

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ÊNFASE EM BIOLOGIA MARINHA E COSTEIRA**

**JULIANA CORRÊA DOS SANTOS**

**ATIVIDADE DA ENZIMA PARAOXONASE-1 EM MAMÍFEROS, AVES E  
RÉPTEIS**

**IMBÉ**

**2019**

**JULIANA CORRÊA DOS SANTOS**

**ATIVIDADE DA ENZIMA PARAOXONASE-1 EM MAMÍFEROS, AVES E  
RÉPTEIS**

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

Orientador: Dra. Marcia Trapp

Co-orientador: Me. Derek Blaese de Amorim

**IMBÉ**

**2019**

#### CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Juliana Corrêa dos  
Atividade da Enzima Paraoxonase-1 em Mamíferos,  
Aves e Répteis / Juliana Corrêa dos Santos. -- 2019.  
57 f.  
Orientadora: Marcia Trapp.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Biologia  
Marinha e Costeira, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Paraoxonase-1. 2. *Arctocephalus australis*. 3.  
*Spheniscus magellanicus*. 4. *Nannopterum brasilianus*.  
5. *Trachemys scripta elegans*. I. Trapp, Marcia,  
orient. II. Título.

**JULIANA CORRÊA DOS SANTOS**

**ATIVIDADE DA ENZIMA PARAOXONASE-1 EM MAMÍFEROS, AVES E  
RÉPTEIS**

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

Orientador: Dra. Marcia Trapp

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Dra. Marcia Trapp

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

ProfªDra. Sandra Costa Valle

Universidade Federal de Pelotas

---

Dra. Mariana Leivas Müller Hoff

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**IMBÉ**

**2019**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, principalmente, aqueles que fizeram de tudo para que eu entrasse e concluísse a faculdade, respeitando meu tempo e vibrando comigo as pequenas conquistas.

Agradeço imensamente e do fundo do meu coração a todas as pessoas que me apoiaram nesta montanha russa que é a faculdade. Foi preciso ter paciência para aguentar meus surtos, meu mau humor e minha indisponibilidade para vida social.

Agradeço a todos os animais pela oportunidade de ter trabalhado, convivido e crescido com cada um que conheci. Conhecer os animais é descobrir a si mesmo.

Agradeço à UFRGS e à UERGS pela educação pública de qualidade, e isto inclui os professores e funcionários de ambas as instituições.

*Em algum lugar, alguma coisa incrível está  
esperando para ser conhecida.*

*Carl Sagan.*

## RESUMO

O uso intensivo de pesticidas na agricultura tem causado a contaminação de recursos hídricos brasileiros. Os ecossistemas marinhos e costeiros tornam-se receptáculos temporários ou finais de uma grande variedade e quantidade de contaminantes, recebendo uma carga constante de substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas através do lançamento direto de efluentes ou indiretamente através de rios. Os agrotóxicos organofosforados possuem atividade muito eficiente e alta persistência no ambiente. Enzimas conhecidas como esterases, incluindo a Paraoxonase-1 (PON-1), possuem a característica de hidrolisar compostos tóxicos em seres humanos, como os pesticidas. Estas enzimas oferecem proteção aos mamíferos contra os compostos organofosforados, enquanto as aves não são protegidas da mesma forma, sendo mais suscetíveis a esses compostos. PON-1 pode desintoxicar o organismo de pesticidas organofosforados, incluindo agentes neurotóxicos, contudo, sua baixa atividade no organismo aumentaria a sensibilidade aos efeitos agudos destes compostos xenobióticos. A partir destas informações, este estudo analisou a atividade de PON-1 em mamíferos marinhos (*Arctocephalus australis*), aves marinhas e costeiras (*Spheniscus magellanicus* e *Nannopterum brasilianus*), quelônios de água doce (*Trachemys scripta elegans*), comparando-os com uma espécie de mamífero terrestre (*Rattus norvegicus*) e uma de ave terrestre (*Gallus gallus domesticus*). Também foram analisados parâmetros bioquímicos de todas as espécies, como glicemia, triglicérides, colesterol, colesterol-HDL e lactato. A atividade de PON-1 foi 200 vezes maior em *R. norvegicus* quando comparada ao mamífero marinho *A. australis*, e maior que a encontrada nas aves marinhas e terrestres e nos quelônios de água doce. Dentre as aves, *G. g. domesticus* apresentou valores maiores ( $P < 0,05$ ) da atividade da PON-1 em relação ao grupo *N. brasilianus*. Quando comparada às aves, *T. s. elegans*, apresentou valores maiores de PON-1 em relação a *N. brasilianus*. Também foi analisada a correlação entre colesterol-

HDL e PON-1 e foi encontrada correlação positiva entre esses parâmetros somente em *R. norvegicus* ( $r=0,672$ ,  $P= 0,047$ ). Os perfis bioquímicos de mamíferos terrestres e marinhos diferiram significativamente quanto à glicemia, triglicerídeos, colesterol total e colesterol-HDL. Já nas aves amostradas, foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros glicemia, triglicerídeos e colesterol. *G. g. domesticus* e *S. magellanicus* foram diferentes significativamente de *N. brasiliensis* quanto ao lactato. O grupo dos quelônios/répteis foi comparado com dados encontrados em literatura sobre tartarugas-marinhas. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros glicemia, triglicerídeos e colesterol com alguns dos estudos de comparação. A descrição do perfil bioquímico especialmente das espécies *N. brasiliensis* e de *S. magellanicus* é de grande importância para a compreensão da fisiologia destas espécies, visto que existem poucos dados a respeito destas espécies na literatura. Esses dados poderão ser utilizados em estudos futuros, inclusive para aprimorar os cuidados durante períodos de reabilitação em centros de conservação marinhos. Além disso, considerando que a atividade da enzima PON-1 é um fator protetor para a toxicidade de organofosforados, a confirmação de que existe baixa atividade desta enzima nos animais marinhos e costeiros encontrados na costa do litoral Norte do RS reforça a necessidade de monitoramento do uso de agrotóxico na agricultura para a conservação das espécies marinhas desta região.



## ABSTRACT

The intensive use of pesticides in agriculture has caused contamination of Brazilian water resources. Marine and coastal ecosystems become temporary or final receptors of a wide variety and quantity of contaminants, receiving a constant load of chemical, organic and inorganic substances through direct discharge of effluents or indirectly through rivers. Organophosphate pesticides have very efficient activity and high persistence in the environment. Enzymes selected as esterases, including Paraoxonase-1 (PON-1), have the ability to hydrolyze toxic compounds in humans such as pesticides. These enzymes protect mammals against organophosphate compounds, while birds are not protected in the same way and are more susceptible to them. PON-1 can detoxify the organism from organophosphate pesticides, including neurotoxic agents, but its low developmental activity increases the sensitivity to acute effects of xenobiotic effects. From this information, this study analyzes the activity of PON-1 in marine mammals (*Arctocephalus australis*), marine and coastal birds (*Spheniscus magellanicus* and *Nannopterum brasilianus*), freshwater turtles (*Trachemys scripta elegans*) and their comparison with one species of a land mammal (*Rattus norvegicus*) and a land bird (*Gallus gallus domesticus*). Biochemical parameters of all species, such as blood glucose, triglycerides, cholesterol, HDL-cholesterol and lactate were also analyzed. PON-1 activity was 200 times higher in *R. norvegicus* when compared to *A. australis* marine mammal, and higher than that found in sea and terrestrial birds and freshwater turtles. When compared to birds, *T. s. elegans* presents higher PON-1 values than *N. brasilianus*. Among birds, *G. g. domesticus* showed higher values ( $P < 0.05$ ) of PON-1 activity compared to *N. brasilianus* group. The correlation between HDL-cholesterol and PON-1 was also analyzed and a positive correlation between these parameters was found only in *R. norvegicus* ( $r = 0.672$ ,  $P = 0.047$ ). Biochemical profiles of terrestrial and marine mammals differ in glycemia, triglycerides, total cholesterol, and

HDL-cholesterol. In the birds sampled, significant differences were observed in the levels of glycemia, triglycerides and cholesterol. *G. g. domesticus* and *S. magellanicus* obtained significant difference in relation to *N. brasiliensis* in lactate. The group of reptiles was compared with data found in the literature on sea turtles. Significant differences in blood glucose, triglyceride and cholesterol levels were observed with some comparison studies. A description of the biochemical profile especially of the species *N. brasiliensis* and *S. magellanicus* is of great importance for understanding the physiology of these species, since there is little data on the impact on the literature. These data can be used in future studies, including to improve care during the recovery of marine conservation centers. In addition, considering that the activity of the enzyme PON-1 is a protective factor for organophosphate toxicity, a confirmation that there is a low activity of this enzyme in marine and coastal animals found on the northern coast of Rio Grande do Sul, with the need for monitor the use of pesticides in agriculture for the conservation of marine species in this region.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Atividade enzimática de Paraoxonase-1 em diferentes substratos. ....	16
<b>Figura 2.</b> Efeitos e modulações biológicas de Paraxonase-1. ....	17
<b>Figura 3.</b> Localização do Litoral Norte do Rio Grande do Sul. ....	20
<b>Figura 4.</b> Exemplar de <i>Arctocephalus australis</i> .....	21
<b>Figura 5.</b> Exemplar de <i>Spheniscus magellanicus</i> .....	22
<b>Figura 6.</b> Exemplares de <i>Nannopterum brasilianus</i> .....	23
<b>Figura 7.</b> Exemplar de <i>Trachemys scripta elegans</i> .....	24
<b>Figura 8.</b> Placa de Elisa utilizada para leitura no espectrofotômetro.....	30
<b>Figura 9.</b> Concentração de Colesterol-HDL (A) e de Colesterol não-HDL (B) nos diferentes grupos de animais estudados .....	37
<b>Figura 10.</b> Atividade de PON-1 nos diferentes grupos de tetrápodes estudados .....	38
<b>Figura 11.</b> Correlação entre concentração sérica de HDL e atividade da enzima PON-1 ..	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros bioquímicos séricos em mamíferos. _____	32
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros bioquímicos séricos em Aves. _____	34
<b>Tabela 3.</b> Paramêtros bioquímicos séricos em Répteis. _____	36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 Paraoxonase	15
1.2 Paraoxonase-1 em tetrápodes	18
1.3 Caracterização do Litoral Norte do Rio Grande do Sul e dos tetrápodes regionais	19
1.4 Perfil bioquímico	24
<b>2 METODOLOGIA</b>	<b>27</b>
2.1 Animais	27
2.2 Coletas de sangue/soro	29
2.3 Dosagens bioquímicas	30
2.3.1 Perfil bioquímico	30
2.3.2 Atividade enzimática de PON-1	31
2.4 Análises estatísticas	31
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>32</b>
3.1 Parâmetros bioquímicos séricos	32
3.1.1 Mamíferos	32
3.1.2 Aves	33
3.1.3 Répteis	35
3.1.4 Colesterol-HDL e Colesterol não-HDL	37
3.2 Atividade da Paraoxonase-1	38
3.3 Correlação Colesterol-HDL e Paraoxonase-1	39
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
4.1 Perfil bioquímico sérico	40
4.2 Atividade enzimática de Paraoxonase-1	44
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso intensivo de pesticidas na agricultura tem causado a contaminação de rios brasileiros por agroquímicos. O impacto do aumento da produção de bens agrícolas no ambiente é notado pela perda da biodiversidade e da qualidade dos recursos hídricos (DELLAMATRICE & MONTEIRO, 2014). Os ecossistemas marinhos tornam-se, de uma forma ou de outra, receptáculos temporários ou finais de uma grande variedade e quantidade de contaminantes, recebendo uma carga constante de substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas através do lançamento direto de efluentes industriais e domésticos, ou indiretamente através de rios, lixiviação de solos e precipitação atmosférica (MORAES *et al.*, 2001). Os agrotóxicos mais utilizados na agricultura são os carbamatos e os organofosforados, os quais possuem atividade inseticida muito eficiente e características de alta persistência no ambiente (DELLAMATRICE & MONTEIRO, 2014). Ecossistemas costeiros, tais como estuários e baías, são os que recebem a maior carga de contaminantes, e por serem regiões de elevada produtividade biológica são também os mais preocupantes (MORAES *et al.*, 2001). Estudos sobre enzimas hidrolases começaram a ser realizados a partir de 1940 (ALDRIDGE, 1953a; ALDRIDGE, 1953b), com plasmas de coelhos, ratos e cavalos hidrolisando os substratos p-nitrofenil acetato, propionato e butirato. A partir destes estudos, foram encontradas moléculas protetoras contra compostos xenobióticos tóxicos, que ficaram conhecidas como esterases.

