



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de
Ambientes Aquáticos Continentais



**Perfil hematológico de uma população natural
de Tartaruga-tigre-d'água, *Trachemys dorbigni*
(Duméril & Bibron, 1835) (Testudines:
Emydidae) sob condições de urbanização no
extremo sul do Brasil**

Danielle Tavares da Silva

Orientador: Daniel Loebmann

Coorientadora: Camila de Martinez Gaspar Martins

Rio Grande

2023



Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-graduação em Biologia de Ambientes
Aquáticos Continentais



Perfil hematológico de uma população natural de Tartaruga-tigre-d'água, *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) sob condições de urbanização no extremo sul do Brasil

Discente: Danielle Tavares da Silva

Orientador: Daniel Loebmann

Coorientadora: Camila de Martinez Gaspar Martins

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

Rio Grande

2023

Ficha Catalográfica

S586p Silva, Danielle Tavares da.
Perfil hematológico de uma população natural de Tartaruga-tigre-d'água, *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) sob condições de urbanização no extremo sul do Brasil / Danielle Tavares da Silva. – 2023.

77 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Rio Grande/RS, 2023.

Orientador: Dr. Daniel Loebmann.

Coorientadora: Dra. Camila de Martinez Gaspar Martins.

1. Efluentes domésticos 2. Biomarcadores 3. Parâmetros hematológicos 4. Micronúcleo I. Loebmann, Daniel II. Martins, Camila de Martinez Gaspar III. Título.

CDU 551.46:504.05

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE -
FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES
AQUÁTICOS CONTINENTAIS



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS – Nº 005/2023

Às 14h00 (quatorze horas) do dia 09 (nove) do mês de março de 2023 (dois mil e vinte e três), via Webconferência, no link: <https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/daniel-loebmann-2>, reuniram-se docentes, discentes e comunidade em geral, para a Defesa Pública da Dissertação de Mestrado da acadêmica Danielle Tavares da Silva. A Dissertação intitulada “**Perfil hematológico de uma população natural de Tartaruga-tigre-d’água, Trachemys dorbigni (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) sob condições de urbanização no extremo sul do Brasil**” foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelo Prof^o. Dr. Daniel Loebmann (Orientador e Presidente da Banca); Prof^a Dra. Camila De Martinez Gaspar Martins (Co-orientadora- FURG); Prof^o Dr. Antonio Sérgio Varela Júnior (FURG) e Prof^a Dra. Lílian Lund Amado (UFPA). Após a defesa e arguição pública, a Banca Examinadora reuniu-se, para deliberação final, e considerou a acadêmica **APROVADA**. Desta forma, a acadêmica concluiu mais uma das etapas necessárias para a obtenção do grau de **MESTRE EM BIOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS**. Nada mais havendo a tratar, às 17h00h (dezessete horas) foi lavrada a presente ata, que lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora, pela Acadêmica e pelo Coordenador do Curso.

Documento assinado digitalmente



DANIEL LOEBMANN
Data: 10/03/2023 17:06:41-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof^o. Dr. Daniel Loebmann

Documento assinado digitalmente



CAMILA DE MARTINEZ GASPAR MARTINS
Data: 10/03/2023 10:06:59-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof^a Dra. Camila De Martinez Gaspar Martins

Documento assinado digitalmente



ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR
Data: 06/04/2023 08:17:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^o Dr. Antonio Sérgio Varela Júnior

Documento assinado digitalmente



LILIAN LUND AMADO
Data: 05/04/2023 15:14:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a Dra. Lílian Lund Amado

Documento assinado digitalmente



DANIELLE TAVARES DA SILVA
Data: 05/04/2023 18:43:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Danielle Tavares da Silva

Documento assinado digitalmente



ROGERIO TUBINO VIANNA
Data: 06/04/2023 08:58:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^o. Dr. Rogério Tubino Vianna
Coordenador do Curso

Dedicatória

Dedico esta dissertação a minha mãe Arlete Tavares, pois sem seu incentivo a minha educação e suas orações, eu não teria conseguido, meu muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado forças para seguir nessa jornada, por eu sentir a presença dEle sempre me guiando e me dando sabedoria para seguir avante.

A minha família por acreditar nos meus sonhos e por sempre incentivar meus estudos. Vocês são minha força impulsionadora, é tudo pra vocês e por vocês (Arlete Tavares, Clara Minelli, Benjamin e Cecília).

A família que eu ganhei no Rio Grande do Sul, Dona Cláudia que foi uma mãe pra mim, Tatiana Schein que foi como uma irmã e Dona Leci que foi uma sogra acolhedora. Vocês são muito especiais para mim.

Ao meu orientador, Daniel Loebmann, pela liberdade de ação e por me aceitar como orientanda.

A minha coorientadora, Camila Martins, por ter aceitado fazer parte desse trabalho e por ter sido minha fonte de ajuda nas vezes que eu mais precisei.

A professora Raqueli França, por aceitar entrar nessa colaboração e realizar as análises do perfil hematológico e também por colocar o Gabriel Zani no meu caminho, sendo minha grande ajuda na coleta do sangue dos animais amostrados.

Aos meus amigos do PPGBAC (Ana, Camila, Fernanda, Yan e Saimon), mas especialmente a minha grande amiga Katu, por não largar minha mão e por ter sido minha grande parceira nas minhas coletas. A vocês meus colegas de jornada, meu muito obrigada pela companhia, que apesar de ter sido pouca no presencial, se fez muito viva e presente no virtual e obrigada também por toda a contribuição e incentivo.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente estiveram na torcida por mim, me incentivando e vibrando por minhas vitórias, em especial aos que me acompanharam de mais perto: Angie Thaís, Renan Mescouto, Ana Emília, Amanda Karolina e Talisson Hartwig. E também minha amiga Thays Guedes, por todo seu companheirismo e auxílio para realizar a análise de micronúcleo e outras anomalias nucleares eritrocíticas, além também, do meu amigo Rodrigo, o motorista da FURG, que me acompanhou nas idas e vindas das coletas e até se aventurou na captura de alguns animais. Muito obrigada a todos vocês meus amigos, vocês moram no meu coração.

Prefácio

UM SALVE

*Confia no teu corre
e fica de boa.
Afia teu trampo
nas lâminas das incertezas,
todo mundo certo
não quer dizer
que você está errado.
Não ande com caranguejos
e sonhe com as mãos,
deixa o coração no presente
e os olhos no futuro.
Muitas vezes o sucesso fica no passado
e ser importante é para sempre.
Cuide da raiz e lapide as asas,
porque abaixo do radar também se voa.*

Sérgio Vaz.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a condição hematológica de uma população de Tartaruga-tigre-d'água (*Trachemys dorbigni*) do extremo sul do Brasil frente à degradação de seu habitat natural em virtude de um processo acelerado de urbanização associado ao despejo irregular de efluentes domésticos. O local de estudo foi um canal urbano localizado no município de Pelotas/RS (latitude: -31.7608741, longitude: -52.3162444), sendo caracterizado pela presença de empreendimentos urbanos entorno, tais como Shopping, prédios empresariais e condomínios residências. Exemplares de tartarugas capturados randomicamente (n = 16) no canal entre os meses de novembro/2021, janeiro, março e abril/2022, foram analisados quanto a sua biometria e presença de enfermidades externas e, após, tiveram amostras sanguíneas para a determinação do perfil hematológico (eritograma e leucograma) e análise das alterações genotóxicas (micronúcleo e outras anomalias nucleares). Adicionalmente, foram medidos parâmetros físico-químicos da água do local de coleta, que indicaram baixa quantidade de oxigênio dissolvido e um alto nível de fósforo total, estando ambos os parâmetros em desacordo com a legislação (CONAMA 357/2005). Apesar da observância de animais com ectoparasitas (31,25 %) e com pequenas deformações no casco (56,25 %), o comprimento máximo da carapaça e peso foram consideradas normais para a espécie. Também em comparação com outros exemplares de *Trachemys* spp., o hematócrito e níveis de hemoglobina plasmática foram baixos, enquanto níveis de leucócitos e eosinófilos estiveram aumentados, caracterizando infecções parasitárias. A frequência de micronúcleos foi baixa, porém, a alta frequência de núcleos *blebbed* (bolhosos) é um indicativo de danos cromossômicos em estágio inicial. Os dados, portanto, indicam que estado fisiológico de indivíduos selvagens de *T. dorbigni* está sendo afetada pela urbanização local e alerta para medidas de monitoramento e conservação dessa espécie de quelônio e outras também cujo habitat natural está sendo invadido e deteriorado por ações antrópicas.

Palavras-chave: efluentes domésticos, biomarcadores, parâmetros hematológicos, micronúcleo.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the hematological condition of a population of D'Orbigny Slider Turtle (*Trachemys dorbigni*) from the extreme south of Brazil in the face of the degradation of its natural habitat due to an accelerated process of urbanization associated with the irregular dumping of domestic effluents. The study site was an urban channel located in the city of Pelotas/RS (latitude: -31.7608741, longitude: -52.3162444), characterized by the presence of surrounding urban developments, such as shopping malls, business buildings and residential condominiums. Specimens of turtles randomly captured (n = 16) in the channel between the months of November/2021, January, March and April/2022, were analyzed for their biometry and presence of external diseases and, afterwards, had blood samples taken to determine the hematological profile (erythrogram and leukogram) and analysis of genotoxic alterations (micronucleus and other nuclear anomalies). Additionally, physical-chemical parameters of the water at the collection site were measured, which indicated a low amount of dissolved oxygen and a high level of total phosphorus, with both parameters not complying with the legislation (CONAMA 357/2005). Despite the observation of animals with ectoparasites (31.25%) and with small hoof deformations (56.25%), the maximum carapace length and weight were considered normal for the species. Also compared to other examples of *Trachemys* spp., hematocrit and plasma hemoglobin levels were low, while levels of leukocytes and eosinophils were increased, characterizing parasitic infections. The frequency of micronuclei was low, but the high frequency of Blebbed nuclei is indicative of early stage chromosomal damage. The data, therefore, indicate that the health of wild individuals of *T. Dorbigni* is being affected by local urbanization and alert for monitoring and conservation measures of this species of Chelonia and others also whose natural habitat is being invaded and deteriorated by anthropic actions.

Keywords: domestic effluents, biomarkers, hematological parameters, micronucleus.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação está dividida em três segmentos. O primeiro refere-se à introdução geral que apresenta a base teórica que justifica a intenção da pesquisa, hipóteses e objetivos, sendo as referências utilizadas listadas seguindo normas da ABNT. O segundo segmento, apresentado em formato de artigo científico, redigido em português e seguindo as normas da revista “Ecological Indicators”, contém além de tópico introdutório, os resultados da pesquisa, interpretação e discussão dos dados. Por fim, o terceiro segmento é composto pelas considerações finais e perspectivas da pesquisa.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 1	39
1. Introdução	40
2. Materiais e Métodos	42
2.1. <i>Local de amostragem, captura e biometria dos animais</i>	42
2.2. <i>Análise físico-química da água</i>	43
2.3. <i>Parâmetros hematológicos</i>	43
2.4. <i>Ensaio do micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocíticas</i>	44
2.5. <i>Análise estatística</i>	45
3. Resultados e Discussão	45
3.1. <i>Condições físico-químicas da água no local de coleta</i>	45
3.2. <i>Parâmetros biométricos</i>	48
3.3. <i>Parâmetros hematológicos</i>	49
3.4. <i>Ensaio do micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocíticas</i>	54
4. Conclusão	62
5. Agradecimentos	63
6. Referências	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	75

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1 – Fotomicrografia de eritrócitos maduros e normais de exemplares de *Trachemys dorbigni* corados com laranja de acridina (DA SILVA, 2023)
.....17p

Figura 2 – (A) Divisão celular normal. (B) Divisão celular anormal com formação de micronúcleos. Fonte: Brito e Luz (2015) adaptado de Fenech (1997)
.....22p

Figura 3 – Fotomicrografias de anormalidades eritrocitárias coradas com laranja de acridina. (A) micronúcleo, (B) núcleo lobado (*lobed*) (C) núcleo entalhado (*notched*), (D) núcleo bolhoso (*blebbed*) e (E) célula binucleada (MITKOVSKA; CHASSOVNIKAROVA, 2020)
.....22p

Figura 4 – Exemplares adultos de *Trachemys dorbigni*. (A) Bujes; Verrastro, 2008. (B) Da Silva, 2023.....25p

Capítulo 1

Figura 1 – Fotomicrografias de anormalidades nucleares eritrocitárias de *T. dorbigni* corados com laranja de acridina. (A) MN; (B) *Lobed*; (C) *Notched*; (D) *Blebbed*; (E) Binucleada.....58p

Figura 2 – Análise de Componentes Principais (PCA) baseada na matriz de correlação entre as variáveis selecionadas.....61p

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1** – Parâmetros físico-químicos de amostras coletadas do local de estudo. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP).....50p
- Tabela 2** – Resultados médios, máximos e mínimos (\pm desvio padrão) de biometria de fêmeas e machos adultos de *T. dorbigni* analisados no presente estudo. As medidas são comprimento máximo e largura máxima da carapaça e do plastrão, peso e sexagem dos animais.....52p
- Tabela 3** – Dados de perfil hematológico de diferentes espécies do gênero *Trachemys*.....53p
- Tabela 4** – Resultados de teste de micronúcleo do presente estudo e de outros realizados com espécies de quelônios adultos. Dados de micronúcleos expressos por média e desvio padrão (DP)..... 58p
- Tabela 5** – Média, desvio padrão e frequência de anormalidades nucleares eritrocíticas de indivíduos adultos de *T. dorbigni* em vida livre analisados no presente estudo.....59p

INTRODUÇÃO GERAL

Os ambientes aquáticos continentais têm sido impactados por ações antrópicas, tais como o crescimento populacional desordenado, despejo irregular dos esgotos domésticos e industriais, e uso intensivo dos recursos naturais pela agropecuária, silvicultura e mineração. E esses impactos têm afetado a biota aquática (FERNICOLA *et al.*, 2003; SÄMY *et al.*, 2010; GLÓRIA; HORN; HILGEMANN, 2017). O nível de contaminação das águas constitui fator limitante para os seres vivos que ocupam os ecossistemas aquáticos (BRITO; LUZ, 2015). A contaminação pode comprometer a saúde animal por ter potencial de induzir alterações que transitam entre níveis citobioquímico e genotóxico (ARIAS *et al.*, 2007; DEL-GUERCIO; CHRISTOFOLETTI; FONTANETTI, 2017) até efeitos no crescimento, reprodução e sobrevivência dos organismos, levando, inclusive a modificações na dinâmica das populações e na estruturação das comunidades (COSTA *et al.*, 2008; MONTANHA *et al.*, 2011). Wokoma (2019) mostrou em sua revisão como a poluição de corpos de água doce tem afetado a biota aquática, causando distúrbios comportamentais, alterações respiratórias, reprodutivas, morfológicas, histopatológicas, bioquímicas, hepatológicas, e, em casos extremos, levando à morte. Especificamente com répteis, tem-se notado uma preocupação com o declínio de suas populações naturais (GIBBONS *et al.*, 2000), diante disso, tem havido um incremento no número de estudos que demonstram que ameaças toxicológicas decorrente da exposição a poluentes químicos têm afetado negativamente o bem estar de espécies reptilianas (e.g. CROTEAU *et al.*, 2008; POLETTA *et al.*, 2013; GRILLITSCH; SCHIESARI, 2015; ZYCHOWSKI; GODARD-CODDING, 2017; SALVARANI, 2018; UALIYEVAL; KHAN, 2022).

Dentre os vários tipos de contaminação dos ambientes aquáticos dulcícolas, destaca-se o despejo de efluentes líquidos domésticos sem tratamento ou com tratamento inadequado (LOPES, 2016; DE CAMPOS *et al.*, 2017; FORNARI *et al.*, 2018). O esgoto doméstico é constituído basicamente por matéria orgânica e microrganismos, que podem ser agentes patogênicos. Além disso, a presença de produtos químicos usados cotidianamente pelos seres humanos como fármacos ou para higiene pessoal e limpeza doméstica, passou a ser detectada no ambiente natural juntamente com descargas de efluentes de esgoto (MERTEN; MINELLA, 2002; ARCHELA *et al.*, 2003; CROTEAU *et al.*, 2008; MANNARINO *et al.*, 2013; DEL-GUERCIO; CHRISTOFOLETTI; FONTANETTI, 2017).

A coleta e o tratamento de efluentes domésticos são essenciais para o saneamento básico, mas referente ao esgotamento sanitário, a situação ainda é preocupante (TOMÉ, 2018; BRASIL, 2021). Mundialmente, 56% das águas residuais domésticas foram coletadas por estações de tratamentos, passando por todos os processos de segurança, no entanto, 44% restante do fluxo de água residuais não são tratados por conta da falta de coleta em instalações de tratamento especializadas ou fossas sépticas (UN-Water, 2021). No Brasil, segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, um pouco mais da metade (55,8%) dos brasileiros têm acesso à rede de esgoto e destes, 51,2% dos esgotos passam por algum tipo de tratamento no país (BRASIL, 2021).

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) são consideradas o principal local de remoção de poluentes, incluindo, nutrientes e matéria orgânica das águas residuais (WANG; WANG, 2016; PEREIRA; GARCIA, 2017). No entanto, deve-se considerar que inúmeros compostos não são totalmente removidos pelos processos convencionais e técnicas de tratamentos adotados pelas ETEs, como por exemplos, os produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, conhecidos como PPCPs, tais como anticoncepcionais e antibióticos (MANNARINO *et al.*, 2013; WANG; WANG, 2016; LIMA *et al.*, 2017; DE CARVALHO PENHA *et al.*, 2021a). Muitos desses compostos não fazem parte do ambiente natural, portanto, sua presença, na maioria dos casos, provoca reações indesejáveis nos organismos, mesmo em baixas concentrações na água tais como: eutrofização (BARRETOS *et al.*, 2013), declínio da riqueza e diversidade de peixes e macroinvertebrados (POMPEU, ALVES, CALLISTO, 2005), afetam a osmorregulação de crustáceos (THEUERKAUFF *et al.* 2018), alterações hematológicas e genotóxicas em peixes (CORREDOR-SANTAMARÍA, SERRANO GÓMEZ E VELASCO-SANTAMARÍA, 2016) e em répteis (SILVA, 2011).

Para proteger os ecossistemas das atividades antrópicas degradantes, existem as legislações ambientais que definem critérios de qualidade da água e têm se aprimorado para estabelecer limites máximos permitidos para diversas substâncias e condições físico-químicas adequadas (PARADA, 2015). No Brasil, a Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dispõe sobre a classificação dos corpos hídricos e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, estabelecendo condições e padrões de qualidade de água (BRASIL, 2005). Tal resolução foi alterada e atualmente é complementada pela Resolução nº 430 de 17 de maio de 2011 que dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos d'água receptores (BRASIL, 2011).

