

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE LITORAL NORTE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOLOGIA MARINHA E COSTEIRA

STEPHANIE DA SILVA SILVEIRA

**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.**

OSÓRIO

2016

STEPHANIE DA SILVA SILVEIRA

**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.**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Andre Casali
Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Valesca Veiga
Cardoso

OSÓRIO

2016

Silveira, Stephanie da Silva

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. / Stephanie da Silva Silveira, 2016.
35 f.

Orientador: Emerson André Casali

Coorientador: Valesca Veiga Cardoso

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Estadual do Rio Grande do Sul em convênio com Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Biologia Marinha e Costeira, Osório/Imbé, BR – RS, 2016.

1. Tartarugas marinhas. 2. Mutagênese. 3. Rio Grande do Sul, Litoral norte. 4. Rio Grande do Sul, Litoral médio leste. I. Casali, Emerson André, orient. II Cardoso, Valesca Veiga, coorient. III. Título.

Adaptado do Sistema de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFRGS com dados fornecidos pela autora.

STEPHANIE DA SILVA SILVEIRA

**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.**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha e Costeira na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Andre Casali
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Valesca Veiga Cardoso

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Carmen Carolina Romero Saavedra

Me. Jonathas da Silva Barreto

Coordenador da Atividade Trabalho de Conclusão II - CBM
Ênio Lupschinski Junior

OSÓRIO
2016
AGRADECIMENTOS

Sempre em primeiro lugar, agradeço à minha família; paizinho, mãezinha e Shay. Esse sonho jamais seria possível sem vocês. Obrigada por sempre me motivarem a fazer o que eu amo, e me apoiarem nas decisões mais loucas e difíceis. Absolutamente nada na minha vida seria possível sem vocês, eu amo vocês mais do que tudo!

À minha Sophia, companheira de vida, que fez meus anos de graduação serem mais alegres e bagunçados, e que me faz todo dia acreditar mais um pouquinho no amor.

À biologia, que me proporciona as melhores experiências, que me faz entender o que está além da minha percepção, entender mais sobre mim, sobre o que me cerca, sobre as pessoas.

Ao Baka, Marcelo, Baby, migo e todas as outras variações desta pessoa maravilhosa, que a BioMarinha me deu o prazer de trombar nessa vida. Pelas boas gargalhadas, idiotices, conversas, conselhos e até mesmo pelos momentos de pavor. Por ser esse canceriano com ascendente em áries que eu consigo amar e odiar ao mesmo tempo. Obrigada por aceitar ser meu irmão de coração, te amo.

À Paola, por me acompanhar nas indiadas dessa vida, pelas conversas com chimarrão, por compartilhar as reclamações rotineiras comigo, pelas bebedeiras com muita história pra contar (quando lembradas). Enfim, pela amizade sincera, leve e sem frescura. Obrigada, amiga, amo tu.

Ao Duda, por me ajudar nas coletas enquanto eu estava fora e principalmente pela amizade. Tu foi parte muito importante neste trabalho.

Ao Derek, por me aguentar pedindo mil e um favores, por coletar todas as minhas amostras e por ser sempre tão atencioso. Tua ajuda foi imprescindível para a realização deste trabalho!

Ao Gabo, pela amizade ao longo destes anos. Por me escutar quando eu prendo o grito pedindo ajuda, por ter sido sempre presente na minha vida mesmo que, na maioria das vezes, distante. Por ter me ajudado nas correções e me acalmado quando eu precisava.

À Stella, um verdadeiro anjinho da guarda. Que ajudou na formatação deste trabalho, se mostrando sempre disponível com todo aquele carinho de mãe.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para este trabalho e que tiveram passagem na minha vida durante a graduação.

Mas nós, como indivíduos, somos imensamente abençoados. Privilegiados, e não apenas por desfrutar nosso planeta. Mais ainda, somos privilegiados por ter recebido a oportunidade de compreender por que nossos olhos estão abertos, e por que eles veem o que veem, no curto espaço de tempo antes de se fecharem para sempre.

(Richard Dawkins)

RESUMO

Programas de monitoramento ambiental são de grande importância para a geração de dados sobre impacto ambiental e podem, através dos testes toxicológicos, ser usados para auxiliar na viabilização de ações corretivas e normas para a proteção dos ecossistemas. Este estudo tem como objetivo principal avaliar a frequência de danos mutagênicos em eritrócitos de tartarugas marinhas por meio do teste de micronúcleos em amostras no Litoral Norte e Médio Leste do Rio Grande do Sul. De 2013 a 2016, foram coletadas amostras de sangue de 16 tartarugas marinhas provenientes de monitoramentos realizados pelo setor de Coleção Didática do Centro de Estudos Costeiros Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) e/ou que foram enviados para o Centro de Reabilitação de Fauna Silvestre e Marinha (CERAM). Com uma gota do sangue de cada indivíduo coletado foram elaboradas lâminas histológicas, que foram posteriormente coradas e analisadas em microscopia ótica para a contabilização de núcleos alterados. Foram examinados 2000 eritrócitos de cada animal, em duas lâminas. Os dados foram analisados no software SPSS por ANOVA de uma via para análises múltiplas e pelo teste t de *student* para amostras independentes ($p < 0,05$). Dos 16 indivíduos analisados, 14 foram identificados como *Chelonia mydas*, um como *Caretta caretta* e o outro acredita-se que seja um indivíduo híbrido entre *C. caretta* e *Lepidochelys olivacea*. O número total de micronúcleos variou muito entre os indivíduos e acredita-se que o tratamento com antibiótico previamente à coleta possa ter causado a alta incidência destas estruturas em dois espécimes. Também, verificou-se que o número de micronúcleos encontrados nos espécimes de tartaruga marinha é mais alto que valores basais estudados para outros animais. Os indivíduos de tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) tiveram um número de micronúcleos significativamente menor que os outros indivíduos, porém acredita-se que as diferenças se devam à diferença natural que ocorre entre espécies. Além disso, todos os indivíduos se apresentavam debilitados na chegada ao CERAM e a maioria veio a óbito, o que leva a acreditar que estes animais se apresentavam mais vulneráveis do que indivíduos saudáveis. Este estudo representa possivelmente o primeiro no Brasil a investigar a incidência de micronúcleos em tartarugas marinhas, portanto faz-se necessária a produção de mais trabalhos na área para que os padrões encontrados neste estudo sejam elucidados com mais clareza.

Palavras-chave: Micronúcleos. Tartarugas marinhas. Mutagênese.

ABSTRACT

Environmental monitoring programs have an important role in environmental impact data generation and can, through toxicological tests, be used to enable corrective actions and create standards for ecosystem protection. This study aims to evaluate the frequency of mutagenic damage in sea turtle erythrocytes through the micronuclei assay in the north and middle east coast of Rio Grande do Sul. From 2013 to 2016, blood samples from sea turtles captured in the monitoring program of the Coleção Didática do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) and/or that were sent to the Centro de Reabilitação de Fauna Silvestre e Marinha (CERAM) were collected. Histological slides were produced with a drop of the blood of each animal, and coloured subsequently in order to enable the microscopic analysis. For each turtle, 2000 erythrocytes were counted, in two slides. The data were analyzed in the SPSS software through on way ANOVA for multiple analyses and through student t test for independent samples ($p < 0,05$). In total, 16 turtles were analyzed, 14 were classified as *Chelonia mydas*, one as *Caretta caretta* and we believed that the other one is a hybrid between *C. caretta* and *Lepidochelys olivacea*. The total number of micronuclei fluctuated among the turtles and we believe that the antibiotic treatment that two individuals received before the collection of blood samples may have caused the higher frequency of micronuclei in these organisms. It was also verified that the micronuclei number found in sea turtle species is higher than the basal numbers established for other animals. The organisms classified as green turtle revealed a micronuclei number significantly lower than the others. However, we believe that the differences are due to a natural disparity that occurs between species. Furthermore, all the sea turtles were injured by the time they arrived in CERAM and the majority passed away, which leads us to believe that these animals were more vulnerable than healthy animals. This study possibly represents the first one in Brazil to investigate the frequency of micronuclei in sea turtles, therefore more studies in this area are required in order to better understand the results presented here.