As esterases são moléculas conhecidas por hidrolisar vários compostos utilizados como drogas por seres humanos como, por exemplo, os pesticidas (WILLIAMS, 1985). Estas enzimas são classificadas amplamente como colinesterases (incluindo acetilcolinesterase), carboxilesterases e arilesterases. A acetilcolinesterase é inibida por drogas anticolinesterásicas, incluindo os pesticidas organofosforados, e a toxicidade destes está

relacionada com a capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase. Compostos com oxons ativos, como diazoxon, paraoxon, pirimifosmetiloxon, entre outros, interagem com a acetilcolinesterase no sistema nervoso. No caso dos vertebrados, ocorre ativação no fígado, de onde estes oxons podem ser transportados pelo sangue para o sistema nervoso central para produzir sua ação tóxica (WALKER & MACKNESS, 1987).

### **1.1 Paraoxonase**

A enzima paraoxonase (PON) pertence a uma família multigene, composta de três diferentes membros: PON-1, PON-2 e PON-3, que compartilham considerável homologia estrutural (PRIMO-PARMO *et al.*, 1996 *apud* CUNHA, 2012) e apresentam atividades desintoxicantes. O nome da família vem da habilidade da Paraoxonase-1 (PON-1) em hidrolisar o Paraoxon, o metabólito mais tóxico do grupo do Parathion (organofosforados – pesticidas) (DIEPGEN & MALLINCKRODT, 1986; NATO ASI, 1986; COSTA *et al.*, 1990; COSTA *et al.*, 2005; CARR *et al.*, 2015; MACKNESS *et al.*, 1987). A inativação do Paraoxon protege o organismo contra os efeitos tóxicos neurológicos (NATO ASI, 1986). As Paraoxonases estão presentes em maior concentração no soro e no fígado de vertebrados (COSTA *et al.*, 1990; FAROOQUI & FAROOQUI, 2012; CUNHA, 2012; MACKNESS & MACKNESS, 2015; COSTA *et al.*, 2005).

A paraoxonase-1 (PON1), a primeira enzima a ser identificada, foi descoberta através de sua capacidade em hidrolisar organofosforados xenobióticos no soro humano (CUNHA, 2012), como diisopropil-fluorofosfato (DFP), tabun, sarin, diazoxon, chlorpirifosoxon, malaixon, carbamatos, carbaril, entre outros (NATO ASI, 1986; MACKNESS *et al.* 1987; COSTA *et al.*, 2005). Tomás *et al.* (2004) descreveram a atividade enzimática realizadas pela PON-1 (Figura 1) e seus diferentes substratos, mostrando que, além de hidrolisar diversos organofosforados, esta enzima também atua como antioxidante, prevenindo doenças.

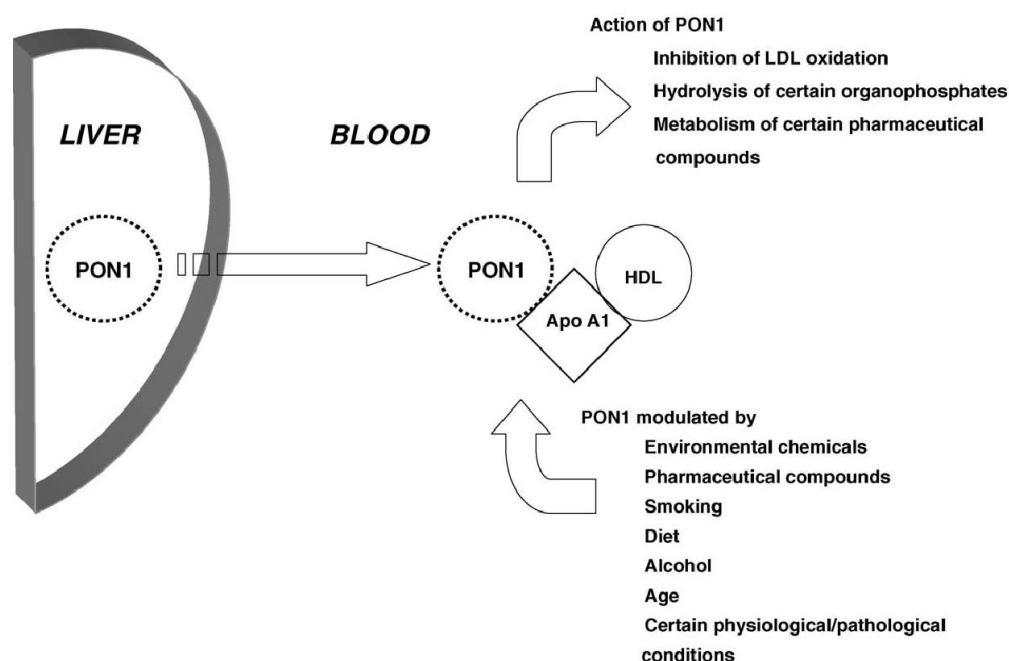
Substrate	Enzymatic Activity	Ca <sup>2+</sup>
Organophosphates	–	–
Paraoxon	Paraoxonase activity	Yes
Chlorpyrifos oxon	–	–
Diazoxon	–	Yes
Sarin	–	–
Soman	–	–
Arylesters	Arylesterase activity	–
Phenylacetate	–	Yes
2-naphthylacetate	–	–
Lactones	Lactonase activity	Yes
Statins	–	–
Homocysteine thiolactone	–	–
Protection against LDL oxidation	Antioxidant activity	No
Phospholipid and cholesterol estersperoxides/hydroperoxides	–	–
Hydrogen peroxide	–	–
PAF	PAF-acetylhydrolase activity	–

**Figura 1.** Atividade enzimática de Paraoxonase-1 em diferentes substratos. Adaptado de Tomás *et al.*, 2004.

Exposição aguda aos organofosforados causa neurotoxicidade. Paraoxonase-1 pode hidrolisar e, portanto, desintoxicar vários pesticidas organofosforados, incluindo agentes nervosos (como tabun e sarin). Sua baixa atividade no organismo aumentaria a sensibilidade aos efeitos agudos dos compostos organofosforados (COSTA *et al.*, 2003a). Assim, PON-1 desempenha um papel importante na modulação da toxicidade destes compostos e parece ser a única defesa contra estes produtos químicos tóxicos (LA DU, 1996). Esta enzima está especificamente associada a lipoproteínas de alta densidade (HDL) e hidrolisa peróxidos de lipídeos presentes nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (FAROOQUI & FAROOQUI, 2012; DEAKIN *et al.*, 2002 *apud* MACKNESS & MACKNESS, 2015; MEYER *et al.*, 2018). As funções fisiológicas da PON-1 humana são bem conhecidas e estão associadas a sua ação protetora contra aterosclerose, e contra o desenvolvimento de doenças inflamatórias (MACKNESS & MACKNESS, 2015). As variantes que influenciam a atividade de PON-1 estão descritas em Costa *et al.* (2005), como drogas lícitas, ilícitas e produtos químicos ambientais.



Walker & Mackness (1987), utilizando soro de ovelhas e humanos, demonstraram que a maior parte da atividade de A-esterase está associada à fração de HDL. Paraoxonase-1 é secretada pelo fígado e transportada principalmente pelo HDL (COSTA *et al.*, 2005). De acordo com Costa (2003a), a partícula HDL associa-se a PON-1 diretamente por dessorção de alta afinidade quando liberada do fígado (Figura 2), em um processo que requer Apolipoproteína e fosfolipídios. Uma importante função fisiológica da PON1 é atuar no metabolismo lipídico, impedindo a formação de LDL oxidado, inativando fosfolipídios oxidados derivados do LDL e protegendo os fosfolipídios do HDL contra a oxidação (COSTA *et al.*, 2003a). A influência de PON-1 nas doenças cardiovasculares está relacionada à sua capacidade de metabolizar lipídios oxidados e impedir sua formação (COSTA, 2003b).



**Figura 2.** Efeitos e modulações biológicas de Paraoxonase-1. Apo1 – Apolipoproteína do tipo 1. Fonte: Costa, 2005.

Acredita-se que a oxidação de LDL esteja centralmente envolvida no início e progressão da aterosclerose (SORAN *et al.*, 2009). Em estudos feitos com ratos, a expressão de PON-1 humana inibiu o desenvolvimento de aterosclerose, provavelmente reduzindo a quantidade de LDL oxidada no plasma e na placa, impedindo seus efeitos pró-aterogênicos

(MACKNESS *et al.*, 2006). Portanto, outra importante função de PON-1 é sua atividade antiaterogênica: associada ao HDL, no plasma, trabalha para evitar a oxidação das lipoproteínas plasmáticas (SORAN *et al.*, 2009). Acredita-se que quanto menor a concentração de Colesterol-HDL, maior é o risco de desenvolver uma doença cardíaca coronária (TOMÁS *et al.*, 2004).

## **1.2 Paraoxonase-1 em tetrápodes**

Um problema preocupante com alguns componentes dos organofosforados é sua aguda e alta toxicidade ao homem, mas também para organismos não-alvos da sua ação inseticida (BREALEY *et al.*, 1980). Vertebrados não-mamíferos podem ser prejudicados pela ação antrópica, uma vez que pesticidas organofosforados são drenados até regiões costeiras, entrando em ambientes de importância alimentar para répteis, mamíferos e aves (KEGLEY *et al.*, 1999). Tanto as aves marinhas, quanto os mamíferos e répteis marinhos podem ingerir estes compostos a partir de suas dietas, compostas por invertebrados e peixes, pois há evidências de bioacumulação de organofosforados nas populações Árticas (MORRIS *et al.*, 2010 *apud* MEYER, 2018).

Inseticidas organofosforados têm se mostrado mais tóxicos para as aves do que para mamíferos. Brealey *et al.* (1980), em um estudo comparando 14 espécies de aves e cinco de mamíferos, demonstraram que todas as aves estudadas apresentaram atividade hidrolítica muito menor *in vitro* para Paraoxon do que as espécies de mamíferos. Os autores concluíram que esta diferença é atribuível à existência de uma atividade plasmática de A-esterase (enzimas catalisadoras de hidrólises) muito maior em mamíferos do que em aves.

Quanto aos animais marinhos, Meyer *et al.* (2018) descrevem que a maior parte dos mamíferos marinhos por eles estudados apresentou baixa expressão e atividade da PON1, sendo as espécies marinhas muito suscetíveis à ação deletéria dos compostos neurotóxicos

presentes em pesticidas, em especial nos organofosforados. Contudo, são ainda escassos os estudos que investigam a presença de proteção enzimática contra organofosforados pela ação da PON-1 em tetrápodes marinhos ou costeiros.

