Gráfico 6: Comparação dos marcadores de bioquímica do estresse oxidativo entre as estações, considerando apenas machos.



6.2 Análise da Bioquímica Metabólica

Para nenhuma das comparações realizadas houve diferenças significativas entre os níveis de glicose (Gráficos 7 a 12), de forma que não foi observada diferença no comportamento glicêmico entre machos e fêmeas ao longo das estações do ano. Resultados similares aos encontrados por Oliveira (2015) em lagartos, porém diferentes dos de Yang et al. (2014) para tartarugas *Cuora flavomarginata*, que apresentaram maiores níveis em machos e diferenças entre as estações do ano, sendo a estação chuvosa com maiores níveis de glicose.

Animais em vida livre apresentam mudanças comportamentais de acordo com as estações do ano, sendo que, depois do período de seca (principalmente no inverno), há aumento de apetite e maior estocagem de energia (por meio da alimentação) para comportamento sexual (corte, copulação e ovoposição), portanto, nesse momento é comum o aumento dos níveis de glicose no plasma sanguíneo (ANDERSON et al., 1997; CHUNG et al, 2009). Possivelmente, os espécimes estudados, por se encontrarem em ambiente com disponibilidade de água, comida, parceiros sexuais e abrigo constante, não apresentam flutuações nos níveis de glicose que apresentariam quando livres na natureza.

A dosagem de glicose em répteis varia, normalmente, de 60 a 100 mg/dL (CAMPBELL, 2006). A partir dos resultados obtidos, percebe-se que os jabutis-piranga apresentam um limite um pouco inferior ao esperado para os répteis em geral, girando em torno de 50 a 60 mg/dL. Devido ao horário da realização das coletas os jabutis encontravam-se em jejum, fator que pode explicar a inexistência de flutuações nos níveis de glicose e uma dosagem inferior ao esperado para os répteis.

Sobre os níveis de colesterol, foram encontradas diferenças quando comparados machos e fêmeas (estação seca e chuvosa – tabela 2, gráfico 7) sendo esses níveis maiores no grupo das fêmeas. Yang et al. (2014) também descreveu maiores valores de colesterol para as fêmeas, enquanto Oliveira (2015) não observou diferenças entre os sexos quando comparados os lagartos *Tropidurus catalanensis*. Não foram encontradas diferenças entre as estações seca e chuvosa (Tabelas 5, 6 e 7). O colesterol é componente estrutural essencial às membranas celulares, sendo importante na produção de diversos hormônios, vitamina D e ácidos biliares (HARPER et al., 2002; CHAMPE et al., 2006). Os maiores níveis de colesterol no grupo das fêmeas como um todo, podem indicar, assim como triglicérides, estocagem de gordura para a vitelogênese (GILLET; CRUZ, 1981; LAMIRANDE et al., 1999).

Em se tratando dos níveis de triglicérides, houve diferenças estatísticas quando comparados machos e fêmeas em ambas as estações (Tabela 2 e Gráfico 7) e na estação seca

(Tabela 4 e Gráfico 9), sendo que fêmeas sempre apresentavam maiores níveis de triglicérides. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Yang et al. (2014) em tartarugas *Cuora flavomarginata* e por Oliveira (2015) em lagartos *Tropidurus catalanensis*, em que os níveis de triglicérides eram maiores em fêmeas. Houve diferenças estatísticas quando comparadas as estações (Tabela 5 e Gráfico 7), principalmente nos machos, que na estação chuvosa apresentaram maiores níveis quando comparados à estação seca (Tabela 7 e Gráfico 9).

No período da estação seca, referente ao término do período de reprodução dos jabutis *C. Carbonarius*, não houve diferença significativa em quase nenhum dos parâmetros analisados, com exceção dos níveis de triglicérides. Esses níveis não apresentaram diferença entre machos e fêmeas na estação chuvosa (período reprodutivo), porém apresentaram-se muito elevados nas fêmeas no período da estação seca. Dessa forma, pode-se inferir que no período reprodutivo (estação chuvosa), as fêmeas demandaram muita energia que, de alguma forma, compensaram na estação seca com elevação dos níveis de triglicérides presentes no plasma. Os triglicérides são uma importante fonte de estocagem de lipídeos (CHAMPE, 2006), sendo observada constância entre os níveis encontrados em machos e fêmeas ao longo do ano. No entanto, no grupo das fêmeas, durante a estação seca, foi observada diferença quando comparados aos machos durante a mesma estação, fora do período reprodutivo, podendo indicar que o tecido hepático está alocando essa reserva energética para outros tecidos, pois é provável que sua alocação esteja ligada à recuperação do gasto energético ocasionado pela vitelogênese (durante a estação chuvosa) e também à estocagem para uso no próximo período reprodutivo, resultado encontrado por Lacy et al. (2002) em lagartos da espécie *Urosaurus ornatos* e Oliveira (2015).

Gráfico 7: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre fêmeas e machos, independente da estação do ano.

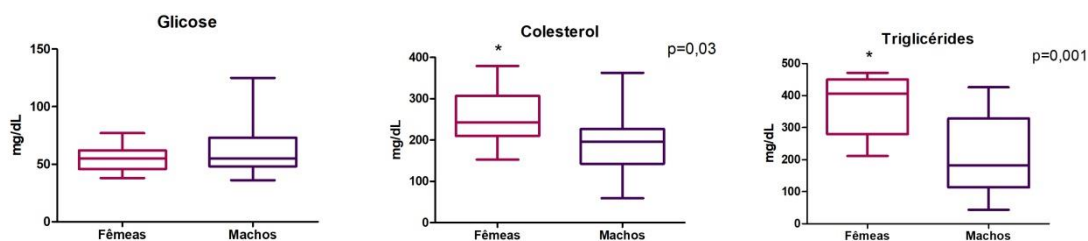


Gráfico 8: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre fêmeas e machos, na estação Chuvosa.

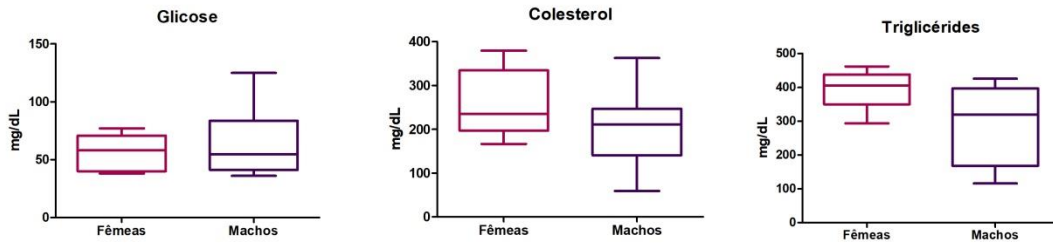


Gráfico 9: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre fêmeas e machos, na estação Seca.

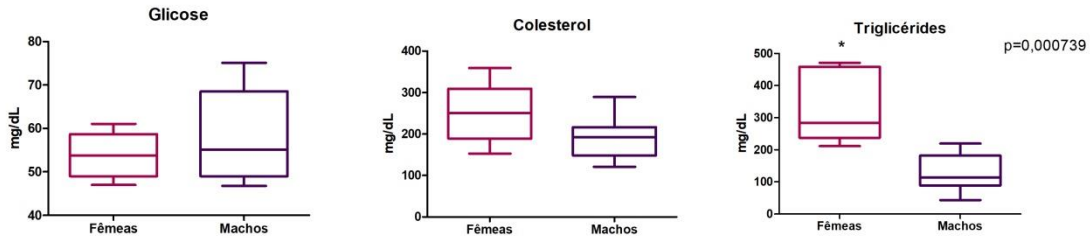


Gráfico 10: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre as estações, considerando o grupo jabutis.

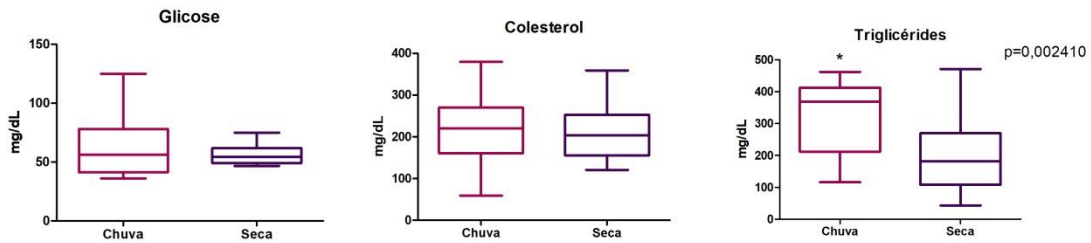


Gráfico 11: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre as estações, considerando apenas fêmeas.

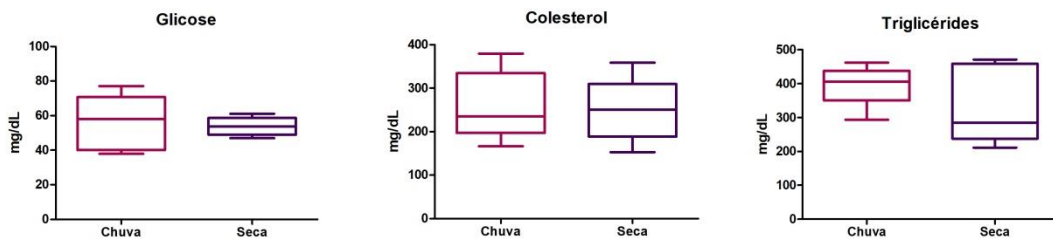
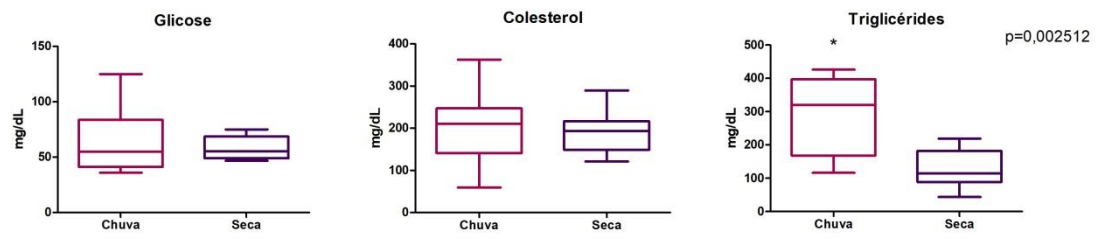


Gráfico 12: Comparação dos marcadores de bioquímica metabólica entre as estações, considerando apenas machos.



6.3 Análise Hematológica

Quando comparados os sexos (tanto chuva quanto seca – Tabela 2, Gráfico 13), os machos apresentaram maiores valores de Hematócrito e Dosagem de Hemoglobina Circulante; quando comparados apenas dentro da estação chuvosa (Tabela 3 e Gráfico 14), continuaram a apresentar maiores valores de Hematócrito e quando comparados dentro da estação seca (Tabela 4 e Gráfico 15), apresentaram maiores valores de Dosagem de Hemoglobina Circulante.

Não houve diferença entre a Contagem Total de Eritrócitos em nenhuma das comparações realizadas entre os sexos (Tabelas 2, 3 e 4), resultados diferentes do que Campbell (2015) defende, ao dizer que em répteis, machos normalmente apresentam maior quantidade de eritrócitos circulantes. Possivelmente, para jabutis *C. carbonarius*, não exista diferença na resposta dos eritrócitos entre machos e fêmeas, não havendo necessidade de serem maiores os níveis em algum sexo biológico.

Referente às comparações entre as estações, quando considerado o grupo jabutis (tanto machos quanto fêmeas - Tabela 5, Gráfico 16) na estação seca, apresentaram valores maiores da Contagem Total de Leucócitos, de Dosagem de Hemoglobina, de Concentração de Hemoglobina Globular Média e de Hemoglobina Globular Média. Quando comparadas as estações apenas no grupo das fêmeas (Tabela 6 e Gráfico 17), não houve diferenças em nenhum dos parâmetros, porém no grupo dos machos, foram maiores os níveis de Leucócitos Totais, Dosagem de Hemoglobina Circulante, Concentração de Hemoglobina Globular Média e Hemoglobina Globular Média na estação seca.

Para o Hematócrito, os machos apresentaram maiores valores se comparados às fêmeas, tanto na comparação estação seca e chuvosa quanto na comparação da estação chuvosa.

Ao analisarmos a Dosagem de Oxihemoglobina e Metahemoglobina, percebemos que, em todas as comparações, sempre houve maior concentração de Metahemoglobina em comparação com a Oxihemoglobina. Resultados interessantes, uma vez que, em todos os organismos vivos, acredita-se ser mais vantajoso ter maior concentração de OxiHb em comparação à MetaHb. Um possível motivo é o local de punção realizado para a coleta da amostra biológica; ao coletar sangue pela veia margino-costal a concentração de MetaHb será maior que a de OxiHb.

Outro fator interessante a se ressaltar: sabe-se que na literatura tem-se que o ânion superóxido produzido na auto-oxidação da hemoglobina (ou seja, na formação de

metahemoglobina) é convertido em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima SOD (RIFKIND; MOHANTY; NAGABABU, 2014), ou seja, existe uma relação direta entre a quantidade de metahemoglobina produzida e a ação dessa enzima. Tal fato foi comprovado no presente estudo, uma vez que os grupos que apresentaram maiores níveis de MetaHb também apresentaram maiores níveis de atividade da SOD (Tabelas 3, 5, 6 e 7).

A reprodução dos jabutis ocorre por meio da postura dos ovos. Durante o período reprodutivo, os machos competem pelo direito de acasalar com as fêmeas. O embate é realizado fisicamente: o objetivo é virar seu oponente de cabeça para baixo, de forma que, enquanto o macho derrotado fica indefeso, o macho que ganhou possa acasalar. (GREEN; SPILSBURY; TAYLOR, 2009). As fêmeas, após a cópula, depositam seus ovos em uma cavidade no chão que é aberta por meio de suas pernas traseiras. O buraco é preenchido para que os ovos não sejam encontrados por predadores. (GREEN; SPILSBURY; TAYLOR, 2009).