Key-words: Micronuclei. Sea turtles. Mutagenesis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	TARTARUGAS MARINHAS	12
2.1.1	<i>Chelonia mydas</i>	13
2.1.2	<i>Caretta caretta</i>	14
2.2	GENOTOXICIDADE	15
2.3	ENSAIO DE MICRONÚCLEOS	15
2.4	ÁREA DE ESTUDO	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	O TESTE DE MICRONÚCLEOS	19
3.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	NÚMERO TOTAL DE MICRONÚCLEOS	22
4.2	MICRONÚCLEOS, BROTAMENTOS E CÉLULAS NORMAIS	23
4.3	COMPARAÇÃO ENTRE AGRUPAMENTOS DE INDIVÍDUOS	25
4.4	ESTADO DE SAÚDE DOS INDIVÍDUOS ANALISADOS	27
5	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 INTRODUÇÃO

Programas de monitoramento ambiental são de grande valia para mensurar o impacto e gerar importantes dados e informações sobre proporção do impacto ambiental e da degradação também são importantes. Eles podem produzir informações sobre os avanços de ações remediadoras adotadas em determinadas áreas. Com isso, os programas de monitoramento podem de forma geral auxiliar na produção de orientações e normas que levem a proteção dos ecossistemas (RAYA-RODRIGUEZ, 2000). Os testes toxicológicos usados em estudos de efluentes líquidos e corpos receptores tem sido um importante instrumento para que os órgãos públicos e privados de controle ambiental possam identificar problemas de lançamento de misturas de substâncias tóxicas e estabelecer prioridades de controle em regiões críticas, além de viabilizar as ações corretivas apropriadas (AMARAL *et al.*, 2007; FARRÉ; BARCELÓ, 2003; FERRARO *et al.*, 2004).

A problemática da urbanização e ocupação das zonas costeiras, juntamente com a intensa exploração de seus recursos são fatores preocupantes no que diz respeito ao ecossistema marinho. A sociedade humana é dependente da água, e áreas onde este bem é farto são amplamente exploradas. Deste modo, uma série de atividades humanas nocivas são criadas ao redor destes ambientes como agricultura, aquacultura, atividade petrolífera e portuária. De todos os ambientes, os ecossistemas aquáticos são considerados os mais afetados, pois são os como receptáculos finais de poluentes (BERNET *et al.*, 1999; HAASE *et al.*, 2003; FERRARO *et al.*, 2004). A exposição dos seres vivos aos diversos contaminantes tóxicos presentes no ambiente aquático podem gerar uma série de efeitos adversos. Os processos de acumulação destes poluentes nos organismos aquáticos envolvem processos de bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação, onde a primeira está relacionada à pura absorção da substância pelo organismo por meio das superfícies respiratórias e dérmicas, a segunda relacionada à concentração retida no organismo após os processos de assimilação e eliminação do mesmo, e a terceira e mais abrangente inclui todas as rotas de exposição ao contaminante, inclusive a dieta alimentar uma vez que, à medida que se avança nos níveis tróficos, pode ocorrer o aumento da concentração de contaminantes nos tecidos. Este aumento é resultante, principalmente, da acumulação ocasionada pela dieta alimentar ao longo da cadeia trófica e seus efeitos deletérios se propagam pelos demais componentes do ecossistema, incluindo os seres humanos, que se encontram no topo da cadeia trófica (COSTA *et al.*, 2008)

A nível genético, os poluentes podem induzir danos ao DNA, causando mutações e até mesmo a morte celular. Quando estas mutações estão associadas às células reprodutivas, podem ser herdadas pela prole e diminuir a capacidade adaptativa e reprodutiva de uma população específica (BICKHAM *et al.*, 2000; MATSUMOTO; MARIN- MORALES, 2004).

Por apresentarem um longo ciclo de vida e uma ampla distribuição geográfica, as tartarugas marinhas podem entrar em contato com uma grande quantidade de fontes poluidoras, sendo assim, organismos sentinela reconhecidos. Estudos realizados no Litoral Norte e Médio do Rio Grande do Sul comprovaram a contaminação por metais pesados e a presença de resíduos sólidos em tartarugas marinhas juvenis encontradas na região (RIGON, 2012; SILVA, 2011). A avaliação dos efeitos da poluição crônica em tartarugas juvenis no litoral do RS justifica-se pelo estado de conservação deste grupo de organismos avaliado pela IUCN como “vulnerável”, “em perigo” e “criticamente em perigo” (IUCN, 2015).

Este estudo teve como objetivo geral avaliar as alterações nucleares presentes em eritrócitos de tartarugas marinhas capturadas/encontradas no Litoral Norte e Médio do Rio Grande do Sul, bem como comparar estes dados com as características biométricas dos indivíduos em questão. Os objetivos específicos focam-se em avaliar a frequência de danos mutagênicos em eritrócitos destas tartarugas marinhas por meio do teste de micronúcleos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Para um melhor entendimento dos dados apresentados neste trabalho estão dispostos abaixo conceitos e informações relevantes ao estudo.

2.1 TARTARUGAS MARINHAS

Os indicadores, muitas vezes, sugerem, pelos efeitos observados, que houve a incidência de algum agente impactante. Contudo, testes complementares se fazem necessários para confirmar a origem de tais impactos. Como exemplo, está a avaliação de micronúcleos (CARRASCO *et al.*, 1990). Vários agentes podem ter efeitos de clastogênese, em especial em meio aquático, onde diferentes compostos e impactos ambientais geram efeitos sobre a hematopoiese (NORMANN *et al.*, 2008).

O estudo toxicológico de espécies sentinelas constitui uma importante ferramenta no monitoramento ambiental e detecção de efeitos adversos de contaminantes químicos em ambientes naturais (HOOK; GALLAGHER; BATLEY, 2014). As tartarugas marinhas são organismos de alta longevidade e ampla distribuição que ocupam diversos habitats e tem acesso a diversas fontes de alimento estando, portanto, expostas à contaminação por poluentes. Por esses motivos, estes animais constituem um grupo importante de organismos sentinelas e viabilizam o monitoramento de poluentes a longo prazo (YU *et al.*, 2011).

Estudos toxicológicos com tartarugas marinhas são abundantes, principalmente no que diz respeito à metais pesados e organoclorados (GARDNER *et al.*, 2006; KELLER; KUCKLICK; MCCLELLAN-GREEN, 2004; KELLER *et al.*, 2003; MEDEIROS, 2011). Em relação a pesquisas relacionadas a danos genéticos, porém, há uma escassez de estudos principalmente com aplicação do ensaio de micronúcleos, havendo apenas um relato encontrado na bibliografia em tartarugas marinhas da Área Protegida de Cerro Verde e da Ilha de Coronilla, ambas no Uruguai (BORRAT *et al.*, 2011).

No Brasil, bem como no Rio Grande do Sul, ocorrem cinco das sete espécies de tartaruga marinha existentes, são elas a Tartaruga-verde, *Chelonia mydas* (LINNAEUS, 1758); a Tartaruga-cabeçuda, *Caretta caretta* (LINNAEUS, 1758); a Tartaruga-de-pente, *Eretmochelys imbricata* (LINNAEUS, 1766); a Tartaruga-oliva, *Lepidochelys olivacea* (ESCHOLTZ, 1829) e a Tartaruga-de-couro, *Dermochelys coriacea* (VANDELLI, 1761). Estes organismos tem distribuição circunglobal, ocorrendo praticamente em todos os oceanos, em águas tropicais, temperadas, subtropicais, até mesmo subpolares. A dieta das tartarugas marinhas varia de acordo com a espécie e estágio de vida. Por apresentarem hábito migratório

e ciclo de vida complexo, estes animais ocupam diferentes zonas de alimentação ao longo da vida (ALMEIDA *et al.*, 2011; MARCOVALDI, M. A. A. G. *et al.*; SANTOS, A. S. dos; SALES, 2011).

As populações de tartaruga marinha enfrentam uma série de ameaças durante todo o ciclo de vida devido à exposição a diversos impactos antrópicos, tais como a captura incidental em redes de pesca, abate de fêmeas e coleta de ovos para consumo, trânsito e iluminação artificial em praias de desova e poluição marinha (AMEAÇA de extinção, 2011). Devido à vulnerabilidade destas populações, contaminantes químicos no ambiente podem levar a perturbações no equilíbrio genético e conseqüentemente a uma perda de diversidade (BICKHAM *et al.*, 2000). Portanto, entender o estado de conservação destas espécies é imprescindível para garantir a sua persistência (BJORNAL, 1999; HAMANN *et al.*, 2010). Todas as espécies que ocorrem na costa do Rio Grande do Sul estão incluídas Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2014), e a nível mundial integram a Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas da União para Conservação da Natureza (SEMINOFF, 2015).

As tartarugas-verde e cabeçuda são as duas espécies com maior registro de ocorrência no Litoral Norte e Médio Leste do Rio Grande do Sul, e estudos comprovam a utilização deste ambiente para alimentação de indivíduos juvenis e adultos. (NAKASHIMA, 2008; TAVARES *et al.*, 2011).