### **1.3 Caracterização do Litoral Norte do Rio Grande do Sul e dos tetrápodes regionais**

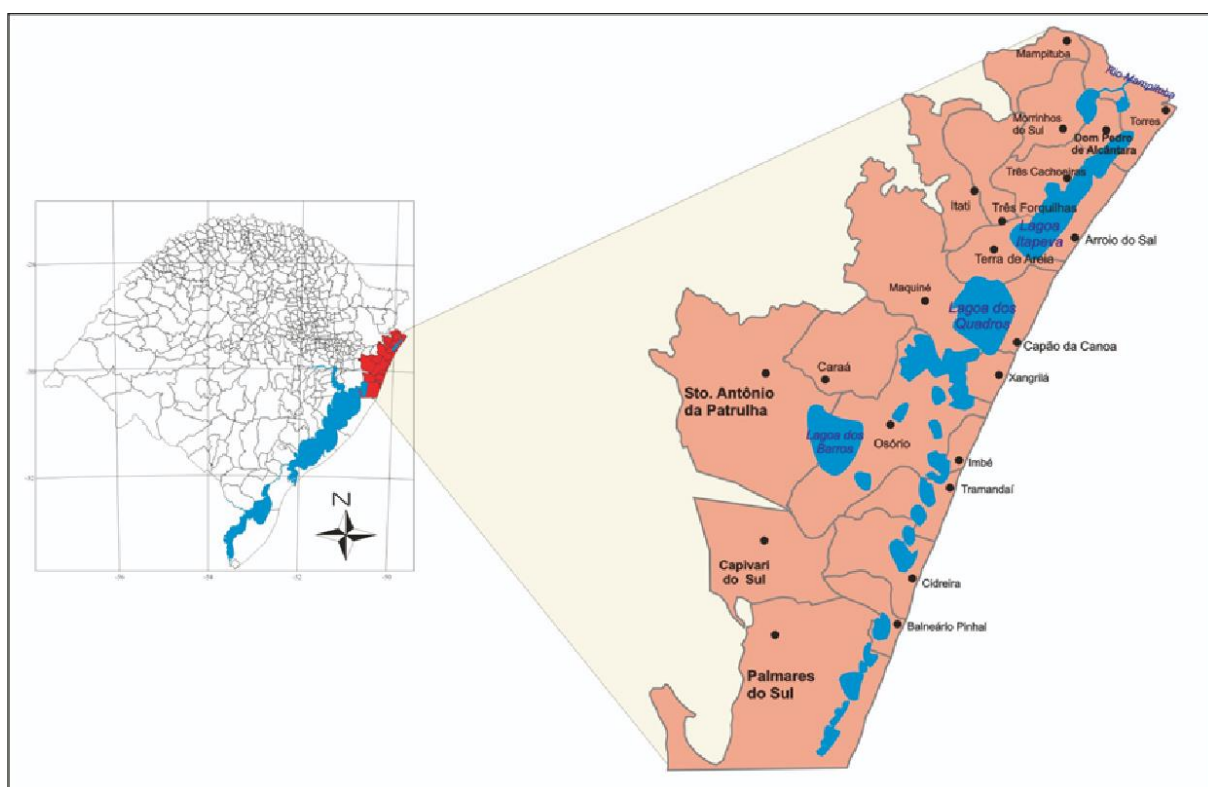
A zona costeira pode ser considerada uma região de contrastes, constituindo-se num campo privilegiado por estar submetida a forte pressão por intensas e diversificadas formas de uso do solo (GRUBER *et al.*, 2003). Nessa região coincidem processos acelerados de intensa urbanização, atividade portuária, pesqueira e industrial relevantes, e exploração turística em larga escala (GRUBER *et al.*, 2003). A região do Litoral Norte, um dos segmentos da Zona Costeira do Rio Grande do Sul (Figura 3), caracteriza-se pela sequência de ambientes longitudinais à costa, chegando até as escarpas do Planalto Meridional (MOURA *et al.*, 2006). O Litoral Norte do Rio Grande do Sul abriga ecossistemas raros e de grande vulnerabilidade ambiental, conformando paisagens diferenciadas no continente latino-americano, destacando-se a extensão de suas praias arenosas e o rosário de lagoas na Planície Costeira (STROHAECKER e TOLDO JR, 2007).

A alta riqueza de espécies no litoral gaúcho está intimamente relacionada à localização geográfica de nosso estado, que sofre influência de duas grandes correntes marinhas: a Corrente do Brasil (quente e pobre em nutrientes), com predomínio no verão, e a Corrente das Malvinas (fria e com água rica em nutrientes), com maior influência durante o inverno (MUCIN, 2018). A interação destas duas correntes marinhas e a influência do desague das lagoas costeiras fazem com que essa região seja uma importante área de alimentação e reprodução de diversos organismos marinhos.

O Litoral Norte do Rio Grande do Sul recebe, sazonalmente, visitantes ilustres já registrados por alguns autores, como o lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*) (SANTOS, 2014; AMORIM, 2014), o leão-marinho-do-sul (*Otaria flavescens*) (SIMÕES-

LOPES *et al.*, 1995), as baleias (LISBOA, 2016), o pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (MULLER E BARROS, 2013; MÄDER *et al.*, 2010, SILVA *et al.*, 2012), algumas espécies de aves Charadriiformes (MULLER E BARROS, 2013) e tartarugas-marinhas (TRIGO, 2000). Além de ter espécies nativas residentes como o biguá (*Nannopterum brasilianus*) (MULLER E BARROS, 2013) e o golfinho-nariz-de-garrafa (*Tursiops* sp.) (SIMÕES-LOPES, 1991; ZAPPES *et al.*, 2011), e espécies exóticas residentes como a tartaruga-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*).

Tetrápodes encontrados debilitados na beira da praia do LNRS podem ser encaminhados ao Centro de Reabilitação de Animais Marinhos e Silvestres, do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CERAM/CECLIMAR), localizado no município de Imbé.



**Figura 3.** Localização do Litoral Norte do Rio Grande do Sul. Fonte: Moura *et al.*, 2006.

a) Lobo-marinho-sul-americano – *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783):

Esta espécie de lobo marinho ocorre desde o Peru até o Sudeste do Brasil (AMORIM, 2014). Essa é a espécie de pinípede mais comum e abundante no litoral brasileiro, ocorrendo entre o outono e a primavera austrais (SANTOS, 2014). Nesta época, é possível encontrar inúmeros indivíduos juvenis descansando nas areias das praias ao longo da costa do Rio Grande do Sul, após enfrentarem o seu primeiro deslocamento. Sua dieta é composta, principalmente, por peixes e cefalópodes (NAYA *et al.*, 2002; BAYLIS *et al.*, 2014).

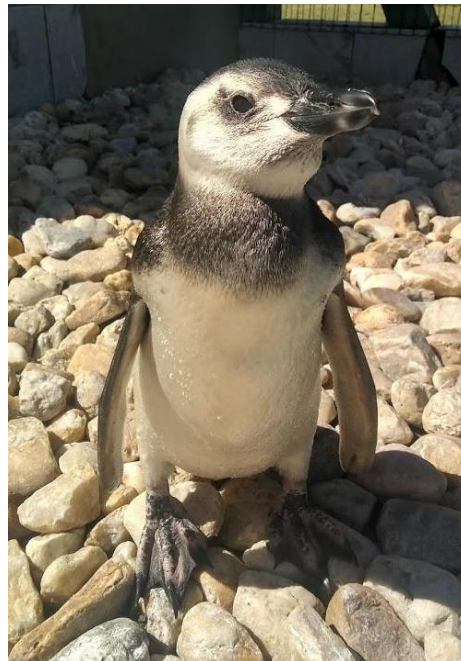


**Figura 4.** Exemplar de *Arctocephalus australis* descansando na beira da praia de Torres/RS. Fonte: Daniela Martins.

b) Pinguim-de-magalhães – *Spheniscus magellanicus* (Forster, 1781):

Pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) são aves migratórias que possuem colônias reprodutivas na Patagônia Argentina, Chilena e nas Ilhas Malvinas. No inverno, se deslocam das colônias da costa do Atlântico ou Pacífico até as águas brasileiras, em busca de alimento, através das correntes oceânicas. É neste período que os indivíduos juvenis enfrentam sua primeira migração e condições ambientais difíceis, que levam os animais à

situação de jejum, ao contato com parasitas, à exposição a microorganismos patológicos e a agentes antrópicos (RODRIGUES *et al.*, 2010; PETRY *et al.*, 2012). Estes fatores mostram como os juvenis são mais vulneráveis que os adultos e, portanto, há mais ocorrência e maior incidência de mortalidade desta faixa etária na costa brasileira nesta época do ano (SICK, 1997; MÄDER *et al.*, 2010).



**Figura 5.** Exemplar de *Spheniscus magellanicus* no Centro de Reabilitação de Animais Marinhos e Silvestres (CERAM). Fonte: a autora (2019).

c) Biguá – *Nannopterum brasilianus* (Gmelin, 1789):

Os biguás (*N. brasilianus*) são aves costeiras que habitam lagos, grandes rios e estuários, e os utilizam para reprodução e para suprir suas necessidades alimentares. A espécie ocorre do México até o sul da América do Sul e nidifica na primavera sobre árvores de matas alagadas (SICK, 1997; MEIJER & DISARÓ, 2018). São encontrados, geralmente, em grupos. Sua dieta é variada, composta por peixes (principal), anfíbios, caranguejos, moluscos, insetos aquáticos, répteis e até pequenos mamíferos (GHELER-COSTA *et al.*, 2018). Algumas populações da espécie na Argentina e no Peru, aparentemente vêm sofrendo declínio

moderado, devido à redução e contaminação dos habitats aquáticos, aliados ao impacto da pesca (CONDE-TINCO & IANNACONE, 2013 *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2019).



**Figura 6.** Exemplares de *Nannopterum brasilianus* no CECLIMAR. Fonte: a autora (2019).

d) Tartaruga-de-orelha-vermelha – *Trachemys scripta elegans* (Wied, 1839):

Esta espécie é encontrada na costa do litoral norte do RS, mas é nativa do Texas, México, Oklahoma, leste de Kansas, leste de Indiana, Kentucky, Tennessee e Alabama (PRITCHARD, 1979 *apud* ROSSI *et al.*, 2006). Apresenta dieta alimentar onívora com preferência por proteína animal (ROSSI *et al.*, 2006). No Brasil, esta espécie de tartaruga é considerada exótica invasora, tomando o lugar de *Trachemys dorbigni*, competindo por recurso alimentar, espaço e reprodução.





**Figura 7.** Exemplar de *Trachemys scripta elegans*. Fonte: The Reptile Database (Acesso em: dez, 2019).

#### **1.4 Perfil bioquímico**

Segundo Vila (2013), os parâmetros bioquímicos são indicadores do estado fisiológico dos animais e sua análise auxilia na compreensão do estado nutricional e energético dos animais.

Os lipídios plasmáticos, em especial o colesterol-HDL, estão relacionados com a atividade de enzimas detoxificantes, como a PON-1. A associação entre a atividade plasmática da enzima Paraoxonase-1 e a concentração de HDL e LDL plasmáticos já foram descritas para mamíferos terrestres (MACKNESS *et al.*, 2002; DEAKIN *et al.*, 2011; MACKNESS & MACKNESS, 2015). Entretanto, essa relação não é conhecida para tetrápodes marinhos ou costeiros.

São conhecidos alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos de tartaruga-de-orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*) (CAIN *et al.*, 2003; GRADELA *et al.*, 2017), de pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) (CORAIOLA, 2012; MAYORGA, 2015; GALLO *et al.*, 2019) e de Lobo-marinho-sul-americano (*Arctocephalus australis*) (SANTOS, 2014; SACCOMANI, 2005). Contudo, para o Biguá (*Nannopterum brasilianus*) não existem dados na literatura a respeito do perfil bioquímico sérico e plasmático.



Entretanto, não são encontrados estudos sobre a atividade enzimática de Paraoxonase-1 destas espécies.

## **Tema**

Tendo em vista a problemática já descrita quanto aos efeitos de toxinas depositadas no ambiente terrestre e aquático e a ação da PON-1 na detoxificação de organofosforados, a análise da atividade da enzima Paraoxonase-1 e do perfil bioquímico sérico em diferentes grupos de tetrápodes marinhos, costeiros e terrestres pode dar um indicativo de quanto essas espécies estão vulneráveis a alterações ambientais antrópicas.

