

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
MESTRADO EM ZOOLOGIA

CAMILA MIGUEL

**PADRÕES SANGUÍNEOS E INDICADORES DE ESTRESSE EM TARTARUGAS VERDES
JUVENIS**

Porto Alegre
2016

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

PADRÕES SANGUÍNEOS E INDICADORES DE ESTRESSE EM
TARTARUGAS VERDES JUVENIS

Camila Miguel

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429
Fone: (051) 320-3500
CEP 90619-900 Porto Alegre - RS
Brasil

2016

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**PADRÕES SANGUÍNEOS E INDICADORES DE ESTRESSE EM
TARTARUGAS VERDES JUVENIS**

Camila Miguel

Orientador: Dra. Guendalina Turcato Oliveira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE - RS - BRASIL

2016

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
APRESENTAÇÃO GERAL	1
Referências	11
ARTIGO CIENTÍFICO	15
Resumo	17
Introdução	18
Material e métodos	20
Resultados	25
Discussão	28
Referências	36
NORMAS PARA PUBLICAÇÃO	46

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmã, por sempre me incentivarem a seguir meus sonhos, mesmo que isso signifique ficar longe deles. Obrigada pela força e ajuda e por serem tão maravilhosos.

Ao meu namorado/melhor amigo/companheiro de aventuras, André Carlos Contini, por me aguentar falando toda hora sobre tartarugas, pelas correções da dissertação, pelo apoio e amor incondicional e principalmente por conseguir me fazer sorrir nos momentos em que tudo parece estar dando errado.

A minha orientadora, Guendalina Turcato Oliveira por me aceitar, mesmo eu nunca tendo trabalhado com fisiologia e principalmente por aceitar trabalhar com as tartarugas. Obrigada por sempre me incentivar a seguir na vida acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente a Betânia Souza de Freitas, pela ajuda nos experimentos, pelos conselhos, conversas e risadas. As bancadas eram sempre divertidas ao teu lado.

Ao Dr. João Feliz Duarte de Moraes pela ajuda estatística e interpretação dos resultados.

Ao Dr. Edgar Chagas Diefenthaler pelas conversas e conselhos nos momentos difíceis.

A toda equipe do projeto Tamar- Ubatuba, por terem me recebido tão bem, por aceitarem meu projeto e ajudarem em tudo que precisei, principalmente ao José Henrique Becker, obrigada pela confiança!

Ao Renato Velloso pela enorme ajuda na coleta de dados, pelo conhecimento e por ter me ensinado a coletar sangue, fazer necropsias e demais procedimentos na quarentena.

Ao Antonio Mauro Corrêa, também conhecido por Maurão perigosão, por ter feito o dia a dia no projeto ser de muito aprendizado e risadas, pelos cafés com bolachinhas, pelas pegadinhas, pela ajuda nas coletas de mergulho e principalmente pela amizade.

Ao Fernando Alvarenga por ter me ajudado no trabalho a campo e na estruturação do projeto. Aos meninos do campo Lucas Borsatto, Fernando Cortez Marques, Andrei Santo Antonio, Vander Bertoldo, Lucas R. Ferreira, pela ajuda nas coletas e captura por mergulho, pela parceria e paciência.

Aos estagiários que fizeram meus meses em Ubatuba serem inesquecíveis: Alicia Wood, Karol Ferreira, Mariana Burato, Maísa von Gal, Lívia Bessa, Wlad Polese, Denise Oliveira, Eduarda Daparé Kirnew, Roberto Carlos Cândido Lima Filho, Naiara Tessaro. Obrigada pela amizade!

Aos pescadores de Ubatuba sempre dispostos a ajudar nas capturas em rede de emalhe e cerco flutuante, pelas conversas e conhecimentos.

Aos professores do pós em Zoologia, pelos ensinamentos e por terem tanto amor pelo seu trabalho, o que acaba sendo transmitido para os alunos.

A CAPES e ao Proex pela ajuda financeira.

A Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci (USP), ao Dr. Matheus Parmegiani Jahn (UCS) e a Dra. Wania Aparecida Partata (UFRGS) por aceitarem fazer parte da banca e por todas as sugestões que enriqueceram este trabalho!

"Os que amam a vida não devem explicações a ninguém. Apenas amam.
São pessoas apaixonadas por tudo o que torna a existência possível.
E, apenas nesse particular, exigem os mínimos detalhes.
Até por que, quem não quer saber como é, na essência, o objeto de seu amor?
Que apaixonado pela vida não se entusiasma ao descobrir a tênue linha
que liga a relva aos seres do mar e costura o comportamento
de um rústico lagarto do deserto à aparente fragilidade de uma libélula?
Por isso, me propus a dar essas explicações, indo além dos detalhes.
Em tudo, até onde a Biologia já pôde chegar, procurando detalhar a vida,
busquei causa e conseqüência.
Se douraduras ou efêmeras, apenas o tempo dirá.
Afinal, não é assim também a vida?"

Dr. Luiz Eduardo Cheida

RESUMO

A pesca é uma das principais ameaças enfrentadas pelas tartarugas marinhas, porém os efeitos fisiológicos causados durante a captura nos diferentes artefatos de pesca são pouco estudados. O objetivo deste trabalho é estabelecer valores sanguíneos de referência para uma população de *Chelonia mydas* juvenis e compará-los com animais capturados incidentalmente pela pesca na mesma área, levando em conta a variação sazonal. Para tanto, coletou-se sangue de 96 tartarugas saudáveis, durante o verão e o inverno, nos três métodos de captura (mergulho livre, cerco flutuante e rede de emalhe). As amostras de sangue foram analisadas quanto as concentrações de glicose, lactato, proteínas totais, ácido úrico, albumina, lipídios totais, triglicerídeos, colesterol VLDL, colesterol total e corticosterona. Tartarugas capturadas no verão tiveram níveis mais elevados de glicose, proteínas totais, ácido úrico e albumina, e concentrações mais baixas de lipídios totais, em relação ao inverno. Apesar do cerco flutuante ser um mecanismo passivo de captura, seis dos dez parâmetros avaliados foram significativamente diferentes dos valores basais obtidos para espécie. A captura em redes de emalhe causou maiores perturbações que o cerco flutuante e todos os parâmetros avaliados diferiram-se significativamente dos valores obtidos para os animais capturados em mergulho livre (valores de referência). Esses resultados indicam que a captura incidental causa distúrbios nos parâmetros fisiológicos, ao quais podem ser utilizados como importantes marcadores em programas que visem auxiliar na reabilitação de tartarugas após a captura. Além disso, os valores de referência obtidos também podem ser utilizados para futuras comparações com populações da mesma espécie e com indivíduos afetados pelo estresse ou doenças.

Palavras-chave: corticosterona, valores de referência, bioquímica sanguínea, cerco flutuante, rede de emalhe

ABSTRACT

Fisheries is one of the main threats faced by sea turtles. However, literature relating the physiological effects of incidental capture by fishing gears is scarce. The aim of this study is to establish blood reference values for a juvenile population of *Chelonia mydas* and compare them with animals incidental captured by fisheries in the same area, taking account seasonal variation. Blood was collected from 96 healthy green sea turtles, during summer and winter, by three different methods (dive, pound net and gillnet). Blood samples were analyzed for glucose, lactate, total protein, uric acid, albumin, total lipids, triglycerides, VLDL cholesterol, total cholesterol and corticosterone concentrations. Turtles captured in summer had a significant increase in blood glucose, total protein, uric acid and albumin, and a decreased in total lipids compared with turtles captured in winter. Although pound net is a passive capture mechanism, six of ten parameters differed significantly from base-line values established for the species. Entanglement in gillnets caused greater perturbations than pound net and all parameters analyzed were significantly different from the values obtained for animals captured by diving (reference values). These data indicate that incidental capture causes significant physiological disturbance in sea turtles and the results obtained in this study are important to help in the rehabilitation of turtles after capture. Reference values can be used for future comparisons with populations of the same species and with unhealthy and stressed individuals.