2.1.1 *Chelonia mydas*

Sabe-se que os indivíduos de *C. mydas* na fase juvenil alimentam-se em áreas temperadas durante o verão e retornam à áreas de menor latitude no inverno, afim de evitar águas frias. Portanto, a área de estudo constitui uma região de extrema importância para o desenvolvimento e alimentação desta espécie (BUGONI; KRAUSE; PETRY, 2003; MUSICK; LIMPUS, 1997; SOTO; BEHEREGARAY, 1997).

A tartaruga-verde é considerada a espécie com hábito mais costeiro, inclusive apresentando registro de utilização de áreas estuarinas e rios. No Rio Grande do Sul existem registros de ocorrência na Laguna dos Patos e Laguna Tramandaí (BARRETO *et al.*, 2010; SILVA, 2006; SOTO; BEHEREGARAY, 1997). Esta espécie habita mares tropicais, geralmente entre as latitudes 40°S e 40°N e ocorre em toda a costa do Brasil. As desovas ocorrem principalmente nas Ilhas da Trindade (Espírito Santo), Atol das Rocas (Rio Grande do Norte) e Fernando de Noronha (Pernambuco) (ALMEIDA *et al.*, 2011).

Após o nascimento, os indivíduos de *C. mydas* deslocam-se imediatamente para o oceano aberto, em ambiente pelágico, e neste estágio apresentam dieta onívora com tendência carnívora. Após a fase pelágica (estimada entre 3 a 5 anos), as tartarugas apresentam entre 30 e 40 cm de comprimento de carapaça e migram para ambientes de desenvolvimento, onde se alimentam principalmente de macroalgas e fanerógamas. Os indivíduos juvenis de *C. mydas* apresentam um comprimento médio da carapaça entre 25 e 75 cm, enquanto os indivíduos adultos podem atingir 140 cm. Durante a fase adulta a dieta mantém-se herbívora, embora ainda possam utilizar fontes de alimento de origem animal. Também nesta fase, os indivíduos ocupam principalmente áreas neríticas associadas a bancos de algas e fanerógamas submersas (BALAZS, 1995; COLLAZO; BOULON; TALLEVAST, 1992; MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011; MAKOWSKI; SEMINNOFF; SALMON, 2006; MUSICK; LIMPUS, 1997).

De acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN, *C. mydas* está classificada como "Em perigo" (SEMINOFF, 2004), e pela Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, como "Vulnerável" (BRASIL, 2014).

2.1.2 *Caretta caretta*

A tartaruga-cabeçuda ocorre em diversas regiões costeiras do Brasil, apresentando registros em diferentes estágios de vida entre o Pará e Rio Grande do Sul. As desovas desta espécie ocorrem principalmente em Sergipe, no norte da Bahia, norte do Rio de Janeiro e norte do Espírito Santo. As áreas secundárias de desova se localizam em algumas regiões do Espírito Santo e sul da Bahia. Fêmeas estudadas em áreas de desova apresentam um comprimento curvilíneo médio da carapaça de 103 cm (MARCOVALDI; SANTOS; SALES, 2011; SANTOS *et al.*, 2011).

Indivíduos de *C. caretta* no estágio inicial são epipelágicos e habitam zonas oceânicas, se alimentando nos primeiros cinco metros da coluna d'água, enquanto os adultos habitam principalmente áreas neríticas e se alimentam no fundo. Sua dieta é predominantemente carnívora durante todo o ciclo de vida, sendo constituída de moluscos, crustáceos e até mesmo peixes e algas, em menor proporção (SANTOS *et al.*, 2011).

Estudos genéticos em *C. caretta* comprovam a existência de duas subpopulações da espécie no Brasil, uma no nordeste (Sergipe e Bahia) e outra no sudoeste do país (Espírito Santo e Rio de Janeiro). No mesmo estudo, Reis *et al.* (2009) também evidencia a existência de hibridização da espécie com *Lepidochelys olivacea* no país. Informações sobre a causa desta interação ainda são escassas, porém destaca-se a importância do entendimento sobre a

relação entre os dois táxon a fim de desenvolver estratégias conservacionistas apropriadas. Sabe-se que o *status* de conservação de *C. caretta* no Brasil é "Em Perigo", de acordo com a Lista de Espécies ameaçadas do ICMBio (BRASIL, 2014), e mundialmente, a espécie está classificada como "Vulnerável" (CASALE; TUCKER, 2014).

2.2 GENOTOXICIDADE

Segundo Erdtman (2003), genotoxicidade (também denominada genética toxicológica) pode ser conceituada como uma área da genética que estuda os processos que induzem alterações na base genética de um organismo, podendo estar relacionado ao DNA; chamado de mutagênese, ou ao determinismo genético ao nível celular ou orgânico; chamados respectivamente de carcinogênese e teratogênese.

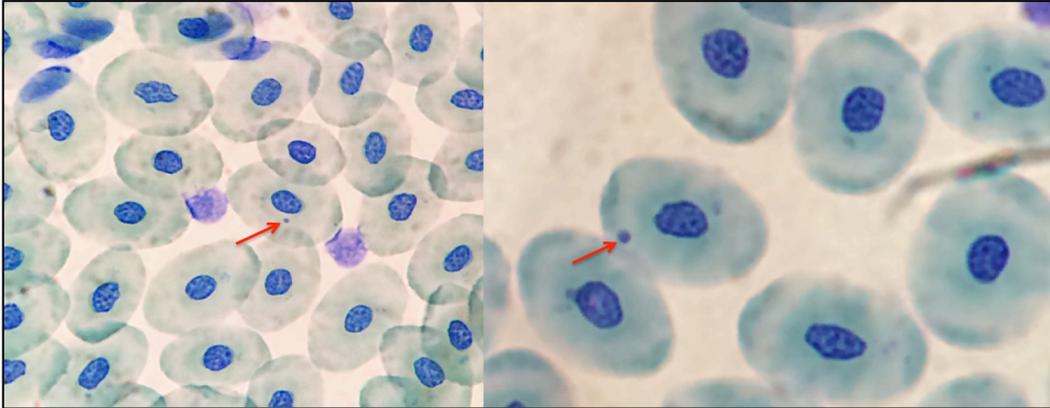
Estudos de monitoramento ambiental com alvo na genotoxicidade avaliam a frequência de danos genéticos encontrados em determinado organismo sentinela (biomonitor), com o intuito de determinar a toxicidade de poluentes presentes no ambiente. Neste sentido, a ecotoxicologia representa um ramo de estudo que analisa a causa-efeito entre os sistemas biológicos e os poluentes (SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

2.3 ENSAIO DE MICRONÚCLEOS

O ensaio de micronúcleos avalia, pela presença de porções de cromatina intracitoplasmática, a possibilidade de indução de quebras ou de perdas de cromossomos inteiros, podendo caracterizar a potencialidade mutagênica de um agente estudado. De um modo geral, o teste de micronúcleos detecta os efeitos de agentes mutagênicos pela observação de fragmentos cromossômicos separados do núcleo em uma estrutura semelhante a esta (ZÚÑIGA-GONZÁLEZ *et al.*, 2000).

O micronúcleo representa fragmentos de cromossomos acêntricos ou cromossomos inteiros perdidos durante a anáfase celular. Especificamente, os micronúcleos consistem em porções citoplasmáticas de cromatina de forma redonda ou ovalada que se localizam perto do núcleo (Figura 1). A sua formação resulta de uma lise na molécula de DNA ocorrida dias ou semanas após a ação dos carcinógenos e são constituídos, portanto, de fragmentos de cromátides ou cromossomos acêntricos ou aberrantes que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da divisão mitótica ou meiótica.

Figura 1 - Eritrócitos micronucleados em microscopia ótica.



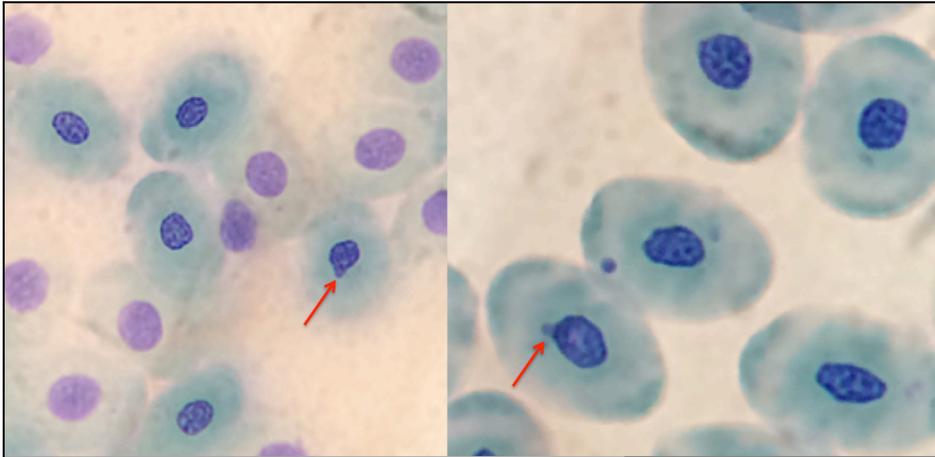
Nota: Microfotografia de eritrócitos micronucleados em microscopia ótica (aumento de 400X e 1000X, respectivamente). Coloração Giemsa. Seta vermelha indica micronúcleos
 Fonte: Autora (2016)

Esta técnica pode ser aplicada especialmente no monitoramento da poluição ambiental e pode ser aplicada em diversos organismos testes como bioindicadores (BELIËN *et al.*, 1995; STICH; ROSIN, 1983).