Aliado a isso, tem-se o período de maior insolação na região de Catanduva nos meses correspondentes à estação chuvosa, e, sabendo-se que os jabutis são animais ectotérmicos e não controlam a temperatura corporal por meio do próprio metabolismo, o período de maior atividade desses indivíduos será no momento mais quente e com maior insolação solar, ou seja, no período chuvoso. Provavelmente as diferenças encontradas entre as estações estejam relacionadas a esse fato. Dessa forma, acreditamos que as diferenças nos marcadores hematológicos de machos e fêmeas, e entre as estações do ano, estejam relacionadas às condições ambientais (períodos mais quentes e com maior insolação) e, como consequência, no período de reprodução, em que, para realizar o comportamento sexual é necessário um alto investimento de energia.

Gráfico 13: Comparação dos marcadores de hematologia entre fêmeas e machos, independente da estação do ano.

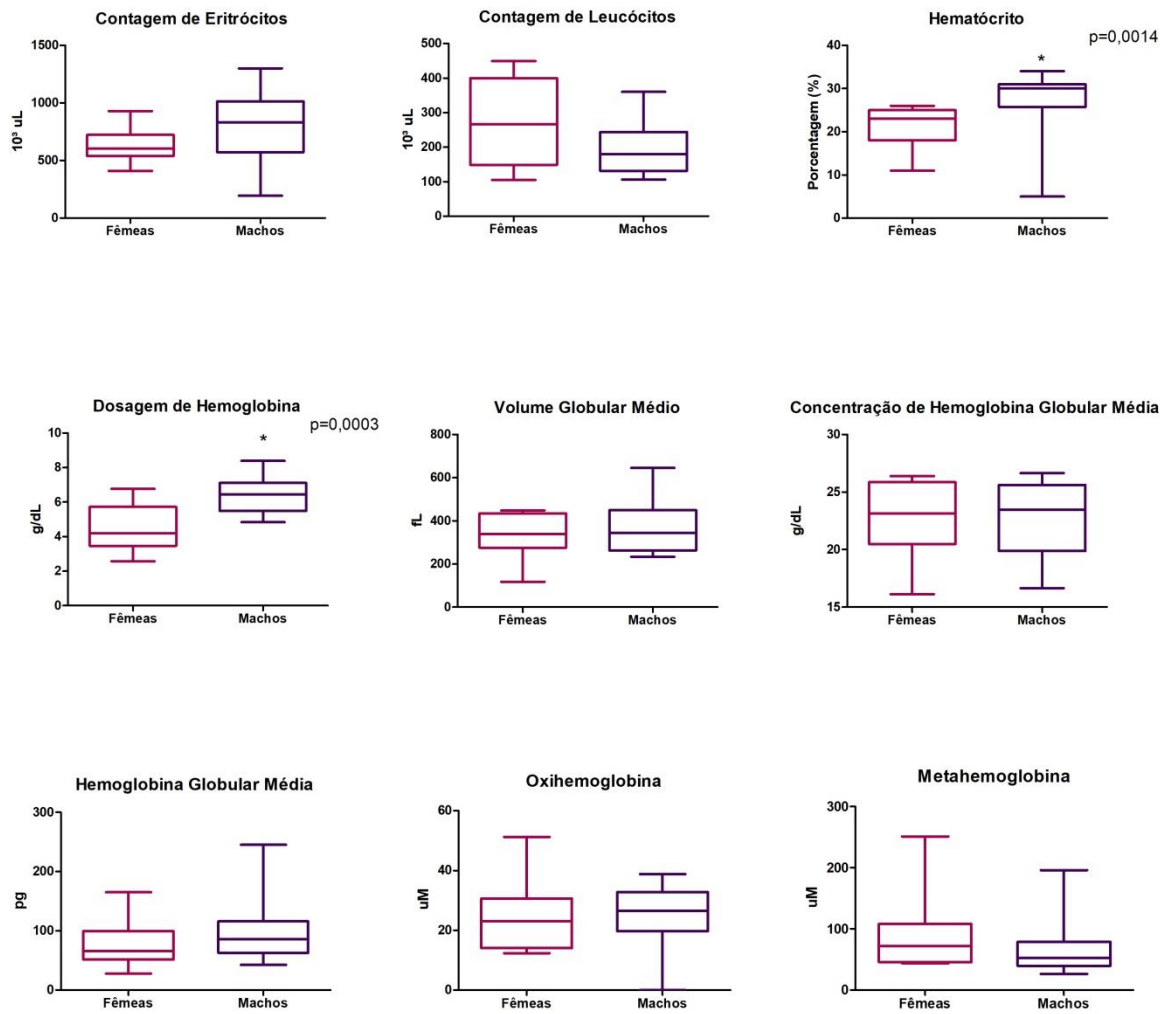


Gráfico 14: Comparação dos marcadores de hematologia entre fêmeas e machos, na estação Chuvosa.

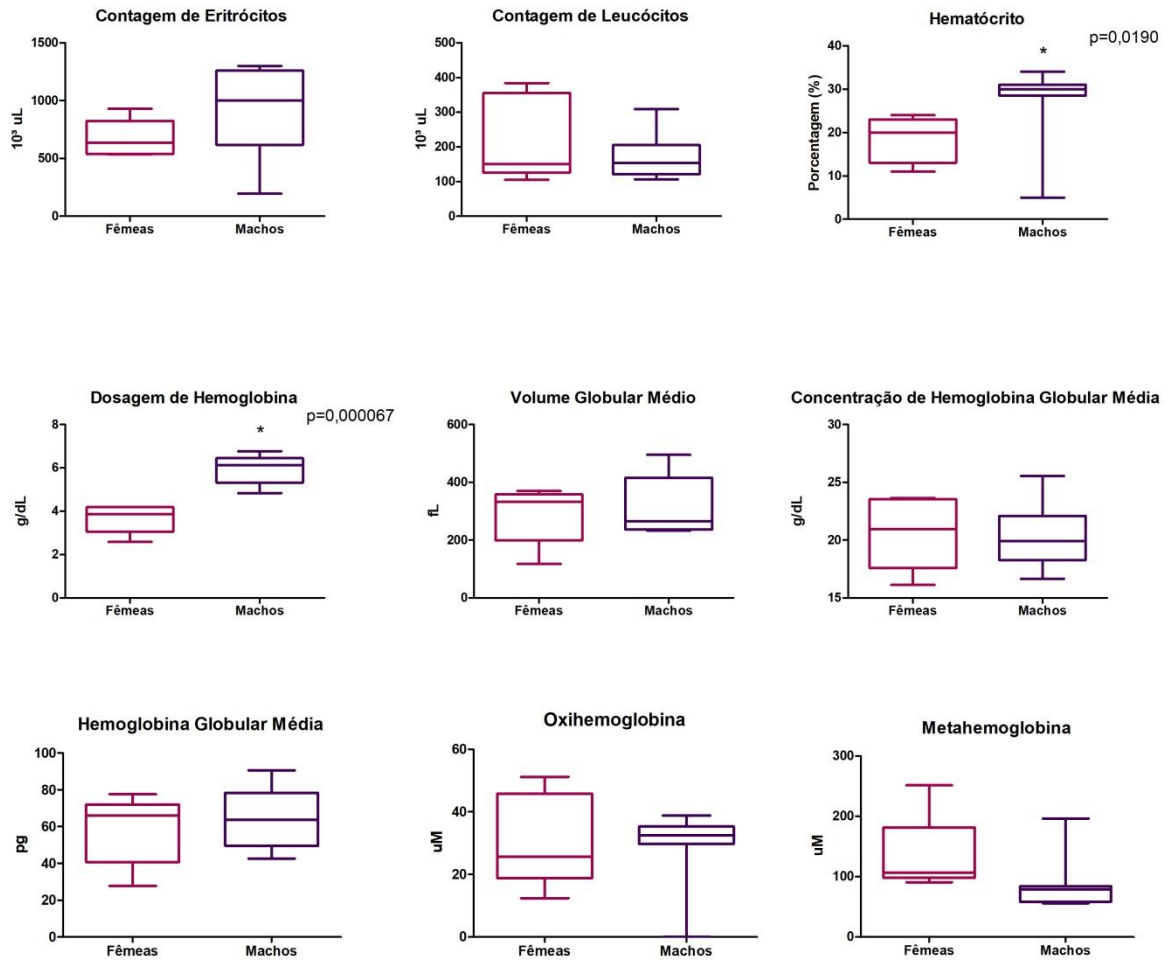


Gráfico 15: Comparação dos marcadores de hematologia entre fêmeas e machos, na estação Seca.

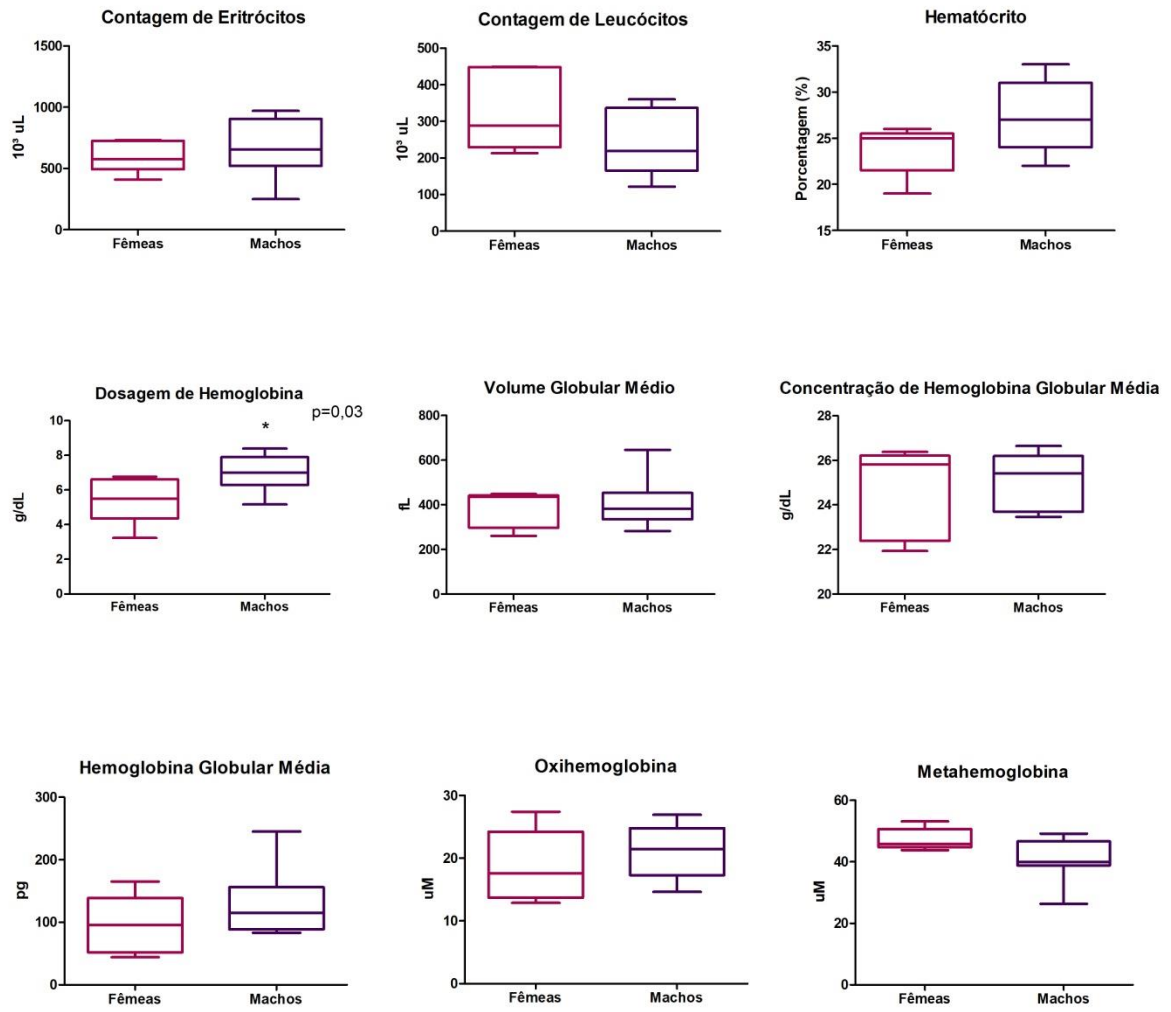


Gráfico 16: Comparação dos marcadores de hematologia entre as estações, considerando o grupo jabutis.

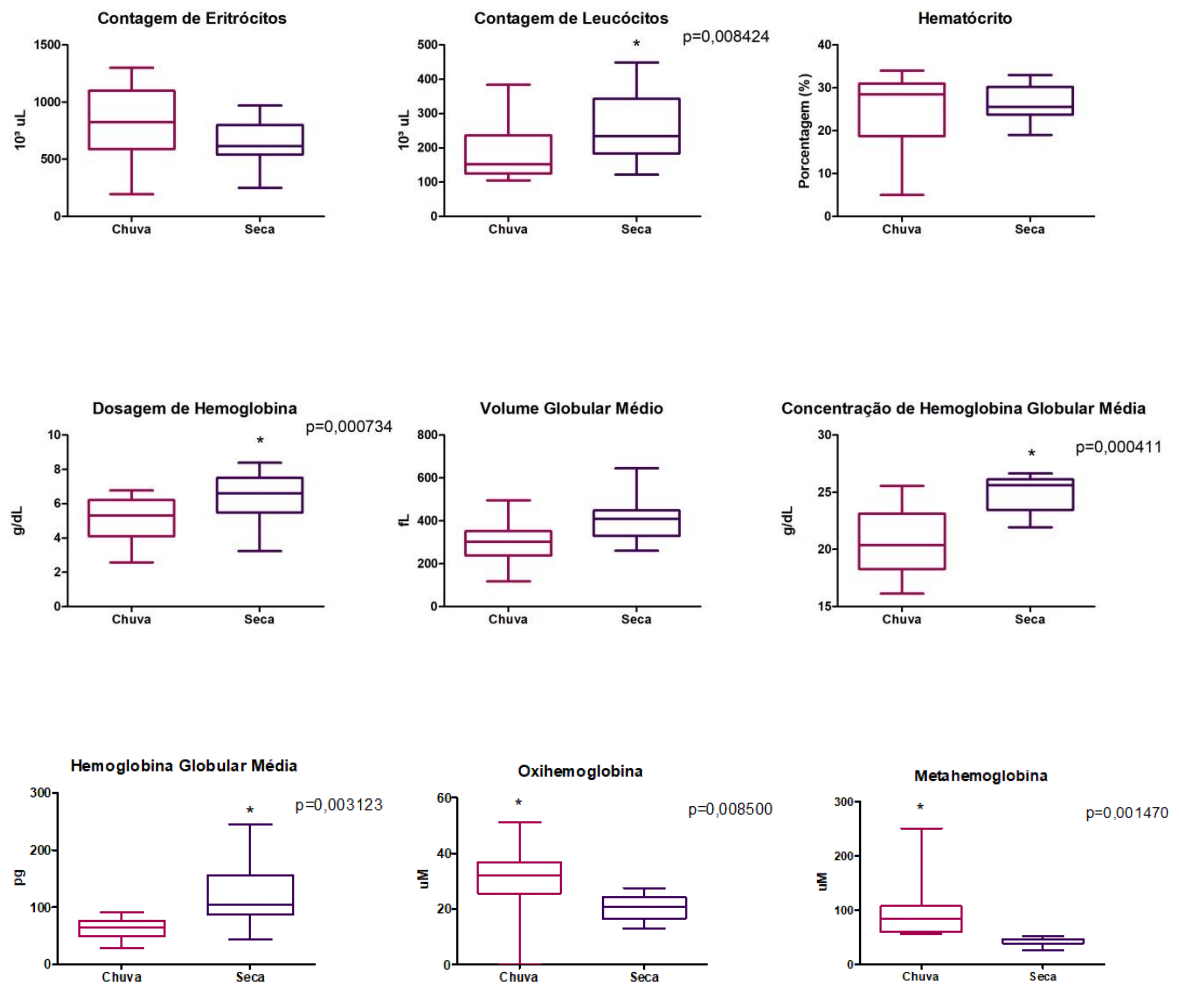


Gráfico 17: Comparação dos marcadores de hematologia entre as estações, considerando apenas fêmeas.