A qualidade de um determinado recurso hídrico pode ser avaliada a partir da sua caracterização físico-química e biológica, bem como, quanto a sua condição ecotoxicológica. Dentre os parâmetros limnológicos mais comuns necessários para avaliação do estado ambiental da água, estão: temperatura, condutividade elétrica (CE), sólidos dissolvidos totais (SDT), potencial hidrogeniônico (pH), turbidez, oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), nitrogênio total, fósforo total, clorofila-a e os coliformes termotolerantes (CT) (PARRON; MUNIZ; PEREIRA, 2011; ABREU; CUNHA, 2015). E apesar dessas variáveis serem um importante subsídio para inferir sobre as condições da água, mesmo que identifiquem os diferentes compostos presentes no corpo hídrico, são incapazes de fornecer dados sobre os efeitos biológicos causados pelos mesmos (COSTA *et al.*, 2008; MAGALHÃES; FILHO, 2008; GRAZEFFE, 2009; CURADO *et al.*, 2018). Neste sentido, elas devem vir associadas a estudos ecotoxicológicos, cuja função é determinar a toxicidade das diversas substâncias presentes nos recursos hídricos sobre a biota aquática (SÄMY *et al.*, 2010; BRITO; LUZ, 2015; PARADA, 2015; WOKOMA, 2019).

As alterações nas respostas dos sistemas biológicos (que variam de moleculares, celulares, fisiológicas ou comportamentais) que estão relacionadas à exposição de substâncias químicas, efeitos tóxicos de um composto ou condição de estresse ambiental são denominados biomarcadores ou marcadores biológicos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Os biomarcadores são importantes ferramentas utilizadas no monitoramento ambiental, incluindo sistemas aquáticos, que detectam precocemente respostas organísmicas, antecipando assim, efeitos adversos em níveis hierárquicos maiores, como populações e comunidades (CAJARAVILLEA *et al.*, 2000). Conseqüentemente, eles vêm sendo cada vez mais usados para a determinação da qualidade ambiental e da saúde da biota local (e.g. FERNANDO; FERRARI; SALIBIÁN, 2005; FREIRE *et al.*, 2008; MANNARINO *et al.*, 2013; JOSENDE *et al.*, 2014; CORREDOR-SANTAMARÍA; SERRANO GÓMEZ; VELASCO-SANTAMARÍA, 2016; BORGES *et al.*, 2018).

Os biomarcadores de exposição e efeito são fundamentais na análise das relações entre os diferentes poluentes do meio ambiente, na incorporação pelos organismos e nas ações tóxicas ou efeitos (PÉREZ IGLESIAS, 2015). Neste sentido, biomarcadores de exposição são aqueles que indicam que ocorreu a exposição dos organismos ao poluente, e que o poluente está biodisponível (AMORIM, 2003). Por outro lado, biomarcadores de

efeitos indicam alterações em níveis bioquímicos, fisiológicos ou genéticos que, dependendo da magnitude, podem provocar danos ou enfermidades (JHA, 2008).

Dentre os biomarcadores utilizados em répteis, tem-se destacado a análise de parâmetros hematológicos, pois permite a detecção de alterações biológicas que afetam o organismo como um todo, levando às descobertas precoces de infecções ou outros sintomas causadores de diversas patologias, além de prever prognósticos, e sem a necessidade de eutanasiar os animais, sendo um método pouco invasivo (CAMPBELL, 2004; VENTURA; CORSINI; GABRIEL, 2015; LOPES, 2016; MORSELLI *et al.*, 2016). Os resultados dessas análises, todavia, podem sofrer limitações por fatores externos e internos, como, idade, tamanho corporal, peso, sexo, estação do ano, saúde, habitat, dieta, estado fisiológico e período reprodutivo, além do mais, esses parâmetros podem variar também ao longo do ciclo anual ou até mesmo ao longo da vida dos indivíduos, dessa forma, dificultando ainda mais o estabelecimento de valores sanguíneos de referência e comparações entre os indivíduos e populações de maneira geral (CAMPBELL, 2006; STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011; ZHANG *et al.*, 2011; ARIZZA *et al.*, 2014).

Como parâmetros hematológicos, pode-se considerar o eritrograma que é o exame que inclui a contagem total de eritrócitos, hematócrito, dosagem de hemoglobina, além do cálculo dos índices hematimétricos e a determinação de proteínas plasmáticas totais, e por meio dessas variáveis, é possível monitorar o estado fisiológico dos animais, principalmente, a eficiência da capacidade de transporte de oxigênio e do estado nutricional (DIAZ GONZÁLEZ; SILVA, 2008; STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011; PENG *et al.*, 2018).

Em répteis saudáveis, os eritrócitos maduros são nucleados e elipsoidais, com núcleos ovais, centralmente posicionados e contendo cromatina densa (ver figura 1) (HOSSEINZADEH; JAFARI, 2007; ZHANG *et al.*, 2011; SYKES; KLAPHAKE, 2015; DE CAMARGO, 2018). Assim como nos outros animais, as células vermelhas dos répteis contêm o citoplasma rico em tetrâmeros de hemoglobinas, que são responsáveis pelo carreamento dos gases respiratórios (oxigênio e gás carbônico) no organismo. A análise por meio da contagem do número total de eritrócitos (CTE) é de muita relevância para a avaliação do estado de saúde dos animais, pois retrata a estimativa do número de células vermelhas que circulam em cada milímetro cúbico de sangue (ZAGO *et al.*, 2010b; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013; CORNACINI, 2020).

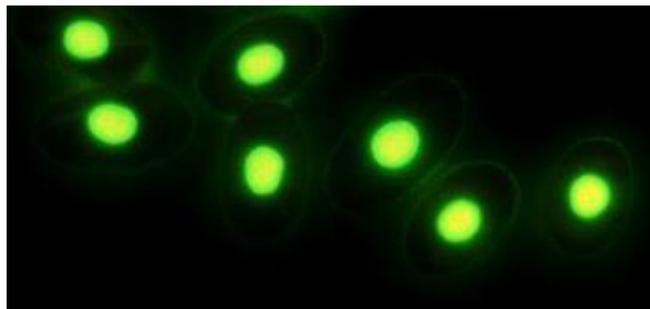


Figura 1 – Fotomicrografia de eritrócitos maduros e normais de exemplares de *Trachemys dorbigni* corados com laranja de acridina (DA SILVA, 2023).

O hematócrito (Hct) ou volume eritrocitário é um parâmetro laboratorial utilizado para avaliar tanto o número de células vermelhas quanto a tamanho destas, indicando o percentual de volume sanguíneo que é ocupado pelos eritrócitos circulantes em relação ao volume de sangue total (ZACHARY; MCGAVIN, 2012). Um Hct considerado normal para a maioria dos répteis é de aproximadamente 30%, em um intervalo que varia de 20% a 40%, valores inferiores a este é indicativo de que o animal pode estar anêmico e/ou com desnutrição, enquanto que valores superiores, sugerem hemoconcentração (que dificulta o fluxo sanguíneo) ou policitemia (eritrocitose) que diminui a massa eritrocitária (CAMPBELL, 2006).

A hemoglobina (Hb) é uma proteína complexa de estrutura quaternária presente no citoplasma das células vermelhas, sendo responsável primordialmente pelo transporte de oxigênio (O₂) dos pulmões para os vários tecidos do corpo, e ao mesmo tempo, realiza o transporte dióxido de carbono (CO₂) dos tecidos de volta para os pulmões (ZHANG; GU, LI, 2011; GELL, 2018). Sua dosagem indica principalmente, a capacidade do organismo em transportar oxigênio, e pode ser influenciada por demasiado esforço físico, condições de estresse, estágio reprodutivo e variações sazonais (FERRAREZI, 2006). E a concentração de Hb de muitas espécies de répteis varia entre 6 e 12 g/dl, embora os valores encontrados sejam frequentemente inferiores a 10 g/dl (CAMPBELL, 2006; MARTÍNEZ-SILVESTRE; CUENCA, 2011).

Com a obtenção dos valores citados acima, é possível calcular os índices hematimétricos, sendo representados neste estudo pelos mais comumente utilizados na veterinária, o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Esses índices conseguem fornecer informações sobre o estado osmorregulatório no organismo, relacionado ao comportamento do eritrócito diante de alterações no volume de água, bem como também, a quantidade de íons

presentes no sangue e a função respiratória (SOUZA, 2004). O VCM representa o volume médio dos eritrócitos no momento da retirada de sangue do animal (GRADELA *et al.*, 2017). Este índice é útil para a avaliação de quadros de anemias e está diretamente influenciado pelo Hct e pelo CTE, sendo expresso em fentolitros (fL) (SILVA, 2011; RODRÍGUEZ-ALMONACID *et al.*, 2022). Já o CHCM, trata-se de um índice que mostra a proporção (em %) de hemoglobina em gramas por 100 de hemácias (gHb/100 RBC). O valor médio deste índice para répteis é de 30%, com uma variação de 22% a 41% (CAMPBELL, 2006; MARTÍNEZ-SILVESTRE; CUENCA, 2011; SILVA, 2011).

O plasma sanguíneo é constituído principalmente por água e por uma variedade de substâncias valiosas para a manutenção do metabolismo, por isso que a determinação da proteína plasmática total (PPT) é o principal indicador nutricional do animal, e para além disso, ajuda também a avaliar o grau de desidratação (TAVARES-DIAS *et al.*, 2009; MEDEIROS *et al.*, 2012; BERGAMINI, 2016). Geralmente níveis baixos de proteínas plasmáticas estão associados à má nutrição, mas outros fatores devem ser considerados, como distúrbios de metabolismo (MORSELLI *et al.*, 2016).

Através do leucograma é possível avaliar os leucócitos ou glóbulos brancos, que são células que atuam no mecanismo de defesa do organismo, na qual são responsáveis pela resposta generalizada do sistema imunológico (MORSELLI *et al.*, 2016). Por intermédio dessas células, é possível monitorar infecções ou agressões nos tecidos (THOMÉ; DA SILVA; DOS SANTOS, 2016; AGUIAR *et al.*, 2018). Sendo que, a variação do número e do tipo de leucócitos pode ser acionado por estresse fisiológico por meio de exposição a toxinas ambientais ou químicas, que possuem o potencial de prejudicar os componentes do sistema imune, na qual está diretamente relacionada a processos infecciosos (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; MARTÍNEZ-SILVESTRE; CUENCA, 2011; MORSELLI *et al.*, 2016; THOMÉ; DA SILVA; DOS SANTOS, 2016).

As células brancas apresentam classificação controversa em répteis, pois variam entre os estudos por conta dos diferentes números e morfologia dos grânulos, padrões de coloração citoquímica e concentração relativa no sangue periférico, diante disso, existe uma certa dificuldade de categorizar essas linhagens celulares, além de depender da espécie e do gênero que está sendo analisado (PITOL *et al.*, 2008; ZHANG; GU; LI, 2011). Por exemplo, algumas literatura identificaram a presença de azurófilos (e.g. KNOTKOVÁ *et al.*, 2002; ZAGO *et al.*, 2010b; OLIVEIRA *et al.*, 2011; LEWBART *et al.*, 2014; RODRÍGUEZ-ALMONACID *et al.*, 2022), mas a existência desse tipo

específico de leucócito ainda é um grande debate, pois alguns cientistas não classifica-os como uma célula leucocitária independente, mas os consideram como uma forma de monócito imatura, pelo fato de serem ultraestrutural e citoquimicamente semelhantes, por isso que, alguns pesquisadores destacam a pouca vantagem clínica em separar os azurófilos de monócitos na contagem diferencial (CAMPBELL, 2006; ZHANG; GU; LI, 2011; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013).

Diante disso, os leucócitos estão divididos em granulócitos e não granulócitos (células mononucleares). Entre os granulócitos, os heterófilo e os eosinófilos são caracterizados por grânulos acidófilos, enquanto os basófilos apresentam grânulos basofílicos; já as células mononucleares, estão aqui subcategorizadas somente por linfócitos e monócitos (CAMPBELL, 2006; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013; DE CAMARGO, 2018).

Referentes aos granulócitos, os heterófilos são equivalentes aos neutrófilos encontrados em mamíferos, sendo considerados o tipo de leucócitos predominante no sangue periférico da maioria dos quelônios, normalmente representam aproximadamente 40% do diferencial leucocitário, podendo chegar até 50%. A concentração de heterófilos em répteis é influenciada por fatores sazonais e sua determinação está associada a processos inflamatórios, especialmente a resposta de infecções microbianas e parasitárias ou lesão tecidual, além disso, pode aumentar significativamente por outros motivos, como em casos de processos estressantes ou neoplásicos (CAMPBELL, 2006; MARTÍNEZ-SILVESTRE; CUENCA, 2011; STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011; ZHANG; GU; LI, 2011; JOSEPH, 2015; SYKES; KLAPHAKE, 2015; BERGAMINI, 2016; DE CAMARGO, 2018).

Os eosinófilos representam cerca de 7% a 20% da contagem total de leucócitos em répteis saudáveis, mas podem encontrar percentuais maiores em algumas espécies de quelônios de vida livre (31-55%) (ARCILA *et al.*, 2005; STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011). Assim como os heterófilos, o número de eosinófilos presentes no sangue periférico é influenciado por fatores ambientais, como mudanças sazonais; e sua mensuração contribui para o diagnóstico de processos infecciosos parasitários e estimulação do sistema imune (CAMPBELL, 2006; MARTÍNEZ-SILVESTRE; CUENCA, 2011; ZHANG; GU; LI, 2011; JOSEPH, 2015; SYKES; KLAPHAKE, 2015).

Já os basófilos, são células altamente variáveis no sangue periférico, sendo geralmente as menos comuns dos tipos leucocitários, mas dependendo da espécie, como por exemplo, em algumas tartarugas de água doce, têm porcentagens significativamente

altas (e. g. STEIN *et al.*, 2015). Estas células podem representar de 0 a 40% do total de leucócitos, porém em alguns quelônios, podem apresentar uma porcentagem que varia de 50 até 65% de basófilos, e aparentemente sem a presença de qualquer alteração, além de não ser sensível às mudanças sazonais igual aos outros granulócitos. Sua função ainda não é tão esclarecida em répteis, mas a basofilia pode estar associada a infecções virais e parasitárias, como a ocorrência de hemoparasitas, tais como a hemogregarina e o tripanossomas (CAMPBELL, 2006; PERPIÑÁN *et al.*, 2008; MARTÍNEZ-SILVESTRE; CUENCA, 2011; STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011; ZHANG; GU; LI, 2011; JOSEPH, 2015; DE CAMARGO, 2018).

Em relação às células mononucleadas, os linfócitos são comuns no sangue periférico dos Testudines, podendo variar entre 15% e 40% do total de leucócitos, dependendo das condições fisiológicas, tais como sexo, idade e estado nutricional; condições ambientais, principalmente, variações conforme as estações do ano. Tem como principal função a produção de imunoglobulinas que participam do processo de estimulação imunológica mediante quadro de infecção viral, mas a linfocitose pode também ocorrer em casos que haja cicatrização de feridas, infecções parasitárias e doenças inflamatórias; já a linfopenia está associada a condições que causam estresse e imunossupressão e também por ocorrência de má nutrição (CAMPBELL, 2006; ZAGO *et al.*, 2010; MARTÍNEZ-SILVESTRE; CUENCA, 2011; STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011; MARTINS *et al.*, 2016; ZHANG; GU; LI, 2011; JOSEPH, 2015; BERGAMINI, 2016; DE CAMARGO, 2018).

E os monócitos são células grandes, sendo os leucócitos de maior tamanho e geralmente apresentam-se em baixo número no sangue periférico, sendo responsáveis por 0-10% da contagem diferencial de leucócitos de quelônios, porém, não está presente em todas as espécies de tartarugas (ARCILA *et al.*, 2005; MARTÍNEZ-SILVESTRE; CUENCA, 2011; ZHANG; GU; LI, 2011; ARIZZA *et al.*, 2014). Em relação às outras células leucocitárias, a concentração de monócito varia pouco com a variação sazonal; essas células têm capacidades fagocitárias e sua mensuração são ativos em condições inflamatórias crônicas e no diagnóstico de doenças infecciosas de origem bacteriana, além de processos que envolvem a formação de granulomas teciduais (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011; JOSEPH, 2015; SYKES; KLAPHAKE, 2015).

Existem ainda, biomarcadores que indicam danos, como os marcadores de genotoxicidade. Os danos genotóxicos são expressos como alterações no material genético, como a formação de substâncias químicas estranhas de DNA, lesões na fita,

síntese de material genético não programada e trocas entre cromátides irmãs (DEARFIELD *et al.*, 2002), e quando não reparados, resultam em efeitos deletérios, que podem se manifestar, especialmente, em neoplasias (BRITO; LUZ, 2015). Além do mais, muitas das alterações genéticas tendem a ser irreversíveis e continuar a se manifestar nas futuras gerações por meio da hereditariedade, assim, além de genotóxico, o efeito pode ser mutagênico, e embora os efeitos genotóxicos possam ser transitórios, os efeitos mutagênicos podem ser permanentes, por isso, podendo colocar em risco a sobrevivência de populações de ecossistemas impactados (DEARFIELD *et al.*, 2002; OBIAKOR *et al.*, 2012).

Neste sentido, a análise sobre a frequência de micronúcleo e outras aberrações nucleares fornecem informações que indicam danos cromossômicos decorrentes da presença de contaminantes tóxicos em ecossistemas aquáticos impactados (ANBUMANI; MOHANKUMAR, 2011; ARALDI *et al.*, 2015). Diante disso, o teste do micronúcleo encontrou seu lugar no biomonitoramento, como um teste que oferece um procedimento técnico rápido, de fácil clareza nas respostas e de baixo custo, além de que, pode ser aplicado a qualquer população de células nucleadas em proliferação, independentemente de seu cariótipo (HAYASHI *et al.*, 1998; FONSECA, 2014; JOSENDE *et al.*, 2014; DE CARVALHO PENHA *et al.*, 2021b).

Os micronúcleos são formados (ver figura 2 e 3) por fragmentos cromossômicos ou por cromossomos inteiros que se atrasam na divisão celular (anáfase) por consequência do reparo incorreto de quebras de DNA ou segregação cromossômica não reparadas, e, portanto, não se incorporam ao novo núcleo da célula-filha (FENECH, 2000; 2011). Diante disso, o teste do MN tem a capacidade de fornecer uma avaliação do potencial clastogênico (quebra cromossômica) e aneugênico (segregação cromossômica anormal relacionado ao aparato do fuso) das espécies expostas a agentes nocivos ambientais (ÇAVAS, 2008; OBIAKOR *et al.*, 2012; BUENO *et al.*, 2017).

Esses erros podem ser induzidos por defeitos genéticos no ciclo celular, estresse oxidativo e/ou exposição a contaminantes (FENECH, 2000; ÇAVAS, 2008; IARMARCOVAI *et al.*, 2008). Para além da formação de micronúcleos, pode haver também a formação de outras alterações induzidas por poluentes, conhecidas como Anomalias Nucleares Eritrocitárias (ANE) (ver figura 3). O processo de formação dessas alterações não é totalmente compreendido, mas sugere-se que ocorra quando uma parte do material genético fica atrasada no ciclo celular, fazendo com que o núcleo apresente algumas protuberâncias em sua cromatina (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2000;

BOMBAIL *et al.*, 2001; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; ÇAVAS, 2008). Mesmo sua origem não sendo bem descrita, essas anormalidades ainda sim, são consideradas indicadores de danos genotóxicos e, portanto, podem complementar a pontuação de micronúcleos em pesquisas de genotoxicidade de rotina (ERGENE *et al.*, 2007; ÇAVAS, 2008; SANTANA; ABRE; ABESSA, 2020). Diante disso, as anormalidades nucleares, incluindo núcleos *blebbed*, *lobed*, *notched* e células binucleadas, vêm sendo usadas por vários autores como biomarcador de genotoxicidade (AYLLÓN; GARCIA-VAZQUEZ, 2001; BOMBAIL *et al.*, 2001; ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; ERGENE *et al.*, 2007; ÇAVAS, 2008; SUMMAK *et al.*, 2010; CORREDOR-SANTAMARÍA *et al.*, 2016).