Micronúcleos são estruturas fáceis de visualizar em eritrócitos e são, portanto, frequentemente usados como medida de anomalias cromossômicas induzidas ou não (PALHARES; GRISOLIA, 2002). Em relação aos micronúcleos encontrados em eritrócitos de tartarugas a facilidade é maior pela dimensão das células. O número normal (basal) de micronúcleos encontrados em eritrócitos varia entre espécies e tem relação uma relação intrínseca com a capacidade de reparo e de controle do ciclo celular do espécime em questão. O número basal de micronúcleos representa um referencial de populações controle. Como a exposição à agentes xenobióticos afeta direta e/ou indiretamente os mecanismos de controle de danos, as células micronucleadas refletem a incidência de eventos genotóxicos sobre os organismos vivos (BELIËN *et al.*, 1995).

No teste de micronúcleos é possível também identificar outros tipos de anomalias genéticas, como o brotamento nuclear. Esta estrutura se parece com um micronúcleo, porém encontra-se presa ao núcleo celular por uma fina conexão nucleoplástica (Figura 2). Longwell e Yergenian (1965) sugerem que o brotamento seja uma fase preliminar de formação do micronúcleo que então se separaria no núcleo principal durante a interfase. Porém, um estudo mais recente sugeriu que as duas estruturas apresentam mecanismos de origem parcialmente diferentes (LINDBERG *et al.*, 2007).

Figura 2 - Eritrócitos com brotamento nuclear em microscopia ótica.



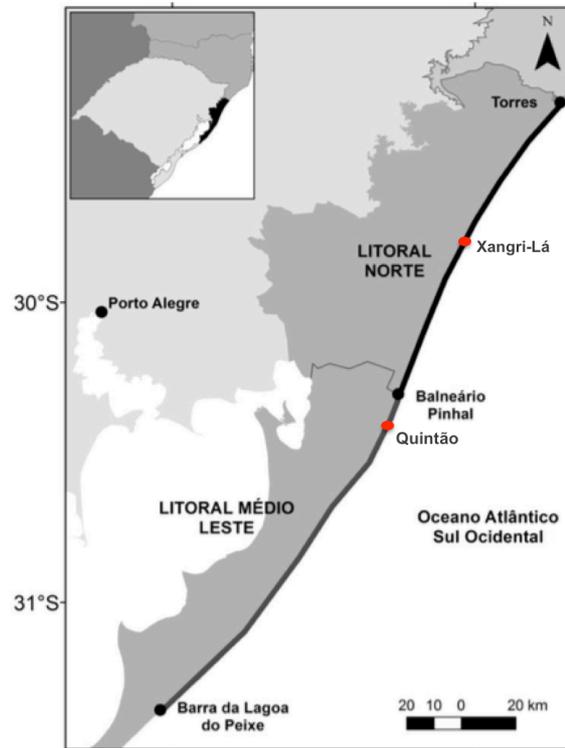
Nota: Microfotografia de eritrócitos com brotamento nuclear em microscopia ótica (aumento de 400X e 1000X, respectivamente). Coloração Giemsa. Seta vermelha indicando brotamento nuclear.
Fonte: Autora (2016).

2.4 ÁREA DE ESTUDO

O Rio Grande do Sul possui uma linha de costa de aproximadamente 610 km dominada por praias retilíneas e de sedimento arenoso fino, com predominância de compostos de quartzo. Em geral as praias desta região apresentam baixa declividade e comportamento intermediário. O vento predominantemente NE, juntamente com a ação secundária de ventos SW (predominante nos meses de inverno) resultam em dunas que migram sentido SW. (CALLIARI *et al.*, 2005; SEELIGER; ODEBRETCH; CASTELLO, 1998; VILLWOCK; TOMAZELLI, 2007). O presente estudo foi conduzido entre o Litoral Norte e Médio Leste do Rio Grande do Sul, em uma região que envolve a área presente entre a praia de Quintão (Latitude: -30.342425S Longitude: -50.268088W) no município de Palmares do Sul, até Xangri-lá (Latitude: -29.797291S Longitude: -50.031563W) (Figura 3).

A área de estudo apresenta clima do tipo subtropical úmido, com precipitação ao longo de todo o ano (FERRARO; HASENACK, 2009). Devido à ação da Convergência Subtropical, formada pela Corrente do Brasil (oligotrófica), que transporta Água Tropical (AT) e a Corrente das Malvinas (rica em nutrientes) que transporta Água Subantártica (ASA), a região oceânica apresenta alta produtividade biológica. A ação da Convergência juntamente com a mistura da AT e ASA formam a Água Central do Atlântico Sul, que influencia as águas costeiras da região (SEELIGER; ODEBRETCH; CASTELLO, 1998).

Figura 3 - Área de estudo indicando limites do Litoral Norte e Médio Leste do Rio Grande do Sul, e limitação da área específica entre Quintão e Xangri-Lá.



Fonte: Modificado de Rigon (2012)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Entre os anos de 2013 e 2016 foram coletadas amostras de sangue de espécimes de tartarugas marinhas provenientes de monitoramentos realizados pelo setor de Coleção Didática do Centro de Estudos Costeiros Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR, IB, UFRGS) e/ou que foram levados ao Centro de Reabilitação de Fauna Silvestre e Marinha (CERAM-CECLIMAR), localizados no município de Imbé, Litoral Norte do Rio Grande do Sul. Todos os indivíduos disponíveis para o estudo foram analisados e todos os protocolos estão de acordo com o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) e com o Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA)¹. Juntamente com as amostras de sangue, também foram coletadas as medidas de comprimento curvilíneo da carapaça (CCL) e massa de cada indivíduo, bem como informações sobre o estado de saúde relevantes ao estudo.

3.1 AVALIAÇÃO DOS DANOS MUTAGÊNICOS: O TESTE DE MICRONÚCLEOS

Para análise de micronúcleos, o sangue do animal *in vivo* foi extraído através de punção em seio venoso cervical com auxílio de uma seringa esterilizada (agulha 25x0,7 22G1) pelo veterinário responsável do CERAM (CRMV = 11.637RS). Uma gota do sangue coletado de cada indivíduo foi pingada em uma lâmina e, com a ajuda de uma lamínula, o esfregaço foi obtido. As lâminas contendo o material foram lavadas delicadamente com metanol absoluto e em seguida, secas ao ar por aproximadamente 30 minutos. No dia seguinte os esfregaços foram corados conforme descrito nos métodos hematológicos, com corante Giemsa (May-Grünwald-Giemsa) (MELLO; VIDAL, 1978). As lâminas preparadas foram analisadas com óleo de imersão por microscopia ótica (1000x de aumento) para identificação e quantificação de micronúcleos e núcleos com formato alterado nos eritrócitos. Para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados foram analisados 2.000 eritrócitos por animal (1.000 eritrócitos por lamina, duas lâminas por animal) e a frequência de eritrócitos micronucleados visualizados foi contabilizada.

Para reconhecimento dos micronúcleos obedeceu-se aos seguintes critérios: os micronúcleos (a) devem ter um contorno regular, redondo ou oval e estar dentro do citoplasma da célula; (b) apresentar coloração semelhante ao núcleo principal; (c) devem

¹O CERAM, centro pelo qual as coletas de sangue foram realizadas, possui autorização do SISBIO E CEUA para tal.

possuir diâmetro menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal; (d) devem estar no mesmo plano de foco do principal; (e) devem estar separados ou marginalmente justapostos ao núcleo principal, de modo que haja identificação clara do limite nuclear de ambos (Figura 4).

Figura 4 - Esquema com alguns critérios para a identificação dos Micronúcleos (MN).



FONTE: Gabriela Geremia (2015).

(A) MN com menos que 1/3 do tamanho do núcleo e dentro do citoplasma da célula;

(B) MN com coloração semelhantes à do núcleo e no mesmo plano de foco;

(C) MN separado marginalmente do núcleo.