## **Problemas de pesquisa**

Qual é a atividade da PON1 nos diferentes grupos de tetrápodes: *Spheniscus magellanicus*, *Nannopterum brasilianus*, *Arctocephalus australis*, *Trachemys scripta elegans*, *Gallus gallus domesticus* e *Rattus norvegicus*?

Qual é o perfil bioquímico sérico nos diferentes grupos de tetrápodes: *Spheniscus magellanicus*, *Nannopterum brasilianus*, *Arctocephalus australis*, *Trachemys scripta elegans*, *Gallus gallus domesticus* e *Rattus norvegicus*?

Existe correlação entre o perfil bioquímico sérico e a atividade da PON-1 nos diferentes grupos de tetrápodes estudados?

## **Hipótese**

As aves marinhas ou terrestres do presente estudo possuem pouca ou nenhuma atividade de PON-1; ratos possuem alta atividade enzimática de PON-1 ao contrário dos lobos-marinhos; e as tartarugas de água doce apresentam PON-1 com atividade baixa.

Quanto aos perfis lipídicos, cada grupo de tetrápode estudado apresentará perfil lipídico específico e diferentes relações entre perfil lipídico e atividade da PON-1.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Comparar a atividade da enzima PON-1 e o perfil bioquímico sérico entre diferentes espécies de tetrápodes.

### **Objetivos específicos**

Analisar a atividade da enzima PON-1 no soro de *S. magellanicus*, *N. brasiliensis*, *T.s. elegans*, *A. australis*, *G. g. domesticus* e *R. norvegicus*;

Analisar o perfil bioquímico sérico de *S. magellanicus*, *N. brasiliensis*, *T.s. elegans*, *A. australis*, *G. g. domesticus* e *R. norvegicus*;

Avaliar a associação e a correlação entre perfil bioquímico sérico e atividade da PON-1 em *S. magellanicus*, *N. brasiliensis*, *T. s. elegans*, *A. australis*, *G. g. domesticus* e *R. norvegicus*.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Animais**

#### *Arctocephalus australis*

Foram amostrados três indivíduos juvenis, sendo duas fêmeas e um macho. O macho ficou em reabilitação por um mês, enquanto as fêmeas ficaram no CERAM por aproximadamente três dias, até serem soltas. Os animais foram alimentados diariamente, duas vezes ao dia, com pescado e água *ad libitum*. Uma fêmea foi encaminhada ao CERAM no verão e a coleta de sangue foi realizada durante o período de reabilitação. Os outros dois indivíduos foram encaminhados no inverno e as coletas também ocorreram no período de reabilitação.

#### *Spheniscus magellanicus*

Foram amostrados oito indivíduos juvenis em processo de reabilitação. Dois animais ficaram no centro de reabilitação por aproximadamente um ano e o sangue destes foi coletado no verão de 2019. Seis indivíduos foram encaminhados ao CERAM na primavera de 2019 e a coleta ocorreu na semana em que chegaram ao centro de reabilitação. Estes animais não apresentam dimorfismo sexual pela plumagem, portanto, não foram identificados quanto ao sexo. Durante a reabilitação, os indivíduos foram alimentados diariamente, duas vezes por dia, com sardinhas e tiveram acesso à água *ad libitum*.

#### *Nannopterum brasilianus*

Quatro indivíduos em processo de reabilitação foram amostrados neste estudo, dois no verão e dois no outono. O tempo máximo de reabilitação destes animais foi de 3 semanas e o mínimo foi de cinco dias. Assim como em *S. magellanicus*, estes animais não possuem dimorfismo sexual pela plumagem, portanto, não foram identificados quanto ao sexo. Durante a reabilitação, os indivíduos foram alimentados diariamente, duas vezes por dia, com sardinhas e tiveram acesso à água *ad libitum*.

#### *Trachemys scripta elegans*

Cinco tartarugas da espécie *T. s. elegans* foram amostrados do terrário do Museu de Ciências Naturais (MUCIN) do CECLIMAR, no período de inverno. Os animais não foram identificados quanto ao sexo. Foram alimentados diariamente, duas vezes por dia, com sardinha e tiveram acesso à água *ad libitum*.

#### *Gallus gallus domesticus*

Foram amostradas, neste estudo, cinco galinhas adultas (“galinhas-poedeiras” - *Gallus gallus domesticus*). Os animais foram alimentados com ração específica para postura e

tiveram acesso à água *ad libitum*. Foram adicionadas ao estudo para fins de comparação com o grupo de aves marinhas e costeiras e com os outros grupos de tetrápodes.

### *Rattus norvegicus*

Foram amostrados ratos machos de 70 dias, obtidos do Centro de Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL). Os animais foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12h/12h em salas climatizadas ( $\pm 22^{\circ}\text{C}$ ) e alimentados *ad libitum* com ração padrão do biotério (Nuvilab CR1<sup>®</sup>, Nutival - Brasil). O monitoramento dos animais foi realizado diariamente, possibilitando a identificação de alterações relacionadas à saúde e ao conforto dos mesmos. A espécie foi utilizada com o propósito de comparar os resultados com mamíferos marinhos e outros grupos de tetrápodes. Ratos Wistar são animais amplamente estudados cujos parâmetros bioquímicos já estão estabelecidos para as análises realizadas neste estudo.

## **2.2 Coletas de sangue/soro**

As coletas de sangue de *A. australis*, *S. magellanicus*, *N. brasiliensis* e *T. s.elegans* foram realizadas no CERAM pelo médico veterinário responsável, juntamente com, no mínimo, dois ajudantes para a contenção dos animais. Para a contenção física de *A. australis* utilizou-se puçá e cambão para limitar os movimentos da cabeça e assim diminuir os estímulos e o estresse, rede para restringir o movimento corporal e pessoas para auxiliar a manter o animal em posição de coleta. As coletas de sangue de *R. norvegicus* foram realizadas no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada da UFRGS (LaMEC/ICBS/UFRGS).

Para a coleta de sangue das aves *S. magellanicus*, *N. brasiliensis* e *G. g. domesticus*, os animais foram cobertos e contidos, para reduzir o estresse e limitar os movimentos. Para *T.s. elegans* foi necessário apenas ajudantes para contenção das patas e do corpo.

Foram coletados, aproximadamente, 2mL de sangue de cada indivíduo, com seringas descartáveis. O sangue coletado foi colocado em um tubo com gel ativador de coagulação (Vaculplast®). Após 20 minutos de descanso, o sangue foi centrifugado a 3500rpm por 10 minutos para se obter somente o soro. As amostras de soro coletadas no CERAM foram separadas em tubos *eppendorf* e transportadas em gelo seco até o LaMEC, em Porto Alegre. As amostras ficaram armazenadas a -20°C até as análises bioquímicas serem realizadas.

## 2.3 Dosagens bioquímicas

### 2.3.1 Perfil bioquímico

Glicemia, Triglicerídeos, Colesterol Total, Colesterol-HDL e Lactato foram dosados com kits colorimétricos (Labtest®), utilizando o protocolo de instruções de uso de cada reagente (Figura 8). As leituras de cada parâmetro foram realizadas através de espectrofotômetro e foram seguidos os protocolos indicados pelo fabricante.



**Figura 8.** Placa de Elisa utilizada para leitura no espectrofotômetro. Fonte: a autora (2019).

### 2.3.2 Atividade enzimática de PON-1

A análise da PON-1 sérica foi realizada segundo Browne *et al.* (2007), medida pela taxa de formação de fenol. Foram utilizadas duas soluções: 1) Solução tampão: 20mmol/L Tris-base, 1mmol/L CaCl<sub>2</sub> em água Mili-Q. A solução foi agitada e ajustada para pH=8,0; 2) Solução de Trabalho: 20mmol/L de solução tampão e 1mmol/L de acetato de fenil como substrato. A absorbância de fenilacetato foi medida a 270nm, durante 60 segundos, no espectrofotômetro UV-VIS T60 (PG Instruments®).

### 2.4 Análises estatísticas

A normalidade foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância de uma via (One Way ANOVA) seguida do *post hoc* Tukey ou ao teste T de Student. Os dados não-paramétricos foram avaliados por Mann Whitney e Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Foi realizada correlação de *Pearson* entre atividade da PON-1 e parâmetros séricos. A significância aceita foi de  $P < 0,05$  e os testes foram realizados utilizando o programa GraphPad Prisma versão 6.0. Os dados paramétricos foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média, e os dados não-paramétricos como mediana e intervalo interquartil (25% a 75%).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Parâmetros bioquímicos séricos

##### 3.1.1 Mamíferos

Os dados de glicemia, triglicerídeos, colesterol total, colesterol-HDL e lactato dos mamíferos estão descritos na Tabela 1. Foi observada diferença estatisticamente significativa em todos os parâmetros entre *R. norvegicus* e *A. australis*, com exceção de lactato. *R. norvegicus* apresentou valores maiores de glicemia, triglicerídeos e colesterol-HDL e menores de colesterol total quando comparado com *A. australis*.

**Tabela 1.** Parâmetros bioquímicos séricos em mamíferos.

	<i>R. norvegicus</i>	<i>A. australis</i>	<i>A. australis</i> (Saccomani, 2005)
<b>Glicemia</b> (mg/dL)	152,8±11,4*	96,08±11,56	93,7±9,4
	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 7
<b>Triglicerídeos</b> (mg/dL)	125,8±9,39*	57,70±25,46	51,0±7,8
	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 7
<b>Colesterol</b> (mg/dL)	57,2±1,86*	193,1±12,68	154,7±24,1
	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 7
<b>HDL (mg/dL)</b>	34,4 (31,2-39,3)*	19,66 (19,53-32,78)	-
	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 3	-
<b>Lactato</b>	6,90 (5,94 - 8,51)	7,02 (2,36 - 12,21)	-



(mmol/L)	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 3	-
----------	--------------	--------------	---

Os resultados referentes a glicemia, triglicerídeos e colesterol total estão representados como média ±EPM; os resultados referentes a colesterol-HDL e lactato estão representados como mediana (intervalo interquartil de 25% - 75%);

*n* = número de animais para cada grupo;

\*  $P < 0,05$  = diferença significativa em relação ao grupo *A. australis*.

### 3.1.2 Aves

Os dados de glicemia, triglicerídeos, colesterol total, colesterol-HDL e lactato das aves estão descritos na Tabela 2. No grupo das aves foi observada diferença estatisticamente significativa no perfil bioquímico sérico entre as espécies aquáticas e a terrestres. As concentrações séricas de glicose e colesterol total de *N. brasiliensis* e *S. magellanicus* foram significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) e as concentrações de triglicerídeos foram menores ( $P < 0,05$ ) em relação a *G. g. domesticus*. Contudo, as concentrações de lactato foram maiores ( $P < 0,05$ ) nas espécies *S. magellanicus* e *G. g. domesticus* em relação a *N. brasiliensis*.

**Tabela 2.** Parâmetros bioquímicos séricos em Aves.

	<i>N. brasiliensis</i>	<i>S. magellanicus</i>	<i>G. g. domesticus</i>	<i>Phalacrocorax atriceps</i> (Gallo, 2013)
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	266,2 (200,8 - 334,8)*	209 (184 - 232)	136,5 (122,8 - 157,3)	194,00 (147 - 254)
	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 163
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	95,72 (56,36 - 185,7)*	179,8 (111,3 - 248,1)	1545 (827,4 - 1641)	96 (54 - 182)
	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 175
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	255,2 (193,3 - 293,5)*	198,3 (189,3 - 272)	95,19 (75,93 - 138,7)	340 (224 - 459)
	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 165
<b>HDL (mg/dL)</b>	51,36 (27,62 - 61,22)	38,63 (24,79 - 50,11)	45,97 (36,78 - 85,21)	-
	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 5	-
<b>Lactato (mmol/L)</b>	5,97 (2,66 - 7,27)	18,64 (16,10 - 23,35)**	18 (13,35 - 19,30)**	-
	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 5	-

Os resultados estão representados como mediana (intervalo interquartil de 25% - 75%). *n* = número de animais amostrados para cada grupo. \**P*<0,05 = diferença significativa em relação a *G. g. domesticus*. \*\**P*<0,05 = diferença significativa em relação ao grupo *N. brasiliensis*. <sup>a</sup>Adaptado de Gallo *et al.* (2013).