Keywords: corticosterone, reference values, blood biochemistry, pound net, gillnet

APRESENTAÇÃO GERAL

Esta dissertação de mestrado é apresentada sob forma de artigo científico e está configurada de acordo com as normas do periódico *Naturwissenschaften*. Todas as legendas de figuras, tabelas e material suplementar do artigo estão incluídos ao final e estão conforme as normas do periódico. Abaixo uma breve descrição sobre o histórico do problema a ser abordado nesta dissertação.

As tartarugas marinhas estão entre os vertebrados pulmonados que conseguem mergulhar em grandes profundidades e por longos períodos, passando somente de 3 a 6% do seu tempo na superfície (Berkson 1967, Lutz and Bentley 1985).

A duração e a profundidade do mergulho variam entre as espécies e são reflexos do tamanho e de atributos fisiológicos dos indivíduos, assim como, da temperatura do ambiente (Lutcavage and Lutz 1990, Lutcavage and Lutz 1997).

Ao longo da evolução, esses animais sofreram diversas modificações para que conseguissem explorar o meio aquático. Entre as principais adaptações morfológicas estão: membros modificados em nadadeiras longas e rígidas; redução do peso da carapaça; pescoço encurtado; corpo em formato hidrodinâmico, que apresenta pouca resistência à água; passagens nasais que se fecham durante o mergulho; capacidade de conservar o calor corporal, nas tartarugas de couro, para permitir o forrageio em águas frias; e glândulas para a secreção do sal (Lutcavage and Lutz 1997, Renous et al. 2008).

No entanto, as características centrais que permitiram esses animais realizar mergulhos estendidos e repetitivos envolvem: um eficiente sistema de transporte e troca de gases, que permite o uso máximo das reservas de oxigênio; e uma extraordinária tolerância a hipóxia (Lutcavage and Lutz 1997).

Essa alta taxa de fluxo é possível pois as tartarugas possuem vias aéreas grandes e reforçadas, e os pulmões são extensivamente subdivididos, o que aumenta as trocas gasosas entre eles e a corrente sanguínea. Além disso, possuem a habilidade de retirar o oxigênio dos pulmões até quando as reservas estão em níveis quase indetectáveis, sem precisar aumentar a frequência cardíaca (Lutz and Bentley 1985).

Ao contrário dos mamíferos marinhos mergulhadores, que armazenam oxigênio no sangue e nos tecidos, a maioria das tartarugas marinhas utilizam o pulmão como primeira reserva desse gás, com exceção da tartaruga de couro, cujas reservas são maiores no sangue e nos tecidos, apresentando assim elevadas concentrações de hemoglobina e mioglobina (Lutz and Bentley 1985, Lutcavage and Lutz 1997).

Por precisarem retornar a superfície para respirar, as tartarugas marinhas desenvolveram um sistema para conseguir, em uma única respiração, esvaziar e encher “completamente” os pulmões. Necessitando de somente 2 a 3 segundos para expirar todo o CO₂ acumulado durante o mergulho anterior e inspirar O₂ suficiente para o próximo mergulho (Lutz and Bentley 1985).

Durante os mergulhos rotineiros, as tartarugas irão subir a superfície para respirar, antes que suas reservas de O₂ se esgotem. Desse modo, esses mergulhos são totalmente aeróbicos, pois os pulmões possuem reservas de oxigênio suficientes para esse processo e, apesar do volume de oxigênio diminuir continuamente, os consequentes aumentos de dióxido de carbono são relativamente pequenos, o que sugere um sistema eficiente de troca de íons (Lutcavage et al. 1989).