3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados utilizou-se o software "Statistical Package for the Social Science" (SPSS) versão 6.0. Os dados obtidos foram analisados por ANOVA de uma via (teste de Duncan) para análises múltiplas. Para comparação entre dois grupos ou características, o teste t de *student* para amostras independentes (teste de Levene) para foi utilizado, sendo considerados estatisticamente diferentes para um $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 16 tartarugas marinhas no total, sendo 14 identificadas como *Chelonia mydas*, 1 como *Caretta caretta*, e 1 delas não foi passível de identificação, sendo considerada indefinida. Este último espécime foi originalmente cadastrado no sistema do CERAM como *Lepidochelys olivacea*, porém, tendo em vista as características morfológicas e a literatura presente a respeito de hibridização, acredita-se que se trata de um híbrido entre *C. caretta* e *L. olivacea* (Figura 5).

Figura 4 - Indivíduo possivelmente híbrido entre *C. caretta* e *L. olivacea*.



Fonte: Arquivo CERAM (2013)

Para fins de equiparação nas análises estatísticas, este indivíduo foi por vezes analisado juntamente com aquele propriamente identificado como *C. caretta*, e está identificado ao longo do trabalho como "*C. caretta**". É importante também ressaltar que dois indivíduos no presente estudo foram, previamente a coleta de sangue, tratados com antibiótico no CERAM, e estão devidamente identificados ao longo do trabalho.

Dos 16 indivíduos analisados, quatro foram reabilitados e soltos e o restante foi à óbito. Todos os animais se apresentavam debilitados na chegada ao CERAM, e o tempo de reabilitação variou entre um e 191 dias (Quadro 1).

Quadro 1 - Indivíduos analisados no estudo

Indivíduo	Espécie	Diagnóstico	Motivo de Entrada	Reabilitação	Local	Entrada
3370	<i>C. mydas</i>	Óbito	A	23 dias	Oásis	Verão 2014
3358	<i>C. mydas</i>	Óbito	B	1 dia	Cidreira	Verão 2014
3589	<i>C. mydas</i>	Óbito	B	6 dias	Xangri-Lá	Verão 2015
3531	<i>C. mydas</i>	Óbito	C	104 dias	Quintão	Primavera 2014
3399	<i>C. mydas</i>	Óbito	A	17 dias	Nova Tramandaí	Outono 2014
3564	<i>C. mydas</i>	Óbito	B	1 dia	Cidreira	Verão 2015
3530	<i>C. mydas</i>	Soltura	D	96 dias	Cidreira	Primavera 2014
3664	<i>C. mydas</i>	Óbito	B	15 dias	Cidreira	Outono 2015
3665	<i>C. mydas</i>	Óbito	B	15 dias	Tramandaí	Outono 2015
3394	<i>C. mydas</i>	Óbito	A	18 dias	Magistério	Outono 2014
3661	<i>C. mydas</i>	Óbito	B	26 dias	Tramandaí	Outono 2015
3663	<i>C. mydas</i>	Óbito	B	23 dias	Tramandaí	Outono 2015
3395	<i>C. mydas</i>	Óbito	A	28 dias	Magistério	Outono 2014
3852#	<i>C. mydas</i>	Soltura	B	121 dias	Quintão	Primavera 2015
3929#	<i>C. caretta</i>	Soltura	B	77 dias	Oásis	Verão 2016
3278	<i>C. caretta*</i>	Soltura	A	191 dias	Quintão	Primavera 2013

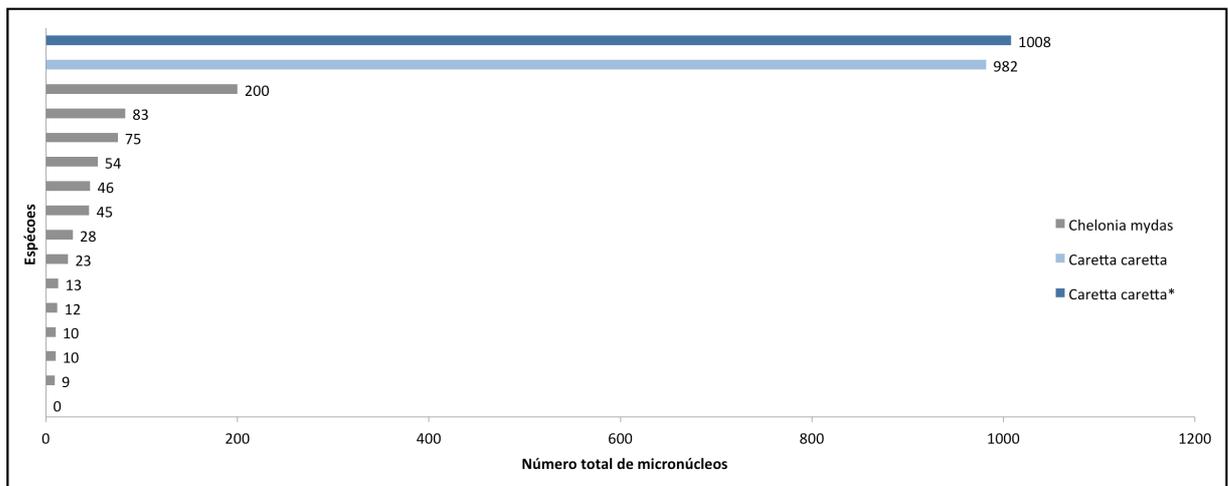
Fonte: Autora (2016)

Nota: A: encalhada e debilitada, B: debilitada, C: nadadeira anterior direita mutilada, D: nadadeira anterior esquerda mutilada

4.1 NÚMERO TOTAL DE MICRONÚCLEOS

O número total de micronúcleos (TMN) variou entre 0 e 1.008, em um total de 2.000 células contabilizadas, sendo que os maiores valores foram encontrados nos indivíduos 3278, 3929 e 3852 (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Número total de micronúcleos (TMN) para cada indivíduo estudado.



Fonte: Autora (2016)

A quantidade e a variação de TMN entre os indivíduos foi compatível com aqueles encontrados em Borrat *et al.* (2011), que encontrou um mínimo de 19 micronúcleos no controle negativo e um máximo de 1.254 no positivo, em um total de 2.000 eritrócitos de *C. mydas* contabilizados. Neste estudo, os autores sugerem que a variação entre os controles ocorreu pelo fato de que o controle positivo se encontrava em uma região onde o lixiviado de cultivos de arroz é carregado por um canal que desemboca no mar, na Área Protegida de Cerro Verde, Uruguai. No nosso trabalho, os indivíduos que apresentaram o maior número total de micronúcleos foram os dois indivíduos que receberam tratamento com antibiótico e o espécime que foi classificado como híbrido.

Estudos relacionados com toxicidade de antibióticos mostram que em determinadas doses, estes medicamentos podem ter potencial mutagênico em organismos (FUJIMOTO *et al.*, 2012; ISIDORI *et al.*, 2005). Acredita-se, com base nestes resultados, que o elevado número de TMN encontrados deve-se à ação dos medicamentos nos indivíduos em questão quando comparados aos outros indivíduos. O número TMN destes também pode ser comparado àqueles expostos à agrotóxicos em Borrat *et al.* (2011), corroborando a ideia de que algum xenobiótico possa ter causado esta alteração de frequência. Quanto ao espécime *C. caretta** acredita-se que pôr este indivíduo tratar-se de um possível híbrido haja um número de micronúcleos diferente em relação à outras espécies estudadas. Como não temos um “n” relevante para afirmar este dado ou outros estudos que corroborem com esta hipótese, só podemos sugerir que a genética diferenciada deste único indivíduo possa ter influencia sobre os mecanismos de reparo gênico e de controle do ciclo celular causando o fenômeno observado.

4.2 MICRONÚCLEOS, BROTAMENTOS E CÉLULAS NORMAIS

Na Tabela 1, estão dispostas as médias \pm EPM dos números de células com micronúcleos, com brotamentos e de células normais encontradas em cada indivíduo.

Como já foi discutido, os indivíduos 3278, 3929 e 3852 são os que um maior número médio de micronúcleos. Por outro lado, estes indivíduos não tiveram da mesma forma uma maior quantidade de células com brotamento. Os indivíduos 3370, 3395 e 3399 (em ordem crescente) foram os espécimes com maior número de brotamentos. Quando todas as células alteradas (MN + BRT) foram agrupadas, os mesmo organismos citados (3278, 3929 e 3852) apresentaram o maior número médio de alterações em comparação aos outros e, por consequência, o menor número médio de células normais.

Tabela 1 - Número de células micronucleadas (MN), com brotamentos (BRT), normais, e alteradas (MN+BRT) encontradas em cada indivíduo estudado.