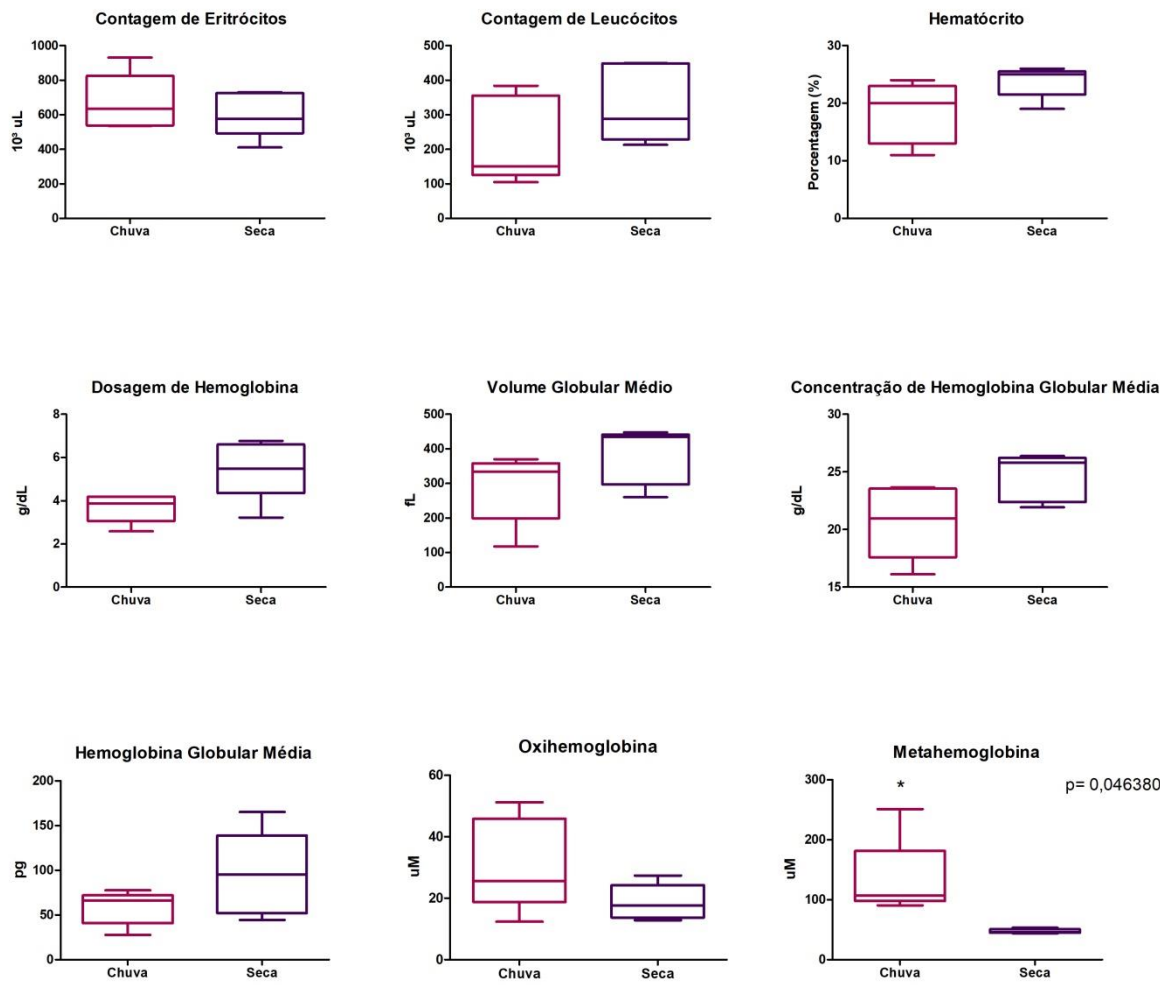
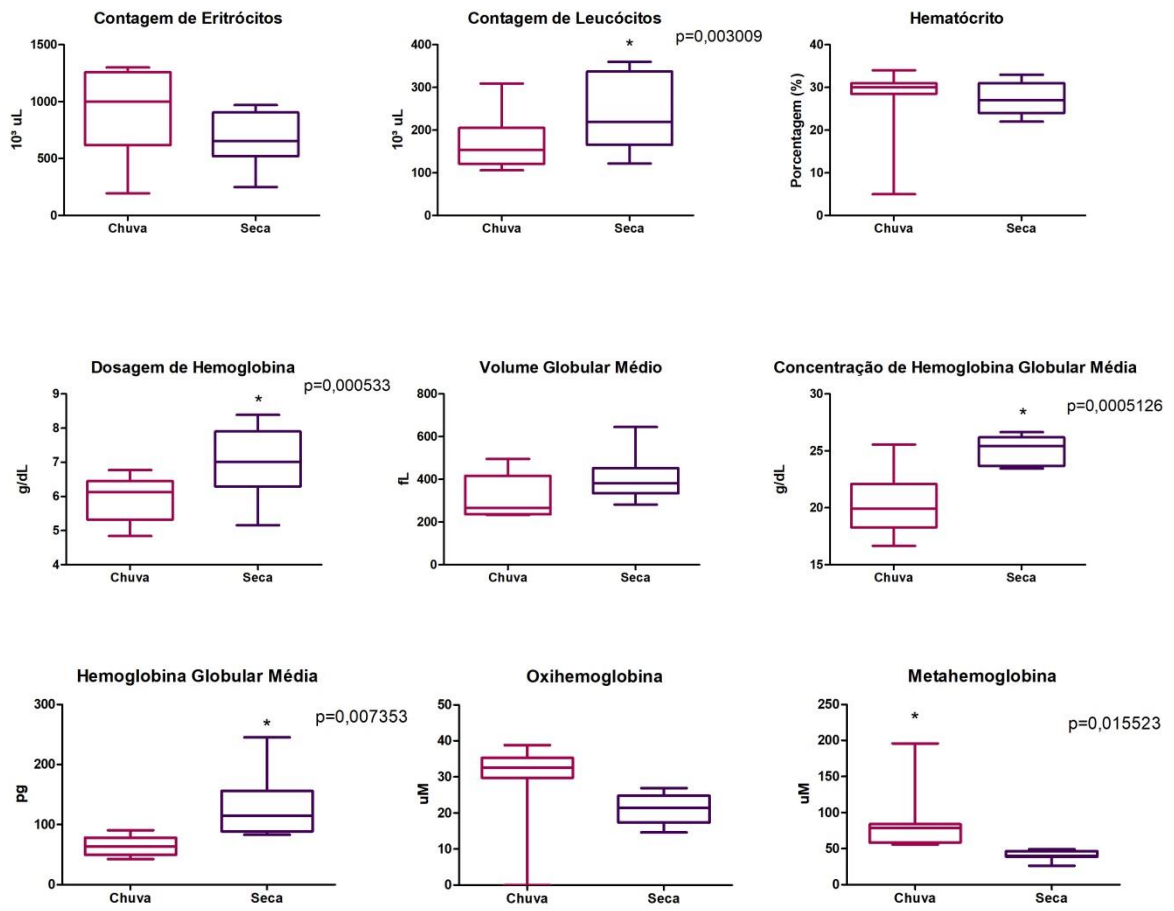


Gráfico 18: Comparação dos marcadores de hematologia entre as estações, considerando apenas machos.



6.4 Análise Citoquímica

As comparações realizadas a partir das análises citoquímicas objetivaram estabelecer se há uma relação da resposta citoquímica com o comportamento bioquímico analisado (seja do sistema do estresse oxidativo, metabólico ou hematológico).

Por meio das análises, percebe-se uma clara relação entre o aparecimento de micronúcleos e o aumento do dano oxidativo ao qual o animal está submetido (Tabelas 4, 5, 6, 7), assim como um aumento de nucléolos ativos nos momentos de maiores atividades de enzimas antioxidantes, sendo observada uma maior porcentagem de células com dois nucléolos ativos juntamente com maior atividade da enzima GPx em fêmeas na estação seca (Tabela 6) e em machos na estação seca (Tabela 7).

Não houve diferença entre a Razão de Heterófilos por Linfócitos em nenhuma das comparações realizadas, de forma que, para jabutis *C. carbonarius* provenientes de cativeiro, essa ferramenta como diagnóstico de estresse não foi eficiente. Possivelmente pelo fato de que a resposta celular demora a ocorrer após o estresse ao qual o animal foi submetido (por exemplo, pela estação seca), ou seja, o indicador provavelmente não indicará o estresse atual, e sim algum estresse ao qual o animal foi submetido anteriormente.

Em se tratando do diferencial de leucócitos, evidenciamos que a maioria dos tipos celulares não sofre influência da sazonalidade, e que o eosinófilo é o único tipo celular que sofre influência do sexo (Tabelas 2 e 4). A partir do resultado do trabalho, evidenciamos que a normalidade da contagem diferencial de leucócitos, em *C. carbonarius* provenientes de cativeiro, distribui-se: Basófilos de 11% a 18%, Heterófilos de 8% a 14%, Azurófilos de 9% a 14%, Linfócitos de 44% a 50% e Monócitos de 3% a 5%. Os Eosinófilos de machos variam de 7% a 13% e os de fêmeas de 2% a 6% (Tabelas 8 e 9).

Dessa forma, podemos inferir que a citoquímica corrobora com o comportamento fisiológico analisado dos animais, sendo uma ferramenta complementar no diagnóstico do bem-estar de indivíduos de cativeiro.

Gráfico 19: Comparação dos marcadores citoquímicos entre fêmeas e machos, independente da estação do ano.

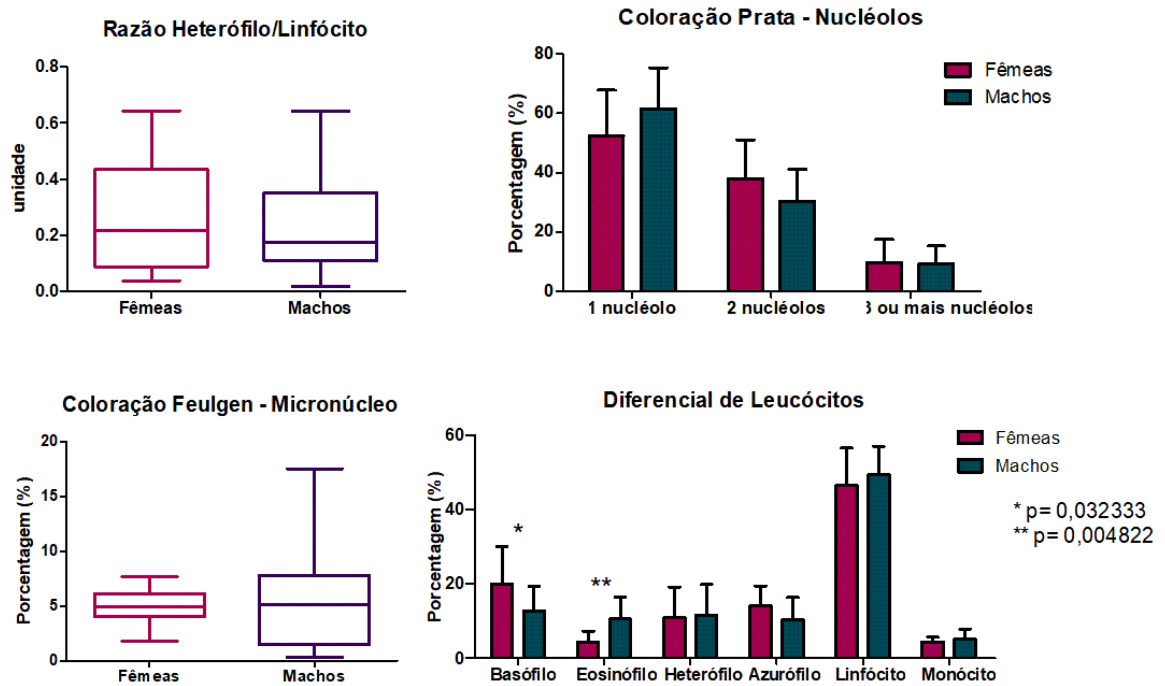


Gráfico 20: Comparação dos marcadores citoquímicos entre fêmeas e machos, na estação Chuvosa.

