

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/07/2021.



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).

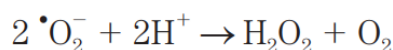
Ainda, as ERO inibem a ação das enzimas, assim como enzima Aminoacil-tRNA sintetase, que edita e corrige o RNA transportador, de modo que a sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica apresente erros, resultando em síntese de proteínas anômalas (LING; SÖLL, 2010). Associado ao fato das ERO também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

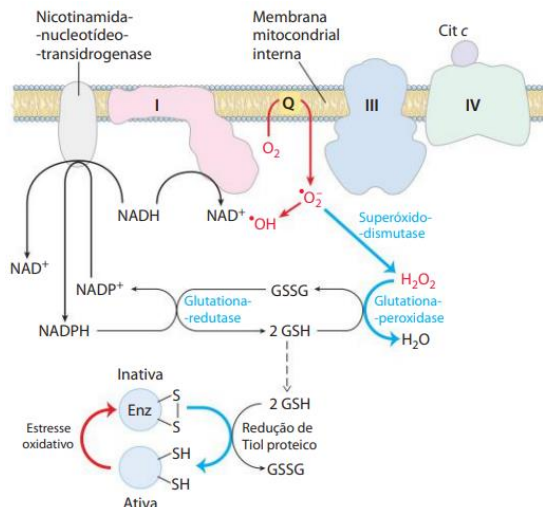
Para impedir o dano oxidativo induzido pelo ânion superóxido, as células têm diversas formas da enzima Superóxido Dismutase (SOD), cuja função é catalisar a reação representada pela figura 1. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) assim gerado torna-se inofensivo pela ação da Glutathione Peroxidase (GPx) (Figura 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.

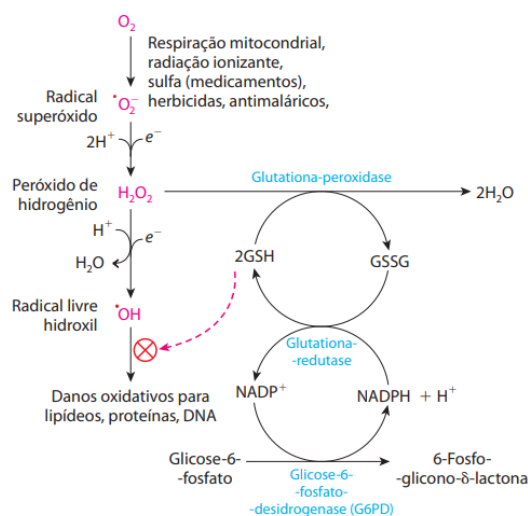
Figura 2: Formação de ERO nas mitocôndrias e defesas antioxidantes mitocondriais.



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 sulfidríla 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 (MANNERNVIK, 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.

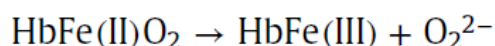
Estudos sobre estresse oxidativo têm maior foco em mamíferos e aves, com menor atenção para répteis, embora a sensibilidade desse grupo diante de fatores de degradação ambiental já tenha sido comprovada (COSTANTINI et al., 2009). Biomarcadores de estresse oxidativo têm especial atenção em estudos de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

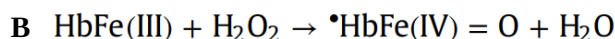
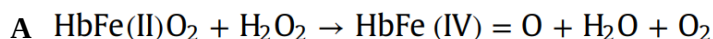


Fonte: VOSKOU et al., 2015.

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.

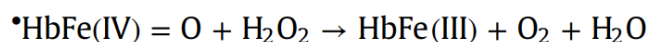
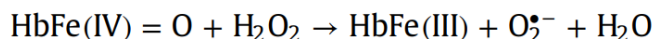


Fonte: VOSKOU et al., 2015.

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).