ID CERAM	Espécie	Indivíduo	MN	BRT	MN + BRT	Normais
3358	Chelonia mydas	1	4,5 ± 1,5	34 ± 2	38,5 ± 0,5	961,5 ± 0,5
3394	Chelonia mydas	2	23 ± 22	11,5 ± 3,5	34,5 ± 18,5	965,5 ± 18,5
3395	Chelonia mydas	3	41 ± 3,5	41,5 ± 10,5	83 ± 7	917 ± 7
3399	Chelonia mydas	4	6 ± 4	31,5 ± 4,5	37,5 ± 8,5	962,5 ± 8,5
3370	Chelonia mydas	5	0	69 ±	69 ±	931 ±
3665	Chelonia mydas	6	22,5 ± 5,5	18 ±	40,5 ± 5,5	959,5 ± 5,5
3664	Chelonia mydas	7	14 ± 5	2,5 ± 0,5	16 ± 5	984 ± 5
3663	Chelonia mydas	8	37,5 ± 2,5	0,5 ± 0,5	38 ± 3	962 ± 3
3661	Chelonia mydas	9	27 ± 17	24,5 ± 16,5	51,5 ± 33,5	948,5 ± 33,5
3530	Chelonia mydas	10	11,5 ± 9,5	3 ± 1	14,5 ± 10,5	985,5 ± 10,5
3589	Chelonia mydas	11	5 ± 2	5,5 ± 1,5	10,5 ± 3,5	989,5 ± 3,5
3564	Chelonia mydas	12	6,5 ± 5,5	1 ± 1	7,5 ± 4,5	992,5 ± 4,5
3531	Chelonia mydas	13	5 ± 3	3,5 ± 2,5	8,5 ± 5,5	991,5 ± 5,5
3852#	Chelonia mydas	14	100 ± 47	21 ± 12	121 ± 35	879 ± 35
3929#	Caretta caretta	15	491 ± 140	21 ± 14	512 ± 126	488 ± 126
3278	Caretta caretta*	16	504 ± 33	19 ± 5	523 ± 38	477 ± 38

Fonte: Autora (2016).

Nota: Os dados são apresentados como média±EPM (erro padrão médio).

Indica os indivíduos que receberam tratamento com antibiótico previamente à coleta e análise *Caretta caretta*

* Indica o indivíduo que acredita-se ser um híbrido.

Estudos realizados com *Tupinambis merianae* (DUMÉRIL; BIBRON, 1839) e *Phrynops hilarii* (DUMÉRIL; BIBRON, 1835) determinaram o número basal de micronúcleos (BFMN) para indivíduos destas espécies provenientes da Estação Zoológica Experimental em Santa Fé, Argentina; uma área semi-natural potencialmente protegida da ação externa de poluentes. Schaumburg *et al.* (2012) determinaram que para *T. merinae* o número basal de micronúcleos em um total de 1.000 eritrócitos analisados é de 0.95±0.27. Já para a espécie *P. hilarii*, Latorre *et al.* (2014) determinaram um BFMN de 3.56±1.39 também em relação a 1.000 eritrócitos.

Quando comparamos os resultados de Schaumburg *et al.* (2012), realizados em duas espécies de répteis, com os nossos dados nota-se que há uma semelhança na frequência de alterações em alguns indivíduos mas não em todos. No geral, as tartarugas marinhas analisadas neste estudo apresentam um número médio de células micronucleadas maior que o número basal de referência encontrado em indivíduos de *T. merianae* e *P. hilarii*. O BFMN destas duas últimas espécies, embora distintas das analisadas no presente estudo, permite inferir que tartarugas marinhas apresentam um número elevado de micronúcleos que pode ser

devido a uma fisiologia e metabolismo diferentes, por estarem inseridas no ambiente marinho e até mesmo por estarem expostas à uma grande quantidade de poluentes ao longo de todo seu ciclo de vida.

Zuñiga, *et al.* (1996) reuniram dados de análises de micronúcleos de 35 espécies de mamíferos e demonstraram valores abaixo dos obtidos no presente trabalho. O maior número total de micronúcleos foi encontrado uma espécie de primata com 2,5 MN/1.000 eritrócitos e o menor em uma espécie de roedor e outro primata, ambos com 0.03MN/1.000 eritrócitos. Mais recentemente, em um trabalho semelhante, foram compilados dados de 54 espécies, incluindo mamíferos, répteis e aves. Dentro do grupo de répteis, os números de micronúcleos para 1.000 eritrócitos variam entre 0 e 0,3 (ZUÑIGA-GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Acredita-se que o número de micronúcleos em espécies de tartaruga marinha seja mais alto em comparação à outras espécies de répteis mas que também tenha uma forte influência da poluição marinha, sendo ainda mais alto quando analisado em indivíduos expostos à compostos químicos potencialmente tóxicos (Borrat *et al.*, 2011).

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AGRUPAMENTOS DE INDIVÍDUOS

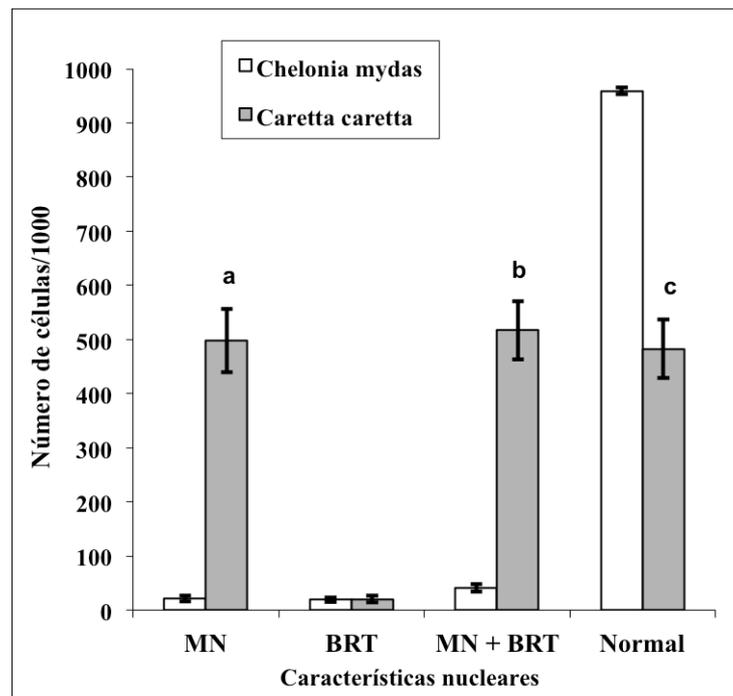
No Gráfico 2, três agrupamentos de indivíduos foram estabelecidos afim de melhor destacar e comparar as diferenças entre eles. O grupo "*C. mydas*" representa todos os indivíduos de tartaruga-verde estudados, excluindo o indivíduo número 3852 (ver Tabela 1). O agrupamento "*C. mydas* + antibiótico" representa o indivíduo 3852, e o grupo "*C. caretta* + *C. caretta**" representa os indivíduos números 3929 e 3278, os únicos espécimes classificados como adultos neste estudo. Nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas em relação aos números de células com brotamentos. Por outro lado, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas em relação às células micronucleadas.

Nesta análise verificou-se uma diferença significativa de micronúcleos (MN), e células alteradas totais (MN + BRT) do agrupamento "*C. mydas*" em relação aos outros dois grupos. Isto se deve possivelmente ao fato de que o primeiro grupo apresenta apenas tartarugas-verdes que não foram tratadas previamente com antibiótico, mostrando que este medicamento possivelmente altera o número de micronúcleos encontrados nos indivíduos, como mencionado anteriormente. Além disso, o grupo "*C. mydas* + antibiótico" também diferiu em MN e MN + BRT do grupo "*C. caretta* + *C. caretta**". Portanto, soma-se o fato de que este último grupo é constituído por espécies diferentes. Além disso, as tartarugas classificadas como *C. mydas* apresentam uma massa média de 4,33 kg enquanto a *C. caretta* e

possível híbrida apresentam 32 e 19,5 kg, respectivamente. O tamanho e massa destes últimos não os classificam como adultos, porém os diferencia dos indivíduos de *C. mydas*.

Schaumburg *et al.* (2014) encontrou uma fraca correlação entre a massa de indivíduos recém nascidos de *Tupinambis merianae* e o número de micronúcleos, e não encontrou relação entre os parâmetros morfométricos dos animais em nenhuma faixa etária estudada. Em estudo semelhante, Schaumburg *et al.* (2012) analisou apenas indivíduos adultos de *T. merianae* e também não encontrou relação significativa entre micronúcleos e tamanho ou massa dos animais analisados. Poletta *et al.* (2008) encontrou um padrão estável nos valores basais de micronúcleos entre juvenis de *Caiman latirostris*, sendo estes independentes do tamanho do animal.