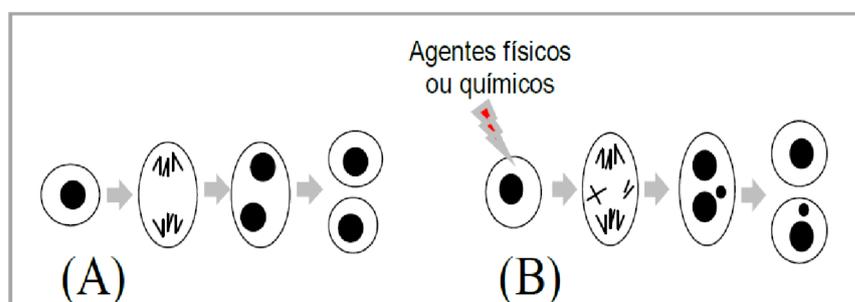


Figura 2 – (A) Divisão celular normal. (B) Divisão celular anormal com formação de micronúcleos. Fonte: Brito e Luz (2015) adaptado de Fenech (1997).

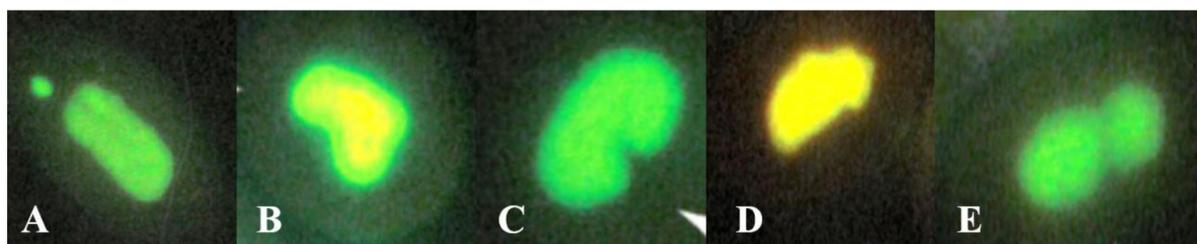


Figura 3 – Fotomicrografias de anormalidades eritrocitárias coradas com laranja de acridina. (A) micronúcleo, (B) núcleo lobado (*lobed*) (C) núcleo entalhado (*notched*), (D) núcleo bolhoso (*blebbed*) e (E) célula binucleada (MITKOVSKA; CHASSOVNIKAROVA, 2020).

Nas últimas décadas vários estudos foram realizados para avaliar danos genotóxicos e mutagênicos através das análises do aparecimento de MNs e ANEs, sobretudo, em ambientes aquáticos deteriorados por ação antropogênica (UDROIU, 2006; ALI; EL-SHEHAWI; SEEHY, 2008; OBIAKOR *et al.*, 2012; BRITO; LUZ, 2015; AGUIAR *et al.*, 2018). Esses testes foram realizados especialmente com o uso em peixes

(e.g. ALI; EL-SHEHAWI; SEEHY, 2008; GALINDO; MOREIRA, 2009; CABANELAS; MOREIRA, 2012; DEL-GUERCIO; CHRISTOFOLETTI; FONTANETTI, 2017; ALENCAR *et al.*, 2018; ALVIM; DOS REIS MARTINEZ, 2018). Posteriormente, vários protocolos foram desenvolvidos ampliando o uso do teste para outros organismos e em linhagens celulares diversas (CABANELAS; MOREIRA, 2012).

Recentemente tem-se verificado uma vasta gama de interesses em estudos ecotoxicológicos e hematológicos em répteis, pois suas características fisiológicas e ecológicas permitem avaliar o estado de contaminação/poluição de um ambiente (SPARLING *et al.*, 2010; GRILLITSCH; SCHIESARI, 2015; BAENA, 2017; ZYCHOWSKI; GODARD-CODDING, 2017; CASTANO *et al.*, 2020; QUIRÓZ HERRERA; UALIYEVAL; KHAN, 2022). Diante disso, vários estudos nos últimos anos têm utilizado o teste MN como biomarcador de eventos genotóxicos em diversas espécies de répteis expostos a diferentes produtos químicos (e.g. STRUNJAK-PEROVIC *et al.*, 2010; CAPRIGLIONE *et al.*, 2011; SCHAUMBURG *et al.*, 2012; GONZÁLEZ *et al.*, 2013; HAYRETDAGĀ *et al.*, 2014; DA COSTA ARAÚJO *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; ZAMORA-PÉREZ *et al.*, 2021). Mas ainda, estes estudos com Testudines de vida livre habitando ambientes contaminados são bastante escassos e limitados (e.g. MATSON *et al.*, 2005; ZAPATA *et al.*, 2016; LABRADA-MARTAGÓN; TENERIÁ; ZENTENO-SAVÍN, 2019; CASTAÑO *et al.*, 2020; FROSSARD, 2020), porém, alguns estudos foram previamente conduzidos, por exemplos, Fonseca (2014) detectou uma maior ocorrência de micronúcleos em eritrócitos em tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) portadoras da fibropapilomatose, sugerido que o teste serviu como um bom marcador de alteração ambiental e carcinogênica. Swartz *et al.* (2003) mostrou uma alta contagem de eritrócitos micronucleados em espécies de tartarugas europeias de uma lagoa adjacente a uma estação de tratamento de água residuárias industriais em comparação a tartarugas de uma lagoa de um local de referência. Matson *et al.* (2005) encontrou aumento nas frequências de MNs em cágado de carapaça estriada (*Emys orbicularis*) que habitavam ambientes contaminados em relação a um local de referência. Da mesma forma, o estudo de Silveira (2016), analisando 16 quelônios marinhos debilitados, obteve como resultado uma elevada incidência de micronúcleos, que pode ter relação com a exposição intensa à poluente sofrida por estes animais, assim como a ineficiência dos seus sistemas de reparo em lidar com quebras cromossômicas, este mesmo autor, ainda enfatiza que existe uma escassez de estudos relacionados a danos genéticos em quelônios, principalmente com aplicação do ensaio de micronúcleos, tendo, portanto, a necessidade de mais estudos nesse

sentido. No entanto, especificamente com *Trachemys dorbigni*, não encontramos na literatura nenhum relato de biomarcadores de genotoxicidade utilizando essa espécie, sendo que, determinar os valores basais de danos ao DNA de espécies sentinelas fornecem uma alternativa particularmente promissora de crescente interesse e relevância para medir os efeitos genotóxicos ocasionados pela exposição a diferentes contaminantes ambientais (POLETTA *et al.*, 2013).

No Rio Grande do Sul, o quelônio mais abundante é a espécie *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) conhecida popularmente como tartaruga tigre d'água, sendo identificada pela coloração com listras verdes e amarelas na cabeça, além do casco ornamentado, principalmente nas fêmeas (QUINTELA; LOEBMANN, 2009; BUJES, 2010). Essa espécie de água doce vive naturalmente em ambientes como rios, lagos e córregos com abundância de vegetação (BUJES, 2008). Também é comumente encontrada em áreas urbanas poluídas por esgoto domésticos e industriais, em áreas de drenagem de plantações de arroz ou cavas decorrentes da extração ilegal de areia (BUJES; VERRASTRO 2008; FAGUNDES; BAGER; CECHIN, 2010). A espécie apresenta hábitos diurnos, com dimorfismo sexual acentuado (Figura 4), sendo as fêmeas maiores que os machos, porém os machos apresentam uma cauda longa (BOSSLE, 2010). Sua dieta é generalista do tipo onívoro oportunista (HAHN, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2019). A estimativa de vida na natureza é da ordem de aproximadamente 30 a 40 anos (CLEITON; GIULIANO-CAETANO, 2008). Embora o estado de conservação de *T. dorbigni* não seja um motivo de preocupação atual, pois essa espécie não está listada como ameaçada de extinção pela Portaria MMA nº 148/2022 que atualiza a Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2022), nos últimos anos, ela tem sido fortemente afetada por atividades antrópicas como contaminação de rios, fragmentação dos habitats, comercialização ilegal de filhotes como pets, mortalidade por atropelamento e interferência dos locais de nidificação por atividades agrícolas, principalmente pelas plantações de arroz irrigado, dessa forma, constituindo risco à sobrevivência de suas populações naturais (BAGER; 2003; BAGER; DE FREITAS; KRAUSE, 2007). Neste sentido, ressaltamos a relevância de estudos sobre indicadores fisiológicos de quelônios que vivem em ambientes alterados, uma vez que a poluição pode afetar negativamente os organismos e, por consequência, acarretar a redução da espécie em ambientes naturais, além de que, esse tipo de estudo oferece um rápido diagnóstico com muitas informações sobre o estado de saúde dos animais (LOPES, 2016).



Figura 4 – Exemplos adultos de *Trachemys dorbigni*. Fonte: (A) Bujes; Verrastro, 2008. (B) Da Silva, 2023.

Em suma, processos de urbanização têm levado à degradação de ambientes aquáticos naturais, tanto por alteração de paisagem, canalização de corpos hídricos e destruição da vegetação de entorno, como pelo despejo de efluentes, onde destaca-se efluentes domésticos que contaminam os ambientes não apenas com bactérias e matéria orgânica, mas outros tipos de contaminantes como os PPCPs, cuja grande maioria ainda não é legislado. Visto que, a exposição crônica dos répteis a estes ambientes degradados e possíveis contaminantes de origem antrópica pode alterar o funcionamento dos organismos e, inclusive causar danos permanentes, afetando seu desenvolvimento, crescimento e, até mesmo, provocar alterações na estabilidade genética (POLETTA *et al.*, 2013). Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo geral relatar o perfil morfométrico e hematológico de exemplares de *Trachemys dorbigni* de vida livre habitando um ambiente urbanizado. Tendo como objetivos específicos:

- Realizar análise físico-química da água para a caracterização do local de estudo e comparar os resultados frente ao CONAMA 357/2005.
- Verificar as condições morfométricas dos exemplares de *T. dorbigni* de vida livre.
- Relatar valores sanguíneos para a espécie *T. dorbigni* por meio da análise da série vermelha e branca.
- Avaliar a presença de eventos genotóxicos através da observação da frequência de micronúcleo e outras anomalias nucleares eritrocitárias.
- Realizar análise de componentes principais com parâmetros bióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, E. M. *et al.* Alterações genotóxicas como biomarcadores em peixes de uma área protegida do sul do Maranhão. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 11, n. 1, p. 13-28, 2018.

ALENCAR, F. V. D. *et al.* Uso de biomarcadores enzimáticos e genotóxicos para diagnóstico da qualidade da água do lago de Itaparica-Pe. **Revista Rios Saúde**, 2018.

ALI, F. K., EL-SHEHAWI, A. M., SEEHY, M. A. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 606-612, 2008.

ALVIM, T. T.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, p. 85-93, 2019.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, p. 158-170, 2003.

ANBUMANI, S.; MOHANKUMAR, M. N. Nuclear and cytoplasmic abnormalities in the fish *Catla catla* (Hamilton) exposed to chemicals and ionizing radiation. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 12, p. 867-877, 2011.

ARALDI, R. P. *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.72, p. 74–82, 2015.

ARCHELA, E. *et al.* Considerações sobre a geração de efluentes líquidos em centros urbanos. **GEOGRAFIA (Londrina)**, v. 12, n. 1, p. 517-526, 2003.

ARIAS, A. L. R. *et al.* Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, p. 61-72, 2007.

ARIZZA, V. *et al.* Morphological characterization of the blood cells in the endangered Sicilian endemic pond turtle, *Emys trinacris* (Testudines: Emydidae). **Italian Journal of Zoology**, v. 81, n. 3, p. 344-353, 2014.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, n. 3, p. 221-225, 2001.

BAGER, A. **Aspectos da biologia e ecologia da Tartaruga Tigre D'Agua, *Trachemys dorbignyi*, (Testudines-Emydidae) no extremo sul do Estado do Rio Grande do Sul-Brasil.** 2003. 110f. Tese (Pós-graduação em Ecologia). Departamento de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2003.

BAGER, A.; DE FREITAS, T. R. O.; KRAUSE, L. Nesting ecology of a population of *Trachemys dorbignyi* (Emydidae) in southern Brazil. **Herpetologica**, v. 63, n. 1, p. 56-65, 2007.

BARRETO, L. V. *et al.* Eutrofização em rios brasileiros. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer-Goiânia, v. 9, n. 16, p. 2167, 2013.

BERGAMINI, B. C. S. **Variação sazonal dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do jabuti piranga (*Chelonoidis carbonaria*).** 2016. 156f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –UNESP. FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CAMPUS DE BOTUCATU, São Paulo, 2016.

BOMBAIL, V. *et al.* Application of the comet and micronucleus assays to butterflyfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, v. 44, n. 3, p. 383-392, 2001.

BORGES, A. C. P. *et al.* Characterization of oxidative stress biomarkers in a freshwater anomuran crab. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 1, p. 61-67, 2018.

BOSSLE, C. M. B. 2010. **Caracterização demográfica da tartaruga tigre d'água *Trachemys dorbigni* (Testudines: Emydidae) em um ambiente urbano de Porto Alegre, RS, Brasil.** Dissertação (Pós-graduação em biologia). Universidade do Vale Rio dos Sinos. São Leopoldo, 2010.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, n. 92, 2011.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.** Diário Oficial da União, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional. Secretaria Nacional de Saneamento – SNS. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – Visão geral, ano de referência, 2021.** Brasília: SNS/MDR, 92 p, 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (2022) Lista oficial da fauna brasileira ameaçada de extinção. **Portaria MMA Nº 148, de 7 de junho de 2022**, Anexo II. Diário Oficial da União 108, de 08 de junho de 2022, Seção 1, página 74.

BRITO, L. O.; LUZ, L. D. Avaliação e monitoramento da qualidade das águas: usando análises moleculares. **Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais**, v. 3, n. 2, p. 076-090, 2015.

BUENO, A. P. M. *et al.* Teste de micronúcleos em peixes e parâmetros físico-químicos da água da represa Cocais, Minas Gerais. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 32-36, 2017.

BUJES, C. S. 2008. **Biologia e conservação de quelônios no delta do Rio Jacuí – RS: aspectos da história natural de espécies em ambientes alterados pelo homem.** Tese (Doutorado em Biologia Animal). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p 255, 2008.

BUJES, C. S. Os Testudines continentais do Rio Grande do Sul, Brasil: taxonomia, história natural e conservação. **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, v.100, n.4, p. 413-424, 2010.

BUJES, C. S.; VERRASTRO, L. Chelonians from the Delta of Jacuí River, RS, Brazil: habitats use and conservation. **Natureza e Conservação**, Curitiba, v. 6, p. 157-170, 2008.

CABANELAS, I. T. D.; MOREIRA, L. M. A. Danos citogenotóxicos em ecossistema aquático submetido a esgotamento sanitário urbano. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 7, n. 2, 2012.

CAJARAVILLE, M. P. *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2-3, pág. 295-311, 2000.

CAMPBELL, T. W. Clinical pathology in reptiles. **Reptile medicine and surgery**, p. 453-470, 2006.

CAMPBELL, T. W; ACVP; ASVCP. Hematology of Lower Vertebrates. In: 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP). International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. p. 1104-1108, 2004.

CAPRIGLIONE, T. *et al.* Genotoxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 885-891, 2011.

CASTAÑO, G. V. *et al.* Análisis de genotoxicidad en eritrocitos de tortugas (*Phrynops hilarii*) de sitios antropizados y naturales de Entre Ríos, Argentina. BAG. **Journal of basic and applied genetics**, v. 31, n. 1, p. 15-22, 2020.

ÇAVAŞ, T. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 352-358, 2008.

ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 538, n. 1-2, p. 81-91, 2003.

CLEITON, F.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of two turtle species: *Trachemys dorbigni* and *Trachemys scripta elegans*. **Caryologia**, v. 61, n. 3, p. 253-257, 2008.

CORNACINI, F. H. **Interferência da variação sazonal de fatores ambientais no perfil hematológico e bioquímico metabólico de *Chelonoidis carbonarius***. 2020. 37f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, 2020.

CORREDOR-SANTAMARÍA, W.; SERRANO GÓMEZ, M.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M. Using genotoxic and haematological biomarkers as an evidence of environmental contamination in the Ocoa River native fish, Villavicencio—Meta, Colombia. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2016.

COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

CROTEAU, M. C. *et al.* Toxicological threats to amphibians and reptiles in urban environments. **Urban Herpetology**, p. 197-209, 2008.

CURADO, A. L. *et al.* Urban influence on the water quality of the Uberaba River basin: an ecotoxicological assessment. *Revista Ambiente & Água*, v. 13, n. 1, 2018.

DA COSTA ARAÚJO, A. P. *et al.* First report on the mutagenicity and cytotoxicity of ZnO nanoparticles in reptiles. **Chemosphere**, v. 235, p. 556-564, 2019.

DE ABREU, C. H. M.; DA CUNHA, A. C. Qualidade da água em ecossistemas aquáticos tropicais sob impactos ambientais no baixo Rio Jari-AP: Revisão descritiva. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazônia, Amazonian Biota)**, v. 5, n. 2, p. 119-131, 2015.

DE CAMARGO, F. R. C. **PARTICULARIDADES DAS TÉCNICAS DE HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE TARTARUGA-DA-AMAZÔNIA (*Podocnemis expansa*, Schweigger, 1812) EM CATIVEIRO**. 2018. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

DE CAMPOS, A. R. *et al.* Análise físico-química e ecotoxicológica do igarapé ouro preto do município de Ouro preto do Oeste–Rondônia. **Biodiversidade**, v. 16, n. 3, 2017.

DE CARVALHO PENHA, L. C. *et al.* Effects of anti-inflammatory diclofenac assessed by toxicity tests and biomarkers in adults and larvae of *Danio rerio*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 242, p. 108955, 2021a.

DE CARVALHO PENHA, L. C. *et al.* Toxicity and sublethal effects of methylparaben on zebrafish (*Danio rerio*) larvae and adults. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 33, p. 45534-45544, 2021b.

DE OLIVEIRA, J. S. P. *et al.* Mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential of different pesticides in the erythrocytes of *Podocnemis expansa* neonates. **Science of the Total Environment**, v. 737, p. 140304, 2020.

DEARFIELD, K. L. *et al.* Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 521, n. 1-2, p. 121-135, 2002.

DEL-GUERCIO, A. M. F; CHRISTOFOLETTI, C. A.; FONTANETTI, C. S. Avaliação da eficiência do tratamento de esgoto doméstico pelo teste do micronúcleo em *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 1121-1128, 2017.

DIAZ GONZÁLEZ, F.H.; S., S. C. Patologia clínica veterinária: texto introdutório. **Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, p. 324, 2008.

ERGENE, S. *et al.* Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, n. 6, p. 421-429, 2007.