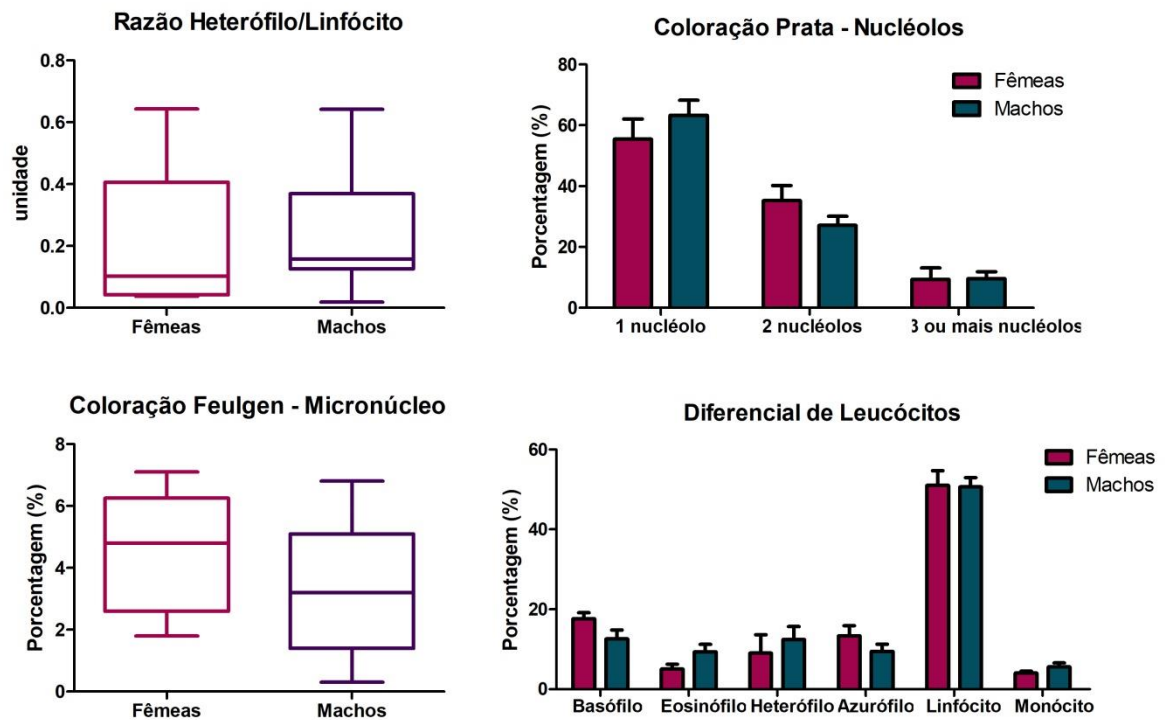


Gráfico 21: Comparação dos marcadores citoquímicos entre fêmeas e machos, na estação Seca.

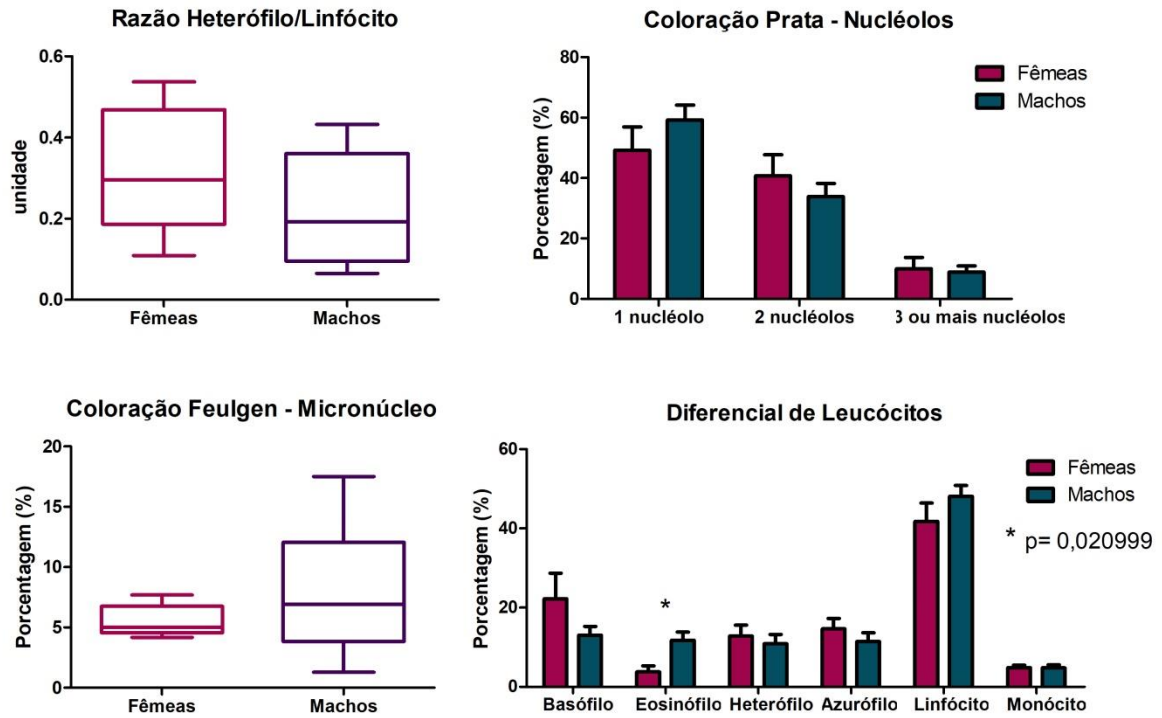


Gráfico 22: Comparação dos marcadores citoquímicos entre as estações, considerando o grupo jabutis.

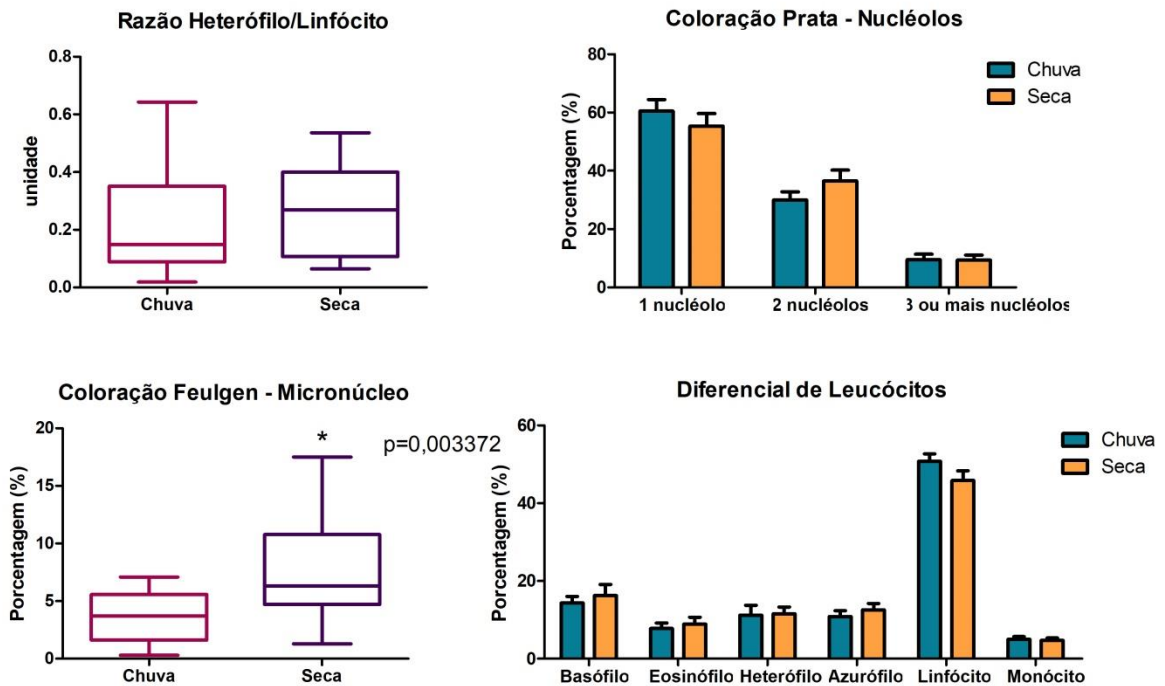


Gráfico 23: Comparação dos marcadores citoquímicos entre as estações, considerando apenas fêmeas.

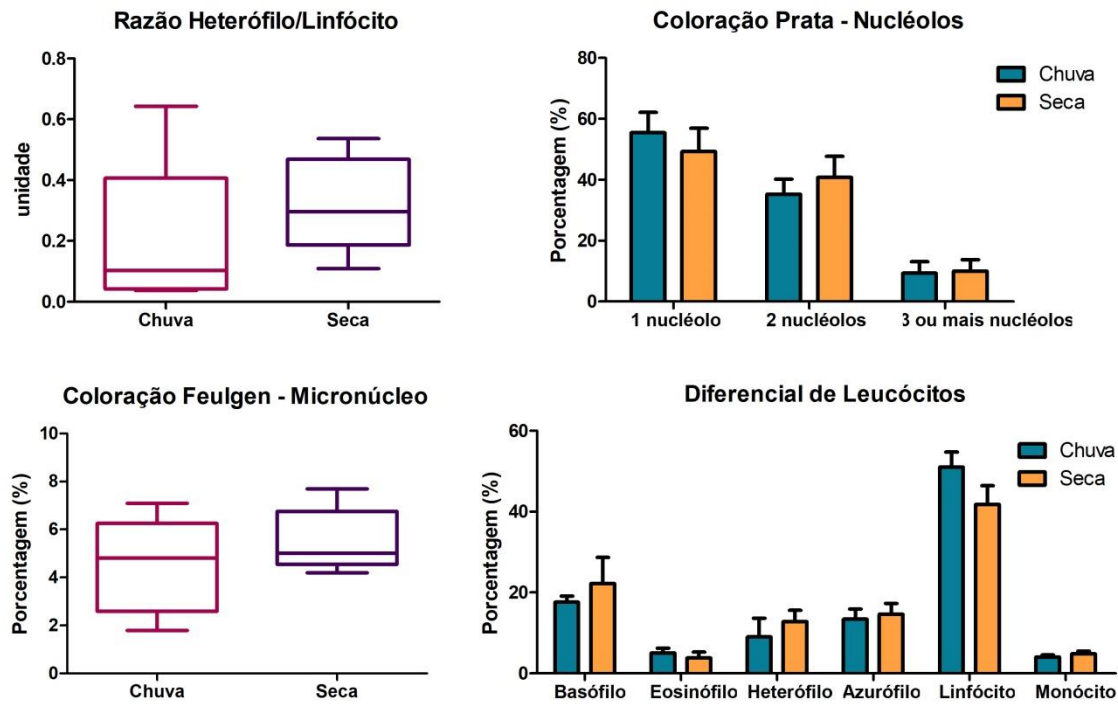
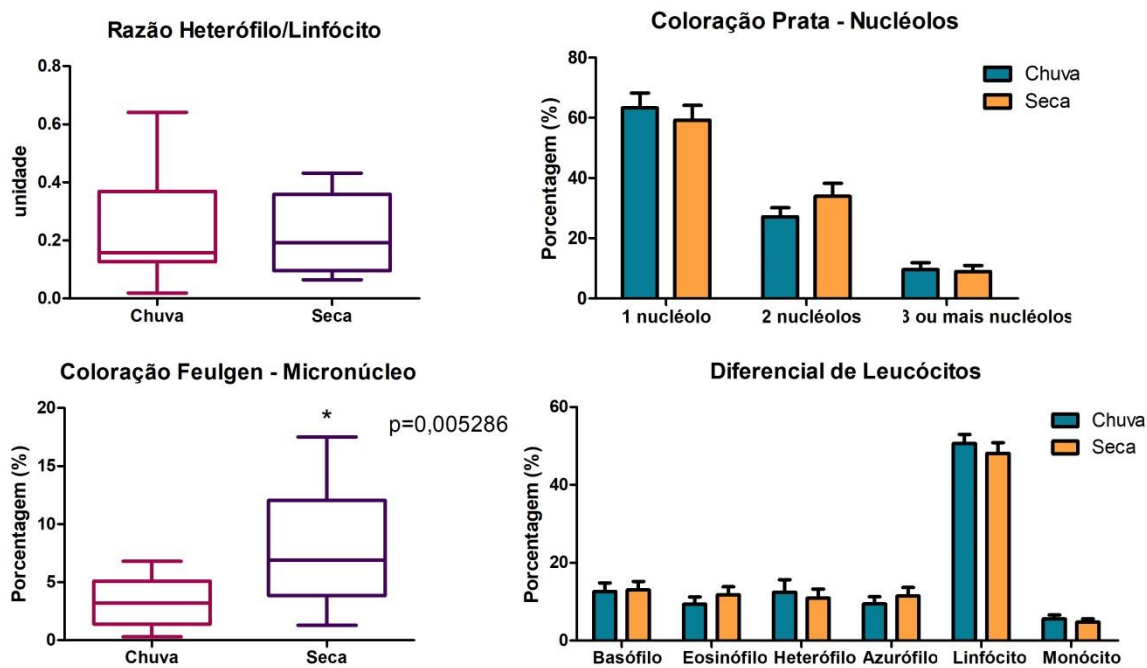


Gráfico 24: Comparação dos marcadores citoquímicos entre as estações, considerando apenas machos.



7 Conclusão

A partir da análise dos marcadores bioquímicos, hematológicos e citoquímicos, sugerimos que exista interferência do sexo e da sazonalidade na resposta fisiológica de indivíduos *C. carbonarius* provenientes de cativeiro.

Machos e fêmeas de *C. carbonarius* provenientes de cativeiro apresentam perfil-específico quando a respostas fisiológicas.

A estação seca foi a estação mais estressora a esses organismos, uma vez que apresentou maiores danos oxidativos.

Na estação chuvosa ocorre o período de maior atividade desses indivíduos, muito provavelmente por ser o período mais quente e com maior insolação, resultando em melhores condições para organismos ectotérmicos e possibilitando a ocorrência do comportamento reprodutivo.

Possivelmente, os machos de *C. carbonarius* são POS positivos discretos, enquanto as fêmeas apresentam-se em hormese.

O comportamento glicêmico dos jabutis-piranga, quando em cativeiro, permanece constante ao longo das estações do ano e não apresenta diferenças entre os sexos. Possivelmente, os espécimes estudados, por se encontrarem em ambiente com disponibilidade de recursos constante, não apresentam flutuações nos níveis de glicose que apresentariam quando livres na natureza, aliado ao fato da coleta ter ocorrido em momentos de jejum.

Os valores de Colesterol foram maiores em fêmeas, possivelmente pela alocação energética para a reprodução. Os valores de Triglicérides foram maiores nas fêmeas, principalmente na estação seca, provavelmente uma tentativa fisiológica de alocação de recursos a fim de compensar o gasto energético elevado no período chuvoso, correspondente ao período reprodutivo; assim como foram maiores nos machos na estação chuvosa, evidenciando o gasto energético para o comportamento reprodutivo.