Gráfico 2 - Comparação entre as características nucleares de três agrupamentos de indivíduos de tartarugas marinhas.



Fonte: Autora (2016)

Nota: Os dados são apresentados como média \pm EPM. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes para um $P < 0,05$.

^a difere de *C. mydas* + antibiótico e *C. caretta* + *C. caretta*

^b difere de *C. caretta* + *C. caretta**

^c difere de *C. mydas*

^d difere de *C. mydas* e *C. mydas* + antibiótico

Quando comparam-se os indivíduos de *C. mydas* e o grupo "*C. caretta* + *C. caretta**", é possível notar a diferença significativa de micronúcleos e células alteradas totais, (MN+BRT) apresentando maiores valores no segundo grupo (Gráfico 2). Conseqüentemente, o número de células normais foi menor no segundo grupo em relação ao primeiro. Estes resultados são diferentes dos encontrados em Poletta *et al.* (2008), Schaumburg *et al.* (2012) e Schaumburg *et al.* (2014), mas podem estar relacionados à outros fatores. Além do fato de destes indivíduos apresentarem diferentes parâmetros corpóreos, eles são também de espécies diferentes. O primeiro grupo é composto inteiramente por espécimes de *Chelonia mydas*, enquanto o outro grupo apresenta *Caretta caretta* e um possível híbrido desta espécie. Portanto, ressalta-se que a diferença no número de micronúcleos entre os dois grupos pode estar relacionada com a diferença genética que ocorre entre espécies.

4.4 ESTADO DE SAÚDE DOS INDIVÍDUOS ANALISADOS

Os indivíduos de tartaruga marinha utilizados neste estudo, com, são provenientes do centro de reabilitação (CERAM). Todos eles apresentavam-se debilitados na chegada ao centro e a maioria dos casos resultou em óbito.

Xavier (2011) ao analisar a fauna parasitológica gastrointestinal de indivíduos de *C. mydas* encontrou, pela primeira vez no Brasil, um parasita cestódeo, provavelmente proveniente do alimento oferecido ao animal durante os dois meses que permaneceu em reabilitação. Além desta descoberta, também foram encontrados, em grande quantidade, resíduos sólidos nos tratos gastrointestinais destas tartarugas. Posteriormente, Rigon (2012) estudou a incidência de resíduos sólidos nos tratos gastrointestinais de *C. mydas* e concluiu que 90% dos indivíduos analisados tinham ingerido resíduo sólido. Uma análise conjunta de lesões gastrointestinais, presentes na maioria dos animais, também sugere que quanto maior a quantidade de resíduos ingeridos, mais lesões.

Além destes estudos, também já foi registrada a contaminação por metais pesados em tartarugas marinhas na área de estudo (MEDEIROS, 2011), bem como a incidência de feohifomicose, uma doença causada por fungos demáceos, em um indivíduo de *C. caretta* em reabilitação no CERAM (DOMICIANO *et al.*, 2011).

Estes estudos fornecem um panorama sobre o estado de saúde e de contaminação das tartarugas marinhas encontradas encalhadas e/ou encaminhadas para reabilitação no Litoral do Rio Grande do Sul. No geral, estes animais se encontram muito debilitados e doentes e, por isso, mais suscetíveis à doenças do que indivíduos saudáveis. A alta incidência de

micronúcleos nas tartarugas analisadas neste estudo pode ter relação com a exposição intensa a poluentes sofrida por estes animais, assim como a ineficiência dos seus sistemas de reparo em lidar com quebras cromossômicas.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram analisadas 16 tartarugas marinhas, das quais 14 foram identificadas como *Chelonia mydas*, apenas uma como *Caretta caretta* e a última discute-se a possibilidade de se tratar de um indivíduo híbrido entre *C. caretta* e *L. olivaceae*.

O número total de micronúcleos variou entre 0 e 1.008 entre todos os indivíduos, de um total de 2.000 eritrócitos contabilizados. O maior número foi contabilizado no indivíduo considerado híbrido, seguido pela *C. caretta* e um espécime de *C. mydas*. Estes últimos dois indivíduos receberam antibiótico antes da coleta de sangue, e acredita-se que o número elevado de MN deva-se à isso. Discute-se a possibilidade de a maior frequência de MN no híbrido estar relacionada com a sua genética diferenciada em relação aos outros indivíduos.

O número basal de micronúcleos estudado em outros animais, incluindo répteis, não condiz com os números médios encontrados no presente estudo. As tartarugas marinhas deste estudo apresentam um número médio de células micronucleadas maior que o número basal de referência estudado em outros répteis. O mesmo foi evidenciado em estudo semelhante com *C. mydas*. Acredita-se que o número de MN em tartarugas marinhas é mais alto em comparação a outros animais. Entre os motivos inclui-se um diferente metabolismo ou até mesmo exposição à uma grande quantidade de poluentes ao longo de todo ciclo de vida.

O grupo de indivíduos envolvendo dois espécimes adultos apresentou diferença significativa de micronúcleos em relação ao agrupamento de indivíduos jovens. Acredita-se que o maior número de MN em indivíduos adultos deva-se à acumulação de danos ao longo do tempo. Porém, não descarta-se a possibilidade desta diferença estar ligada à diferenciação entre espécie, já que os grupos não apenas separam faixa etária, mas também diferentes espécies.

Os indivíduos analisados neste estudo se apresentaram, no geral, muito debilitados e a maioria dos casos resultou em morte. Acredita-se, portanto, que a fragilidade destes organismos possa também estar ligada à alta incidência de micronúcleos, entre outros fatores já citados.

O baixo número amostral deste trabalho não permite uma interpretação conclusiva dos dados. Porém representa, possivelmente, o primeiro no Brasil a investigar a presença de micronúcleos em tartarugas marinhas.

Portanto, enfatiza-se a necessidade de que mais estudos na área sejam realizados, afim de melhor esclarecer os padrões encontrados neste estudo. Além disso, recomenda-se um

estudo genético do espécime classificado como híbrido neste trabalho, para melhor compreensão dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA *et al.* Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, ano 1, n. 1, p. 12-19. Disponível através de: <<http://www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR/article/view/87>>. Acesso em: 13/06/2016.

AMEAÇA de extinção. **Projeto Tamar**, 2011. Disponível em: <<http://www.projtotamar.org.br/interna.php?cod=100>>. Acesso em: 14/06/2016.

BALAZS, G. H. Growth rates of immature green turtles in the Hawaiian Archipelago. In: BJORN DAL, K. A. (Edt). **Biology and conservation of sea turtles**. Washington, USA: Smithsonian Institution, p. 117-125. 1995.

BARRETO, J. S. *et al.* Primeiro registro de tartaruga-verde, *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758), na Laguna Tramandaí, Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MARINHA, 2., 2010, Tramandaí e Imbé. **Livro de Resumos**. Tramandaí: DABMAR, 2010. p. 12.

BELIËN, J. A. *et al.* Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. **Carcinogenesis**, Inglaterra, GB, v. 16, n. 10, p. 2395- 2400. 1995.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, 22, 25-34, 1999.

BICKHAM, J. W. *et al.* Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 463, n. 1, p. 33-51. 2000.

BJORN DAL, K. A. Priorities for research in foraging habitats. In: ECKERT, K. L. *et al.* (Eds.). **Research and management techniques for the conservation of sea turtles**. Washington, USA : IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group, n. 4. 1999. p. 12-14.

BORRAT, V. *et al.* Evaluación del estado de la tortuga verde (*Cheloniemydas*) mediante el uso de biomarcadores de genotoxicidad en el área protegida “Cerro Verde e Islas de la Coronilla” próxima al Canal Andreoni. In: JORNADA SOBRE TARTARUGAS

MARINHAS DO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL (ASO), 5., 2011, Florianópolis. **Livro de Resumos ...**. Florianópolis, 2011. p. 88-91.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n. 444, de 17 de dezembro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 18 dez. 2014. Seção 1, p. 121.

BUGONI, L.; KRAUSE, L.; PETRY, M. V. Diet of sea turtles in southern Brazil. **Chelonian Conservation and Biology**, Lunenburg, v. 4, n. 3, p. 685-688. 2003.

CALLIARI, L. R. *et al.* Variabilidade das dunas frontais no Litoral Norte e Médio do Rio Grande do Sul, Brasil. **Gravel**, Porto Alegre, RS, v. 3, n.1, p. 15-30. 2005

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K.L. MYERS, K.S. "Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects." **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 47.11 (1990): 2123-2136.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K.L. MYERS, K.S. "Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects." **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 47.11 (1990): 2123-2136.