FAGUNDES, C. K.; BAGER, A.; CECHIN, S. T. Z. *Trachemys dorbigni* in an anthropic environment in southern Brazil: I) Sexual size dimorphism and population estimates. **The Herpetological Journal**, v. 20, n. 3, p. 185-193, 2010.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1-2, p. 11-18, 1997.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FERNICOLA, N. A. G. G. *et al.* 2003. Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (Coord.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa/ São Paulo: Intertox, 2003, p. 221-243.

FERRAREZI A. L. (2006). **Estudos estruturais e funcionais das hemoglobinas de *Phrynos geoffroanus* (Schweigger, 1812)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto - SP, 2006.

FONSECA, L. A. 2014. **Biomarcadores de estresse e carcinogênese: um estudo em *Chelonia mydas***. Tese (Pós-Graduação em Biologia Animal). Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, ES, fevereiro de 2014.

FORNARI, M. R. *et al.* Efluentes urbanos na água do Rio Marau (Brasil). Qualidade da água no rio marau. **Bitácora Urbano/Territorial**, v. 28, n. 3, 2018.

FREIRE, M. M. *et al.* Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 2, 2008.

FROSSARD, A. **Avaliação ecotoxicológica de metais em testudines**. 2020. Tese de Doutorado (Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas). Universidade Vila Velha, Espírito Santo, 2020.

GALINDO, T. P.; MOREIRA, L. M. Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). **Genetics and molecular biology**, v. 32, p. 394-398, 2009.

GELL, D. A. Structure and function of haemoglobins. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 70, p. 13-42, 2018.

GIBBONS, J. W. *et al.* The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. **BioScience**, v. 50, p. 653-666, 2000.

GONZÁLEZ, E. C L. *et al.* Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed in vivo to Roundup®(glyphosate) concentrations used in agriculture. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, n. 2, p. 131-134, 2013.

GRADELA, A. *et al.* Biometria corporal e parâmetros hematológicos de *Trachemys scripta elegans* e *Trachemys dorbignyi* (Testudines: Emydidae) criadas em cativeiro em Petrolina, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 83-90, 2017.

GRAZEFFE, V. S. 2009. **Estabelecimento do teste do cometa em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) expostos à radiação gama (60 Co)**. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências). São Paulo (Estado) Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças, 2009.

- GRILLITSCH B.; SCHIESARI, L. The Ecotoxicology of Metals in Reptiles. In: **Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles**. CRC Press, 2010. p. 363-474.
- HAHM, A. T. 2005. **Análise da dieta de *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) no sul do Rio grande do Sul, Brasil (Testudines: Emydidae)**. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Animal). Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.
- HAYASHI, M. *et al.* Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 399, n. 2, p. 125-133, 1998.
- HAYRETDAG, S. *et al.* A preliminary study on micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of some Colubrid snakes from Turkey. **Biharean Biologist**, v. 8, n. 1, p. 53-55, 2014.
- HOSSEINZADEH, C. A.; JAFARI, N. Red blood cell morphology and plasma proteins electrophoresis of the European pond terrapin *Emys orbicularis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 13, 2007.
- IARMARCOVAI, G. *et al.* Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 215-233, 2008.
- JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-221, 2008.
- JOSENDE, M. E. *et al.* Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. **Ecological Indicators**, v. 49, p. 83-87, 2015.
- JOSEPH, V. Reptile clinical pathology. **Bird and pet clinic of Roseville**. USA, v. 121, p. 155-162, 2015.

KNOTKOVÁ, Z. *et al.* Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agrionemys horsfieldi*). **Acta Veterinaria Brno**, v. 71, n. 2, p. 191-198, 2002.

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

LABRADA-MARTAGÓN, V.; TENERIÁ, F. A. M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Standardized micronucleus assay for peripheral blood from sea turtles. **Chelonian Conservation and Biology: Celebrating 25 Years as the World's Turtle and Tortoise Journal**, v. 18, n. 2, p. 175-186, 2019.

LEWBART, G. A. *et al.* Blood gases, biochemistry, and hematology of Galapagos green turtles (*Chelonia mydas*). **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96487, 2014.

LIMA, D. R. S. *et al.* Fármacos e desreguladores endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 6, p. 1043-1054, 2017.

LOPES, G. M. **Indicadores hematológicos em cágados do córrego Felizardo no município de Uruguaina-RS**. Monografia (Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura). Universidade Federal do Pampa. Uruguaiiana-RS, 2016.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2018.

MANNARINO, C. F. *et al.* Avaliação de impactos do efluente do tratamento combinado de lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos e esgoto doméstico sobre a biota aquática. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, p. 3235-3243, 2013.

MARTÍNEZ-SILVESTRE, A.; CUENCA VALERA, R.; LAVÍN GONZÁLEZ, S. Hematología y citología sanguínea en reptiles. **Clínica veterinaria de pequeños animales**, v. 31, n. 3, 2011.

MARTINS, G. S. *et al.* Cytochemical characteristics of blood cells from Brazilian tortoises (Testudines: Testudinidae). **Genet. Mol. Res.**, v. 15, n. 1, 2016.

MATSON, C. W. *et al.* Chromosomal damage in two species of aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan. **Ecotoxicology**, v. 14, n. 5, p. 513-525, 2005.

MEDEIROS, N. C. *et al.* Efeito do sítio de venopunção nos parâmetros hematológicos em tigre-d'água-americano, *Trachemys scripta elegans*. **Pesq. Vet. Bras**, p. 37-40, 2012.

MERTEN, G. H.; MINELLA, J. P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e desenvolvimento rural sustentável**, v. 3, n. 4, p. 33-38, 2002.

MITKOVSKA, V.; CHASSOVNIKAROVA, T. Chlorpyrifos levels within permitted limits induce nuclear abnormalities and DNA damage in the erythrocytes of the common carp. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 7, p. 7166-7176, 2020.

MONTANHA, F. P. *et al.* Degradação de ambientes aquáticos por exposição a compostos químicos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 17, p. 1-12, 2011.

MORSELLI, M. E. P. *et al.* Biometria e parâmetros hematológicos em tartarugas da Amazônia de um criatório comercial de Rio Branco/AC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p. 1548-1556, 2016.

NARDINI, G.; LEOPARDI, S.; BIELLI, M. Clinical hematology in reptilian species. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 16, n. 1, p. 1-30, 2013.

OBIAKOR *et al.* Eco-genotoxicology: Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as *In situ* Aquatic Pollution Biomarker: a Review. **J. Anim. Sci. Adv.**, v. 2, p. 123-133, 2012.

- OLIVEIRA, A.T. *et al.* Morphological and cytochemical characterization of thrombocytes and leukocytes in hatchlings of three species of Amazonian freshwater turtles. **Veterinarski arhiv**, v. 81, n. 5, p. 657-670, 2011.
- PARADA, T. S. M. **Caracterização ecotoxicológica e físico-química das águas da Bacia do Rio Morto, Vargem Grande – RJ**. 2015. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Ambiental). Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Rio de Janeiro, 2015.
- PARRON, L. M; MUNIZ, D. H. F.; PEREIRA, C. M. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. **Colombo: Embrapa Florestas**, 2011.
- PENG, F. *et al.* Hematological and serum biochemical parameters of captive Chinese alligators (*Alligator sinensis*) during active and hibernation periods. **Tissue and Cell**, v. 51, p. 8-13, 2018.
- PEREIRA, A. C. A.; GARCIA, M. L. Efeitos da disposição de lodo de estações de tratamento de efluentes (ETE) de indústria alimentícia no solo: estudo de caso. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 3, p. 531-538, 2017.
- PÉREZ IGLESIAS, J. M. **Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros neotropicais**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto. São José do Rio Preto, 2015.
- PERPIÑÁN, D. *et al.* Hematology of the Pascagoula map turtle (*Graptemys gibbonsi*) and the southeast Asian box turtle (*Cuora amboinensis*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 39, n. 3, p. 460-463, 2008.
- PITOL, D. L. *et al.* Radioautographic study of the seasonal distribution of leukocytes in turtles *Phrynops hilarii* (Chelonia Chelidae). **Micron**, v. 39, n. 8, p. 1381-1386, 2008.

POLETTA, G. L. *et al.* *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 2, p. 202-209, 2008.

POLETTA, G. L. *et al.* Reptiles as animal models: examples of their utility in genetics, immunology and toxicology. **Livro: Réptil no campo de pesquisa**, p. 1-39, 2013.

POMPEU, P.S.; ALVES, C. B. M.; CALLISTO, M. The effects of urbanization on biodiversity and water quality in the Rio das Velhas basin, Brazil. In: **American Fisheries Society Symposium**, p. 11-22, 2005.

QUINTELA, F. M.; LOEBMANN, D. **Guia ilustrado: Os répteis da região costeira do extremo Sul do Brasil**. Pelotas: USEB, 2009.

QUIROZ, V. H.; BAENA, J. A. P. Niveles sanguíneos de biomarcadores de daño genético en eritrocitos de *Lepidochelys olivacea* (Cheloniidae) en Colombia. **Acta biológica colombiana**, v. 22, n. 3, p. 322-330, 2017.

RODRÍGUEZ-ALMONACID, C. *et al.* Hematological and blood chemistry parameters of a *Podocnemis vogli* and *P. unifilis* captive population in Colombia. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2022.

SALVARANI, P. I. **Impact of Contaminants in Natural Populations of Marine Turtles (Campeche, Mexico)**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de Aveiro (Portugal).

SÄMY, C. H. *et al.* Estudo do impacto ambiental na bacia do rio do braço através de análises ecotoxicológicas. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 4, n. 2, p. 45-55, 2010.

SANTANA, L. M. B. M.; ABREU, F. E. L.; ABESSA, D. M. S. Piscine micronucleus assay and the evidence of environmental degradation: the case of catfish from Brazilian tropical estuaries. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 4, p. 3369-3394, 2020.

SCHAUMBURG, L. G. *et al.* Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 84, p. 99-103, 2012.

SILVA, M. I. A. **Alterações hematológicas e bioquímicas em uma população de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em resposta a estressores ambientais.** 2011. Dissertação (Mestrado em Genética Animal). Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto - SP, 2011.

SILVEIRA, E. C. *et al.* Dieta de *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) em ambientes antrópicos do sul do Brasil. **Revista Pan-Americana de Ciências Aquáticas**, v. 14, n. 1, p. 42-50, 2019.

SILVEIRA, S. S. **Avaliação dos danos mutagênicos através da análise de micronúcleos em eritrócitos de tartarugas marinhas no Litoral Norte e Médio Leste do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2016. Monografia (Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira). Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Osório, Rio Grande do Sul, 2016.

SOUZA, F. L. *et al.* Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, v. 3, n. 1, pág. 15-27, 2004.

SPARLING, D. W. *et al.* (Ed.). **Ecotoxicology of amphibians and reptiles.** CRC Press, 2010.

STACY, N. I.; ALLEMAN, A. R.; SAYLER, K. A. Diagnostic hematology of reptiles. **Clinics in laboratory medicine**, v. 31, n. 1, p. 87-108, 2011.

STEIN, I. V. *et al.* Perfil hematológico de tigras d'água (*Trachemys dorbigni*) de uma população do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Veterinária em Foco**, v. 12, n. 2, 2015.

STRUNJAK-PEROVIC, I. *et al.* Evaluation of micronucleus and erythrocytic nuclear abnormalities in Balkan whip snake *Hierophis gemonensis*. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1460-1465, 2010.

SUMMAK, S. *et al.* Evaluation of genotoxicity from Nilufer Stream (Bursa/Turkey) water using piscine micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2443-2447, 2010.

SWARTZ, C. D. *et al.* Chemical contaminants and their effects in fish and wildlife from the industrial zone of Sumgayit, Republic of Azerbaijan. **Ecotoxicology**, v. 12, n. 6, p. 509-521, 2003.

SYKES I. V, John M.; KLAPHAKE, E. Reptile hematology. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 481-500, 2008.

TAVARES-DIAS, M. *et al.* Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. **Veterinarski arhiv**, p. 601-610, 2009.

THEUERKAUFF, D. *et al.* Efeitos de descargas de efluentes domésticos na fisiologia do caranguejo de mangue: Balanços energéticos, osmorregulatórios e redox integrados de uma espécie chave de engenheiro. **Aquatic Toxicology**, v. 196, p. 90-103, 2018.

THOMÉ, R. G.; DA SILVA, P. M.; DOS SANTOS, H. B. Avaliação de Genotoxicidade da Água de um Rio Urbano Utilizando Estudo de Células Sanguíneas de *Danio rerio*. **Conexão Ciência (Online)**, v. 11, n. 2, p. 9-16, 2016.

TOMÉ L. M. SANEAMENTO BÁSICO: SITUAÇÃO ATUAL E PERSPECTIVAS. **Caderno Setorial**. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE, ano 3, n. 37, 2018.

UALIYEVA, D.; KHAN, Z. Reptiles in Decline: Eco-Toxicological Prospective. **A Epidemiol Public Health**, 2022.

UDEIGWE, T. K.; WANG, J. J. Biochemical oxygen demand relationships in typical agricultural effluents. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 213, n. 1-4, p. 237-249, 2010.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 79, n. 2, p. 201-204, 2006.

UEDA, T. *et al.* A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Water Science and Technology**, v. 25, p. 235-240, 1992.

UN-Water, 2021: **Summary Progress Update 2021 – SDG 6 – water and sanitation for all**. Version: July 2021. Geneva, Switzerland.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VENTURA, A. S.; CORSINI, F. E.; GABRIEL, A. M. A. Hematologia como biomarcador de contaminação ambiental em peixes. **Nutritime**, v. 12, n. 6, p. 4500-4507, 2015.

WANG, J.; WANG, S. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: a review. **Journal of environmental management**, v. 182, p. 620-640, 2016.

WOKOMA, O. A. F. "Impacto da poluição de água doce em organismos aquáticos": Uma revisão. **Journal of Environment, Earth Sciences and Ecology** v. 1, n.1; 2019.

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. (Ed.). Pathologic Basis of Veterinary Disease5: Pathologic Basis of Veterinary Disease. **Elsevier Health Sciences**, 2012.

ZAGO, C. E. S. *et al.* Morphological, morphometrical and ultrastructural characterization of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) blood cells, in different environments. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1005-1010, 2010.

ZAMORA-PEREZ, A. L. *et al.* Micronuclei and Nuclear Buds Induced by Cyclophosphamide in *Crocodylus moreletii* as Useful Biomarkers in Aquatic Environments. **Animals**, v. 11, n. 11, p. 3178, 2021.

ZAPATA, L. M. *et al.* Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 127, p. 108-116, 2016.

ZHANG, F. *et al.* Hematology, morphology, and ultrastructure of blood cells of juvenile olive ridley sea turtles (*Lepidochelys olivacea*). **Chelonian Conservation and Biology**, v. 10, n. 2, p. 250-256, 2011.

ZHANG, F.; GU, H.; LI, P. A review of chelonian hematology. **Asian Herp Res**, v. 2, n. 1, p. 12-20, 2011.

ZYCHOWSKI, G. V.; GODARD-CODDING, C. A. J. Reptilian exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and associated effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 25-35, 2017.

CAPÍTULO 1

Perfil hematológico e análise de alterações genotóxicas e mutagênicas de uma população natural de Tartaruga-tigre-d'água, *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) sob condições de urbanização no extremo sul do Brasil

Hematological profile and analysis of genotoxic and mutagenic alterations of a natural population of Water Tiger Turtle, *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) under urbanization conditions in the extreme south of Brazil

Manuscrito a ser submetido à revista **Ecological Indicators** (Fator de impacto - 2021: 6.263 e Qualis A1).

Danielle Tavares da Silva^a; Camila de Martinez Gaspar Martins^a; Raqueli Teresinha França^b; Thays de Andrade Guedes^a; Daniel Loebmann^a.

^a *Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Carreiros, Av. Itália km 8, Rio Grande, RS 96203-900, Brazil*

^b *Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Clínica Veterinária, Campus Capão do Leão, Pelotas, RS, 96160-000, Brazil*

Authors e-mail addresses:

daniits2912@gmail.com (Danielle Tavares da Silva)

camilaos@hotmail.com (Camila de Martinez Gaspar Martins)

raquelifranca@gmail.com (Raqueli Teresinha França)

thays_guedes@hotmail.com (Thays de Andrade Guedes)

daniel.loebmann@furg.br (Daniel Loebmann)

Corresponding author:

Daniel Loebmann, Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Av. Itália Km 8, Rio Grande, RS, 96203-900, Brasil

E-mail: daniel.loebmann@furg.br

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar de acordo com a literatura se a degradação de corpos d'água por efluentes líquidos domésticos afetam índices morfométricos e hematológicos, e se causam genotoxicidade e mutagenicidade em exemplares de Tartarugas-tigre-d'água (*Trachemys dorsalis*) em vida livre. Os animais foram capturados randomicamente (n = 16) em um canal urbano sob fortes pressões antrópicas onde ocorre o despejo irregular de efluentes domésticos. As tartarugas foram analisadas quanto a sua biometria e presença de enfermidades externas e, após, foram coletadas amostras sanguíneas da veia subcarapacial para determinação do perfil hematológico (eritrograma e leucograma) e análise das alterações genotóxicas (micronúcleo e outras anomalias nucleares). Amostras de água também foram coletadas para medições físico-químicas. O baixo teor de oxigênio dissolvido e elevada concentração de fósforo total na água são indícios da contaminação do ambiente estudado por efluente doméstico e eutrofização. Os animais possuíam ectoparasitas (31,25 %) e pequenas deformações no casco (56,25 %), porém o comprimento máximo da carapaça e peso medidos foram consideradas normais para a espécie. Os resultados do perfil sanguíneo mostraram baixa concentração de hemoglobina e hematócrito e elevada quantidade de leucócitos totais com diferenciação predominante de eosinófilos, característicos de infecções parasitárias. Quanto à danos genotóxicos, a frequência de micronúcleo foi considerada basal (0,12%), mas a frequência das outras anomalias eritrocitárias foram bastantes evidentes, principalmente de núcleos *blebbed* (bolhosos) (63,79%), portanto, um indicativo de danos cromossômicos em estágio inicial. Os resultados deste estudo indicam que ambientes degradados por ações antrópicas, decorrentes de urbanização, invadem habitat naturais de tartarugas e afetam seu estado fisiológico, colocando populações em risco.

Palavras-chave: biomonitoramento, efluentes domésticos, parâmetros hematológicos, teste do micronúcleo, saúde animal.

1. Introdução

A poluição dos recursos hídricos é uma preocupação ambiental crescente em áreas urbanas (Singh et al., 2022). O aumento desenfreado de atividades antropogênicas intensifica o despejo de águas residuais sem tratamento prévio ou efetivo (Lopes, 2016; Fornari et al., 2018), perturbando a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas aquáticos naturais, constituindo assim, uma ameaça à biodiversidade aquática (Fleeger et

al., 2003; Çavas; Ergene-Gözükara, 2005). A exposição crônica dos organismos a estas misturas que são águas residuais / efluentes pode interferir em processos bioquímicos e fisiológicos, estabilidade genética, bem como, no desenvolvimento e crescimento (Poletta et al., 2013), o que em maior escala, pode afetar, inclusive, a manutenção de populações naturais (De Lemos et al., 2007; Costa et al., 2008; Croteau et al., 2008; Montanha et al., 2011; Lopes, 2016).