### 3.1.3 Répteis

Os dados de glicemia, triglicerídeos, colesterol total, colesterol-HDL e lactato de *Trachemys scripta elegans* estão descritos na Tabela 3. Os resultados foram comparados com os dados da literatura em *Caretta caretta* (Tartaruga-cabeçuda) (GOLDBERG, 2011; PIRES, 2008; SOZBILEN e KASKA, 2018) e *Chelonia mydas* (Tartaruga-verde) (Leite, 2007).

A glicemia apresentou-se menor e a concentração de triglicerídeos maior na espécie de água doce com relação às espécies marinhas *Chelonia mydas* (LEITE, 2007) e *Caretta caretta* (SOZBILEN e KASKA, 2018). A concentração de colesterol total apresentou-se menor em relação à espécie marinha *Caretta caretta* nos trabalhos de Goldberg (2011) e Pires (2008)

**Tabela 3.** Parâmetros bioquímicos séricos em Répteis.

	<i>T. s. elegans</i>	<i>Caretta caretta</i> (A)	<i>Caretta caretta</i> (B)	<i>Caretta caretta</i> (C)	<i>Chelonia mydas</i> (D)
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	50,44 ± 22,22*	-	68,53 ± 10,29	88,2 ± 9,50	100,83 ± 16,29
	<i>n</i> = 5	-	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 12
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	468,8 ± 197,5*	580,28 ± 232,08	334,73 ± 269,19	91,3 ± 60,70	63,67 ± 35,95
	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 28	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 12
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	157,4 ± 59,7**	247,75 ± 48,52	334,24 ± 125,28	147,41,70	-
	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 28	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 7	-
<b>HDL (mg/dL)</b>	25,5 ± 15,89	-	-	31,4 ± 13,63	-
	<i>n</i> = 5	-	-	<i>n</i> = 7	-
<b>Lactato (mmol/L)</b>	5,19 ± 3,6	-	-	-	-
	<i>n</i> = 5	-	-	-	-

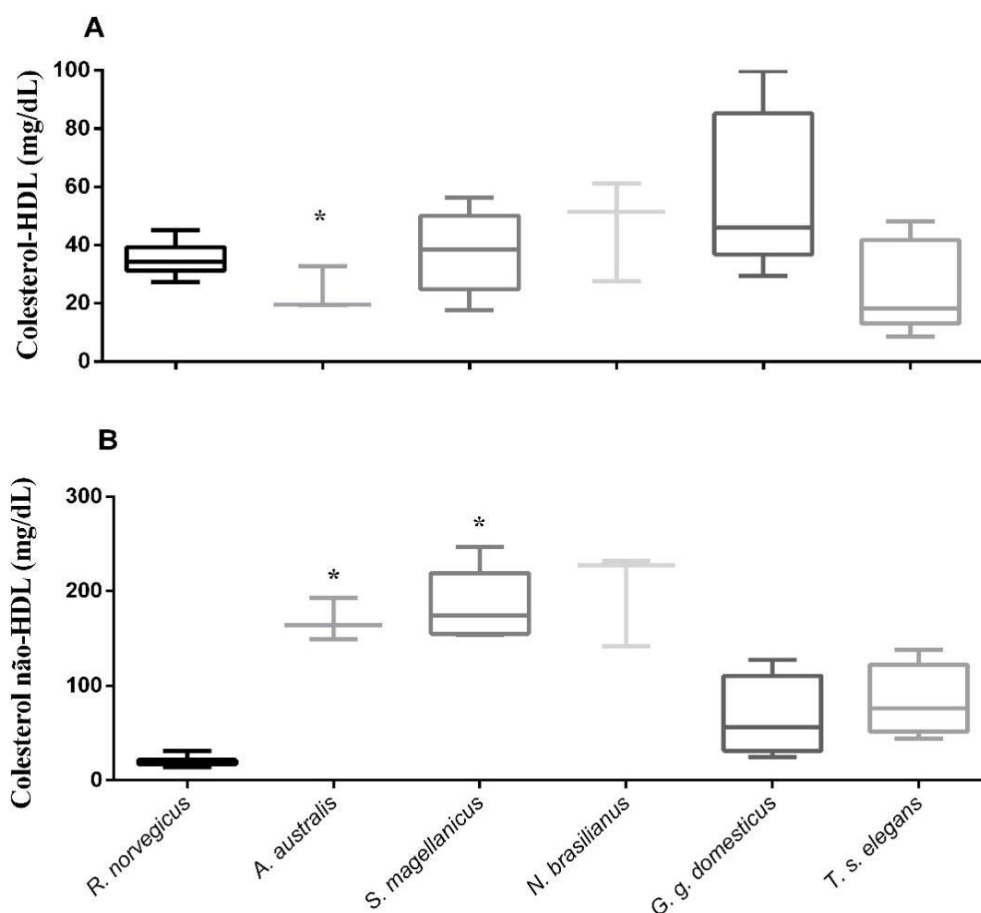
Os resultados estão representados como média ±EPM. *n* = número de animais mostrados para cada grupo.

\*Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação a (C) e (D); \*\*Diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação a (A) e (B).

(A) Goldberg, 2011; (B) Pires, 2008; (C) Sozbilen e Kaska, 2018; (D) Leite, 2007.

### 3.1.4 Colesterol-HDL e Colesterol não-HDL

Além destes parâmetros, também foram analisadas as concentrações de Colesterol não-HDL nos diferentes grupos amostrados (Figura 9). Os valores apresentados na Figura 9B como colesterol não-HDL incluem os diferentes tipos de colesterol, como o LDL e VLDL, IDL. Os valores de colesterol-HDL não diferiram estatisticamente entre os grupos de aves e répteis em relação ao mamífero terrestre. Contudo, os mamíferos marinhos apresentaram menores comparado aos mamíferos terrestres ( $P < 0,05$ ). Por sua vez os níveis de colesterol não-HDL foram maiores nas espécies marinhas do que no rato.

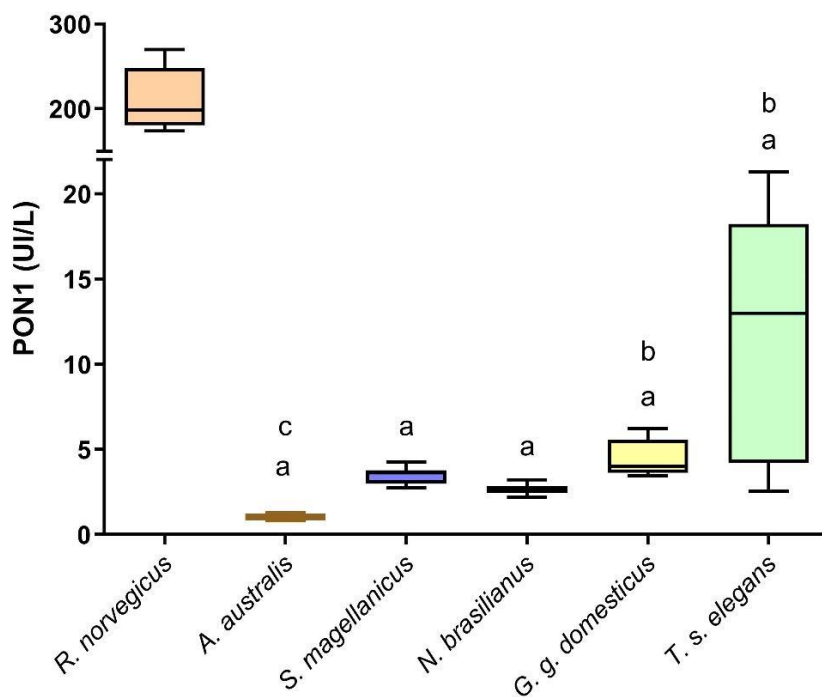


**Figura 9.** Concentração de Colesterol-HDL (A) e de Colesterol não-HDL (B) nos diferentes grupos de animais estudados. Resultados representados como mediana (intervalo interquartil de 25% - 75%).  $n = 3$  a 10 animais para cada grupo. \* $P < 0,05$  = diferença significativa em relação ao grupo *R. norvegicus*.

### 3.2 Atividade da Paraoxonase-1

A atividade enzimática de PON-1 está representada na Figura 10, comparando todas as espécies amostradas. A atividade da PON-1 foi 200 vezes maior no mamífero terrestre *R. norvegicus* quando comparada àquela do mamífero marinho *A. australis*. Além disso, a atividade da enzima foi maior em *R. norvegicus* comparado com as aves e também com a tartaruga *T. s. elegans*.

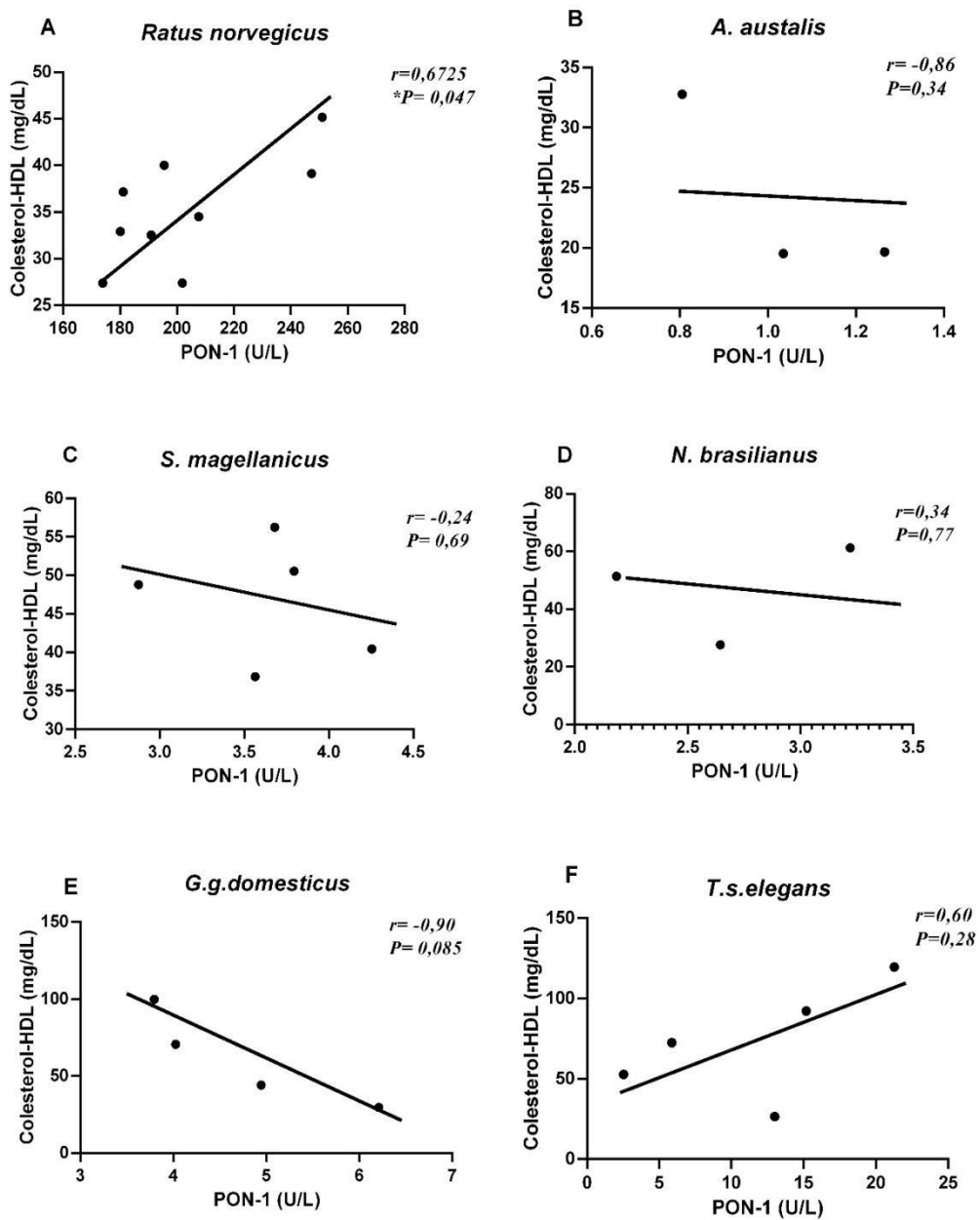
Entre as aves, *G. g. domesticus* apresentou maiores valores da atividade da PON-1 em relação ao grupo *N. brasiliensis*, mas não com *S. magellanicus*. Já *T. s. elegans*, quando comparada as aves, apresentou maiores valores de PON-1 em relação a *N. brasiliensis*, mas não com *S. magellanicus*. *A. australis* apresentou menores valores da enzima quando comparado com *T. s. elegans* e *G. g. domesticus*.