No entanto, quando os mergulhos são prolongados, ocorrem ajustes para estender o período de tempo das reservas de oxigênio, como: bradicardia (diminuição na frequência cardíaca); depressão metabólica (diminuição da taxa metabólica); e isquemia

periférica, que fornece oxigênio e substratos aeróbicos para o cérebro e coração, enquanto os outros tecidos se tornam anaeróbicos (Berkson 1966, Lutz and Bentley 1985).

Berkson (1966) observou que durante os 45 minutos iniciais de mergulho, a pressão sanguínea é mantida e poucas quantidades de lactato são liberadas no sangue pelos tecidos, sugerindo uma isquemia seletiva. Após esse período, a pressão sanguínea diminui gradualmente e o lactato se acumula no sangue, os depósitos de oxigênio são esgotados e os ajustes para economizar este gás são inúteis, o que leva uma mudança para o sistema anaeróbico, para suprir as necessidades de energia.

As tartarugas possuem uma habilidade extraordinária para sobreviver na falta de oxigênio. Sendo que, a maior adaptação que permitiu esses animais a suportarem a anoxia por algumas horas é a capacidade do cérebro de funcionar na ausência de oxigênio, através da manutenção dos níveis de ATP e da homeostase iônica, reduzindo a demanda metabólica para um nível atendido pela glicólise anaeróbica (Lutz et al. 1980, Lutz and Bentley 1985).

Contudo, sabe-se que durante o mergulho forçado, que ocorre principalmente por emaranhamentos em redes de pesca, as tartarugas marinhas apresentam respostas fisiológicas diferentes daquelas demonstradas em um mergulho normal (Stabenau et al. 1991, Lutcavage and Lutz 1997). Essas diferenças ocorrem principalmente em função do comportamento agressivo que esses animais apresentam na tentativa de se libertarem das redes, acelerando o metabolismo e consumindo rapidamente as reservas de oxigênio, resultando em um baixo tempo de tolerância à anoxia (Lutcavage and Lutz 1997).

Além disso, a captura incidental também causa uma resposta neuroendócrina que resulta na elevação de glicocorticóides, catecolaminas e outros fatores sanguíneos, necessários para restaurar a homeostase (Wingfield et al. 1998). Entre os glicocorticóides

está a corticosterona, cuja liberação aciona ajustes fisiológicos e comportamentais para eliminar ou reduzir o impacto dos potenciais estressores e promover a sobrevivência do animal, enquanto restringe outros processos não essenciais (Jessop 2001, Jessop et al. 2002). Os ajustes fisiológicos podem incluir a mobilização de reservas energéticas e a gliconeogênese, já os comportamentais estão ligados a comportamentos de luta e/ou fuga (Wingfield et al. 1998). No entanto, o estresse contínuo associado com os ferimentos ocasionados durante o emaranhamento, podem comprometer a sobrevivência dos animais após a liberação (Snoddy et al. 2009).

Nesse contexto, diversas pesquisas vêm sendo realizadas, em laboratório e em campo, para avaliar os impactos do mergulho forçado e dos diferentes artefatos de pesca na fisiologia das tartarugas marinhas (Tabela 1).

Wood et al. (1984) observaram que um indivíduo adulto de *Chelonia mydas* submetido a submersão forçada por 15 minutos, apresentou uma diminuição de 90 para 45% das reservas de oxigênio, já a concentração de lactato sanguíneo aumentou em dez vezes.

Para a *Caretta caretta*, as concentrações de oxigênio no sangue caíram a níveis insignificantes dentro de 30 minutos, enquanto que as concentrações de lactato sanguíneo duplicaram entre 30 e 90 minutos de imersão forçada (Lutz and Bentley 1985).

Sasso and Epperly (2006) observaram que a mortalidade de tartarugas capturadas em rede de arrasto, aumenta mais rapidamente no inverno do que no verão, pois as temperaturas baixas podem resultar em uma tolerância reduzida ao mergulho involuntário.