Neste sentido, o biomonitoramento é um método sistemático que utiliza respostas biológicas de bioindicadores para avaliar a qualidade ambiental (Buss et al., 2003). As alterações nas respostas dos sistemas biológicos (que variam de moleculares à comportamentais) que estão relacionadas à exposição a substâncias químicas ou aos seus efeitos tóxicos são denominados biomarcadores ou marcadores biológicos (Van Der Oost et al., 2003). Os biomarcadores de exposição e efeito são fundamentais na análise das relações entre os diferentes poluentes do meio ambiente, na incorporação pelos organismos e na ação tóxica ou efeito sobre eles mesmos (Pérez Iglesias, 2015). Assim, os biomarcadores detectam precocemente respostas organísmicas ao estresse ambiental, antecipando efeitos adversos em níveis hierárquicos maiores, como em nível de populações e comunidades (Cajaraville et al., 2000).

Análises sanguíneas são essenciais para monitorar e medir distúrbios fisiológicos em populações de Testudines em vida livre, por se tratar de um método pouco invasivo que não requer a eutanásia dos animais, têm sido muito utilizado por atuar no diagnóstico precoce de doenças quelônicas, que podem estar associados a fatores de estresse causados pela exposição a contaminantes, enfermidades ou até pela invasão de espécies exóticas, além disso, possibilitando a determinação do prognóstico de patologias. Além do mais, observações feitas sobre o estado clínico de saúde fornecem informações valiosas que auxiliam nos esforços para a conservação e gerenciamento das espécies de quelônios, bem como o uso desses animais como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas impactados (Matson et al., 2005; Metin et al., 2006; Hidalgo-Villa et al., 2007; Chaffin et al., 2008; Oliveira-Júnior; Tavares-Dias; Marcon, 2009; Zhang; Gu; Li, 2011; Arizza et al., 2014; Silveira, 2016; Zapata et al., 2016; Castaño et al., 2020).

A avaliação de danos no DNA é usada para medir eventos genotóxicos de contaminantes presentes nos ambientes aquáticos degradados. Diante disso, o ensaio para a observação da presença de eritrócitos com micronúcleo e outras alterações eritrocitárias é um método simples e eficiente que tem a capacidade e de fornecer evidências do potencial genotóxico e mutagênico, pois permite examinar a exposição crônica dos

diferentes compostos em animais, visto que, a elevada contagem de eritrócitos micronucleados (MN) e anormalidades nucleares eritrocíticas (ANEs) pode evidenciar problemas de saúde, pois quanto maior o número de MN ou ANEs, maior o dano ao material genético (Fenech, 2000; Ergene et al., 2007; Hosseinzadeh; Jafari, 2007; Metin et al., 2008; Anbumani; Mohankumar, 2011; Labrada-Martagón; Teneriá; Zenteno-Savín, 2019; osende et al., 2014; Zapata et al., 2016; De Carvalho Penha et al., 2021; Zamora-Perez et al., 2021).

O presente trabalho teve como foco a avaliação da condição de saúde de uma população do quelônio *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) conhecida popularmente como tartaruga tigre d'água, que é a espécie mais abundante do Rio Grande do Sul, e que vive naturalmente em ambientes dulcícolas como rios, lagos e córregos que vem sofrendo constante degradação antrópica em decorrência da urbanização. Especialmente no local de estudo, a degradação ocorre por lançamento clandestino de esgoto doméstico, sendo esta a principal fonte poluidora. O estado de conservação de *T. dorbigni* não é considerado um motivo de preocupação atual, pois essa espécie não está listada como ameaçada de extinção pela Portaria MMA nº 148/2022 que atualiza a Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção (Brasil, 2022). No entanto, os animais desta espécie têm sido afetados pela contaminação das águas, fragmentação dos habitats, além de outros fatores como comercialização ilegal de filhotes, mortalidade por atropelamento e interferência dos locais de nidificação por atividades agrícolas, principalmente pelas plantações de arroz irrigado. Este conjunto de fatores constitui risco à sobrevivência de populações naturais de *T. dorbigni* (Bager; De Freitas; Krause, 2007). Cabe ressaltar que a redução da abundância ou perda de tartarugas em sistemas aquáticos pode resultar em alterações significativas no funcionamento do ecossistema (Lindsay et al., 2013).

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é avaliar de acordo com a literatura consultada se a degradação de corpos d'água por efluentes líquidos domésticos afetam índices morfométricos e hematológicos, e se causam genotoxicidade e mutagenicidade em exemplares de Tartarugas-tigre-d'água (*Trachemys dorbigni*) em vida livre.

2. Materiais e Métodos

2.1. Local de amostragem, captura e biometria dos animais

O estudo foi conduzido em um canal a céu aberto localizado no perímetro urbano da cidade de Pelotas/RS (latitude: -31.7608741, longitude: -52.3162444). Este local vem

sofrendo intensa antropização pelo crescimento imobiliário e existem registros de despejo irregular de esgoto doméstico no canal. Nos meses de novembro/2021, janeiro, março e abril/2022 foram capturados 16 exemplares adultos de *T. dorbigni* (13 fêmeas e 3 machos) utilizando-se armadilhas do tipo covão com iscas atrativas e auxílio adicional de puçá. Após a captura, os animais foram contidos manualmente e marcados com um corte no escudo marginal da carapaça com auxílio de um arco de serra, também foram tiradas as medidas dos parâmetros biométricos (ver Tabela 2), tais como, comprimento e largura máxima da carapaça e do plastrão, massa corporal, registrada com uso de uma balança digital (precisão 0,1 g); e o sexo identificados visualmente pelo dimorfismo evidente conforme descrito por Bager (2003). Outras alterações visuais como a ocorrência de erupções cutâneas, deformações na carapaça e presença de parasitas foram anotadas.

2.2. Análise físico-química da água

A coleta e o armazenamento das amostras da água seguiram as orientações do Guia Nacional de Coleta e Preservação de amostras publicadas pela CETESB/ANA (Brandão et al., 2011). Para a amostragem *in loco* de alguns parâmetros físico-químicos da água foram medidos utilizando a sonda de multiparâmetros Horiba (Modelo U-53), a fim de obter resultados para turbidez, temperatura, condutividade elétrica, sólidos totais e pH (ver Tabela 1). No laboratório de Limnologia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foi realizada a análise da Clorofila-a utilizando o método de espectrofotometria segundo Mackinney (1941) com adaptações de Paranhos (1996) e Chorus e Bartram (1999); para determinação do Oxigênio dissolvido foi utilizado o método de Winkler (Golterman et al., 1978); e para as análises de Nitrogênio total e do Fósforo total foi realizada pelo método de Kjeldahl (Mackereth et al., 1978). Os resultados foram interpretados frente aos padrões estabelecidos pela Resolução nº 357/2005 do CONAMA (Brasil, 2005).

2.3. Parâmetros hematológicos

Amostras de sangue foram coletadas dos animais em campo, sob contenção física, pelo acesso da veia subcarapacial utilizando seringa plástica descartável (3mL) com agulha de calibre 40 x 12. No caso de contaminação do sangue com linfa, as amostras eram descartadas, o material de punção substituído, e procedia-se uma nova coleta. As amostras de sangue foram acondicionadas em microtubos contendo heparina de lítio, homogeneizadas gentilmente e mantidas sob refrigeração até o seu processamento. As

extensões sanguíneas foram feitas no local, logo após a coleta das amostras. A contagem numérica manual das hemácias e leucócitos foi feita em câmara hematimétrica após macrodiluição do sangue com solução diluente isotônica desenvolvida por Natt e Herrick (1952). A contagem diferencial leucocitária e avaliação morfológica celular foram realizadas por microscopia óptica, após coloração dos esfregaços sanguíneos pelo método de Wright. O hematócrito (Hct) foi determinado através da técnica de microhematócrito por 5 min a 11.000 rpm. A proteína plasmática total (PPT) foi mensurada através do método de refratometria. A dosagem de hemoglobina (Hb) foi realizada através do método cianometahemoglobina (Labtest, Lagoa Santa, BR) com centrifugação por 5 minutos, para remoção dos núcleos livres, antes da leitura das absorbâncias do sobrenadante em espectrofotômetro semi automático. Os índices hematimétricos (VCM e CHCM) foram calculados de acordo com Jain (1986).

2.4. Ensaio do micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocíticas

A determinação de micronúcleos (MNs) e anormalidades nucleares eritrocíticas (ANEs) também foram analisadas no tecido sanguíneo, de acordo com a técnica descrita por Ueda et al. (1992). Para tanto, três esfregaços de sangue periférico para cada animal foram preparados em lâminas limpas, fixados com metanol absoluto por 10 min e corados com laranja de acridina (0,003%) dissolvido em tampão de Sorenson (KH_2PO_4 , NaHPO_4 , pH 6.8) seguindo Alvim; Martinez (2018).

Logo após, as lâminas com o esfregaço sanguíneo já fixado foram examinadas sob microscópio de fluorescência (Olympus IX81) com aumento de 100x utilizando óleo de imersão. Um total de 3000 eritrócitos por animal foram pontuados quanto à presença de MNs e ANEs. Para a classificação de micronúcleos, foram seguidos alguns critérios descritos por Fenech (2000): 1) estrutura corpuscular circular ou oval, 2) mesma coloração do núcleo principal e 3) tamanho até 1/6 ou 1/3 do tamanho do núcleo principal. Outras anormalidades nucleares foram observadas e classificadas seguindo Carrasco et al. (1990), sendo elas descritas como: núcleos *blebbed* que apresentam uma projeção relativamente pequena da membrana nuclear parecendo conter eucromatina ou heterocromatina. Essas “bolhas” variam em forma de uma ligeira protuberância a uma estrutura pedunculada com um terminal redondo completamente circunscrito; núcleos *lobed*: são aqueles que apresentam evaginações maiores do que as descritas para os *blebbed*, podendo apresentar a formação de um único ou de múltiplos lóbulos; núcleo entalhado (*notched*): apresenta uma fenda bem definida de largura uniforme que se

estendia a uma profundidade apreciável em um núcleo que não contém material nuclear e parecem ser delimitados pela membrana nuclear. Além dessas anomalias, também foi avaliada a presença de núcleos binucleados, que são células que apresentam dois núcleos no citoplasma, interligados ou não e que estão dispostas no mesmo plano e com tamanho semelhante (Yasui et al., 2015). A avaliação do potencial genotóxico foi determinada separadamente para cada tipo de anomalia eritrocitária seguindo a fórmula mostrada por Zapata et al. (2016), onde a frequência (%) foi calculada como = (número de células contendo anormalidades x 1000) / número total de células contadas. O resultado de micronúcleo também foi expresso por média e desvio padrão.

Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FURG (autorização nº 23116.001406/2021-41).

2.5. Análise estatística

Foram realizadas estatísticas descritivas com resultados expressos por média e desvio padrão. O teste t de Student foi usado para determinar se houve diferenças significativas nos dados biométricos (comprimento máximo da carapaça e massa corporal) entre fêmeas e machos. Uma matriz de correlação foi utilizada para determinar o grau de similaridade entre as variáveis, para posterior ordenação utilizando o método de análise de componentes principais (PCA), a fim de visualizar a distribuição das associações entre as variáveis selecionadas. Um nível de significância 95% foi adotado para indicar diferença estatística, usando o programa software R- Studio ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

3.1. Condições físico-químicas da água no local de coleta

Os resultados dos parâmetros físico-químicos da água são apresentados na Tabela 1 e foram comparados e classificados de acordo com a resolução nº 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe sobre a classificação dos corpos hídricos e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, estabelecendo condições e padrões de qualidade de água do Brasil (Brasil, 2005).

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos de amostras coletadas do local de estudo. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão (DP).

Parâmetros Limnológicos	Média \pm DP
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	1,09 \pm 0,26
pH	7,11 \pm 0,30
Fósforo Total (mg/L)	1,18 \pm 0,10
Nitrogênio Total (mg/L)	9,77 \pm 1,75
Turbidez (UNT)	7,41 \pm 1,08
Sólidos Totais Dissolvidos (mg/L)	175,33 \pm 54,26
Condutividade Elétrica (μ S/cm)	276,67 \pm 77,17
Clorofila-a (μ g/L)	6,90 \pm 3,04

De acordo com o CONAMA 357/2005, a classificação do corpo hídrico é definida pelos usos preponderantes mais restritivos da água, atuais ou futuros. Levando em conta que atualmente não existe uma proposta de enquadramento específica para o ambiente foco deste estudo e, tampouco para o Canal São Gonçalo de acordo com o Relatório Anual de Qualidade Ambiental do município de Pelotas no qual ele deságua (RAMB, 2020), foram seguidas as diretrizes do art. 42 da Resolução CONAMA 357/2005, na qual estabelece que "enquanto não aprovados os respectivos enquadramentos, as águas doces serão consideradas classe 2". Neste contexto, a maioria dos parâmetros analisados e expressos na Tabela 1 se encaixaram nas determinações da classe 2, com exceção do fósforo total (Pt) e do oxigênio dissolvido (OD) que estão em desacordo com os padrões de qualidade exigidos pela legislação vigente.

Neste sentido, cabe ressaltar que concentrações inferiores a 5 mg/L de OD já podem afetar o ecossistema aquático, sendo capazes de causar a mortalidade de alguns organismos quando esses ambientes alcançam teores inferiores a 2 mg/L (Embrapa, 2020). Da mesma forma, foi verificado baixa taxa de OD no canal em estudo, com média de 1,09 mg/L, corroborando os resultados de outros autores os quais evidenciaram que este canaleta recebe direta e indiretamente esgoto sem tratamento prévio de maneira a

potencializar o aumento de microrganismos que a diminuem a taxa de oxigênio dissolvido na água (Rangel; Sanches Filhos, 2014).

O fósforo (P) é o principal fator limitante da produtividade primária nos corpos hídricos de água doce e, assim como o nitrogênio (N), constitui-se em um dos principais nutrientes para os processos metabólicos dos seres vivos (Esteves, 2011). Por isso que, uma concentração de fosfato de 0,01 mg/L é suficiente para sustentar o fitoplâncton e concentrações de 0,03 a 0,1 mg/L ou mais provavelmente promoverão o bloom de algas (WHO, 2002). Por ser nutriente essencial para processos biológicos, o excesso de fósforo ocasionado por esgotos sanitários devido principalmente à presença de detergentes superfosfatados e matéria fecal, conduz a processos de eutrofização das águas naturais, sendo assim, a concentração de fósforo na água pode determinar também o estado trófico de um corpo d'água (Esteves, 2011; Buzelli; Cunha-Santinho, 2013). O valor máximo de Pt permitido pela Resolução CONAMA 357/2005 para o enquadramento de ambientes lênticos de água doce classe 2 é de 0,030 mg/L, sendo que o valor médio encontrado para esta variável no canal de estudo foi de 1,18 mg/L. Foi verificado também por outros estudos que amostras de água coletadas nos corpos hídricos da cidade de Pelotas e no Canal São Gonçalo, apresentaram concentrações muito elevadas de Pt, demonstrando um alto grau de eutrofização. Tais estudos inferem que a deterioração desses corpos d'água são influenciadas pelo despejo inadequado de efluentes urbanos (domésticos) e industriais, que muitas vezes não recebem tratamento prévio adequado antes do descarte (Coradi et al., 2009; De Souza, 2015).

No Brasil, segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, 51,2% dos esgotos passam por algum tipo de tratamento (Brasil, 2021), sendo a outra parte do esgoto bruto, lançada sem tratamento prévio nos cursos d'água (Barreto et al., 2013). Esta eutrofização cultural (artificial ou antrópica) é atualmente a principal problemática de qualidade da água enfrentada pelos sistemas de água doce do mundo, pois as atividades humanas têm alterado as taxas de entrada, exportação e ciclagem de nutrientes (N e P), desta forma, acelerando o produtividade primária e causando efeitos ecológicos adversos, como o desequilíbrio na cadeia alimentar que resulta em altos níveis de biomassa fitoplanctônica que pode levar à proliferação de algas nocivas, com isso, aumentar a produção de carbono orgânico, que induz a respiração, e que por sua vez, causa consequência direta na redução da concentração de OD, por fim, podendo levar a mortandade de peixes e a redução da diversidade de outras espécies aquáticas (Smith; Schindler, 2009; US EPA, 2000; 2010; WHO, 2002).

3.2. Parâmetros biométricos

A Tabela 2 traz os parâmetros bióticos medidos dos 16 exemplares de Tartarugas-tigre-d'água coletadas para este estudo. Os indivíduos coletados estavam cobertos de lodo, alguns possuíam cicatrizes na carapaça e/ou plastrão, e outros larvas de ectoparasitas, principalmente ao redor do pescoço e patas, além disso, observamos uma fêmea cega do olho esquerdo.

Tabela 2 – Resultados médios, máximos e mínimos (\pm desvio padrão) de biometria de fêmeas e machos adultos de *T. dorbigni* analisados no presente estudo. As medidas são comprimento máximo e largura máxima da carapaça e do plastrão, peso e sexagem dos animais.

Parâmetros morfométricos	Total (n= 16)		Fêmeas (n= 13)		Machos (n= 3)	
	Média \pm DP	Máx-Mín	Média \pm DP	Máx-Mín	Média \pm DP	Máx-Mín
CMC (mm)	232,3 \pm 11,66	250-210	200 \pm 10	210-190	200 \pm 10	210-190
CMP (mm)	215,4 \pm 8,77	230-200	180 \pm 10	190-170	180 \pm 10	190-170
LMC (mm)	200 \pm 8,16	210-190	160 \pm 0	160-160	160 \pm 0	160-160
LMP (mm)	179,2 \pm 8,62	190-170	150 \pm 10	140-160	150 \pm 10	140-160
Peso (g)	1498,5 \pm 229,20	1880-1150	903,3 \pm 100,2	1000-800	903,3 \pm 100,2	1000-800

Observações. Comprimento máximo da carapaça (CMC); comprimento máximo do plastrão (CMP); largura máxima da carapaça (LMC) e largura máxima do plastrão (LMP).

Como já esperado, por conta do dimorfismo evidente da espécie estudada, as fêmeas mostraram uma tendência a serem mais pesadas e maiores que os machos, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa, possivelmente, por conta do reduzido número amostral. Os exemplares analisados apresentaram tanto a massa corporal quanto o comprimento máximo da carapaça semelhante aos dados biométricos encontrados na literatura com *T. dorbigni* em vida livre coletados também no Sul do Brasil, evidenciando que apesar destes animais não estarem em boas condições físicas externas, eles se encontram com boas medidas corporais (e.g. Bager, 2003; Fagundes, 2007; Bujes, 2008; Bager et al., 2010; Bossle, 2010; Silveira, 2010; Bujes et al., 2011; Silveira et al., 2012).

3.3. Parâmetros hematológicos

Os resultados hematológicos estão apresentados na Tabela 3 juntamente com um compilado dos valores encontrados para diferentes espécies do gênero *Trachemys* para efeitos de comparação. Deve-se considerar que intervalos de referência para parâmetros hematológicos ainda não foram estabelecidos para muitas espécies de tartarugas, inclusive para a espécie em questão, e mesmo quando determinados, sofrem muitas limitações por conta de múltiplos fatores que os influenciam como idade, sexo, estado reprodutivo, estresse, temperatura, sazonalidade, habitat e sua distribuição geográfica, além de técnicas de coleta e métodos de análise. Por isso que, para comparação do perfil hematológico entre espécies e trabalhos diferentes é importante descrever em detalhes os fatores e condições envolvidas (Campbell, 2006; Allender; Mitchell, 2013; Boned et al., 2015). No presente estudo, machos e fêmeas foram considerados conjuntamente, devido à diferença no número amostral (4 vezes mais fêmeas do que machos foram coletados), assim como fizeram os trabalhos com hematologia de quelônios de água doce de Stein et al. (2015) e Lopes (2016).