Sobre os valores hematológicos, os machos aparentam responder fisiologicamente à mudança das estações do ano, modificando o valor de hematócrito e hemoglobina circulante, principalmente; possivelmente para compensar o gasto energético no comportamento sexual. Fêmeas aparentemente não sofrem flutuações quanto aos parâmetros hematológicos estudados ao longo do ano.

Machos na estação seca apresentam as maiores diferenças nos parâmetros bioquímico e hematológico analisados, o que pode ser indicativo de que ser macho e estar na estação seca contribui com maiores indicadores de estresse.

As análises citoquímicas apresentaram relação com os dados bioquímicos analisados, uma vez que há maior porcentagem de micronúcleo nos momentos de maiores danos oxidativos, assim como há mais nucléolos ativos à medida que as enzimas analisadas apresentam aumento na atividade.

Referências

- ALLEMAN, A. R.; JACOBSON, E. R.; RASKIN, R. E. **Morphological, cytochemical staining and ultrastructural characteristics of blood cells from eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamaneus*)**. Am J Vet Res. V.60. pp. 501-514. 1999.
- ALMEIDA, E. A.; BAINY, A.C. 2006. **Effects of Aerial Exposure on Antioxidant Defenses in the Brow Mussel *Perna perna***. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 49, n. 2, p. 225-229.
- ALMEIDA, E. A.; MARQUES, S.D.; KLITZKE, C.F.; BAINY, A.C.D.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P.; LOUREIRO, A.P.M. 2003. **DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna***. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v. 135C, n. 3, p. 295–303, 2003.
- ANDERSON, N. L.; WACK, R. F.; HATCHER, R. 1997. **Hematology and clinical chemistry reference ranges for clinically normal, captive New Guinea snapping turtle (*Elseya novaeguineae*) and the effects of temperature, sex, and sample type**. J Zoo Wildl Med;28:394–203.
- BARROS, Y. M. 2013. **Zoos e aquários tem papel importante na conservação**. Artigo de opinião. Oeco. Disponível em: < <http://www.oeco.org.br/colunas/colunistas-convidados/27224-zoos-e-aquarios-tem-papel-importante-na-conservacao/>> Acesso em: 09 de Junho de 2019.
- BARROWS, M. S.; MCAURTHUR, S.; WILKINSON, R. **Diagnostics**. In: MCARTHUR S.; WILKINSON, R.; MEYER, J. Editors. Medicine and surgery of tortoise and turtles. Oxford (United Kingdom: Blackwell Publishing Ltd. pp. 109-149. 2004.
- BENNETT, A. F.; DAWSON, W. R. 1976. **Metabolism**. In: Gans C, Dawson, WR (Eds.), The Biology of Reptilia. Academic Press, New York, pp. 127-223
- BERGAMI, B. C. S. **Valores hematológicos em *Geochelone carbonaria* (Jabuti)**. Monografia, FMVZ/UNESP, Botucatu. 2011.
- BERNDT, C.; LILLIG, C.H.; FLOHÉ, L. 2014. **Redox regulation by glutathione needs enzymes**. Frontiers in Pharmacology 5 (julho). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00168>.
- BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods**. New York: Grune & Stratton, 1975.
- BONINI-DOMINGOS, C. R.; OLIVEIRA, C. (Org.). ***Phrynops geoffroanus*: pesquisa no Brasil**. São José do Rio Preto, São Paulo. HN. p. 144. 2017.
- BOUNOUNS, D. I.; DOTSON, T. K.; BROOKS, R. L. et al. **Cytochemical staining and ultrastructural characteristics of peripheral blood leucocytes from the yellow rat snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*)**. Comp Haematol Int. v. 6. pp. 86-91. 1996.
- BRASIL. Lei nº 5.197, de 3 de Janeiro de 1967. **Dispõe sobre a proteção da fauna**. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/l5197.htm>. Acesso em: 09 de junho de 2019.

BRASIL. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. **Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente.** Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9605.htm>. Acesso em: 09 de junho de 2019.

CALISI, R. M.; BENTLEY, G. E. 2009. **Lab and field experiments: are they the same animal?** Horm. Behav. 56, 1–10. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.02.010.

CAMPBELL, T. W. 2006. **Clinical pathology of Reptiles.** In: MADER, D. R. (Ed.). Reptile Medicine and Surgery. Florida: Ed. Saunders Elsevier. p. 453-470.

CAMPBELL, T. W. 2015. **Exotic Animal Hematology and Cytology.** 4ª Ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 421

CARROL, L. 1865. **Alice no país das maravilhas.** Reino Unido.

CHACUR, M. G. M.; IBRAHIM, D. B.; ARREBOLA, T. A. H.; SANCHES, O. C.; GIUFFRIDA, R.; OBA, E.; RAMOS, A. A. 2015. **Avaliação da técnica de coloração AgNOR em testículos bovinos.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Belo Horizonte, v. 67, n. 2, p. 447-454.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. 2006. **Bioquímica Ilustrada.** Artmed.

CHUNG, C. S.; CHENG, C. H.; CHIN, S. C.; LEE, A. H.; CHI, C. H. 2009. **Morphologic and cytochemical characteristics of Asian yellow pond turtle (*Ocadia sinensis*) blood cells and their hematologic and plasma biochemical reference values.** J Zoo Wildl Med;40:76–85.

COSTA, M. J.; MONTEIRO, D. A.; OLIVEIRA-NETO, A. L.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. 2008. **Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®.** Ecotoxicology, 17: 153-163

DELL'ANNA, M. L.; OTTAVIANI, M.; ALBANESI, V.; VIDOLIN, A. P.; LEONE, G.; FERRARO, C.; COSSARIZZA, A.; ROSSI, L.; PICARDO, M. 2007. **Membrane lipid alterations as a possible basis for melanocyte degeneration in vitiligo.** J Invest Dermatol. v. 127. n.5, pp. 1226-1233.

DI MEO, S.; REED, T. T.; VENDITTI, P. VICTOR, V. M. 2016. **Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016:1–44. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>.

DRABKIN, D. **The standardization of hemoglobin measurement.** American Journal Medical Science, v. 215(1), 110-111p. 1948.

FALCE, M. C. L. B. 2009. **Hematologia de Répteis - Revisão Bibliográfica.** 2009. 53 f. Trabalho de conclusão do curso (Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. 1997. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Rev Ass Med Brasil; 43(1): 61-8

FOWLER, M. E. **Restraint and Handling of Wild and Domestic Animals**. 3 ed. Iowa: WileyBlackwell. p. 470, 2008.

FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. 2002. **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. Pp. 40–50.

FREITAS, J. S.; TERESA, F. B.; ALMEIDA, E. A. 2017. **Influence of temperature on the antioxidant responses and lipid peroxidation of two species of tadpoles (*Rhinella schneideri* and *Physalaemus nattereri*) exposed to the herbicide sulfentrazone (Boral 500SC®)**. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. Volume 197, Pp 32-44.

FRYE, F. L. **Hematology as applies to clinical reptile medicine**. In: Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry. 2nd edition. Malabar (FL): Krieger Publishing Co. pp. 209-279. 1991.

FRYE, F.L. **Reptile Care**. In: Atlas of Diseases and Treatments. Neptune City: T.F.H. Publications, v.1, 209-224p. 1991.

GILLET, M. P. T.; CRUZ, M. E. M. 1981. **Seasonal variation in plasma and hepatic lipids in relation to nutritional status and vitellogenesis in male and female lizards, *Ameiva ameiva* (Teiidae)**. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 70B. pp. 313-315.

GONÇALVES, A. F. 2014. **Estresse oxidativo promovendo a longevidade – um conceito de mito-hormese**. Revista Brasileira de Nutrição Funcional. N.59 pp 8-11.

GOULART, C. E. S. 2004. **Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis**. 1ª ed. Ed. L. F. Livros de Veterinária LTDA. p. 330.

GREEN, J.; SPILSBURY, R.; TAYLOR, B. 2009. **Exploring the world of reptiles and amphibians**. Chelsea House. New York, pp. 419.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. 2010. **Antioxidants: molecules, medicines, and myths**. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 393, n.4, pp. 561-564.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 2015. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5 edição. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.

HERMES-LIMA, M. 2004. **“Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals”**. In Functional Metabolism, organizado por K. B. Storey, 319–68. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch12>.

HERMES-LIMA, M. STOREY, K. B. 1993. **In vitro oxidative inactivation of glutathione Stransferase from a freeze tolerant reptile**. *Molecular and Cellular Biochemistry* 124:149-158

HERMES-LIMA, M.; MOREIRA, D. C.; RIVERA-INGRAHAM, G. A.; GIRAUD-BILLOU, M.; GENARO-MATTOS, T. C.; CAMPOS, E. C. 2015. **Preparation for Oxidative Stress Under Hypoxia and Metabolic Depression: Revisiting the Proposal two Decades Later**. *Free Radical Biology and Medicine*. n. 89. pp. 1122-1143.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. 1998. **Antioxidant Defenses and Metabolic Depression. The Hypothesis of Preparation for Oxidative Stress in Land Snails.** Comparative Biochemistry and Physiology B v.120. n. 3, pp. 437–448.

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. 2002. **Animal Response to Drastic Changes in Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress.** Comparative Biochemistry and Physiology C v.133. n. 4 pp. 537–56.

HERNANDEZ-DIVERS, S. J. **Diagnostic techniques.** In: MADER, D. R, editor. Reptile medicine and surgery. 2 edição. St Louis (MO): Saunders. pp. 490-532.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. 2018. **Fundamentos em hematologia de Hoffbrand** [recurso eletrônico]/tradução e revisão técnica: Renato Failace. 7 ed. Porto Alegre. Artmed.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. 1980. **Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method.** Experientia. v. 36, pp 1014–1015.

HUEY, R. 1982. **Temperature, physiology, and the ecology of reptiles.** In: Gans C, Pough FH (Eds.), The Biology of Reptilia. Academic Press, New York, pp. 25–91.

IBAMA. 2008. **Instrução Normativa Ibama 169, de 20 de Fevereiro de 2008.** ICMBio. Disponível em: < http://www.icmbio.gov.br/sisbio/images/stories/instrucoes_normativas/IN%20n%20169%20manejo%20ex%20situ.pdf> Acesso em: 09 de Junho de 2019.

INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2019. Disponível em: < <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index>>. Acesso em: 10 de Novembro de 2019.

INNIS, C.; KNOTEK, Z. Tortoises and Freshwater Turtles. In: Exotic Animal Laboratory Diagnosis, Editora Wiley Blackwell, 1ªEd. 630p. 2020.

IRIZARRY-ROVIRA, A. R. In: COWELL, R.L. (Ed.). **Veterinary clinical pathology secrets.** Missouri: Ed. Sauders Elsevier Inc. Mosby, 2004. p. 314-336

JACOBSON, E. R. **Blood collection techniques in reptiles.** In: FOWLER, M. E., editor. Zoo and wild animal medicine, current therapy. Philadelphia: WB Saunders Co. pp. 144-52. 1993.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. 1976. **Mechanism for several activities of glutathione S-transferases.** J. Biol. Chem. 251, 6183–6188.

LACY, E. L.; SHERIDAN, M. A.; MOORE, M. C. 2002. **Sex differences in lipid metabolism during reproduction in free-living tree lizards (*Urosaurus ornatus*).** General and Comparative Endocrinology 128:180-192

LAMIRANDE, E. W.; BRATTHAUER, A. D.; FISCHER, D. C.; NICHOLS, D. K. **Reference hematologic and plasma chemistry values of brown tree snakes (*Boiga irregularis*).** Journal of Zoo and Wildlife Medicine, v. 30, n. 4, p. 516-520. 1999.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B. 2004. **Reactive oxygen Species, aging, and antioxidative nutraceuticals.** Rev Food Sci Saf. v. 3. n.1, pp. 21–33.

- LING, J.; SÖLL, D. 2010. **Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site.** Proc Natl Acad Sci. v. 107. n. 9, pp. 4028-4033.
- LINNAEUS, C. 1766. **Systema Naturae. Editio Duodecima, Reformata.** Tomus I, Pars I, Regnum Animale. 12th Ed. Holmia Stockholm: Laurentii Salvii, 532 pp.
- LÓPEZ-BAREA, J.; PUEYO, C. 1998. **Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution.** Mutat Res, v. 399, n. 1, p. 3–15.
- LOYD, M.; MORRIS, P. **Chelonian venipuncture techniques.** Bull Assoc Reptilian Amphibian Vet. N.9. v. 1. Pp 26-28. 1999.
- MANNERVIK, B. 1987. **The enzymes of glutathione metabolism: an overview.** Biochem. Soc. Transact. v. 15, pp. 717–718.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. 1969. **Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein).** J Biol Chem; 244 :6049 – 6055.
- MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. A. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v. 30, p. 665-676, 1978.
- MELLOR, D. J.; HUNT, S.; GUSSET, M. 2015. **Cuidando da vida selvagem: A Estratégia Mundial de Zoológicos e Aquários para o Bem-estar Animal.** Gland, WAZA Escritório Executivo. p. 88.
- MOREIRA, D. C.; CARVAJALINO-FERNANDEZ, J. M.; SILVA, W. P. KUZNIEWSKI, F.; NAVAS, C. A. CARVALHO, J. E. HERMES-LIMA, M. 2020. **Preparation for oxidative stress in Proceratophrys cristiceps (Anura, Odontophrynidae) naturally estivating in the Brazilian Caatinga.** Science of the Total Environment. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137957>.
- MOREIRA, D. C.; VENANCIO, L. P. R.; SABINO, M. A. C. T.; HERMES-LIMA, M. 2016. **How Widespread is Preparation for Oxidative Stress in the Animal Kingdom?** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 200, pp. 64-78.
- MURO, J.; CUENCA, R.; PASTOR, J. et al. **Effects of lithium heparin and tripotassium EDTA on hematologic values of Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*).** J Zoo Wild Med. N. 29, v. 1. pp. 40-44. 1998.
- NARDINI, G.; LEOPARDI, S.; BIELLI, M. 2013. **Clinical Hematology in Reptilian Species.** Vet. Clin. Exot. Anim., v. 16, p. 1-30.
- NATT, M.P.; HERRICK, C.A. 1952. **A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken.** Poultry Science, v. 31(4), 735-738p.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. 2014. **Princípios de bioquímica de Lehninger** [recurso eletrônico] / David L. Nelson, Michael M. Cox ; [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga ... et al.] ; revisão técnica: Carlos Termignoni ... [et al.]. – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed.