Tabela 1 Trabalhos realizados para verificar os efeitos fisiológicos dos diferentes artefatos de pesca e do mergulho forçado em tartarugas marinhas

Fonte	Local	Período	Número amostral	Espécie	Método de captura / Experimento	Coletas de amostras	Análises realizadas
Berkson (1966)	México-Laboratório	Agosto de 1959 a Dezembro de 1962	17	<i>Chelonia mydas agassizii</i>	Arpão; Foram submetidas a submersão forçada	Coleta de sangue e outros dados antes, durante e 2 horas após o experimento	Taxa cardíaca, volume respiratório, composição do ar na traqueia, pressão do sangue, ácido láctico, O ₂ , CO ₂ e pH
Berkson (1967)	México-Laboratório	Agosto de 1959 a Abril de 1963	22	<i>Chelonia mydas agassizii</i>	Arpão; Foram submetidas ao mergulho forçado em uma câmara de pressão	Sangue e outros dados coletados durante o experimento	Frequência cardíaca, volume do pulmão, nitrogênio no sangue
Wood et al. (1984)	Costa Rica-Laboratório	-	9	<i>Chelonia mydas</i>	Submetidas a submersão forçada	Coleta de sangue durante e após o experimento	pH, pO ₂ , pCO ₂ , HCO ₃ , ácido láctico, hematócrito
Lutz and Dunbar-Cooper (1987)	Estados Unidos-Flórida	Dezembro de 1978 a Agosto de 1982	88	<i>Caretta caretta</i>	Rede de arrasto de camarão	Coleta de sangue após a captura e 3, 4 e 5 horas depois da primeira coleta	K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , Mg, Lactato, Glicose, Ureia
Stabenau et al. (1991)	Estados Unidos-Flórida	-	17	<i>Lepidochelys kempii</i>	Foram criadas em laboratório e colocadas em rede de arrasto de camarão equipadas com TEDs	Coleta de sangue antes e após a submersão	Lactato, pH pO ₂ , pCO ₂ , HCO ₃ , Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻
Gregory et al. (1996)	Estados Unidos	Junho a Agosto de 1992; Janeiro a Março de 1993	107	<i>Caretta caretta</i>	Rede de arrasto de camarão;	Coletas seriadas de sangue: Tempos: 0, 60, 180 e 360 minutos	Corticosterona
		Maio a Novembro de 1992	11		Rede de emalhe	Tempos: 0, 30, 60, 180 e 360 minutos	
Hoopes et al. (2000)	Estados Unidos-Texas	1996-1997	58	<i>Lepidochelys kempii</i>	Rede de emalhe; Após a captura, foram feitos 2 grupos: Grupo 1- Mantido em tanques com água do mar Grupo 2- Colocadas em gaiolas no mar	Coletas seriadas de sangue para os dois grupos; Tempo: 1, 3, 6, 10, 24 e 48 horas	Lactato, Norepinefrina, Epinefrina, Glicose, Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻
Harms et al. (2003)	Estados Unidos-Carolina do Sul e Flórida	Junho a julho de 2001	16	<i>Caretta caretta</i>	Rede de arrasto	Coleta de sangue após a captura e 30 minutos depois da primeira coleta	Lactato, pH, pO ₂ , pCO ₂ e HCO ₃
	Carolina do Norte	Agosto de 2001	6		Cerco flutuante		
Stabenau and Vietti (2003)	Estados Unidos-Flórida	-	36	<i>Caretta caretta</i>	Tartarugas de 2 anos de idade foram submersas em redes de arrasto de camarão equipadas com TEDs	Coleta de sangue antes e após, cada mergulho (total de 3 mergulhos) e 180 minutos após a última submersão	pH, pO ₂ , pCO ₂ , Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , hematócrito, lactato, glicose, norepinefrina, e pressão osmótica do plasma

Continua...