**Figura 10.** Atividade de PON-1 nos diferentes grupos de tetrápodes: *Rattus norvegicus* (Rato Wistar, n=10), *Arctocephalus australis* (Lobo-marinho-sul-americano, n=3), *Spheniscus magellanicus* (Pinguim-de-magalhães, n=12), *Nannopterum brasiliensis* (Biguá, n=), *Gallus gallus domesticus* (Galinha-doméstica, n=5) e *Trachemys scripta elegans* (Tartaruga-de-orelha-vermelha, n=5). Os resultados estão representados como mediana (intervalo interquartil de 25% e 75%). <sup>a</sup>(P<0,05) diferença significativa em relação ao grupo *R. norvegicus*; <sup>b</sup>(P<0,05) diferença significativa em relação ao grupo *N. brasiliensis*; <sup>c</sup>(P<0,05) diferença significativa em relação a *G. g. domesticus* e a *T. s. elegans*.

### 3.3 Correlação Colesterol-HDL e Paraoxonase-1

Correlação de *Pearson* positiva entre a atividade da PON-1 e a concentração de colesterol-HDL foi encontrada apenas para *Rattus norvegicus* ( $r = 0,67$ ,  $P=0,047$ ). Nos demais grupos de tetrápodes estudados não houve correlação de PON-1 com colesterol-HDL (Figura 11). Além disso, não foi observada correlação entre PON-1 e qualquer outro parâmetro sérico analisado para nenhum dos grupos de tetrápodes analisados.



**Figura 11.** Correlação entre concentração sérica de HDL e atividade da enzima PON-1. \* $P < 0,05$  – correlação positiva.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Perfil bioquímico sérico

A importância da análise de parâmetros bioquímicos de animais marinhos e costeiros é, primeiramente, oferecer dados novos aos acervos científicos, visto que a literatura ainda é restrita. Neste trabalho nós descrevemos pela primeira vez parâmetros bioquímicos da espécie de ave costeira *Nannopterum brasilianus* (o Biguá), que irá contribuir para posteriores estudos da ecologia e fisiologia desta espécie. Além disso, é possível avaliar o estado nutricional e de saúde do animal conhecendo os parâmetros bioquímicos quando este está em processo de reabilitação.

As concentrações de glicose, triglicerídeos e colesterol total, descritas para *Arctocephalus australis* na Tabela 1, estão de acordo com os dados apresentados por Santos (2014), Saccomani (2005) e Seguel *et al.* (2016) para animais vivos e saudáveis. Mellish *et al.* (2011) analisaram condições bioquímicas de *Leptonychotes weddellii* (Foca-de-Weddell) e encontraram valores de glicemia semelhantes, porém, para machos ( $104 \pm 4.8$ ) e para fêmeas ( $113 \pm 3.6$ ).

Quanto ao parâmetro lactato, não houve diferença estatisticamente significativa em relação a *Rattus norvegicus*, apesar de *A. australis* ter apenas três indivíduos amostrais, e estes apresentarem grande variação em seus valores. Provavelmente esta amplitude de variação justifique o resultado. Entretanto, analisando cada indivíduo amostrado, foi necessário levar em conta a quantidade de dias que estes permaneceram no centro de reabilitação e o manejo para as coletas de sangue. O aumento de lactato no sangue pode ocorrer por realização de atividades físicas e os indivíduos amostrados estavam fora de seu habitat natural, em diferentes períodos de tempo em reabilitação: o primeiro indivíduo amostrado, com  $2,369 \text{ mmol/L}$ , estava há 2 dias em reabilitação, assim como o segundo,



com 7,025mmol/L. Já o terceiro indivíduo, com 12,211mmol/L estava há mais de um mês de reabilitação. A alta concentração do terceiro indivíduo pode ser explicada pela resistência física à contenção na hora da coleta de sangue. O animal estava extremamente agitado e estressado, o que pode ter levado a esta amplitude de variação entre os indivíduos. Em ratos é conhecido o efeito do exercício físico sobre a concentração de lactato plasmático, sendo que esta aumenta ao longo do tempo de exercício, podendo sofrer uma estabilização ou não, dependendo da carga da atividade (CONTARTEZE *et al.*, 2007). Em mamíferos marinhos, logo após algum tempo de mergulho (aproximadamente 5 minutos) já é possível observar um aumento na concentração de lactato na corrente sanguínea, indicando que algumas áreas do corpo estão carentes de oxigênio e precisam funcionar em modo anaeróbio (KOOYMAN *et al.*, 1981; MARINKOVICH *et al.*, 2019).

Quanto aos parâmetros bioquímicos séricos de aves, os valores da glicemia de *N. brasiliensis* se assemelham aos valores apresentados por Gallo *et al.* (2013) com indivíduos de *Phalacrocorax atriceps* (Cormorão-imperial); e os valores de *S. magellanicus* se assemelham com os achados de Coraiola (2012) e Mayorga *et al.* (2016). A glicose serve como uma fonte de energia quimicamente específica para certos tecidos e processos metabólicos que não podem usar outras fontes de energia. Situações estressantes podem aumentar as concentrações de glicose no sangue. Em aves, os processos fisiológicos relacionados com a muda também produzem elevações do parâmetro (VILA, 2013). A maioria das aves possui valores de glicemia mais elevada do que em mamíferos e estes variam consoante o ciclo circadiano (MORAIS, 2016). Assim, os níveis de glicose no sangue das aves selvagens mantidas em cativeiro são um fator importante para a avaliação clínica dos animais em recuperação (MORAIS, 2016). A hipoglicemia em aves e mamíferos é encontrada com maior frequência, sendo o jejum prolongado uma das possíveis causas (CAMPBELL, 2004).

Dependendo do clima, da dieta, do sexo ou de fatores hormonais, os níveis de triglicerídeos sofrem variações (VILA, 2013). Em aves, há indícios de que os lipídios podem ser uma fonte mais significativa de energia do que a glicose, especialmente durante a migração e jejum, já que estas fazem uso das reservas de gordura para poderem sobreviver durante períodos de restrições calóricas (REMAGE-HEALEY & ROMERO, 2001 *apud* MORAIS, 2016). Os lipídios plasmáticos em pinguins imperador (*Aptenodytes forsteri*) decrescem significativamente durante a muda das penas, mas após a conclusão da muda voltam a aumentar, ultrapassado o valor inicial (GROSCOLAS & ROBIN, 2001).

Os níveis de triglicerídeos foram extremamente diferentes entre as aves marinhas e terrestres. Foi observada diferença estatística significativa em relação a *G. g. domesticus*, que apresentou concentração cerca de 8 vezes maior de triglicerídios séricos do que *S. magellanicus*, e 16 vezes mais que *N. brasiliensis*. Estes níveis eram esperados a partir de estudos como Fanchiotti *et al.* (2010) e Mendonça Jr, (2000) que mostravam níveis de triglicerídeos extremamente altos em galinhas-poedeiras. As concentrações de colesterol total também diferiram significativamente entre *S. magellanicus* e *N. brasiliensis* em relação ao grupo *G. g. domesticus*. Contudo, todas as concentrações de colesterol total observadas nas diferentes espécies de aves avaliadas neste trabalho estão de acordo com estudos de Gallo *et al.* (2013), Coraiola (2012), Fanchiotti *et al.* (2010) e Mendonça Jr, (2000).

Ponganis *et al.* (1997) analisaram os níveis de lactato em Pinguins-imperador (*Aptenodytes forsteri*) pós-mergulho e concluíram que as concentrações aumentam com o passar dos minutos de mergulho (de 1.2 para 2.7mmol/L em 5 minutos), e que após o mergulho as concentrações tendem a demorar para baixar (de 5-8mmol/L para menos de 2.5mmol/L em até 12 minutos). Observou-se neste estudo diferença estatística significativa na concentração de lactato entre *N. brasiliensis*, *Spheniscus magellanicus* e *Gallus gallus*

*domesticus*. Ente os dois últimos os valores foram semelhantes. Contudo, os animais amostrados neste estudo estavam em cativeiro e os valores do lactato obtido são maiores do que os descritos para outras aves marinhas em mergulho. Uma explicação para este fato poderia ser o estresse de captura e coleta de sangue ao qual os animais foram submetidos, mas estudos posteriores poderão esclarecer os altos valores de lactato encontrados.

Quanto ao perfil bioquímico sérico de *Trachemys scripta elegans*, a glicemia foi menor do que nas espécies marinhas (Tabela 3). Pires *et al.* (2008) relatam hiperglicemia em animais de vida livre em resposta ao estresse agudo em tartarugas-marinhas, assim como ocorre nos mamíferos. Os animais de comparação do grupo C (SOZBILLEN e KASKA, 2018) são tartarugas-marinhas de vida livre e, portanto, apresentaram valores mais altos de glicemia, assim como os animais do grupo D (LEITE, 2007), também com tartarugas-marinhas de vida livre, com valores glicêmicos mais altos.

Os valores de triglicerídeos foram significativamente maiores em *T. s. elegans* em relação aos grupos C e D de tartarugas-marinhas (tabela 3). A concentração sérica de triglicerídeos de *T. s. elegans* foi muito semelhante as encontradas nos grupos A (GOLDBERG, 2011), que analisou 25 tartarugas-marinhas nidificantes, e B (PIRES, 2008), que analisaram 5 tartarugas-marinhas fêmeas em cativeiro. Entretanto, a concentração de triglicerídeos do grupo C, exemplificado na tabela 3, retrata apenas o valor de tartarugas-marinhas de vida livre não-nidificantes. No mesmo trabalho, Sozbilen e Kaska (2018) analisaram tartarugas-marinhas nidificantes e encontraram valores de triglicerídeos extremamente diferentes ( $322,40 \pm 119,50$ mg/dL), o qual possui grande semelhança com os dados do presente estudo. O grupo D (LEITE, 2007) apresenta valor de triglicerídeos para tartarugas-marinhas juvenis, não-nidificantes mas de vida livre.