- OLIVEIRA, M. R. 2015. **Efeitos da variação sazonal sobre o metabolismo intermediário e o status oxidativo de *Tropidurus catalanensis* (Squamata, Tropiduridae)**. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – Brasil.
- PERCY, M. J.; LAPPIN, T. R. 2008. **Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b(5) reductase deficiency**. Br. J. Haematol. v. 141 pp.298–308.
- PICKERING, A. M. 2013. **Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repeated stress**. Free Radicals Biomolecular Medicine. v.55, p. 109-118.
- PITOL, D. L.; ISSA, J. P.; CAETANO, F. H.; LUNARDI, L. O. 2008. **Radioautographic study of the seasonal distribution of leukocytes in turtles *Phrynops hilarii* (Chalonia Chelidae)**. Micron. v.39, n.8, p.1381-1386.
- POLETTA, G. L.; LARRIERA, A. KLEINSORGE, E.; MUDRY, M. D. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleous and comet assay. **Mutation Research**, v.650, p. 202-209, 2008.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. 2013. **Vertebrate life**. Editora Pearson, 9ªEd. 729p.
- RACHMILEWITZ, E. A.; WEIZER-STERN, O.; ADAMSKY, K.; AMARIGLIO, N.; RECHAVI, G.; BREDI, L.; RIVELLA, S.; CABANTCHIK, Z. I. 2005. **Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: Can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants?** Ann. N.Y. Acad. Science. v. 1054 pp. 118–123.
- RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, L. C. 2007. **Aspectos hematológicos, bioquímicos, morfológicos e citoquímicos de células sanguíneas em Viperídeos neotropicais dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* mantidos em cativeiro**. 2007. 177 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RATTAN, S.I.S.; DEMIROVIC, D. 2010. **Hormesis can and does work in humans**. Dose response; v. 8 n.1, pp. 58-63.
- RIFKIND, J. M.; MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E. 2014. **The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions**. Front. Physiol. v. 5 p. 500.
- RIGHETTI, B. P. H.; SIMÕES-LOPES, P. C.; UHART, M. M.; WILHELM FILHO, D. 2014. **Relating diving behavior and antioxidant status: Insights from oxidative stress biomarkers in the blood of two distinct divers, *Mirounga leonine* and *Arctocephalus australis***. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 173.1–6
- RISTOW, M.; SCHMEISSER, S. 2011. **Extending life span by increasing oxidative stress**. Free Radical Biology & Medicine; v. 51, pp. 327-336.
- RISTOW, M.; ZARSE, K. 2010. **How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis)**. Experimental Gerontology. v. 45. pp 410-418.

- SAINT GIRONS, M. C. 1970. **Morphology of the circulating blood cell**. In: GANS, C. PARSONS, T. C. Editors. *Biology of the reptilia*. Vol. 3. New York: Academic Press. pp 73-91.
- SALAKIJI, C.; SALAKIJI, J.; APIBAL, S. et al. 2002. **Hematology, morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of blood cells in king cobras (*Ophiophagus hannah*)**. *Vet Clin Pathol*. V. 31. Pp.116-126.
- SBH – SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. 2012. **Lista Completa de Répteis do Brasil**. Disponível em: < <http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2015-03-Repteis.pdf>> Acesso em: 26 de março de 2019.
- SCHUMACHER, J.; YELEN, T. 2006. **Anesthesia and analgesia**. In: MADER, D. R. editor. *Reptile medicine and surgery*. 2nd edition. St Louis (MO): Saunders. pp. 442-452.
- SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. 2012. **Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species**. *Molecular Cell* 48 (2):158–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>.
- SIEGEL, H. S. 1980. **Physiological stress in birds**. *Bioscience* v. 30, n. 8, p. 529-534.
- SIES, H. K.; OCH, O. R.; MARTINO, E. et al. 1979. **Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats**. *FEBS Lett* 1979; 103 :287 – 290.
- SILVA, T. L. et al. 2012. **Blood Sampling in Testudinidae and Chelidae**. *Herpetological Review*, v.43, n.1, p.64-65.
- SILVA, W. B.; MACHADO, C.; GOLDBERG, D. W.; MOREIRA, S. B.; SILVA, L. C. C. P.; FREIRE, I. M. A.; MACIEL, P. O.; ALMOSNY, N. R. P. 2009. **Avaliação da resposta inflamatória hematológica em cascavéis (*Crotalus durissus* Linnaeus, 1758) inoculadas com BCG**. *Pesq. Vet. Bras*. 29:985-992.
- SILVA, W. J. M. D.; FERRARI, C. K. B. 2011. **Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento**. *Rev Bras Geriatr Gerontol*; v. 14 n.3 pp. 441-451.
- SILVESTRE, A. M.; LAVIN, S. CUENCA, R. 2011. **La bioquímica sanguínea en clínica de reptiles**. *Consulta Difus. Vet.*, v. 200, p. 31-40. 2013. STACY, N. I.; ALLEMAN, A. R.; SAYLER, K. A. *Diagnostic Hematology of Reptiles*. *Clin. Lab. Med.*, v. 31. p. 87–108.
- SOMERO, G. N. 2004. **Temperature adaptation of proteins: searching for basic “strategies”**. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 139:321-333
- SOMERO, G. N.; LOCKWOOD, B. L.; TOMANEK, L. 2016. **Biochemical Adaptation: Response to Environmental Challenges, from Life’s Origins to the Anthropocene**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, INC. Publishers.
- SPICER, J. I. 2014. **What can an ecophysiological approach tell us about the physiological responses of marine invertebrates to hypoxia?** *J. Exp. Biol.* 217, 46–56. doi:10.1242/jeb.090365.

SPICKETT, C. M. 2013. **The Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2-Nonenal: Advances in Chemistry and Analysis**. Redox Biology 1. v.1. pp. 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.007>.

SPIX, J. B. 1824. **Animalia Nova sive Species Novae Testudinum et Ranarum**. Monachii, 53p.

STACY, N. I.; ALLEMAN, A. R.; SAYLER, K. A. 2011. **Diagnostic Hematology of Reptiles**. Clinics in Laboratory Medicine. v.31, p. 87-108.

STOREY, K. B. 2004. **Biochemical Adaptation**. In Functional Metabolism, organizado por K. B. Storey, 383–413. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch14>.

STRIK, N. I.; ALLEMAN, A. R.; HARR, K. E. 2007. **Circulating inflammatory cells**. In: JACOBSON, E. R. Editor. Infectious diseases and pathology of reptiles color atlas and text. Boca Raton (RL). CRC Press. pp 167-218.

SYKES, J. M.; KLAPHAKE, E. 2015. **Reptile Hematology**. Clin Lab Med. v. 35. n. 3. pp. 661-680.

TAPIA, P.C. 2006. **Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: “Mitohormesis” for health and vitality**. Medical Hypotheses; v. 66, pp. 832-843.

TAVARES, M. G.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. 1997. **Pattern of Nucleolar Activity During Spermiogenesis In Triatomines (Heteroptera-Reduviidae) As Analysed By Silver-Staining**. Cytobios, Cambridge/England, v.89, p. 93-103.

TESSEROLLI, G. L. 2004. **Análise hematológica e bioquímica em cágados pescoço-de-cobra (*Hydromedusa tectifera*) mantidos em cativeiro**. 2004. 58 f. Dissertação (Mestrado Patologia Veterinária) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

THE REPTILE DATABASE. 2014. ***Chelonoidis denticulatus* (Linnaeus, 1766)**. Disponível em: <<http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Chelonoidis&species=denticulatus>> Acesso em: 26 de março de 2017.

THE REPTILE DATABASE. 2015. ***Chelonoidis carbonarius* (Spix, 1824)**. Disponível em: <<http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Chelonoidis&species=carbonarius>> Acesso em: 26 de março de 2019.

TROIANO, J. C.; GOULD, E. G.; ALTHAUS, R.; MALINSKAS, G.; GOULD, J. A.; HEKER, J.; VIDAL, J. C.; AMANTINI, E.; SIMONCINI, C. 2001. **Blood biochemical profile of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) in captive**. Journal of Venomous Animals and Toxins. v. 7, n. 2, p. 183-189.

TTWG - TURTLE TAXONOMY WORKING GROUP [VAN DIJK, P.P.; IVERSON, J.B.; RHODIN, A.G.J.; SHAFFER, H.B.; BOUR, R.] 2017. **Turtles of the World: annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution with maps and conservation status**. In: Rhodin, A.G.J.; Pritchard, P.C.H.; van Dijk, P.P.; Saumure, R.A. (Eds). Conservation Biology

of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. Chelonian Research Monographs, n.5, p. 329-479. Disponível em: <http://www.iucn-tftsg.org/wp-content/uploads/file/Accounts/crm_5_000_che cklist_v7_2014.pdf>

UCHIYAMA, M. MIHARA, M. 1978. **Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test.** Anal. Biochem. 86, 271–278.

UETZ, P.; ETZOLD, T.; CHENNA, R. 2018. **The EMBL Reptile Database.** Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>>. Acesso em: 30 de julho de 2018.

UMBREIT, J. 2007. **Methemoglobin – it's not just blue: a concise review.** Am. J. Hematol. v. 82, pp. 134–144.

VALDIVIA, P. A.; ZENTENO-SAVIN, T.; GARDNER, S. C.; AGUIRRE, A. A. 2007. **Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizi*).** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 146, p.111-117.

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

VAREJÃO-SILVA, M. A. 2001. **Meteorologia e Climatologia.** Brasília: INMET, Gráfica e Editora Pax. 532 p.

VENANCIO, L. P. R.; SILVA, M. I. A.; SILVA, T. L.; MOSCHETTA, V. A. G.; ZUCCARI, D. A. P. C.; ALMEIDA, E. A.; BONINI-DOIMNGOS, C. R. 2013. **Pollution-induced metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles.** Ecotoxicology and environmental safety, v. 97, p.1-.

VOSKOU, V.; ASLAN, M.; FANIS, P.; PHYLACTIDES, M.; KLEANTHOUS, M. 2015. **Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease.** Redox Biology, v. 6, pp. 226-239. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.018>

WELKER, A. F. 2009. **Efeito da disponibilidade de oxigênio e da privação de alimentar sobre o metabolismo de radicais livres.** (Tese de Doutorado) (Universidade de São Paulo): São Paulo

WELKER, A. F.; MOREIRA, D. C. CAMPOS, E. G.; HERMES-LIMA, M. 2013. **Role of Redox Metabolism for Adaptation of Aquatic Animals to Drastic Changes in Oxygen Availability.** Comparative Biochemistry and Physiology A 165 (4):384–404. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.003>.

WILKINSON, R. **Clinical pathology.** In: MCARTHUR, S. WILKINSON, R. MEYER, J. Editors. Medicine and surgery of tortoise and turtles. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. pp 141-186. 2004.

WINTERBOURN, C. C. 1990. **Oxidative reactions of hemoglobin.** Methods Enzymol 186:265–272.

- YANG, P.; YU, P. WU, S. CHIE, C. 2014. **Seasonal hematology and plasma biochemistry reference range values of the yellow-marginated box turtle (*cuora flavomarginata*).** Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 45(2):278-286. <https://doi.org/10.1638/2013-0125R1.1>
- ZAGO, C. E. S.; FERRAREZI, A. L.; VIZOTTO, L. D. OLIVEIRA, C. et al. 2010. **Hemoglobin polymorphism and hematological profile of Geoffroy's sidenecked turtle (*Phrynops geoffroanus*, Testudines) in the northwestern region of São Paulo State, Brazil.** Genet. Mol. Res. V.9. pp 721-726. <http://dx.doi.org/10.4238/vol9-2gmr731>
- 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, morphometrical and ultrastructural characterization of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) blood cells, in diferente environments.** Micron, v.41, p. 1005-1010.
- ZHANG, F.; GU, H.; LI, P. 2011. **A review of Chelonian Hematology.** Asian Herpetol. Res. V.2. pp 12-20. <http://dx.doi.org/10.3724/ SP.J.1245.2011.00012>
- ZHANG, X. H. 2010. **Regulation of protein function by residue oxidation.** Proteomics Insights. v. 3, pp. 17-24.
- ZWIETEN, R. V.; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. 2013. **Inborn defects in the anti-oxidant systems of human red blood cells.** Free Radical Biology and Medicine, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.022>

APÊNDICE A – Média e desvio padrão de todos os indivíduos estudados

Apêndice A: Representação da média e do desvio padrão, entre as estações seca e chuvosa, dos indivíduos analisados.

Indivíduo	Massa (Kg)		Comprimento (cm)		Largura (cm)	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Fêmea 01	6,94	0,08	42,00	0	38,50	2,12
Fêmea 02	6,94	0,62	42,75	0,35	39,25	1,06
Fêmea 03	5,65	0,21	42,00	0	37,00	0
Fêmea 04	5,45	0,07	38,25	0,35	33,50	0,70
Fêmea 05	5,44	0,08	40,00	0	36,00	1,41
Macho 06	15,60	0,84	62,00	0	57,50	2,12
Macho 07	14,10	0,14	59,50	0,70	52,00	0
Macho 08	6,29	0,41	45,25	0,35	38,50	0,70
Macho 09*	5,10	0,56	39,00	0	35,00	0
Macho 10	5,06	0,08	35,50	0,70	34,75	0,35
Macho 11	4,71	0,29	39,25	0,35	33,50	0,70
Macho 12	4,47	0,04	35,50	0	32,50	0,70
Macho 13	3,60	0,84	36,25	0,35	34,00	0,70
Macho 14	3,38	0,53	35,50	0,70	30,75	1,06
Macho 15	2,52	0,73	31,00	0,70	27,00	0

Legenda: A massa está expressa em quilos (Kg), e o comprimento e largura da carapaça em centímetros (cm). Os indivíduos foram enumerados em ordem decrescente de massa. Observação: o macho #09 apresentou hemorragia no período da seca, e, portanto, foi desconsiderado nas análises estatísticas. Fonte: Elaborado pela autora.

APÊNDICE B – Valores de normalidade do hemograma de jabutis *C. carbonarius*

Apêndice B: Valores de normalidade do hemograma de jabutis *C. carbonarius* sem diferenciação entre as estações do ano.