Tabela 3 – Dados de perfil hematológico de diferentes espécies do gênero *Trachemys*.

Parâmetros/Espécies	VALORES HEMATOLÓGICOS					
	<i>T. dorbigni</i>	<i>T. dorbigni</i>	<i>T. dorbigni</i> e <i>T. scripta</i> <i>elegans</i>	<i>T. scripta</i> <i>elegans</i>	<i>T. scripta</i> <i>elegans</i>	<i>T. callirostris</i>
CTE (x106/μL)	0,47	0,43 e 0,387	**	5,3 e 4,8	**	0,79 e 0,99
Hct (%)	19,63	18,79 e 18,36	22,68 e 23,54	18 e 18	**	25,08 e 32,60
Hb (g/dL)	5,3	4,4 e 3,65	7,57 e 7,85	7,1 e 7,2	**	5,20 e 3,80
VCM (fL)	428,99	442,86 e 487,81	41,73 e 39,89	NA	458,3 e 431,1	321 e 330,28
CHCM (%)	26,34	23,69 e 19,99	**	NA	**	21,20 e 13,20
Lt (μL)	8250	4392,86 e 5071,43	**	13,833 e 9,708	**	**
Heterófilos (%)	31	12,85 e 15,92	NA	42 e 39	50,2 e 34,2	29,80 e 30
Eosinófilos (%)	43	41,14 e 43,92	NA	37 e 39	12 e 11,5	18,50 e 29
Basófilos (%)	9	29 e 23,64	NA	4 e 4	27 e 36,8	3,30 e 3,34

Linfócitos (%)	10	10,71 e 10,57	NA	10 e 11	9 e 12,8	33,90 e 27,60
Monócitos (%)	6	6,28 e 5,92	NA	9 e 9	3,2 e 4,2	14,50 e 10,06
Especificações	Canal urbano antropizado por efluentes domésticos	Verão e inverno (animais de vida livre)	Cativeiro	Seio venoso supraoccipital e veia coccígea dorsal	Verão e inverno (Cativeiro)	<i>In situ e Ex situ</i>
Referências	Autores, 2023	Stein et al., 2014	Gradela et al., 2017	Medeiros et al., 2012	Hernandez et al., 2017	Carrascal Velásquez et al., 2014

Observações. CTE: contagem total de eritrócitos; Hct: hematócrito; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; Lt: Leucócitos totais.

NA: não disponível.

**unidade de medida diferente.

Em quelônios, a avaliação eritrócitos (série vermelha) pode ser interpretada como um índice comparativo da condição de transporte de oxigênio, nutrição ou de saúde de modo geral (Campbell, 2004). A média da contagem total de eritrócitos (CTE) dos indivíduos adultos de *T. dorbigni* aqui analisados foi de $0,47 \times 10^6/\mu\text{L}$, dado semelhante ao trabalho de Stein et al. (2015) com a mesma espécie capturada em um lago artificial em diferentes estações do ano, sendo de $0,43 \times 10^6/\mu\text{L}$ no verão e de $0,387 \times 10^6/\mu\text{L}$ no inverno. Valores parecidos também foram encontrados por Carrascal Velásquez et al. (2014) que analisou indivíduos de *T. callirostris* (Tartaruga deslizante Colombiana) em condições *in situ* ($0,79 \times 10^6/\mu\text{L}$) e *ex situ* ($0,99 \times 10^6/\mu\text{L}$). Mas que difere dos valores de CTE encontrados no estudo de Medeiros et al. (2012) utilizando indivíduos de *T. dorbigni* com o sangue coletados em diferentes vias de punção, tendo média de $5,3 \times 10^6/\mu\text{L}$ via seio venoso supraoccipital e $4,8 \times 10^6/\mu\text{L}$ via veia coccígea dorsal, dessa forma, reforçando que diferentes vias de coleta sanguínea podem expressar resultados diferentes, reiterando que a via de punção coletada neste trabalho, foi a veia subcarapacial.

O valor de referência do hematócrito de répteis varia entre 20 e 40%, sendo que valores inferiores a 20% podem ser um indicativo de anemia e, quando superiores a 40%, podem representar diminuição na quantidade do plasma (hemoconcentração) e/ou aumento da massa eritrocitária (policitemia) (Campbell, 2006). O Hct dos animais coletados para este estudo foi de 19,63%, estando no limite inferior daquilo que é

considerado referência. Esses resultados são corroborados pelos observados por Stein et al. (2015) para *T. dorbigni* capturadas em um lago artificial em área urbana no Sul do Brasil nas estações do verão e inverno, tendo respectivamente a média de 18,79% e 18,36%; os autores deste trabalho, afirmam também que não é possível determinar se os animais estudados estavam anêmicos, pois os parâmetros hematológicos são influenciados por grandes variações e ainda não foi determinado o intervalo de referência para a espécie. Por outro lado, o valor de hematócrito encontrado em nosso trabalho foi inferior aos analisados por Gradela et al. (2017) em espécies de *Trachemys* spp. criadas em cativeiro, na qual foram vistos Hct de 22,68% para *T. dorbigni* e de 23,54% para *T. scripta elegans*; inferior também ao observado por Carrascal Velásquez et al. (2014) com indivíduos de *T. callirostris*, determinado Hct de 25,08% *in situ* e 32,60% *ex situ*, e esses valores maiores que os nossos foram considerados dentro dos determinados para referência, indicando ausência de hemoconcentração ou anemia.

O valor encontrado para a concentração média de hemoglobina (Hb) de exemplares adultos de *T. dorbigni* analisados foi de 5,3 g/dL, estando também um pouco abaixo da média determinada para maioria dos répteis clinicamente saudáveis, que apresentam Hb na faixa de 5,5-12 g/dL (Stacy et al., 2011). O valor médio deste estudo foi semelhante aos valores encontrados por Stein et al. (2015) para a mesma espécie coletada no verão (4,4 g/dL) e inverno (3,65 g/dL) e ao encontrado por Carrascal Velásquez et al. (2014) para *T. callirostris* (4 g/dL). Mas, nosso dado é inferior aos encontrados por Gradela et al. (2017) para *T. scripta elegans* (Tartaruga-de-Orelhas-Vermelhas) (7,85 g/dL) e *T. dorbigni* (7,57 g/dL), e por Medeiros et al. (2012) com *T. scripta elegans* (7,1g/dL - seio venoso supraoccipital e 7,2 g/dL - veia coccígea dorsal). E tais discrepâncias na concentração de hemoglobina variaram de acordo com a espécie, mas também podem ocorrer devido ao esforço físico excessivo, condições de estresse, estágio reprodutivo e variações sazonais (Ferrarezi, 2006).

O volume corpuscular médio (VCM) representa o tamanho médio dos eritrócitos, no presente estudo foi encontrado um valor de 428,99 fL, sendo muito parecido com os valores mostrados por Stein et al. (2015) com indivíduos de *T. dorbigni*, sendo um valor de 442,86 fL no verão e de 487,81 fL no inverno; e por Hernandez et al., 2017 com *T. scripta elegans*, onde encontrou um VCM de 458,3 fL e 431,1 fL respectivamente nas estações do verão e inverno também. Porém, no trabalho de Gradela et al. (2017) foram relatados valores baixíssimos de VCM para *T. dorbigni* (41,73 fL) e *T. scripta elegans* (39,89 fL) em cativeiro, estes autores afirma que estes resultados já eram esperados, visto

que observaram valores menores para CTE e maiores para Hct em seu trabalho. Além do mais, essa diferença significativa dos valores de VCM do nosso trabalho com o do Gradela et al. (2017) pode ter ocorrido por conta dos distintos ambientes que esses animais estavam inseridos, que sofre muitas variações por conta da temperatura, dieta, estresses entre outros, e tudo isso, podendo afetar direta ou indiretamente os resultados do VCM de tartarugas. E sobre o outro índice hematimétrico analisado, a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), designa o índice médio da porcentagem de hemoglobina por hemácia (em %) e possui uma variação de 22% a 41% para répteis (Campbell, 2006; Silva, 2011), sendo encontrada no presente estudo uma porcentagem de 26,34%, parecido com o de *T. dorbigni* com variação sazonal (Stein et al., 2015); inferiores aos valores médios de *T. dorbigni* e *T. scripta elegans* (Gradela et al., 2017); e superiores aos de *T. callirostris* (Carrascal Velásquez et al., 2014) (ver Tabela 3).

A verificação de proteínas plasmáticas totais (PPT) fornece informações sobre a situação do estado nutricional dos indivíduos, no qual, níveis baixos podem estar associados à má nutrição, mas outros fatores também devem ser considerados, como distúrbios do metabolismo (Morselli et al., 2016; Tavares-Dias et al., 2009). A concentração média de PPT de todos os indivíduos foi de 4,05 g/dL e mostrou semelhança ao valor relatado por Rossini et al. (2012) com a Tartaruga da Amazônia (*Podocnemis expansa*) (4,2 g/dL). Porém, valores superiores foram relatados por Medeiros et al. (2012) utilizando duas vias de punção diferentes com a espécie *T. scripta elegans*; por Morselli et al. (2016) com *P. expansa*, por Pessoa (2015) com indivíduos de Cágado-de-barbicha (*Phrynops geoffroanus*) negativos e positivos para hemogregarina (parasitas sanguíneos) e também ao valor encontrado por Pires et al. (2006) com *Caretta caretta* utilizando a mesma técnica para análise que em nosso trabalho, a refratometria. De maneira geral, todos estes estudos supracitados apresentaram valores baixos de PPT, indicativo de hipoproteïnemia, que comumente está associada com desnutrição, mas também pode estar relacionada com uma absorção ou digestão deficiente, parasitismo, perda de sangue intensa ou doenças hepáticas e renais crônicas (Campbell, 2006), sendo que com os exemplares aqui estudados, apresentaram ocorrência de ectoparasitas.

Enquanto a análise da série vermelha diz sobre a condição fisiológica de demanda e distribuição de oxigênio (mais energética), a séria branca diz respeito à condição imunológica dos animais (Allender; Mitchell, 2013). A média da contagem de leucócitos totais no presente estudo foi de 8250 μ l (\pm 2625), estando muito superior aos valores encontrado na literatura por Stein et al. (2015) utilizando a mesma espécie coletadas no

verão e inverno; porém com valores semelhantes aos encontrados por Medeiros et al. (2012) em um criadouro comercial utilizando a espécie *T. scripta elegans* com amostras coletadas em diferentes punções (ver Tabela 3). Sendo que, um quadro de leucocitose pode estar relacionado a processos inflamatórios e neoplásicos, desnutrição e situação de estresse (Campbell 2004).

A contagem diferencial dos leucócitos permite identificar a variedade de glóbulos brancos e estabelecer suas proporções relativas na ativação do sistema imune (Silva, 2011). A ordem encontrada de predominância numérica dos leucócitos foi a seguinte: eosinófilos (43%), heterófilos (31%), linfócitos (10%), basófilos (9%) e monócitos (6%). Corroborando com o trabalho de Stein et al. (2015) analisando a mesma espécie, onde os eosinófilos foram os mais abundantes e os monócitos menos. Para além disso, foi observado por Pires et al. (2009) que a contagem relativa e absoluta de eosinófilos apresentaram um número mais elevado em tartarugas cabeçudas de vida livre do que as em cativeiro, isso se vale, pelo fato dos animais de vida livre possuírem um estímulo parasitário maior para a produção de eosinófilos, vale ressaltar que, a maioria dos indivíduos de *T. dorbigni* analisados no presente estudo apresentavam ocorrência de larvas de ectoparasitas, confirmando portanto, a contagem elevada de eosinófilos, pois, de acordo com Pitol et al. (2007), o aumento deste tipo celular está relacionado a casos de parasitismo, já que uma das suas principais funções é participar da defesa contra infecções parasitárias.

Geralmente os valores mostrados na literatura para a contagem diferencial de leucócitos são bastante discordantes, isso se vale, em parte pela dificuldade de classificação dos leucócitos, pois possuem morfologia variável entre os répteis em geral, e também pelo fato de sofrerem alterações de fatores intrínsecos e extrínsecos (De Deus Santos et al., 2009; Pires et al., 2009). Além disso, os Testudines apresentam uma importante adaptabilidade a diferentes ambientes e essas características podem ser atribuídas às diferenças na contagem de leucócitos observadas dentro da mesma espécie e também para espécies diferentes. E por conta disso, que essas variações na contagem de leucócitos representa uma limitação nas comparações entre quelônios (Rossini et al., 2012).

3.4. Ensaio do micronúcleo e outras anormalidades nucleares eritrocíticas

O ensaio para a observação da presença de eritrócitos com micronúcleo e outras alterações eritrocitárias é um método simples e eficiente que tem a capacidade de fornecer

evidências do potencial genotóxico de poluentes em ambientes degradados, pois permite medir danos cromossômicos (Fenech, 2000; Josende et al., 2014). A Figura 1 mostra as diferentes anomalias nucleares encontradas no presente estudo: micronúcleos (MN), núcleos lobulados (“*lobed*”); núcleos entalhados (“*notched*”) e núcleos bolhosos (“*blebbed*”), além de células binucleadas, cujas frequências estão dispostas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Assim como os resultados hematológicos, os dados de MNs, expressos por média e desvio padrão, foram comparados com resultados disponíveis na literatura para diferentes espécies de quelônios (ver Tabela 4).

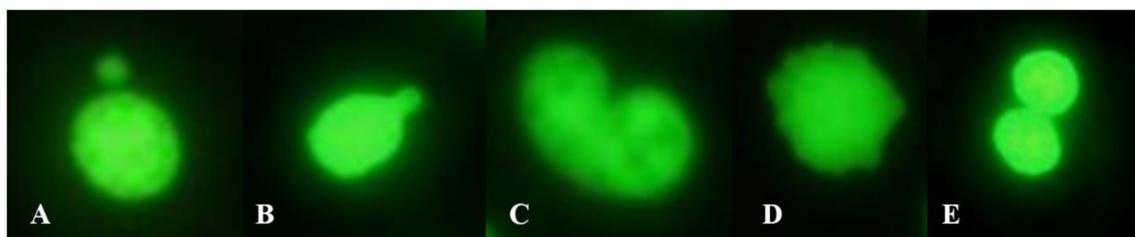


Figura 1 – Fotomicrografias de anormalidades nucleares eritrocitárias de *T. dorbigni* corados com laranja de acridina. (A) MN; (B) *Lobed*; (C) *Notched*; (D) *Blebbed*; (E) Binucleada.

O surgimento de MN representa estágios finais de danos genéticos, sendo resultante da perda cromossômica pela eliminação do DNA excedente do núcleo durante a divisão do ciclo celular (Crott; Fenech, 2001; Fenech, 2000). No presente estudo, foi relatada baixa indução de formação de MN nos indivíduos analisados, tendo frequência em torno de 0,12%, com média e desvio padrão de $0,38 \pm 0,6$, inferior ao encontrado em outros estudos. Borges et al. (2022) relataram que a baixa incidência de MN pode indicar uma condição normal de reparo do ciclo celular e de replicação do material genético, por isso, uma frequência baixa pode ser considerada valores basais e normais.

Tabela 4 – Resultados de teste de micronúcleo do presente estudo e de outros realizados com espécies de quelônios adultos. Dados de micronúcleos expressos por média e desvio padrão (DP).

Espécies	Local de coleta	N amostral	Médias \pm DP	Referências
<i>T. dorbigni</i>	Canal urbano	16	$0,38 \pm 0,60$	Presente estudo

<i>T. callirostris</i>	Dois ambientes urbanos	49 e 24	8,04 ± 7,08 e 12,19 ± 12,94	Zapata et al., 2016
<i>Phrynops hilarii</i>	Sítio Agroflorestal e urbano	6 e 6	3,33 ± 0,62 e 2,00 ± 0,36	Castanõ et al., 2020
<i>Podocnemis unifilis</i>	Áreas de proteção ambiental na Amazônia	6 e 34	1,47 ± 0,74 e 1,44 ± 0,59	Borges et al., 2022
<i>C. caretta</i>	Mar Mediterrâneo	61	15,82 ± 15,16	Casini et al. 2018
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Pacífico Colombiano	55	0,6 ± 0,6	Quiroz Herrera; Baena, 2017

Apesar da ausência de níveis significativos de MN neste estudo, detectamos maior incidência de alterações morfológicas nos eritrócitos de *T. dorbigni*, apresentando uma frequência total de 75.42%, sugerindo assim, a ocorrência de falhas nos estágios iniciais dos processos de divisão celular dos indivíduos analisados.

Tabela 5 – Média, desvio padrão e frequência de anormalidades nucleares eritrocíticas de indivíduos adultos de *T. dorbigni* em vida livre analisados no presente estudo.

Animais	Lobed	Notched	Blebbed	Binucleados
1	9	59	219	6
2	3	12	138	4
3	9	36	188	5
4	3	73	249	1
5	2	22	289	3
6	1	13	251	2
7	12	25	362	0
8	0	20	257	3
9	2	6	77	1
10	19	30	227	4
11	44	28	277	7
12	2	5	47	0

13	0	7	58	0
14	4	9	91	0
15	0	36	180	3
16	6	22	152	1
Total de anomalias	116	403	3062	40
Média ± DP	7.25 ± 11.09	25.19 ± 19.03	191.38 ± 91.48	2.5 ± 2.25
% Anomalias*	2.41%	8.39 %	63.79 %	0.83 %

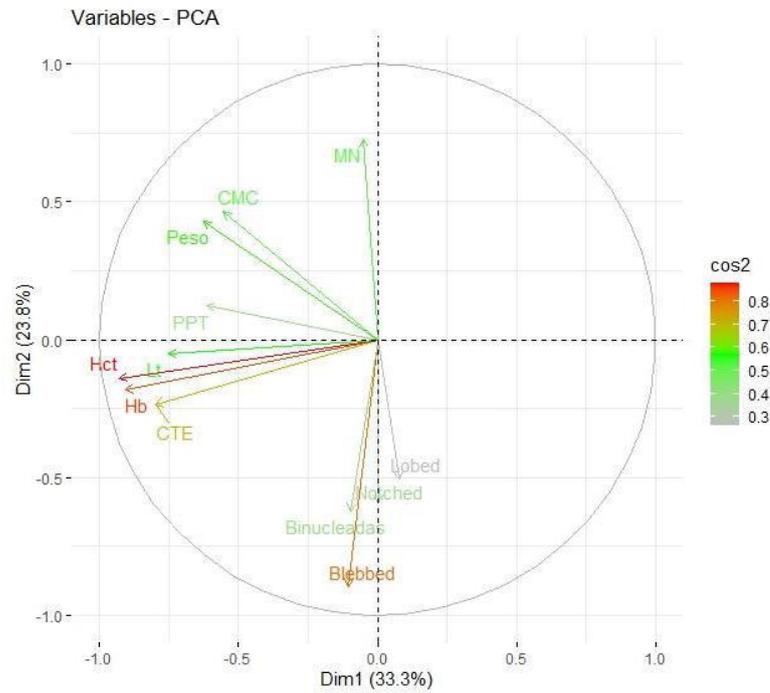
* Frequência de anormalidades eritrocitárias.