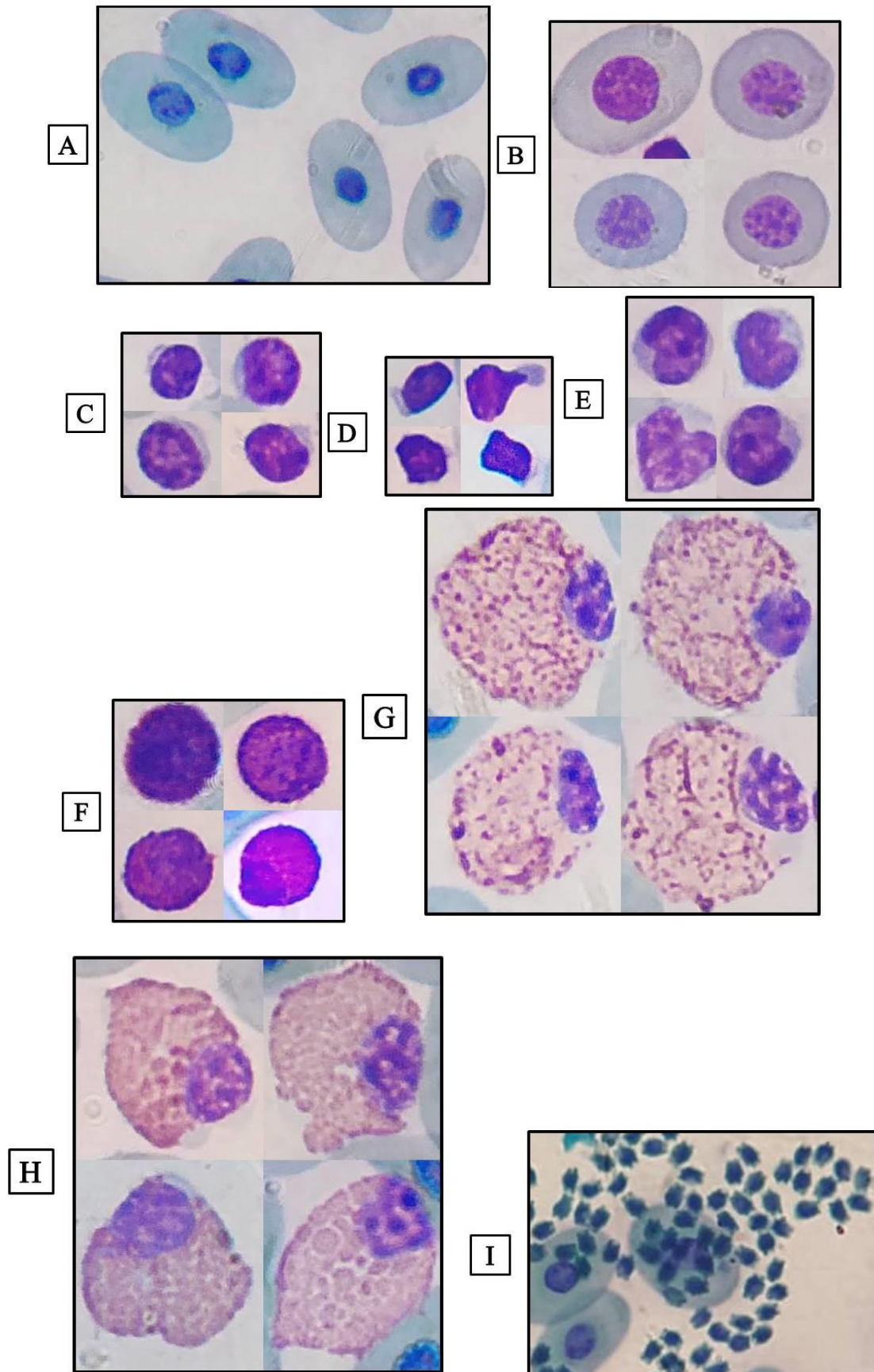
Para quelônios, foram descritos diversos locais de coleta, como coração, jugular, veia femoral, veia margino-costal, sino occipital e veia cloacal (LOYD; MORRIS, 1999; BARROWS et al., 2004; SILVA et al., 2012). O melhor local para a punção difere de acordo com a espécie estudada, seu tamanho e seu estado 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 Neubauer (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 heterófilos, há uma diminuição da quantidade de linfócitos circulantes (SIEGEL, 1908).

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-BILLOUD, 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 erythrocuprein (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 Zoolos 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 os 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>