CASALE, P.; TUCKER, A. D. **The IUCN Red List of Threatened Species: *Caretta Caretta***. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20154>>. Acesso em: 11/06/2016.

COLLAZO, J. A.; BOULON, R. JR.; TALLEVAST, L. T.. Abundance and growth patterns of *Cheloniemydas* in Culebra, Puerto Rico. **Journal of Herpetology**, Athens, v. 26, n. 3, p. 293-300. 1992.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química nova**, 31(7), 1820-1830, 2008.

ERDTMAN, B. A Genotoxicidade Nossa de Todos os Dias. In: SILVA, J.; ERDTMAN, B.; HENRIQUES J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 23-46.

FERRARO *et al.* 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**. Ribeirão Preto, SP, v.27, n. 1, p. 103-107. 2004.

FERRARO, L.W; HASENACK, H. Clima. In: WÜRDIG, N. L.; FREITAS, S. M. F. **Ecosistemas e biodiversidade do litoral norte do RS**. Porto Alegre: Nova Prova. 2009. p. 26-31.

FUJIMOTO, R. Y. *et al.* Toxicidade e risco ambiental da oxitetraciclina e efeito em leucócitos de mató grosso (*Hyphessobrycones*). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Itajaí, v. 7, n. 2, p. 11-15. 2012.

GARDNER, S. C. *et al.* Heavy metal accumulation in four species of sea turtles from the Baja California peninsula, Mexico. **Biometals**, London, GB, v. 19, n. 1, p. 91-99

HAASE *et al.* Qualidade das águas superficiais do Litoral Norte e Médio do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 22., 2003, Joinville. **Anais ...** Joinville, 2003. p. 1-16.

HAMANN, M. *et al.* Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. **Endangered Species Research**, Oldendorf/Luhe, Germany, v. 11, n.3 , p. 245-269. 2010.

HOOK, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. **Integrated Environmental Assessment and Management**, Pensacola, US, v. 999, n. 999, p. 1-15. 2014.

ISIDORI, M. *et al.* Toxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, NL, v. 346, n. 1-3, p. 87-98. 2005.

KELLER, J. M. *et al.* Organochlorine contaminants in sea turtles: correlations between whole blood and fat. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, US, v. 23, n. 3. p.726-738. 2003.

KELLER, J. M.; KUCKLICK, J. R.; MCCLELLAN-GREEN, P. D. Organochlorine Contaminants in Loggerhead Sea Turtle Blood: Extraction Techniques and Distribution Among Plasma and Red Blood Cells. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, US, v. 46, n. 2, p. 254-264. 2004.

LATORRE, M. A. *et al.* Basal frequency of micronuclei and hematological parameters in the Side-necked Turtle, *Phrynopshilarii* (Duméril & Bibron, 1835). **Acta Herpetologica**, Firenze, v. 10. n. 1, p. 31-37. 2015.

LINDBERG *et al.* Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 617, n. 1-2, p. 33-45. 2007.

LONGWELL, A. C.; YERGANIAN, G. Some observations on nuclear budding and nuclear extrusions in a Chinese hamster cell culture, **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, Estados Unidos, v. 34, n. 1, p. 53-69. 1965.

MAKOWSKI, C.; SEMINNOF, J. A.; SALMON, M. Home range and habitat use of juvenile Atlantic green turtles (*Cheloniemydas* L.) on shallow reef habitats in Palm Beach, Florida, USA. **Marine Biology**, Berlin, DE, v. 148, n. 5, p. 1167-1179. 2006.

MARCOVALDI, M. A. A. G. de; SANTOS, A. S. dos; SALES, G. (Org.) **Plano de Ação Nacional para Conservação das Tartarugas Marinhas**. Brasília: ICMBio, 2011. (Série espécies ameaçadas, n. 25)

MEDEIROS, L. **Metais pesados em tecidos de *Chelonia mydas* encalhadas no Litoral do Rio Grande do Sul, Brasil**. 2011. 40 f. Dissertação (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso Superior de Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha, Imbé. 2011.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 665-676. 1978.

MUSICK, J. A.; LIMPUS, C. J. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (Eds) **The biology of sea turtles**. Florida: CRC, 1997. p. 137-164.

NAKASHIMA, S. B. **Dieta da tartaruga-verde *Chelonia mydas* Linnaeus, 1758 (Testudines, Cheloniidae) no Litoral Norte do Rio Grande do Sul**. 2008. 38 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Biociências, Porto Alegre, 2008.

NORMANN, C. A. B. M. ; CARDOSO, V. V. ; MOREIRA, J. C. F. . Micronuclei in Red Blood Cells of Armored Catfish *Hypostomus plecostomus* exposed at potassium dichromate. **African Journal of Biotechnology**, v. Vol. 7, p. 12-16, 2008.

PALHARES, D.; GRISOLIA C. K. Comparision between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, SP, v. 25, n. 3, p. 281-284. 2002.

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**, Amsterdam, NL, v. 650, n. 2. p. 202-209.2008.

RAYA-RODRIGUEZ, M.T. O uso de bioindicadores para avaliação da qualidade do ar de Porto Alegre. In: ZURITA, M.L.L. (Org.), TOLFO, A.M. (Org.) **A qualidade do ar em Porto Alegre**. Porto Alegre: Secretaria Municipal de Meio Ambiente, 2000.p.68-76.

RIGON, C. T. **Análise da ingestão de resíduos sólidos e impactos no trato gastrointestinal em juvenis de *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Litoral Norte e Médio Leste do Rio Grande do Sul, Brasil. 2012.** 66 f. Dissertação (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso superior de Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha, Imbé. 2012.

SANTOS *et al.* Avaliação do Estado de Conservação da Tartaruga Marinha *Caretta caretta* Linnaeus, 1758 no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, ano 1, n. 1. p. 3-11. 2011. Disponível através de: <<http://www.icmbio.gov.br/revistaeletronica/index.php/BioBR/article/view/86>>. Acesso em: 13/06/2016.

SCHAUMBURG, L. G. *et al.* Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, US, v. 84, n. 1, p. 99-103. 2012.

SCHAUMBURG, L. G. *et al.* Spontaneous genetic damage in the tegu lizard (*Tupinambis merianae*): The effect of age. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 766, n. 1, p. 5-9. 2014.
SEMINOFF, J. A. **The IUCN Red List of Threatened Species: *Chelonia mydas***. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T4615A11037468.en.>>. Acesso em: 13/06/16

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMAN, B.; HENRIQUES J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 167-174.

SILVA, L. M. **Captura incidental de tartarugas marinhas no estuário da lagoa dos patos e região costeira adjacente – RS – Brasil.** 2004. 23f. Monografia (Graduação) - Escola de Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pelotas, Curso de Ciências Biológicas, Rio Grande, 2004.

SOTO, J. M. R.; BEHEREGARAY, R. C. P. *Chelonia mydas* in the northern region of the Patos Lagoon, south Brazil. **Marine turtle newsletter**, v. 77, p. 10-11, 1997. Disponível em: < <http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn77/mtn77p10.shtml>>. Acesso em: 11/06/2016.

STICH, H. F.; ROSIN, M. P. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **International journal of cancer**, New York, US, v. 31, n. 3, p. 305-308. 1983.

TAVARES, M. *et al.* Panorama do recebimento de tartarugas marinhas pelo CERAM (CECLIMAR/UFRGS) entre agosto 2008 e agosto 2011. In: **JORNADA SOBRE TARTARUGAS MARINHAS DO ATLÂNTICO SUL OCIDENTAL**, 5., 2011, Florianópolis. **Livro de Resumos ...**. Florianópolis, 2011 p. 72-75.

VILLWOCK, J. A.; TOMAZELLI, L. J. Planície costeira do Rio Grande do Sul: gênese e paisagem atual. In: BECKER *et al.* **Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Ministério do Meio Ambiente - Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Brasília: SCAN, 2007. p. 20-33.

XAVIER, R. A. **Análise da fauna parasitológica gastrointestinal de *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) no Litoral Norte e Médio do Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso Superior de Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Marinha, Imbé. 2011.

YU, S. *et al.* Metal accumulation and evaluation of effects in a freshwater turtle.

Ecotoxicology, London, England, v. 20, n. 8, p.1801-1812. 2011.

ZÚÑIGA-GONZÁLES, G. *et al.* Differences in the number of

micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans:

Spontaneous micronuclei in 43 species. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 494, n. 1-2, p. 161-167. 2001.

ZÚÑIGA-GONZÁLES, G. *et al.* Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds). : Part two. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 467, n. 1, p. 99-103. 2000.

ZÚÑIGA, G. *et al.* Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 369, n. 1-2, p. 123-127. 1996.