Dentre as ANEs observadas, núcleos tipo “blebbed” foi a anormalidade encontrada com maior frequência (63,79%), lembrando que estes são os núcleos com pequenas evaginações da membrana nuclear que lembram bolhas, as quais parecem conter eucromatina ou heterocromatina (Anbumani; Mohankumar, 2011). E podem ser considerados precursores de MNs e de fenômenos de binucleação (Mesak et al., 2019). Todavia, é importante salientar, que ainda não há consenso sobre os tipos de irregularidades na morfologia nuclear que podem ser consideradas análogas aos micronúcleos (Azevedo; Braga; Ribeiro, 2012). Tem sido sugerido que complicações na separação de cromossomos emaranhados ou ligados podem induzir núcleos “lobed” e “blebbed” ao mesmo tempo que ocorre perda do material genético amplificado do núcleo durante o ciclo celular (Shimizu et al. 1998; Çavaş, 2008; Fenech et al. 2011). A ocorrência de núcleos “notched” também tem sido atribuída à presença de substâncias capazes de induzir citotoxicidade, sendo importante quantificar esse tipo de anormalidade (Bolognesi; Hayashi 2011). Corredor-Santamaría et al. (2016), relatou uma maior incidência de eritrócitos binucleados em um ponto que recebe esgoto doméstico sem tratamento; Ferraro et al. (2004) sugeriu que esse tipo de anormalidade nuclear, assim como *notched*, são manifestadas a partir dos efeitos dos xenobióticos.

Vale ressaltar que, embora o número de indivíduos analisados possa ser considerado baixo, esses animais foram encontrados em liberdade, naturalmente expostos às condições dos ambientes em que habitam (Castaño et al., 2020). Além do mais, essa espécie possui uma dieta onívora oportunista, podendo estar no topo da cadeia alimentar e com capacidade de bioacumular diferentes substâncias e muitos contaminantes, mesmo em baixas concentrações, podem colocar em risco a fisiologia e sobrevivência de espécies expostas (Grisolia et al., 2009; Silveira, 2015). Dessa forma, a reduzida frequência das

anomalias nucleares não significa ausência de efeitos genotóxicos no despejo de efluentes domésticos, pois o esgoto pode ainda sim indicar um risco genotóxico, mesmo que seja em proporção menor que outros contaminantes (Grisolia et al., 2001).

A



B

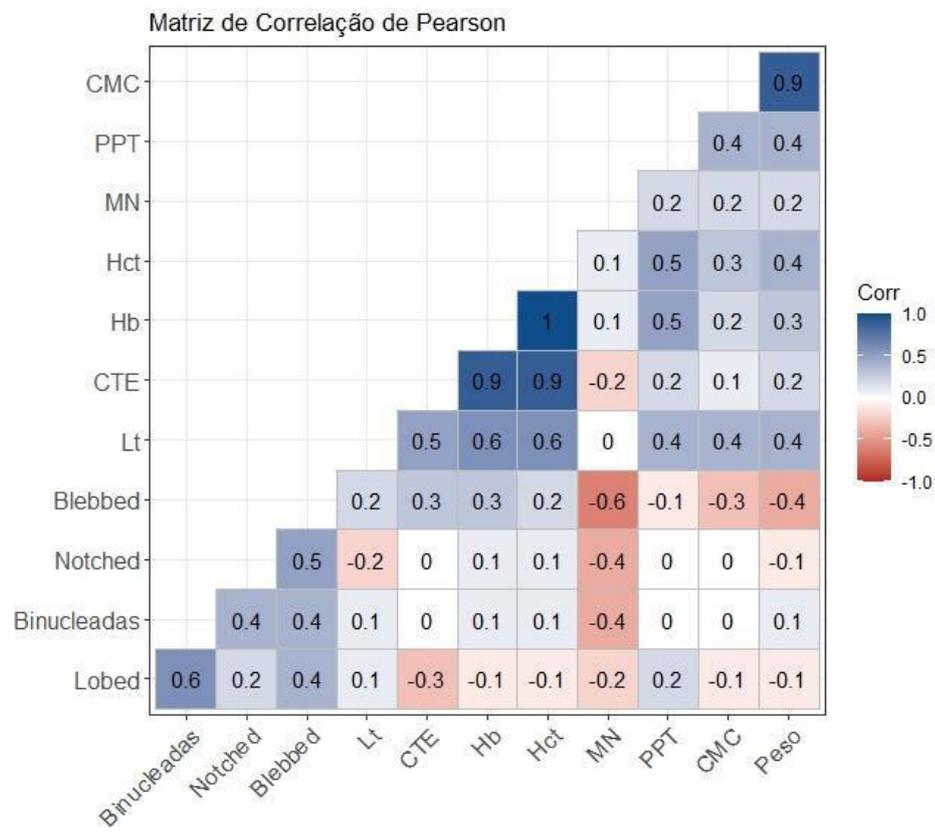


Figura 2 – Análise de Componentes Principais (PCA) baseada na matriz de correlação

Observações. **A:** PCA e **B:** Matriz de correlação.

Variáveis: comprimento máximo da carapaça (CMC); contagem total de eritrócitos (CTE); Hemoglobina (Hb); Hematócrito (Hct); Leucócitos totais (Lt); proteínas plasmáticas totais (PPT); eritrócitos micronucleados (MN).

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada a fim de visualizarmos graficamente a ordenação de possíveis similaridades dos parâmetros biométricos (CMC e Peso), hematológicos (CTE, Hb, Hct, Lt e PPT) e genotóxicos (MN, *lobed*, *notched*, *blebbed* e binucleadas). Verificamos que os eixos PC1 e PC2 sumarizam 57,10% da variação total dos resultados, sendo que o PC1 contribui com 33,3% e o PC2 com 23,8%. As variáveis Hct, Hb e *Blebbed* que estão bem posicionadas próximas à circunferência do círculo de correlação, têm \cos^2 muito alto, o que implica em uma boa qualidade de representação nos primeiros componentes, portanto, responsáveis pela maior explicação das variâncias encontradas.

Os resultados da PCA aplicada para os parâmetros genotóxicos mensurados em *T. dorbigni* mostraram que não houve relações significativas com os parâmetros morfométricos (tamanho e peso dos indivíduos), apesar de, em tartarugas, as dimensões corporais serem um importante fator associado às respostas biológicas, pois está relacionado à idade e, possivelmente, ao tempo de exposição a substâncias tóxicas (Schneider et al. 2011). Dados semelhantes foram relatados com outras espécies de quelônios, nos quais também não foram encontradas relações entre peso e frequência de MN (e.g. Boned et al., 2015; Zapata et al., 2016; Quiroz Herrera e Baena, 2017). Essa falta de correlação ainda não é bem esclarecida, embora se saiba que alterações na estrutura e composição nuclear são altamente relevantes para o desenvolvimento normal e diferentes funções fisiológicas, podendo contribuir para o aparecimento de inúmeras doenças (Van der oost et al., 2003; Zwerger et al., 2011). Além disso, Quiroz Herrera e Baena (2017) relatam que alterações nos eritrócitos podem afetar as medidas morfométricas nas fases iniciais do crescimento e por isso, que teve uma ausência de correlação nos indivíduos estudados, que pode ter ocorrido pelo fato de que os exemplares eram todos adultos, ou seja, já totalmente desenvolvidos; o mesmo pode ter acontecido em nosso trabalho, na qual utilizamos indivíduos adultos de *T. dorbigni*.

Ainda em relação às anormalidades, foi verificado também uma ligeira correlação negativa entre *blebbed* e MN ($r = -0.6$), isso de fato pode ter ocorrido porque *blebbed* foi

o tipo de alterações eritrocíticas com maior frequência (63.79 %) e MN com menor frequência (0.12%), sendo que, alterações do tipo *blebbed* pode ser mais evidente em estágio iniciais de genotoxicidade (Crott e Fenech, 2001) e também ser precursores de eritrócitos micronucleados (Mesak et al., 2019).

Os parâmetros derivados da série vermelha (CTE, Hb e Hct) foram evidenciados pela forte correlação positiva ($r= 0.9$), corroborando os achados de Gradela et al. (2017) os quais observaram uma máxima correlação entre Hb e Hct nas espécies *T. dorbigni* e *T. scripta elegans* e CTE ligeiramente correlacionado com Hct em somente *T. dorbigni*. Já os resultados da PCA dos biomarcadores hematológicos em relação às variáveis biométricas, foram relativamente correlacionados, porém não significativos, assim como observado por Gradela et al. (2017) com espécies do gênero *Trachemys* e com Morselli et al. (2016) com *P. expansa* em criatório, que não identificaram correlação significativa entre os parâmetros corporais e hematológicos, indicando que os animais apresentam estado de saúde relevante, independentemente da massa corporal.

A forte correlação positiva ($r= 0,9$) entre a massa corporal e o comprimento máximo da carapaça (Peso e MCL) corrobora estudos usando outras espécies de tartarugas (Omonona et al., 2011; Gradela et al., 2017; de Mello e Alvarez, 2020), indicando um desenvolvimento harmônico do corpo dos exemplares amostrados.

4. Conclusão

Os resultados encontrados no presente estudo para os valores biométricos, hematológicos e genotóxicos fornecem informações valiosas para monitorar o estado de saúde de indivíduos selvagens de *T. dorbigni*, representando informações incipientes e essenciais para a sugestão de medidas de conservação desta espécie de quelônios, bem como, para propor sua utilização como espécie bioindicadora para avaliar o monitoramento da qualidade dos ecossistemas antropizados.

Quanto ao perfil hematológico, são sugestivos a ocorrência de alterações, mas não são suficientes para conclusão de diagnóstico, como por exemplo, não é possível confirmamos que nossas espécimes estavam anêmicas, mas em relação a diferenciação leucocitária, a eosinofilia foi evidente, caracterizando que os indivíduos analisados estavam sofrendo por algum tipo de infecção parasitária, sendo que é necessário mais estudos para comprovação e para determinar quais ectoparasitas estavam acometendo esses animais. Portanto, se faz necessário fomentar mais estudos nesse sentido, visto que,

os relatos sobre os valores hematológicos para *T. dorbigni* tanto em vida livre quanto em cativeiro são limitados.

Quanto aos eventos genotóxicos, este estudo representa possivelmente o primeiro no Brasil a investigar a incidência de micronúcleos e outras anomalias eritrocitárias em *T. dorbigni*, portanto faz-se necessário a produção de mais trabalhos na área para que os padrões encontrados neste estudo sejam elucidados com mais clareza, visto que, a frequência de MN foi basal, mas a frequência de outras alterações eritrocíticas foi mais evidente, indicando que os indivíduos analisados estão sofrendo danos cromossômicos em estágio inicial em decorrência dos efluentes domésticos.

5. Agradecimentos

Este estudo contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. DL e CMGM agradecem o apoio financeiro do CNPq (bolsa de produtividade PQ 310651/2017-4 e PQ 312898/2020-7, respectivamente).

6. Referências

- Allender, M. C., & Mitchell, M. A. (2013). Hematologic response to experimental infections of frog virus 3-like virus in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 23(1-2), 25-31.
- Alvim, T.T., dos R. Martinez, C.B., 2019. Genotoxic and oxidative damage in the freshwater teleost *Prochilodus lineatus* exposed to the insecticides lambda-cyhalothrin and imidacloprid alone and in combination. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 842, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.11.011>.
- Anbumani, S., & Mohankumar, M. N. (2011). Nuclear and cytoplasmic abnormalities in the fish *Catla catla* (Hamilton) exposed to chemicals and ionizing radiation. *Research Journal of Environmental Sciences*, 5(12), 867-877.
- Arizza, V., Russo, D., Marrone, F., Sacco, F., & Arculeo, M. (2014). Morphological characterization of the blood cells in the endangered Sicilian endemic pond turtle, *Emys trinacris* (Testudines: Emydidae). *Italian Journal of Zoology*, 81(3), 344-353.
- Ayllon, F., & Garcia-Vazquez, E. (2001). Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(3), 221-225.

- Azevedo, J. D. S., Braga, E. D. S., & Ribeiro, C. A. O. (2012). Nuclear abnormalities in erythrocytes and morphometric indexes in the catfish *Cathorops spixii* (Ariidae) from different sites on the southeastern Brazilian coast. *Brazilian Journal of Oceanography*, 60, 323-330.
- Bager, A. Aspectos da biologia e ecologia da Tartaruga Tigre D'Água, *Trachemys dorbignyi*, (Testudines-Emydidae) no extremo sul do Estado do Rio Grande do Sul-Brasil. 2003. 110f. Tese (Pós-graduação em Ecologia). Departamento de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2003.
- Bager, A., De Freitas, T. R., & Krause, L. (2007). Nesting ecology of a population of *Trachemys dorbignyi* (Emydidae) in southern Brazil. *Herpetologica*, 63(1), 56-65.
- Barreto, L., Barros, F., Bonomo, P., Rocha, F., & Amorim, J. (2013). Eutrofização em rios brasileiros. *Enciclopédia biosfera*, 9(16).
- Bolognesi, C., & Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205-213.
- Boned, M. J., López González, E. C., Latorre, M. A., Poletta, G. L., & Siroski, P. A. (2011). Determinación del valor basal de micronúcleos (MN) en la tortuga de laguna (*Phrynops hilarii*). *J. Basic Appl. Genet*, 40, 91.
- Borges, Â. O., Erickson, J., Silva, L. A. D., Fantin, C., & Domingos-Moreira, F. X. (2022). Mercury bioaccumulation, genotoxic and biochemical biomarkers reveal the health status of yellow-spotted Amazon River turtles (*Podocnemis unifilis*) in an environmental protection area in the Amazon. *Acta Amazonica*, 52, 254-263.
- Bossle, C. M. B. 2010. Caracterização demográfica da tartaruga tigre d'água *Trachemys dorbignyi* (Testudines: Emydidae) em um ambiente urbano de Porto Alegre, RS, Brasil. Dissertação (Pós-graduação em biologia). Universidade do Vale Rio dos Sinos. São Leopoldo, 2010.
- Brandão, C. J., Botelho, M. J. C., & Sato, M. I. Z. (2018). Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 2005.
- Brasil. Ministério do Desenvolvimento Regional. Secretaria Nacional de Saneamento – SNS. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – Visão geral, ano de referência, 2021. Brasília: SNS/MDR, 92 p, 2021.

- Brasil. Ministério do Meio Ambiente (2022) Lista oficial da fauna brasileira ameaçada de extinção. Portaria MMA N° 148, de 7 de junho de 2022, Anexo II. Diário Oficial da União 108, de 08 de junho de 2022, Seção 1, página 74.
- Bujes, C. S. 2008. Biologia e conservação de quelônios no delta do Rio Jacuí – RS: aspectos da história natural de espécies em ambientes alterados pelo homem. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p 255, 2008.
- Bujes, C. S., Molina, F. B., & Verrastro, L. (2011). Population characteristics of *Trachemys dorbigni* (Testudines, Emydidae) from delta do Jacuí state Park, Rio Grande do Sul, southern Brazil. south american Journal of herpetology, 6(1), 27-34.
- Buss, D. F., Baptista, D. F., & Nessimian, J. L. (2003). Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. Cadernos de Saúde Pública, 19, 465-473.
- Buzelli, G. M., & Cunha-Santino, M. B. D. (2013). Análise e diagnóstico da qualidade da água e estado trófico do reservatório de Barra Bonita, SP. Revista Ambiente & Água, 8, 186-205.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., & Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Science of the total environment, 247(2-3), 295-311.
- Campbell, T. W. Clinical pathology in reptiles. Reptile medicine and surgery, p. 453-470, 2006.
- Campbell, T. W; ACVP; ASVCP. Hematology of Lower Vertebrates. In: 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP). International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. p. 1104-1108, 2004.
- Carrascal Velásquez, J., Negrete Cartagena, H., Rojano Bolaño, C., Álvarez Otero, G., Chacón Pacheco, J., & Linares Arias, J. (2014). Caracterización hematológica de hicotetas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. Revista de Medicina Veterinaria, (28), 43-55.
- Carrasco, K.R.; Tilbury, K.L.; Myers, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 47: 2123–2136.

- Casini, S.; Caliani, I.; Giannetti, M.; Marsili, L.; Maltese, S.; Coppola, D.; et al. 2018. First ecotoxicological assessment of *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) in the Mediterranean Sea using an integrated nondestructive protocol. *Science of the Total Environment*, 631–632: 1221–1233.
- Castaño, G. V., Cabagna Zenklusen, M., Prieto, Y., & Manzano, A. S. (2020). Análisis de genotoxicidad en eritrocitos de tortugas (*Phrynops hilarii*) de sitios antropizados y naturales de Entre Ríos, Argentina. *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 31(1), 15-22.
- Çavaş, T. (2008). In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 352-358.
- Çavaş, T., & Ergene-Gözükara, S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic toxicology*, 74(3), 264-271.
- Chaffin, K., Norton, T. M., Gilardi, K., Poppenga, R., Jensen, J. B., Moler, P., ... & Mazet, J. (2008). Health assessment of free-ranging alligator snapping turtles (*Macrochelys temminckii*) in Georgia and Florida. *Journal of wildlife diseases*, 44(3), 670-686.
- Chorus, I & Bartram, J. (1999). Water Resources. In: Chorus, I & Bartram, J. (Eds). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, Inc. New York, Chap. 1: 02-05.
- Coradi, P. C., Pereira-Ramirez, O., & Fia, R. (2009). Avaliação da qualidade da água superficial dos cursos de água do município de Pelotas-RS, Brasil. *Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 4(2), 46-56.
- Corredor-Santamaría, W., Serrano Gómez, M., & Velasco-Santamaría, Y. M. (2016). Using genotoxic and haematological biomarkers as an evidence of environmental contamination in the Ocoa River native fish, Villavicencio—Meta, Colombia. *SpringerPlus*, 5(1), 1-10.
- Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M., & Espindola, E. L (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química nova*, 31, 1820-1830.
- Croteau, M. C., Hogan, N., Gibson, J. C., Lean, D., & Trudeau, V. L. (2008). Toxicological threats to amphibians and reptiles in urban environments. *Urban Herpetology*, 197-209.
- Crott, J.; Fenech, M. 2001. Preliminary study of the genotoxic potential of homocysteine in human lymphocytes in vitro. *Mutagenesis*, 16: 213–217.