Com relação ao lactato, são escassos estudos deste parâmetro em quelônios de água doce ou marinhos. Pereira *et al.* (2012) analisaram os níveis de Lactato, Glicose e

Corticosterona em filhotes de *Natator depressus* (Tartaruga-marinha-australiana) e de *Caretta caretta* (Tartaruga-cabeçuda), sendo que nenhum parâmetro apresentou diferença estatisticamente significativa entre ambas as espécies, possuindo um aumento destes níveis no início do rastejamento da areia até o mar e, após entrarem na água, os níveis voltavam aos valores basais em alguns minutos. Swimmer (2000) analisou quatro grupos de *Chelonia mydas* e obteve os seguintes resultados: cativa sem fibropapiloma ( $9,51 \pm 1,07$ mmol/L), cativa com fibropapiloma ( $5,5 \pm 0,75$ mmol/L), vida livre sem fibropapiloma ( $17 \pm 1,79$ mmol/L) e vida livre com fibropapiloma ( $16,2 \pm 1,66$ mmol/L). Portanto, animais em cativeiro, como a espécie de tartaruga de água doce investigada no presente estudo, tendem a ter uma menor concentração de lactato quando comparados aos animais de vida livre, que não estão acostumados com manuseios.

#### **4.2 Atividade enzimática de Paraoxonase-1**

Neste trabalho a atividade arilesterase da PON1 em espécies de mamíferos, aves e quelônios foi avaliada. Entre as espécies de mamíferos analisadas, a atividade de PON-1 apresentou-se muito menor no mamífero marinho *A. australis* do que no mamífero terrestre *R. norvegicus*, sendo que o último possui 200 vezes mais atividade de PON-1 do que *A. australis*. Ao estudarem a atividade enzimática de Paraoxonase-1 em mamíferos marinhos, Meyer *et al.* (2018) observaram um padrão de perda convergente da capacidade funcional de PON-1 no meio marinho. Testando plasmas de animais marinhos e semiaquáticos para a capacidade de hidrolisar os substratos de PON-1 (Clorpirifos e Diazinon), os autores encontraram, com exceção de uma das espécies, níveis de atividade mais semelhantes com os de camundongos que não expressam PON-1 (*knockout mouse*) do que com os outros grupos terrestres. A perda funcional de PON-1 nos mamíferos marinhos pode estar relacionada com o seu papel no metabolismo lipídico de oxidação de ácidos graxos, já que as dietas de mamíferos aquáticos carnívoros contêm uma alta proporção de ácidos graxos

poli-insaturados de ômega-3 e ômega-6 (conhecidos como PUFAs) do que as dietas de mamíferos terrestres. Além disso, estes PUFAs diferem em sua capacidade de sustentar danos oxidativos. (CASTRO-GONZÁLEZ, 2002; MEYER *et al.*, 2018).

Ainda no mesmo estudo, Meyer *et al.* (2018) constataram que a sequência de codificação de PON-1 contém lesões genéticas nas linhagens de cetáceos, pinípedes e sirênios, mas é intacta em todos os genomas de mamíferos terrestres estudados. Assim, a deterioração genética de PON-1 deixou essas espécies sem um mecanismo para decompor compostos neurotóxicos específicos. Além disso, mamíferos marinhos e terrestres também têm perfis antioxidantes muito diferentes, relacionado ao estresse oxidativo extremo experimentado durante o mergulho, com ciclos repetidos de hipóxia e reperfusão, como observado por Wilhelm Filho *et al.* (2002). A religação das redes antioxidantes em ancestrais de mamíferos marinhos pode ter evitado a função da PON1 (MEYER *et al.*, 2018), hipótese esta apoiada pelo mergulho mais longo conhecido em Foca-de-Weddell (MELLISH *et al.*, 2011), que carrega lesões na PON-1, em contraste com a morsa, de mergulho mais curto, e a Foca-antártica, que não possuem lesões, mas compartilham de uma dieta aquática. Na comparação do mamífero marinho *A. australis* com as outras espécies de tetrápodes, a atividade da PON-1 apresentou-se muito menor em relação a *G. g. domesticus* e *T. s. elegans*, mas semelhantes aos das aves marinhas.

Em Pinípedes, Meyer *et al.* (2018) observaram evidências de perda funcional de PON-1 apenas em um subconjunto de espécies da família Phocidae. No entanto, provavelmente houve pelo menos uma perda desde que Phocidae-Otaridae se separaram (aproximadamente 2 milhões anos atrás). Essa perda incompleta pode refletir uma diferença entre os ambientes seletivos experimentados pelos pinípedes e os experimentados por outros mamíferos marinhos, ou a colonização mais recente do meio marinho por pinípedes.

Assim como nos mamíferos marinhos, as aves marinhas apresentaram atividade de PON-1 reduzida, provavelmente pelo fato de que também são animais mergulhadores, gerando um estresse ao realizar tal atividade, como é observado em Ponganis *et al.* (1997), e que as espécies marinhas amostradas compartilhavam dieta semelhante durante o período de reabilitação. Entretanto, nas espécies amostrais do grupo Aves, esta hipótese do mergulho não se aplica, pois os valores de *G. g. domesticus* foram diferentes somente em relação a *N. brasiliensis*, mas não a *S. magellanicus*. Assim, outro fator que pode explicar a grande quantidade de atividade de PON-1 em *G. g. domesticus* é o contato longo e direto com os organofosforados, provenientes das rações e dos locais de criação, supondo que estes animais tenham desenvolvido, ou nunca perdido, a capacidade de defesa do organismo contra os compostos organofosforados durante os anos de domesticação.

Muitos autores consideram a toxicidade dos organofosforados mais alta em aves do que em mamíferos (BREALEY *et al.*, 1980; WALKER, 1982; WALKER & MACKNESS, 1987; MACKNESS, 1991), entretanto, a partir dos dados encontrados, pode-se inferir que há uma maior proteção às aves do que aos mamíferos marinhos. De qualquer forma, os mamíferos terrestres são os organismos com uma maior defesa contra os compostos organofosforados.

No grupo dos mamíferos, o colesterol-HDL e o Colesterol Total apresentaram valores inversos dentre as espécies. *Arctocephalus australis* apresentou níveis maiores de colesterol total e menores de colesterol-HDL, enquanto *Rattus norvegicus* apresentou o inverso. Estes achados reforçam a correlação encontrada entre colesterol-HDL e Paraoxonase-1 em mamíferos terrestres. A presença de correlação de *Pearson* positiva entre a atividade da PON-1 e a concentração de colesterol-HDL foi encontrada apenas para *Rattus norvegicus*, assim como encontrado por Secchiero *et al.* (1989) em humanos. Nos

demais grupos estudados não houve correlação de PON-1 com colesterol-HDL. Esse dado reforça o fato de que os mamíferos marinhos não teriam PON-1 funcional enquanto os outros grupos têm sua atividade reduzida, já que sua ligação ao colesterol-HDL é essencial para sua ação biológica.

Em relação aos quelônios, não se sabe em que ponto do processo evolutivo a atividade de PON-1 fez-se mais importante a eles do que às aves e aos mamíferos marinhos. Não foram encontrados dados na literatura para comparar as atividades enzimáticas de PON-1 e discutir sobre sua possível origem.

Qualquer mudança evolutiva convergente no contexto de um ambiente específico pode ter consequências negativas em um ambiente diferente (MEYER *et al.*, 2018), implicando riscos potenciais em ambientes modernos. Neste trabalho foram demonstradas, pela primeira vez, atividades de PON-1 em uma espécie de mamífero marinho, *Arctocephalus australis*, uma de ave marinha, *Spheniscus magellanicus*, e uma de ave costeira, *Nannopterum brasilianus*, que ocorrem no Litoral Norte do Rio Grande do Sul. O processo evolutivo fez com que estes animais sofressem mudanças fisiológicas para se adaptarem ao ambiente marinho, e uma destas mudanças foi a eliminação ou diminuição da sua principal defesa contra a neurotoxicidade de compostos orgânicos organofosforados produzidos pelo homem. Desta forma, se níveis suficientes destes compostos se acumularem nos habitats ou nas fontes de alimentos destes animais, existe um grande potencial para neurotoxicidade.

As concentrações de colesterol não-HDL entre os organismos marinhos foram muito semelhantes, sugerindo que o metabolismo lipídico destes animais sofreu alterações no decorrer do processo evolutivo para um novo ambiente. E que as aves marinhas podem ter uma fração de colesterol-HDL que não seja funcional para PON-1.

Algumas limitações do presente estudo são: 1) o fato de não separarmos os animais em machos e fêmeas pode haver diferenças entre sexo. Contudo, pela dificuldade da amostragem destes animais, visto que amostramos apenas animais que estavam em reabilitação ou que estavam em cativeiro e não animais de campo, optamos por não separar entre sexos pois o número de animais amostrado, se separado por sexo, seria muito pequeno para a realização de uma análise estatística adequada; 2) A enzima PON1 é uma enzima hepática detoxificante contra a ação de organofosforados em tetrápodes, contudo, não podemos afirmar que é a única proteção existente nestes animais contra estes agentes nocivos. Estudos posteriores são necessários para esclarecer este tópico de estudo.



## 5 CONCLUSÃO

A descrição do perfil bioquímico realizada neste estudo, especialmente das espécies *Arctocephalus australis*, *Nannopterum brasilianus* e *Spheniscus magellanicus*, é de grande importância para a compreensão da fisiologia destas espécies, visto que existem muito poucos dados a respeito destas espécies na literatura. Esses dados poderão ser utilizados em estudos futuros, inclusive para aprimorar os cuidados durante períodos de reabilitação em centros de conservação marinhos. Além disso, considerando que as zonas costeiras são áreas essenciais para a sobrevivência de espécies marinhas e que a atividade da enzima PON-1 é um fator protetor para a toxicidade de organofosforados, a confirmação de que existe baixa atividade desta enzima nos animais marinhos e costeiros encontrados na costa do Litoral Norte do Rio Grande do Sul reforça a necessidade de monitoramento do uso de agrotóxico na agricultura para a conservação das espécies marinhas desta região.

## REFERÊNCIAS

ALDRIDGE, W. N. **Two Types of Esterase (A and B) Hydrolysing p-Nitrophenyl Acetate, Propionate and Butyrate, and a Method for their Determination.** *Med. Res. Council Unit for Research in Toxicology*, v.53, 1953a.

ALDRIDGE, W. N. **An Enzyme Hydrolysing Diethyl p-Nitrophenyl Phosphate (E600) and its Identity with the A-esterase of Mammalian Sera.** *Med. Res. Council Unit for Research in Toxicology*, v.53, 1953b.

AMORIM, D. B. **Estudo de causa mortis de *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) (Lobo-marinho-sul-americano) no litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil.** Dissertação. 2014.

BAYLIS, A. M. M. *et al.* **Diet of South American fur seal sat the Falkland Islands.** *Marine Mammal Science*, v.30, n.3, p.1210-1219, 2014.

BREALEY, C. J. *et al.* **A-Esterase Activities in Relation to the Differential Toxicity of Pirimiphos-methyl to Birds and Mammals.** *Pestic. Sci.*, v.11, p.546-554, 1980.

CAIN, W. *et al.* **Characterization of lipoproteins from the turtle, *Trachemys scripta elegans*, in fasted and fed states.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. Vol. 134. P.783-794. 2003.

CAMPBELL, T. W. **Blood Chemistry of Lower Vertebrates.** *IVIS*, v.55, 2004.

CARR, R. L. *et al.* **Species Differences in Paraoxonase Mediated Hydrolysis of Several Organophosphorus Insecticide Metabolites.** *Journal of Toxicology*, article ID: 470189, 5p.

CASTRO-GONZÁLEZ, M. I. Ácidos Grasos Omega 3: Benefícios y fuentes. *INCI*, v.27, n.3, p.128-136, 2002.

CONTARTEZE, R. V. L. *et al.* **Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato.** *Rev. Bras. Med. Esporte*, v.13, n.3, p.169-174, 2007.

CORAIOLA, A. M. **Indicadores clínicos, hematológicos, bioquímicos e toxicológicos na pré e pós-reabilitação de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) no sul do Brasil.** Dissertação. 2012.