Normalidade do hemograma de <i>C. carbonarius</i>	
	Valores de Normalidade
Hemograma	
Jabutis	
Eritrócitos Totais (10 ³ uL)	739,46 (629,41 – 849,51)
Hematócrito (%)	25,28 (22,69 – 27,88)
VGM (fL)	355,14 (313,37 – 396,92)
Razão Heterófilo/Linfócito (un)	0,24 (0,17 – 0,31)
Coloração de Prata (%)	
1 Nucléolo	58,63 (51,91 – 65,35)
2 Nucléolos	33,14 (28,36 – 37,93)
3 ou mais Nucléolos	9,40 (6,78 – 12,03)
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)	
Basófilos	15,32 (11,99 – 18,64)
Heterófilos	11,39 (8,25 – 14,52)
Azurófilos	11,92 (9,57 – 14,27)
Linfócitos	47,74 (44,54 – 50,93)
Monócitos	4,88 (3,94 – 5,82)
Machos	
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)	
Eosinófilos	10,55 (7,62 – 13,48)
Fêmeas	
Leucócitos totais (10 ³ uL)	275,40 (185,90 – 364,90)
Dosagem de Hemoglobina Total (g/dL)	4,58 (3,57 – 5,58)
CHGM (g/dL)	22,63 (20,30 – 24,97)
HGM (pg)	76,82 (48,66 – 105)
Micronúcleo (%)	5,01 (3,79 – 6,22)
Contagem Diferencial de Leucócitos (%)	
Eosinófilos	4,40 (2,31 – 6,48)

Legenda: Os valores que não apresentavam diferenças foram agrupados na categoria jabutis. Valores expressos em média (intervalo de confiança de 95%). Fonte: Elaborado pela autora.

APÊNDICE C – Valores de normalidade do hemograma de jabutis *C. carbonarius* nas diferentes estações do ano

Apêndice C: Valores de normalidade do hemograma de jabutis *C. carbonarius* nas diferentes estações do ano.

Normalidade do hemograma de <i>C. carbonarius</i> nas estações do ano		
	Chuva	Seca
Hemograma		
Jabutis		
Oxihemoglobina	29,60 (20,77 – 38,44)	21,06 (17,88 – 24,23)
Machos		
Leucócitos totais (10 ³ uL)	169,11 (120,05 – 218,17)	235 (167,43 – 302,56)
Dosagem de Hemoglobina Total (g/dL)	5,87 (5,37 – 6,38)	7,01 (6,23 – 7,79)
CHGM (g/dL)	20,38 (18,31 – 22,45)	25,13 (24,18 – 26,08)
HGM (pg)	64,67 (52,41 – 76,92)	127,34 (87,22 – 167,46)
Metahemoglobina (µM)	83,92 (50,35 – 117,49)	41,24 (35,92 – 46,55)
Micronúcleo (%)	3,22 (1,50 – 4,94)	8,26 (4,20 – 12,32)
Fêmeas		
Metahemoglobina (µM)	133,20 (50,51 – 215,80)	47,35 (42,86 – 51,83)

Legenda: Os valores que apresentavam diferenças entre os sexos biológicos foram separados em machos e fêmeas. Valores expressos em média (intervalo de confiança de 95%). Fonte: Elaborado pela autora.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética (CEUA – IBILCE/UNESP)



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Etnozoologia e caracterização de parâmetros de normalidade de hematologia e capacidade antioxidante de *Chelonoidis carbonarius* (Spix, 1824)", registrada com o nº. 197/2018 - CEUA, sob a responsabilidade da Professora Doutora Claudia Regina Bonini Domingos, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou de ensino), encontra-se de acordo com os Preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), do IBILCE/UNESP, em reunião de 23 de outubro de 2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/11/2018 a 15/12/2019
Espécie/linhagem/Raça	<i>Chelonoidis carbonarius</i>
Nº de animais	20 (vinte)
Peso/Idade	Aprox. 10Kg/Maior de 5 anos
Sexo	Fêmea e Macho
Origem	Animais mantidos em cativeiro no Zoológico Municipal Palmeira Zancaner de Catanduva/SP

São José do Rio Preto, 23 de outubro de 2018.


Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Freitas
Presidente da CEUA

ANEXO B – Ensaio da Catalase

- Diluir as amostras de sangue em 50x
- Quantificação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase, por meio do decréscimo de absorbância em 240 nm a 30°C.

→ Preparo de amostras

1. Centrifugar amostra de sangue total por 3 min a 1500 rpm a 4°C, coletar 10 uL de papa de eritrócitos e misturá-los a 490 uL de água mili-Q
↪ hemolisado para as análises

→ Preparo do tampão Tris - HCl 1M, pH 8,0 contendo EDTA 0,5 mM

- Tris (hidrocimetil) aminometano 30,27 g
- EDTA 0,365 g
- H₂O destilada 250 mL

↪ ajustar o pH para 8,0 com HCl ou NaOH

↪ preparar antes e armazenar na geladeira

* Tris - HCl (1 M)

1 M - 121 g - 1 L

6,055 g - 50 mL

30,27 g - 250 mL

* EDTA 5mM

1 M - 292,2 g - 1 L

5 mM - 1,461 g - 1 L

0,07305 g - 50 mL

0,365 g em 250 mL

Pesar os dois sais, colocar o respectivo volume de H₂O, ajustar o pH para 8

→ Meio de reação

*caso for H₂O₂ a 10%, colocar 1 mL

1. Colocar 100 uL de H₂O₂ 30% ou 1 mL de H₂O₂ 10% em 100 mL de água mili-Q (concentração = 10 mM) usar peixinho
2. Desta solução H₂O₂ 10 mM retirar 10 mL e jogar fora (pia)
3. Adicionar 5 mL do tampão da catalase nos 90 mL restantes
4. Adicionar 4 mL de água mili-Q

OBS: Caso seja necessário diluir a amostra, diluídas no tampão diluindo 10x (1 mL de tampão + 9 mL de água mili-Q)

10 uL de papa

10 uL em 90 uL

10 uL em 190 uL → alíquota de 50 uL

ENSAIO

Reativos

Meio de reação

990 µL

Amostra

10 µL

Na referência: Água MiliQ 1000 µL

BRANCO: não se faz

Leitura: a 240nm, 1 min.

Cubetas de quartzo

ANEXO C - Ensaio da Glutathione Peroxidase (GPx)

Reagentes:

- Tampão PO_4^- 0,1 M; pH 7,0
- EDTA 0,005 M; pH 7,0 $\rightarrow$ 292,24 g/mol: 730,6 mg em 500 mL H_2O up
- NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo-P): 1,72 mg em 10 mL do meio de reação
- GSH (3,2 mg em 10 mL do meio de reação) $\rightarrow$ Reduz
- tBOOH

PREPARO DO TAMPÃO PO_4^- (500 ml)

Monobásico (KH_2PO_4)	Dibásico (K_2HPO_4)
1 M - 136,1 g	1 M - 174,2 g
0,1 M - 6,805 g em 1 L	0,1 M - 8,71 g em 1 L
3,4 g em 500 mL	4,35 g em 500 mL

PREPARO DO MEIO DE REAÇÃO

• Tampão PO_4^-	25 mL
• EDT	10 mL
• G.reductase	11 μL
• GSH	16 mg (0,016 g)
• H_2O	15 mL
• NADPH	0,0096 g (nicotinamida adenina dinucleotídeo-P)

PREPARO DO tBOOH (Peróxido de terbutila 0,5 mM)

128 μL em 10 mL do tampão

ENSAIO

Reativos

Meio de reação (manter no gelo)	(990 - X) μL
tBOOH	10 μL
Amostra	X

BRANCO: 990 μL meio de reação + 10 μL tBOOH
Leitura: 1 minuto a 340 nm.

ANEXO D – Ensaio da Glutathione S-Transferase (GST)

- Reagentes estoque:
 - 1) Tampão fosfato: 0,2 M KPO₄ pH 6,5
 - 2) CDNB (10 mM estoque) em etanol

Pesar 0,00304 g de CDNB em um tubo tipo eppendorf, acrescentar 1,5 mL de etanol, passar parafilme e agitar bem (vórtex) até os cristais se desfazerem completamente
- Reagentes de trabalho (preparar na hora)
 - * CDNB (2 mM)

Diluir 1,15 mL de CDNB 10 mM (estoque) em 4,05 mL de tampão fosfato em um tubo de ensaio. Passar parafilme e agitar. Manter no gelo. Suficiente para microplacas 96 well.

 - * GSH (2,22 mM)

Pesar 0,0036 g de GSH. Transferir para tubo de ensaio de vidro. Acrescentar 5,2 mL de tampão fosfato. Passar parafilme e agitar bem. Proteger da luz e manter no gelo. Suficiente para microplacas de 96 well.
- Preparo do meio de reação

	Quantidade
Tampão fosfato 0,2 M pH 6,5	5,2 mL
GSH	0,0036 g
CDNB	
Tampão fosfato 0,2 pH 6,5	4,05 mL
CDNB (10 mM)	1,15 mL

 - * Quando trocar de grupo, colocar referência novamente
$$\text{GSH} + \text{CDNB} \leftrightarrow \text{CDNB-SG} + \text{HCl}$$

Ensaio espectrofotômetro a 30 °C, $\lambda = 340 \text{ nm}$.

Reagentes necessários: Solução tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 6,5; GSH 200 mM; CDNB 200 mM; amostra

Preparando os Reagentes:

- Solução tampão fosfato de potássio:** Para preparar 1,0 L de solução tampão fosfato de potássio 0,2 mol.L⁻¹ pH 6,5; são necessários 13,605 g de fosfato de potássio monobásico + 17,42 g de fosfato de potássio dibásico, o pH deve ser corrigido com HCl se precisar abaixar o pH ou NaOH para aumentar (OBS: deve-se usar os dois fosfatos com a finalidade de chegar mais rápido no pH desejado). A solução deve ser feita com água miliQ.
- GSH:** pesar 61,46 mg e adicionar 1,0 mL de solução tampão fosfato de potássio 0,2 mol.L⁻¹ pH 6,5.
- CDNB:** pesar 40,51 mg e adicionar 1,0 mL de etanol absoluto.

Na Cubeta:

Reagentes	Volume (µL)
Solução tampão Fosfato de Potássio	980 - X

GSH	10
CDNB	10
Amostra	X

Na Referência:

- Solução tampão Fosfato de Potássio (1000,0 μL)

Hidrólise espontânea:

- Solução tampão Fosfato de Potássio (980,0 μL)
- GSH (10,0 μL)
- CDBN (10,0 μL)

Amostra:

- **Brânquias:** usar 10,0 μL sem diluir.
- **Fígado:** usar 10,0 μL diluído. (10 μL de amostra em 90 μL de solução tampão).

ANEXO E - Protocolo de preparo de amostra e análise de Peroxidação Lipídica

Preparo do TBA

- Pesar 0,04 g de ácido tiobarbitúrico;
- Dissolver em 10 mL de HCl 0,2 M.

Preparo da amostra:

- Pesar cerca de 100 mg de tecido;
- Adicionar cerca de 3x a massa de tecido em volume de Tampão Tris HCl 100 mM pH 8,0;
- Homogeneizar utilizando o *mixer*;
- Acrescentar 300 μ L da solução de TBA;
- Incubar por 40 min a 90 °C;
- Colocar as amostras no gelo;
- Após resfriar, adicionar 1mL de álcool n-butílico;
- Centrifugar a 5000 rpm por 5 min;
- Coletar 700 μ L do sobrenadante e estocar para análise.

Preparo da curva de calibração (TMP):

Solução estoque de 0,1 μ mol/mL:

- Colocar 1,65 μ L de tetrametoxipropano (TMP) em 1 mL de H₂O;
- Agitar bem;
- Diluir 10 μ L da solução anterior em 900 μ L de H₂O;
- Agitar novamente;
- Diluir a solução estoque nos padrões, seguindo a tabela:

Concentração (nmol/mL)*	Volume de solução estoque (μ L)	Volume de tampão Tris, H ₂ O, PBS (μ L)	Volume da solução de TBA (μ L)
0,5	5	295	300
1	10	290	300
1,5	15	285	300
2	20	280	300
1,5	25	275	300

- Incubar por 40 min a 90 °C;
- Colocar as amostras no gelo;
- Após resfriar, adicionar 1 mL de álcool n-butílico;
- Centrifugar a 3500 rpm por 3 min;
- Coletar 700 μ L do sobrenadante e estocar para análise.

*Isso é, concentração que será extraída com 1 mL de n-butanol, portanto, 0,5; 1; 1,5; 2,0 e 2,5 nmol por mL de n-butanol! Se for injetado 20 μ L do padrão, a curva deve ser construída com área do pico X os seguintes valores, em picomol: 10, 20, 30, 40 e 50!

- *Preparo das amostras e da curva*
→ curva

- fazer procedimento acima (em eppendorf de 2 mL)
 - *amostras*
 - 300 uL de amostra (plasma) em 300 uL de TBA
 - branco: 300 uL de H₂O d em 300 uL de TBA
 - ↪ Incubar por 40 min a 90 °C (nível de água baixo, eppendorf abre c/ calor)
 - ↪ Após incubação, adicionar 1 mL de *álcool-n-butílico* nas amostras (inclusive na curva) e agitar bem (vórtex)
 - ↪ Centrifugar a 5000 rpm por 5 min
 - ↪ Coletar pelo menos 700 uL do sobrenadante
- ↪ Colocar na cubeta para leitura em 535 nm

ANEXO F – Análise Bioquímica – Dosagem de Glicose, Colesterol e Triglicérides

Princípio da Técnica

As análises de concentração bioquímica de glicose, colesterol e triglicérides serão determinadas a partir do sistema enzimático (metodologia de Coloração Enzimática de Trinder), descrito pela LabTest Diagnósticos S.A. em seu manual de uso do kit comercial de Glicose Liquiform (Ref.: 133), Colesterol Liquiform (Ref.: 67) e Triglicérides Liquiform (Ref.: 87), respectivamente.