- De Deus Santos, MR, Ferreira, LS, Batistote, C., Grossman, A., & Bellini, C. (2009). Valores hematológicos de tartarugas marinhas *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) juvenis selvagens do Arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia*, 46 (6), 491-499.
- De Lemos, C. T., Rödel, P. M., Terra, N. R., de Oliveira, N. C. D. A., & Erdtmann, B. (2007). River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(3), 391-401.
- De Mello, D. M., & Alvarez, M. C. (2020). Health assessment of juvenile *green turtles* in southern São Paulo State, Brazil: A hematologic approach. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(1), 25-35.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/meio-ambiente/projetos/ecoagua/eco/oxigdiss.html>> Acesso: 04 de agosto de 2020.
- Esteves, F. D. A. (2011). *Fundamentos de Limnologia*. 3ª edição. Interciência, Rio de Janeiro, 790.
- World Health Organization. European Commission. *Eutrophication and health* Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002 — 28 pp. ISBN 92-894-4413-4
- Fagundes, C. K. (2007). Dinâmica populacional de *Trachemys dorbigni*, (Testudines: Emydidae) em ambiente antrópico em Pelotas, RS.
- Fagundes, C. K., Bager, A., & Cechin, S. T. Z. (2010). *Trachemys dorbigni* in an anthropic environment in southern Brazil: I) Sexual size dimorphism and population estimates. *The Herpetological Journal*, 20(3), 185-193.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., ... & Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125-132.
- Fernando, R., Ferrari, L., & Salibián, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*, 59(4), 577-583.
- Ferrezezi, A. L. Estudos estruturais e funcionais das hemoglobinas de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812). 2006. 137f. Tese (Mestrado em Biologia Animal) -

- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, São José do rio Preto, São Paulo, 2006.
- Ferraro, M. V. M., Fenocchio, A. S., Mantovani, M. S., Ribeiro, C. D. O., & Cestari, M. M. (2004). Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 103-107.
- Fleeger, J. W., Carman, K. R., & Nisbet, R. M. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the total environment*, 317(1-3), 207-233.
- Fornari, M. R., & Camotti-Bastos, M., Medeiros-Silveira, F., Vargas, J. P-R., Fernandes, G., Santos, M. A. S., & Santos, D. R. (2018). Efluentes urbanos na água do Rio Marau (Brasil). *Qualidade da água no Rio Marau. Bitácora Urbano Territorial*, 28(3), 121-130.
- Freire, M. M., Santos, V. G., Ginuino, I. S. F., & Arias, A. R. L. (2008). Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. *Oecologia brasiliensis*, 12(3), 2.
- Gloterman, H. L., Clymo, R. S., & Ohnstad, M. A. M. (1978). Methods for physical and chemical analysis of fresh water. *IBP Handbook*, (8).
- Gradela, A., Souza, V. N., Queiroz, M. M. D., Constantino, A. D. C., Bandeira, C. G., Faria, M. D. D., ... & Corrêa, F. M. (2017). Biometria corporal e parâmetros hematológicos de *Trachemys scripta elegans* e *Trachemys dorbignyi* (Testudines: Emydidae) criadas em cativeiro em Petrolina, Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37, 83-90.
- Grillitsch, B., & Schiesari, L. (2010). 12 The Ecotoxicology of Metals in Reptiles. In *Ecotoxicology of amphibians and reptiles* (pp. 337-448). CRC Press New York.
- Grisolia, C. K., & Starling, F. L. (2001). Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 491(1-2), 39-44.
- Grisolia, C. K., Rivero, C. L., Starling, F. L., da Silva, I. C., Barbosa, A. C., & Dorea, J. G. (2009). Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 138-143.
- Hidalgo-Vila, J., Díaz-Paniagua, C., Pérez-Santigosa, N., Plaza, A., Camacho, I., & Recio, F. (2007). Hematologic and biochemical reference intervals of free-living Mediterranean pond turtles (*Mauremys leprosa*). *Journal of wildlife diseases*, 43(4), 798-801.

- Jain, N. C. (1986). Hematologic Techniques. In: N. C. Jain (Ed.), Schalm's Veterinary Hematology, (2nd ed., pp. 20-86). Philadelphia: Wiley-Blackwell.
- Jenkins-Perez, J. (2012). Hematologic evaluation of reptiles: a diagnostic mainstay. *Veterinary technician*, 33(8).
- Josende, M. E., Tozetti, A. M., Alalan, M. T., Mathies Filho, V., da Silva Ximenez, S., da Silva Júnior, F. M. R., & Martins, S. E. (2015). Genotoxic evaluation in two amphibian species from Brazilian subtropical wetlands. *Ecological Indicators*, 49, 83-87.
- Labrada-Martagón, V., Teneriá, F. A. M., & Zenteno-Savín, T. (2019). Standardized micronucleus assay for peripheral blood from sea turtles. *Chelonian Conservation and Biology: Celebrating 25 Years as the World's Turtle and Tortoise Journal*, 18(2), 175-186.
- Labrada-Martagón, V.; Tenorio Rodríguez, P.A.; Méndez-Rodríguez, L.C.; Zenteno-Savín, T. (2011). Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 154: 65–75.
- Lewbart, G. A., Hirschfeld, M., Denking, J., Vasco, K., Guevara, N., García, J., ... & Lohmann, K. J. (2014). Blood gases, biochemistry, and hematology of Galapagos green turtles (*Chelonia mydas*). *PLoS One*, 9(5), e96487.
- Lindsay, M. K., Zhang, Y., Forstner, M. R., & Hahn, D. (2013). Effects of the freshwater turtle *Trachemys scripta elegans* on ecosystem functioning: an approach in experimental ponds. *Amphibia-Reptilia*, 34(1), 75-84.
- Lopes, GM (2016). Indicadores hematológicos em cágados do córrego Felizardo no município de Uruguaiana-RS.
- Mackerth, F. (1978). Water analysis: some revised methods for limnologists. *Freshwater Biol. Assoc. Sci. Pub.*, 36, 117.
- Mackinney, G. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, 140: 315-322, 1941.
- Mannarino, C. F., Moreira, J. C., Ferreira, J. A., & Arias, A. R. L. (2013). Avaliação de impactos do efluente do tratamento combinado de lixiviado de aterro de resíduos sólidos urbanos e esgoto doméstico sobre a biota aquática. *Ciência & Saúde Coletiva*, 18, 3235-3243.
- Matson, C. W., Palatnikov, G., Islamzadeh, A., McDonald, T. J., Autenrieth, R. L., Donnelly, K. C., & Bickham, J. W. (2005). Chromosomal damage in two species of

- aquatic turtles (*Emys orbicularis* and *Mauremys caspica*) inhabiting contaminated sites in Azerbaijan. *Ecotoxicology*, 14(5), 513-525.
- Medeiros, N. C., Locatelli-Dittrich, R., Schmidt, E., Alvares, A. A., Patrício, L. L., Lange, R. R., & de Souza, R. A. (2012). Efeito do sítio de venopunção nos parâmetros hematológicos em tigre-d'água-americano, *Trachemys scripta elegans*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32, 37-40.
- Mesak, C., Montalvão, M. F., Paixão, C. F. C., Mendes, B. D. O., Araújo, A. P. D. C., Quintão, T. C., & Malafaia, G. (2019). Do Amazon turtles exposed to environmental concentrations of the antineoplastic drug cyclophosphamide present mutagenic damages? If so, would such damages be reversible?. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 6234-6243.
- Metin, K., Türkozan, O., Kargin, F., Basumoglu, Y. K., Taskavak, E. R. T. A. N., & Koca, S. (2006). Blood cell morphology and plasma biochemistry of the captive European pond turtle *Emys orbicularis*. *Acta Veterinaria Brno*, 75(1), 49-55.
- Mitkovska, V., & Chassovnikarova, T. (2020). Chlorpyrifos levels within permitted limits induce nuclear abnormalities and DNA damage in the erythrocytes of the common carp. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(7), 7166-7176.
- Montanha, F. P., Astrauskas, J. P., Kirnew, M. D., Nagashima, J. C., & Pimpão, C. T. (2011). Degradação de ambientes aquáticos por exposição a compostos químicos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 10(17), 1-12.
- Morselli, M. E. P., Faria, F. S. E. D. V., Ribeiro, V. M. F., Viana, M. N. S., Parente, A. F., Baginski, L. J., ... & Reis, D. B. V. (2016). Biometria e parâmetros hematológicos em tartarugas da Amazônia de um criatório comercial de Rio Branco/AC. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68, 1548-1556.
- Nardini G, Leopardi S, Bielli M. 2013. *Clinical Hematology in Reptilian Species*. *Vet clin Exot Ani*, v. 16: 1-30.
- Natt, M. P., & Herrick, C. A. (1952). A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the *chicken*. *Poultry Science*, 31(4), 735-738.
- Oliveira-Junior, A. A., Tavares-Dias, M., & Marcon, J. L. (2009). Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa* (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Research in Veterinary Science*, 86(1), 146-151.

- Omonona A.O., Olukole S.G. & Fushe F.A. 2011. Haematology and serum biochemical parameters in free ranging African side neck turtle (*Pelusios sinuatus*) in Ibadan, Nigeria. *Acta Herpetol.* 6:267-274.
- Paranhos, R. Alguns métodos para análise de água. Cadernos didáticos/Rodolfo Paranhos. Rio de Janeiro: UFRJ, Sub-Reitoria de Ensino de Graduação e Corpo Discente/SR-1, 1996. 200p.il.— (CADERNOS DIDÁTICOS UFRJ;19).
- Pérez Iglesias, J. M. (2015). Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros neotropicais.
- Pires, T. T, Rostan, G., de Bittencourt, TCC, & Guimarães, JE (2009). Hemograma e bioquímica sérica de tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) de vida livre e mantidas em cativeiro, no litoral norte da Bahia. *Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia*, 46 (1), 11-18.
- Pires, T. T., Rostan, G., & Guimarães, J. E. (2006). Hemograma e determinação da proteína plasmática total de tartarugas marinhas da espécie *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), criadas em cativeiro, Praia do Forte, Município de Mata de São João-Bahia. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43(3), 348-353.
- Pitol, D. L., Issa, J. P. M., Caetano, F. H., & Lunardi, L. O. (2007). Morphological characterization of the leukocytes in circulating blood of the turtle (*Phrynops hilarii*). *International Journal of Morphology*, 677-682.
- Poletta, G. L., Siroski, P. A., Amavet, P. S., Ortega, H. H., & Mudry, M. D. (2013). Reptiles as animal models: examples of their utility in genetics, immunology and toxicology. *Reptiles in Research: Investigations of Ecology, Physiology and Behavior from Desert to Sea*, 407-445.
- Poletta, G., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M., 2008. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 650, 202–209.
- Quiroz, V. H., & Baena, J. A. P. (2017). Niveles sanguíneos de biomarcadores de daño genético en eritrocitos de *Lepidochelys olivacea* (Cheloniidae) en Colombia. *Acta biológica colombiana*, 22(3), 322-330.
- RAMB. Relatório Anual de Qualidade Ambiental do município de Pelotas. Secretaria de Qualidade Ambiental, Pelotas. 2020. Disponível em: <<https://www.pelotas.com.br/storage/servicos/meio-ambiente/RAMB%202020.pdf>>. Acesso: 24 de setembro de 2021.

- Rangel, E. M., & Sanches Filho, P. J. (2014). Determinação de metais traço no sedimento do canal prolongamento da Avenida Bento Gonçalves, Pelotas (RS). *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 5(1), 229-241.
- Rossini, M., Blanco, P. A., Marín, E., Comerma-Steffensen, S., & Zerpa, H. (2012). Haematological values of post-laying Arrau turtle (*Podocnemis expansa*) in the Orinoco River, Venezuela. *Research in veterinary science*, 92(1), 128-131.
- Schneider, L., Belger, L., Burger, J., Vogt, R. C., Jeitner, C., & Peleja, J. R. P. (2011). Assessment of non-invasive techniques for monitoring mercury concentrations in species of *Amazon turtles*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93(2), 238-250.
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H., & Wahl, G. M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *The Journal of cell biology*, 140(6), 1307-1320.
- Silva, C. D. L. (2017). Análise de genotoxicidade e níveis de mercúrio em *Hoplias malabaricus* (PISCES-CHARACIFORMES) de duas áreas da bacia do Rio Tapajós (Doctoral dissertation, Universidade Federal do Oeste do Pará).
- Silva, M. I. A. Alterações hematológicas e bioquímicas em uma população de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em resposta a estressores ambientais. 2011. Dissertação (Mestrado em Genética Animal). Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto - SP, 2011.
- Silveira, E. C., Mascarenhas, C. S., Corrêa, F. A. B. I. A. N. O., & Müller, G. (2019). Diet of *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) in anthropic environments from southern of Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 14(1), 42-50.
- Silveira, Melise Lucas; Hartmann, Marília Teresinha; Bager, Alex. Biometria, razão sexual e dimorfismo sexual de *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron 1835) (Testudines, Emydidae) em um açude no município de São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biotemas*, v. 25, n. 3, p. 187-193, 2012.
- Silveira, S. D. S. (2016). Avaliação dos danos mutagênicos através da análise de micronúcleos em eritrócitos de tartarugas marinhas no Litoral Norte e Médio Leste do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Singh, N., Poonia, T., Siwal, S. S., Srivastav, A. L., Sharma, H. K., & Mittal, S. K. (2022). Challenges of water contamination in urban areas. In *Current directions in water scarcity research* (Vol. 6, pp. 173-202). Elsevier.

Smith, V. H., & Schindler, D. W. (2009). Eutrophication science: where do we go from here?. *Trends in ecology & evolution*, 24(4), 201-207.

Souza, F. L. Uma revisão sobre padrões de atividades, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidea). *Phyllomeduse* 3, v.1, 2004.

Souza, M. F. D. (2015). Qualidade da água do Canal São Gonçalo-RS/Brasil: uma avaliação hidroquímica considerando seus usos múltiplos (Master's thesis, Universidade Federal de Pelotas).

Sparling, D. W., Linder, G., Bishop, C. A., & Krest, S. (Eds.). (2010). *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. CRC Press.

Stacy, N. I., Alleman, A. R., & Sayler, K. A. (2011). Diagnostic hematology of reptiles. *Clinics in laboratory medicine*, 31(1), 87-108.

Stein, I. V., Stein, G. G., Hlavac, N. R. C., de Almeida Lacerda, L., & Carissimi, A. S. (2015). Perfil hematológico de tigras d'água (*Trachemys dorbigni*) de uma população do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Veterinária em Foco*, 12(2).

Sykes IV, J. M., & Klaphake, E. (2008). Reptile hematology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 11(3), 481-500.

Tavares-Dias, M., Oliveira-Junior, A. A., Silva, M. G., Marcon, J. L., & Barcellos, J. F. (2009). Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the amazon farmed in poor and normal nutritional conditions.

US EPA, 2000. Nutrient Criteria Technical Guidance Manual Rivers and Streams. EPA-822-B-00-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, D.C.

US EPA, 2010. Using Stressor–Response Relationships to Derive Numeric Nutrient using an integrated nondestructive protocol. *Science of the Total Environment*, 631–632: 1221–1233.

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.

Yasui, M.; Kamoshita, N.; Nishimura, T.; Honma, M. 2015. Mechanism of induction of binucleated cells by multiwalled carbon nanotubes as revealed by live-cell imaging analysis. *Genes and Environment*, 37: 1–6.

Zago, C. E. S., Da Silva, T. L., Da Silva, M. I. A., Venancio, L. P. R., Mendonça, P. P., Junior, L. R. F., ... & de Oliveira, C. (2010). Morphological, morphometrical and

ultrastructural characterization of *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) blood cells, in different environments. *Micron*, 41(8), 1005-1010.

Zapata, L.M.; Bock, B.C.; Orozco, L.Y.; Palacio, J.A. 2016. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127: 108–116.

Zhang, F., Gu, H., & Li, P. (2011). A review of chelonian hematology. *Asian Herp Res*, 2(1), 12-20.

Zuñiga González, G., Torres Bugarín, O., Luna Aguirre, J., González Rodríguez, A., Zamora Perez, A., Gómez Meda, B.C., Ventura Aguilar, A.J., Ramos Ibarra, M.L., Ramos Mora, A., Ortiz, G.G., Gallegos Arreola, M.P. (2000): Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species mammals, reptiles and birds: Part two. *Mutat. Res.* 467: 99-103.

Zuñiga González, G., Torres Bugarín, O., Zamora Perez, A., Gómez Meda, B.C., Ramos Ibarra, M. L., Martínez González, S., González Rodríguez, A., Luna Aguirre, J., Ramos Mora, A., Ontiveros Lira, D. and Gallegos Arreola, M.P. (2001): Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutat. Res.* 494: 161-167.

Zychowski, G. V., & Godard-Codding, C. A. (2017). Reptilian exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and associated effects. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(1), 25-35.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Atualmente o estado de conservação de *T. dorbigni* não é um motivo de preocupação, pois essa espécie não está listada como ameaçada de extinção, mas pelo fato de que nos últimos anos ter sido fortemente afetada por atividades antrópicas, se faz necessário o fomento de pesquisas que visam analisar o estado fisiológico dessa espécie de quelônio.

No presente estudo, os dados preliminares demonstraram que estudos em conjunto de biomarcadores do sangue para determinar variáveis hematológicas e/ou alterações de genotoxicidade em populações de vida livre de *T. dorbigni* em áreas antropizadas, se fez útil para realizar um panorama inicial de investigação sobre o estado de saúde desses animais, bem como, realizar o monitoramento da qualidade ambiental, além de ser um passo inicial para propô-la como organismo sentinela.

Sugere-se realizar mais estudos com análise de múltiplos biomarcadores com esta espécie, tanto em vida livre quanto em cativeiro, além da utilização de uma metodologia mais ampla, com comparações entres locais e aumento na quantidade de indivíduos amostrados, e com isso, contribuir com eficácia para a melhor compreensão das características fisiológicas e sugerir medidas para a conservação e utilização sustentável dessa espécie, a fim de prevenir contra futuras ameaças de extinção.

Para além disso, vale ressaltar, que a crescente urbanização, que culmina sobretudo, pelo lançamento de águas residuárias de atividades domésticas têm acarretado a deterioração de ambientes aquáticos naturais, e esta degradação é evidenciada pela análise dos parâmetros físico-químicos da água do local de estudo, na qual identificaram baixo teor de OD e elevado de Pt, estando estes parâmetros fora da legislação e identificando a ocorrência de processos de eutrofização artificial. E apesar desses dados caracterizar deterioração do ambiente, não é necessariamente causas dos efeitos fisiológicos observados nos indivíduos analisados, mas é um indicativo da contaminação ambiental por efluentes domésticos, sendo que esses efluentes além da presença de matéria orgânica e microrganismos, possuem forte aporte de PPCPs (produtos farmacêuticos e de higiene pessoal) e que existe vários que não estão legislados, mas já existe trabalhos realizados na região que comprovam a toxicidade desses compostos no ambiente natural.

ANEXO
CERTIFICADO Nº P018/2021

Certificamos que o projeto intitulado “**O uso de biomarcadores para avaliar os efeitos de contaminação ambiental sobre populações naturais de *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) no extremo sul do Brasil**”, protocolo nº 23116.001406/2021-41, sob a responsabilidade de Daniel Loebmann - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 27 de outubro de 2021 (Ata 010/2021).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	Pq006/2021
FINALIDADE	Pesquisa
COLABORADORES AUTORIZADOS A MANIPULAR OS ANIMAIS	Camila de Martinez Gaspar Martins, Danielle Tavares da Silva, Fernanda de Lacerda Freire
VIGÊNCIA DO PROJETO	31/05/2022
ESPÉCIE / GRUPOS TAXONÔMICOS	<i>Trachemys dorbigni</i>
NÚMERO DE ANIMAIS	100
Nº SOLICITAÇÃO / AUTORIZAÇÃO SISBIO	79978-1
ATIVIDADE(S)	(X) CAPTURA (X) COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO (X) MARCAÇÃO (X) OUTRAS:
LOCAL(is) REALIZAÇÃO ATIVIDADES	Pelotas e Estação Ecológica do Taim, Rio Grande
ENVIO DO RELATÓRIO PARCIAL	Janeiro/2022
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Junho/2022

Rio Grande, 10 de novembro de 2021.

Med. Vet. Alice T. Meirelles Leite
Coordenadora da CEUA-FURG