COSTA, L. G. *et al.* **Functional Genomics of the Paraoxonase (PON1) Polymorphisms: Effects on Pesticide, Sensitivity, Cardiovascular Disease, and Drug Metabolism.** *Annu. Rev. Med.*, v.54, p.371-392, 2003.

COSTA, L. G. *et al.* **Modulation of paraoxonase (PON1) activity.** *Biochemical Pharmacology*, v.69, p.541-550, 2005.

COSTA, L. G. *et al.* **Paraoxonase (PON1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity.** *Biomarkers*, v.8, n.1, p.1-12, 2003.

COSTA, L. G. **Serum Paraoxonase and Its Influence on Paraoxon and Chlorpyrifos-oxon Toxicity in Rats.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.103, p.66-76, 1990.

COSTA, L. G.; Galli, C. L. & Murphy, S. D. **Toxicology of Pesticides: Experimental, Clinical and Regulatory Perspectives.** NATO ASI. Series H: Cell Biology, v.13, 320p, 1987.

CUNHA, J. **Estudo da atividade e polimorfismos da paraoxonase-1 em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo-1 (HIV-1) tratados com inibidores de protease.** Tese. 2012.

DEAKIN, S. P. *et al.* **HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 50, n. 1, p. 102-109, 2011.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. **Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 18, n.12, p.1296-1301, 2014.

DIEPGEN, T.L.; MALLINCKRODT, M. G. **Interethnic Differences in the Detoxification of Organophosphates: The Human Serum Paraoxonase Polymorphism.** *Toxicology*, v.9, p.154-158.

FANCHIOTTI, F. E. *et al.* **Avaliação de óleos, carvão vegetal e vitamina E no desempenho e nas concentrações lipídicas do sangue e dos ovos de poedeiras.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 12, p. 2676-2682, 2010.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A. **Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: molecular aspects of cell signaling.** Nova Jersey, 2012.

GALLO, L. *et al.* **Hematology and Blood Chemistry Values in Free-Living Imperial Cormorants (*Phalacrocorax atriceps*).** *Avian Diseases*, v.57, p.737-743, 2013.

GALLO, L. *et al.* **Hematology, plasma biochemistry and trace element reference values for free-ranging adult Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*).** *Polar Biology*, v. 42, p.733-742, 2019.

GHELER-COSTA, C. *et al.* **Foraging behavior of Brazilian cormorant, *Nannopterum brasilianus* (Suliformes: Phalacrocoracidae).** *Zoologia*, v.35, 2018.

GOLDBERG, D. W. *et al.* **Serum biochemistry profile determination for wild loggerhead sea turtles nesting in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil.** *Ciência Rural*, v.41, n.1, p.143-148, 2011.

GRADELA, A. *et al.* **Biometria corporal e parâmetros hematológicos de *Trachemys scripta elegans* e *Trachemys dorbignyi* (Testudines: Emydidae) criadas em cativeiro em Petrolina, Pernambuco.** *Pesq. Vet. Bras.*, v.37, n.1, p.83-90, 2017.

GROSCOLAS, R.; ROBIN, J. P. **Long-term feeding and re-feeding in penguins.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v.128, p.645-655, 2001.

KEGLEY, S. E. *et al.* **Disrupting the balance: ecological impacts of pesticides in California.** CPR, San Francisco, 105p, 1999.

KOOYMAN, G. L. *et al.* **Physiology of diving marine mammals.** *Annu. Rev. Physiol.*, v.43, p.343-356, 1981.

LA DU, B. N. **Structural and functional diversity of paraoxonases.** *Nature Medicine*, v.2, n.11, 1996.

LEITE, A. T. M. **Determinação do perfil bioquímico de Tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) juvenis selvagens no Litoral Sul do Brasil.** Especialização. 2007.

LISBÔA, T. N. **Ocorrência, distribuição e comportamento da baleia-franca-austral, *Eubalaena australis* (DESMOULINS, 1822), em águas costeiras do litoral norte do rio grande do sul.** Monografia. 2016.

MACKNESS, B. *et al.* **The paraoxonase gene family and coronary heart disease.** *Current Opinion in Lipidology*, London, v. 4, n. 13, p. 357-362, Aug. 2002.

MACKNESS, M. I. *et al.* **Distinction between ‘A’-esterases and arylesterases.** *Biochem. J.*, v.245, p.293-296, 1987.

MACKNESS, B. *et al.* **Human Paraoxonase-1 overexpression Inhibits Atherosclerosis in a Mouse Model of Metabolic Syndrome.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.26, n.7, 2006.

MACKNESS, M.; MACKNESS, B. **Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression., promiscuous activities and multiple physiological roles.** *Gene*, v.405, n.10, 10p, 2015.

MÄDER, A. *et al.* **Ciclo sazonal de mortalidade do Pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) influenciado por fatores antrópicos e climáticos na costa do Rio Grande do Sul, Brasil.** *Revista Brasileira de Ornitologia*, v.8, n.3, p.228-233.

MARINKOVICH, M. *et al.* **Evaluation of Serial Blood Lactate and the Use of a Point-of-Care Lactate Meter in Live-Stranded Pinnipeds.** *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.50, n.1, p.137-146, 2019.

MAYORGA, L. F. S. P. *et al.* **Valores hematológicos e bioquímicos de pinguins-de-Magalhães em reabilitação no Espírito Santo, sudeste do Brasil.** *Pesq. Vet. Bras.*, v.35, supl.1, p.65-70, 2016.

MEIJER, A. A. R.; DISARÓ, S. T. **Aves Estuarinas do Paraná.** Museu de Ciências Naturais (UFPR). Curitiba, 2018.

MELLISH, J. E. **Health and condition in the adult Weddel seal of McMurdo Sound, Antarctica.** *Zoology*, v.114, p.177-183, 2011.

MENDONÇA JR, C. X. *et al.* **Efeito da adição de óleo de peixe à dieta sobre o desempenho e níveis de lípidos plasmáticos e de colesterol no ovo de galinhas poedeiras.** *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.*, v. 37, n. 1, p.79-83, 2000.

MEYER, W. K. *et al.* **Ancient convergent losses of Paraoxonase 1 yield potential risks for modern marine mammals.** *Science*, v.361, p.591-594, 2018.

MORAES, R. *et al.* **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos.** São Paulo: Arte e Ciência Vilipress, 288p, 2001.

MORAIS, J. B. **Bioquímica clínica de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) em soro e plasma com diferentes anticoagulantes.** Dissertação. 2016.

MOURA, N. *et al.* **Litoral norte do estado do Rio Grande do Sul: indicadores socioeconômicos e principais problemas ambientais.** *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, n.13, p.99-124, 2006.

MUCIN. **Catálogo de Atividades.** Edição Especial 35 Anos. 2018.

MULLER, A; BARROS, M. P. **Diversidade e abundância de aves costeiras em um treco do litoral norte do Rio Grande do Sul.** *Biotemas*, v.26,n.3, p.163-175, 2013.

NAYA, D. E.*et al.* **Diet of South American Fur Seals (*Arctocephalus australis*) in Isla de Lobos, Uruguay.** *Marine Mammal Science*. 18(3):734-745. Julho, 2002.

OLIVEIRA, K. R. *et al.* **Dieta de *Nannopterum brasilianus* (AVES: PHALACROCORACIDAE), no Sul do Brasil.** *Oecologiaaustralis*, v.23, n.3, p.432-439, 2019.

PEREIRA, C. M. *et al.* **Blood concentrations of lactate, glucose and corticosterone in dispersing hatchling sea turtles.** *Biology Open*, v.2, p.63-67, 2012.

PETRY, M. V. *et al.* **Ocorrência, alimentação e impactos antrópicos de aves marinhas nas praias do litoral do Rio Grande do Sul, sul do Brasil.** *Revista Brasileira de Ornitologia*, v.20, n.1, p.65-70, 2012.

PIRES, T. T. *et al.* **Hemograma e bioquímica sérica de tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) de vida livre e mantidas em cativeiro, no litoral norte da Bahia.** *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.*, v.46, n.1, p.11-18, 2009.

PONGANIS, P. J. *et al.* **Post-dive blood lactate concentrations in emperor penguins, *Aptenodytes forsteri*.** *The Journal of Experimental Biology*, v. 200, p. 1623-1626. 1997.

ROSSI, S. *et al.* **Aspectos biológicos da tartaruga-de-orelha-vermelha, *Trachemys scripta elegans* (Reptilia, Testudines, Emydidae), em cativeiro.** *Bioikos*, v.20, n.1, p.33-40, 2006.

SANTOS, J. T. **Análise das reservas energéticas de *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783) (Lobo-marinho-sul-americano) encontrados ao longo do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil.** Monografia. 2014.

SECCHIERO, S. *et al.* **Serum arylesterase (paraoxonase) activity following myocardial infarction.** *Clinica. Chimica. Acta.*, v.183, p.71-76, 1989.

SEGUEL, M. *et al.* **Hematology, Serum Chemistry, and Early Hematologic Changes in Free-Ranging South American Fur Seals (*Arctocephalus australis*) at Guafo Island, Chilean Patagonia.** *Journal of Wildlife Diseases*, v.52, n.3, short communications, 2016.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 862p.



SILVA, R. R. et al. **Occurrence of Magellanic Penguins along the Northeast Brazilian Coast during 2008 Austral Winter.** *The Scientific World Journal*. Article ID: 686184. 2012.

SIMÕES-LOPES, P. C. *et al.* **Nota sobre os Otariidae e Phocidae (Mammalia: Carnivora) da costa norte do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil.** *Biociências*, v.3, n.1, p.173-181, 1995.

SIMÕES-LOPES, P. C. **Interaction of Coastal Populations of *Tursiops truncatus* (Cetacea, Delphinidae) with the mullet artisanal fisheries in Southern Brazil.** *Biotemas*, v.4, n.2, p.83-94, 1991.

SOZBILEN, D.; KASKA, Y. **Biochemical blood parameters and hormone levels of foraging, nesting and injured loggerhead seaturtles (*Caretta caretta*) in Turkey.** *Turkish Journal of Zoology*, v. 42, p. 287-296, 2018.

STROHAECKER, T. M.; TOLDO JR., E. E. **O litoral norte do Rio Grande do Sul como um Pólo de Sustentabilidade Ambiental do Brasil Meridional.** *Revista Electrónica de Geografía y Ciencias Sociales*, v.11, n.245, 2007.

SWIMMER, Y. **Biochemical responses to fibropapilloma and captivity in the greenturtle.** *Journal of Wildlife Diseases*, v.36, n.1, p. 102-110. 2000.

TOMÁS, M. *et al.* **The Antioxidant Function of High Density Lipoproteins: A New Paradigm in Atherosclerosis.** *Rev. Esp. Cardio.*, v.57, n.6, p.557-569, 2004.

TRIGO, C. C. **Padrões de ocorrência da tartaruga marinha *Chelonia mydas* no litoral do Rio Grande do Sul e verificação da presença de marcas de crescimento em ossos longos.** Monografia. 2000.

VILA, L. G. **Bioquímica em Aves: Revisão de literatura.** 56p. 2013.

WALKER, C. H. **Pesticides and Birds – Mechanisms of Selectivity Toxicity.** *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.9, p.211-226, 1983.

WALKER, C. H.; Mackness, M. I. **“A” esterases and their role in regulating the toxicity of organophosphates.** *Arch. Toxicol.*, v.60, p-30-33, 1987.

WILHELM FILHO, D. *et al.* **Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals.** *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*, v.133, p. 885-892. 2002.

WILLIAMS, F. M. **Clinical Significance of Esterases in Man.** *Clinical Pharmacokinetics*, v.10, p.392-403, 1985.

ZAPPES, C. A. *et al.* **‘Human-dolphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) cooperativity fishery’ and its influence on cast net fishing activities in Barra de Imbé/Tramandaí, Southern Brazil.** *Ocean & Coastal Management*, v.54, p.427-432, 2011.