Procedimentos

O procedimento para realização das análises bioquímicas, segue os passos a seguir:

- Utilizar três tubos de ensaio, para respectivos componentes: branco, padrão e teste;
- Acrescentar 1,0mL de Reagente nº1 em cada um dos tubos, seguido de 0,01mL de Padrão nº2 no tubo padrão e 0,01mL de Amostra no tubo teste;
- Misturar vigorosamente e colocar em banho-maria a 37°C durante dez minutos;
- Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 505nm ou filtro verde (490 a 520nm), acertando o zero como branco.

Para averiguar a linearidade das concentrações (Figura 23), o resultado final será a absorbância do teste multiplicado pelo fator de calibração, que pode ser calculado pela divisão de 100 pela absorbância padrão, sendo ele, expresso em mg/dL, para glicose e o mesmo para colesterol e triglicérides, porém, o fator de calibração deverá ser a divisão de 200 pela absorbância padrão.

Figura 23: Cálculo da linearidade dos resultados da análise de glicose, colesterol e triglicérides sanguínea.

Glicose (mg/dL) = Absorbância do Teste x Fator Fator de Calibração = $\frac{100}{\text{Absorbância do Padrão}}$
Colesterol (mg/dL) = Absorbância do Teste x Fator Fator de Calibração = $\frac{200}{\text{Absorbância do Padrão}}$
Triglicérides (mg/dL) = Absorbância do Teste x Fator Fator de Calibração = $\frac{200}{\text{Absorbância do Padrão}}$

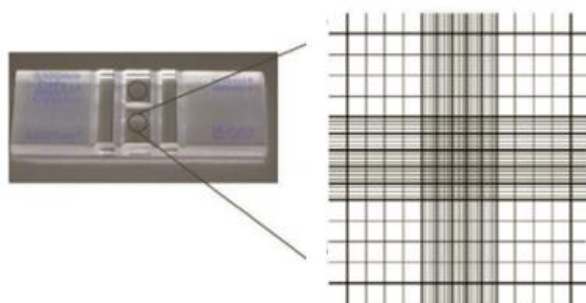
Fonte: Modificado de Uso, LabTest Diagnóstica R.A., 2020.

ANEXO G – Metodologia do Hemograma – Contagem Global de Células Sanguíneas

Princípio da Técnica

Devido à presença de núcleo nas células vermelhas e trombócitos, a contagem celular dos répteis deve ser realizada de forma manual e não automatizada, segundo Frye (1991). Seus métodos permitem calcular o número absoluto de células de um determinado volume de amostra. A técnica consiste em colocar uma solução contendo amostra de sangue diluída junto de um reativo apropriado para o tipo celular estudado em uma Câmara de Neubauer (Figura 24). Em instantes, os elementos irão sedimentar no fundo da câmara, o qual é todo quadriculado, permitindo realizar os cálculos necessários para a contagem das células, obtendo resultados expressos em μL .

Figura 24: Imagem da Câmara de Neubauer.



Legenda: Os círculos demonstram as duas áreas de observação para contagem das células. A direita, uma imagem microscópica da área quadriculada de um dos círculos. Fonte: Adaptado de BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017.

Procedimento

Para os eritrócitos, segue:

- Com pipeta de Thomas, aspirar sangue total homogeneizado até a graduação 1 e completar com a solução de Natt and Herrick (1952) até a marca 101;
- Agitar a pipeta com movimentos circulares, homogeneizando a mistura;
- O sangue, então diluído em 1:100, deve permanecer de um a dois minutos na pipeta.
- As primeiras gotas devem ser desprezadas e em seguida, a pipeta deve ser colocada na abertura da câmara de Neubauer, formando entre elas um ângulo de 45° , enchendo-a com o líquido que penetrar por capilaridade;
- Deixar a câmara em local úmido por cinco minutos, para perfeita sedimentação dos eritrócitos;

- O número total de eritrócitos nos cinco pequenos quadrantes (quatro das extremidades e o central) na área do grande quadrado central da câmara (Figura 25) é determinado no microscópio, em objetiva de 40x (aumento de 400 vezes);

- O valor total dessa contagem (N) deve ser multiplicado por 5000 vezes, valor que considera a diluição, a altura da câmara e a área contada, resultado no valor estimado de eritrócitos.

Apesar de semelhante, a contagem de leucócitos difere da anterior, seguindo os passos:

- Com a pipeta de Thomas, aspirar sangue até a graduação 1 e completar com a solução de Natt and Herrick (1952) até a marca 11.

- Agitar a pipeta com movimentos circulares, homogeneizando a mistura;

- O sangue, agora diluído em 1:10, deve permanecer de um a dois minutos na pipeta.

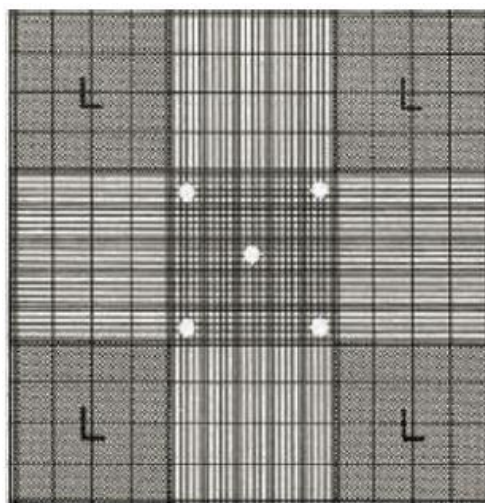
- As primeiras gotas devem ser desprezadas e em seguida, a pipeta deve ser colocada na abertura da câmara de Neubauer, formando entre elas um ângulo de 45°, enchendo-a com o líquido que penetrar por capilaridade;

- Deixar a câmara em local úmido por cinco minutos, para perfeita sedimentação dos leucócitos;

- Com a iluminação reduzida do microscópio, observar primeiramente na objetiva de 10x, para verificar a distribuição das células, em seguida, passar para a objetiva de 40x e fazer a contagem dos leucócitos nos quatro quadros laterais da câmara (Figura 3);

- O valor desta contagem é multiplicado por 1000, resultando no total de leucócitos expresso em μL .

Figura 25: Imagem microscópica representando o interior da Câmara de Neubauer.



Legenda: Imagem microscópica representando o interior da Câmara de Neubauer, onde é realizada a contagem das células. Os quadrantes representados pela letra L são utilizados para contagem de leucócitos, enquanto que os quadrantes com os círculos brancos são utilizados para a contagem de eritrócitos. Fonte: Adaptado de BONINI-DOMINGOS; OLIVEIRA, 2017.

Reagentes

A solução Natt and Herrick (1952) é utilizada como diluidor para as contagens de eritrócitos e leucócitos, além de destaca-las com coloração azul anil. A sua vantagem é que os resultados podem ser obtidos com o uso do mesmo hemocitômetro. Já sua desvantagem está na dificuldade na identificação de pequenas células, além do uso de pipetas diluidoras manuais e do preparo da solução diluidora, seguindo os passos:

- 3,88g de cloreto de sódio (NaCl);
- 2,50g de sulfato de sódio (Na₂SO₄);
- 2,91g de fosfato de sódio dibásico dodecahidratado (Na₂HPO₄.12H₂O);
- 0,25g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄);
- 7,50mL de formalina (37%);
- 0,10g de metil violeta 2B;
- 1000mL de água destila q.s.p.

A solução é mantida em recipiente de vidro escuro, em temperatura ambiente *overnight* e filtrada antes do uso.

ANEXO H – Metodologia do Hemograma – Hematócrito

Princípio da Técnica

O hematócrito possui o objetivo de verificar o volume globular sanguíneo a partir de uma comparação proporcional entre os glóbulos vermelhos e o plasma. Resumidamente, ele é capaz de mostrar a proporção de eritrócitos no sangue.

Procedimento

- Homogeneizar a amostra com delicadeza e posteriormente, preencher $\frac{3}{4}$ do tubo capilar de microhematócrito com sangue;
- Fechar a extremidade aberta do tubo e colocá-lo na centrífuga própria para microhematócrito por cinco minutos a 13.000 rpm;
- Fazer a leitura do resultado utilizando o cartão de referência, cujos valores são dados em porcentagem de volume celular em relação ao total.

ANEXO I – Metodologia do Hemograma – Dosagem de Hemoglobina Circulante

Princípio da Técnica

O método de análise da concentração de hemoglobina circulante no sangue ocorre a partir da presença de cianometahemoglobina, cuja presença advém a partir da transformação da hemoglobina e seus derivados por um reativo especial a base de cianeto. Em seguida, a amostra é quantificada por espectrofotometria.

Procedimento

- Adicionar 20 µL da amostra em 5mL de Solução Drabkin (1948) e homogeneizar;
- Medir em espectrofotômetro com comprimento de onda 540 nm. O resultado da leitura da absorbância é multiplicado por um fator de correção (FC), cujo cálculo ocorre a partir da divisão entre a concentração e absorbância (C/A) de uma amostra padrão;
- Medir o espectrofotômetro com comprimento de onda 540nm. O resultado da leitura da absorbância deve ser dividido por 15,3 e multiplicado por 250 como fator de correção, tendo a concentração de hemoglobina em mM. Esse total deve ser multiplicado por 1,7, que irá fornecer a concentração em g/dL.

Reagentes da Solução Drabkin (1948):

- 0,20g de ferricianeto de potássio ($C_6N_6FeK_3$);
- 0,20g de cianeto de potássio (KCN);
- 1000 mL de água destilada q.s.p.

ANEXO J – Metodologia do Hemograma – Contagem Diferencial de Leucócitos

Princípio da Técnica

A contagem diferencial de leucócitos tem por objetivo proporcionar uma porcentagem dos diferentes tipos celulares da linhagem branca presente em uma gota da amostra sanguínea. Esse tipo de amostragem é realizado a partir da análise do esfregaço sanguíneo corado e é de extrema importância para análises clínicas e da saúde dos animais.

Procedimento

- Utiliza-se o esfregaço sanguíneo, feito com uma gota da amostra de sangue total, que é estendida sobre uma lâmina de vidro com ajuda de uma segunda lâmina e corado com Panótico (*Hematocor-Biológica®*);
- O esfregaço é observado ao microscópio com objetiva de imersão a óleo (100x);
- Contam-se 100 células, anotando cada tipo diferencial e, ao final, são estabelecidos os valores percentuais relativos de cada tipo leucocitário.

ANEXO K - Oxihemoglobina, Metahemoglobina e Hemicromos

Primeiro: Dosar Hb circulante por Drabkin

- Esse método sai na concentração de g/dL
- Converter em mmol/L (site: www.saymed.com/en/smnxpf/pfxdq210_chtm)
- Descobrir a diluição necessária para a concentração de 20 uM [Hb humano]
- Fórmula:

$$C1V1 = C2V2$$

C1 = valor em uM da amostra

C2 = 20 uM

V1 = ?

V2 = 1000 uL

V2 - V1 = volume de H2O u.p.

Leitura das análises

- Fazer diluição em eppendorf de 1,5 mL ou 2,0 mL
- Colocar 500 uL na cubeta (fazer duplicata)
- Fazer leitura no espectro na opção
- Zerar equipamento c/ H2O u.p. nos dois pocinhos, clicar ↓↓
- Ajustar o comprimento de onda desejado → 3 leituras por amostra: 577 nm; 630 nm; 560nm
- Sempre mudar o λ , zerar o equipamento.

Oxihemoglobina: 119. A577 - 39. A630 - 89. A560

Metahemoglobinina: 28. A577 + 307. A630 - 55 A560

Hemicromos: - 133. A577 - 114. A630 + 230 A560

ANEXO L - Técnica AgNOR Impregnação por Íons Prata

→ Solução Coloidal Reveladora (Solução A)

- Dissolver muito bem *1 grama de gelatina* em 50 mL de água destilada acrescentando a seguir 0,5 mL de *ácido fórmico*
- A solução deve ser guardada em frasco escuro envolto em alumínio
→ Antes de usar, tirar da geladeira até ficar líquido ou colocá-la em banho maria

→ Solução de Nitrato de Prata 50% (Solução B)

- Dissolver 1 g de *nitrato de prata* (AgNO_3) em 2 mL de água destilada, agitar bem no vórtex (fazer em eppen dorf)
↪ Guardar em frasco escuro

→ Impregnação por Prata (AgNor)

- Em câmara úmida
- Pingar 1 gota de *solução A* e 2 gotas da *solução B*
- Colocar na estufa a 37°C por 25 minutos
↪ Lavar com água destilada
↪ Pingar Tiosulfato 5% por 2 minutos
↪ Lavar com H_2O d

ANEXO M - Reação de Feulgen

- *Método de coloração*

1. Retirar o Schiff da geladeira
2. Colocar lâminas nas cubas (proteger do escuro com papel alumínio)
3. Preparar o HCl 0,1N e deixar na geladeira
 - ↪ Retirar da geladeira somente 10 minutos antes do uso
4. Colocar HCl 4N na cuba e deixar por 1 h 05 min a T °C25 (ambiente)
5. Tirar o HCl 4N da cuba e colocar o HCl 0,1N gelado
 - ↪ Dar apenas um banho rápido para interromper a hidrólise
6. Adicionar o reativo de Schiff na cuba e deixar por 40 min (*no escuro*)
7. Banhar as lâminas em água sulforosa: 3x de 5 min (*no escuro*)
8. Lavar rapidamente em H₂O destilada (3x)
9. Deixar as lâminas secarem protegidas da luz
10. Depois de secar, montá-las em bálsamo do Canadá
 - ↪ 5 min em cada xilol de montagem

- *Preparo de solução*

- *Reativo de Schiff*

Fucsina básica	1 g
Água destilada	100 mL
Metabissulfito de sódio	4 g
Ácido Clorídrico	2 mL
Carvão ativado	± 4 colheres

→ Aquecer água destilada até a ebulição. Interromper o aquecimento e adicionar a fucsina básica à água. Dissolver bem e, em seguida, resfriar a solução até 60 °C. Filtrar a solução e acrescentar o metabissulfito de sódio e o HCl. Deixar a solução em repouso, no escuro, por 24 h. No dia seguinte, acrescentar o carvão ativado e agitar bem. Quando a solução ficar incolor ou com uma coloração palha, filtrar e conservar, protegido da luz, em geladeira.

- *Metabissulfito de sódio 10%*

→ Para 15 mL de metabissulfito - 1,5 g de meta e completa com água destilada

- *Água sulforosa*

Água destilada	270 mL
Metabissulfito de sódio 10%	15 mL
HCl 1N	1,5 mL

→ Diluir as substâncias na ordem dada com auxílio de um agitador magnético