Snoddy et al. (2009)	Estados Unidos-Carolina do Norte	Maio a Outubro de 2007	14	<i>Chelonia mydas</i>	Rede de emalhe	Coleta de sangue após a captura e antes da soltura	Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , P, Ca ²⁺ , LDH, AST, CPK, Proteína, Albumina, Globulina, Ácido úrico, Ureia, Glicose e Corticosterona
			4	<i>Lepidochelys kempii</i>			
Snoddy and Williard (2010)	Estados Unidos-Carolina do Norte	Maio a Outubro de 2007	14	<i>Chelonia mydas</i>	Rede de emalhe	Coleta de sangue logo após a captura	Lactato, Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻
			4	<i>Lepidochelys kempii</i>			
Williard et al. (2015)	Sudoeste do Mar Mediterrâneo	2009	10	<i>Caretta caretta</i>	Espinhel	Coleta de sangue logo após a captura	Corticosterona, Glicose e Lactato
		2008, 2010-2012	13		Rodeo		

Abreviações: pO₂= pressão parcial de oxigênio; pCO₂= pressão parcial de gás carbônico; HCO₃= bicarbonato, K⁺=potássio, Na⁺= sódio, Cl⁻= cloro, Mg= magnésio, Ca²⁺= Cálcio, P= fósforo, CO₂= gás carbônico, O₂= oxigênio, LDH= lactato desidrogenase, AST= aspartato aminotransferase, CPK= creatina fosfoquinase, Rodeo= técnica para capturar tartarugas que estão descansando na superfície, se necessário um barco persegue a tartaruga e o mergulhador se joga na água para capturá-la

Stabenau et al. (1991) relataram que a submersão forçada de *Lepidochelys kempii* por menos de 7,5 minutos em redes de arrasto de camarão, equipadas com dispositivo de escape de tartarugas (TEDs- Turtle Excluder Device) resultou em uma acidose sanguínea, originada primeiramente por fontes não respiratórias. Esse desequilíbrio entre ácido-base pode ser explicado pelo significativo aumento de lactato no sangue e diminuição do pH. As tartarugas também apresentaram um aumento de 10 vezes na frequência respiratória (de 1-2 respirações por minuto, para 11 respirações por minuto).

Da mesma forma, constatou-se um aumento no lactato, diminuição do pH e taquicardia em indivíduos de *Caretta caretta*, submersos em rede de arrasto de camarão por até 30 minutos (Harms et al. 2003) e de *Lepidochelys kempii* capturados em rede de emalhe (Hoopes et al. 2000).

Em contraste, Williard et al. (2015) analisaram o estado fisiológico de tartarugas cabeçudas, após a remoção do espinhel e observaram níveis moderados de lactato e glicose no sangue, o que pode ser explicado pelo livre acesso a superfície para respirar. Todavia, foi verificada uma indução ao estresse sistêmico, pelo aumento de corticosterona no sangue, o que pode beneficiar as tartarugas em curto prazo, por coordenar ajustes fisiológicos e comportamentais para promover a sobrevivência. Entretanto, algumas tartarugas foram liberadas com ferimentos graves, experimentando assim, estresse contínuo devido a dor ou a restrição dos movimentos, elevando ainda mais os níveis de corticosterona e aumentando o risco de efeitos subletais ou morte.

Gregory et al. (1996) compararam os níveis de corticosterona, em juvenis e adultos de *Caretta caretta* capturados em rede de arrasto de camarão e em rede de emalhe, durante o verão e inverno. Eles verificaram que a concentração mais alta de corticosterona foi no verão, em juvenis capturados em rede de arrasto.

Porém, para que estes autores possam afirmar que os resultados obtidos em seus trabalhos estão alterados e que diferem dos apresentados pelas tartarugas em condições normais, precisa-se de valores de referência.

Hoje, é consenso que devem ser estabelecidos valores sanguíneos de referência para tartarugas marinhas saudáveis, em nível populacional e por área geográfica, considerando-se idade, sexo e variações sazonais (Aguirre and Balazs 2000, Whiting et al. 2007, Prieto-Torres et al. 2013), para assim conseguir comparar com animais enfermos ou afetados pelo estresse.

Pesquisas prévias sugerem que as variações bioquímicas do sangue de tartarugas podem estar associadas com as áreas geográficas, habitats e genética das populações (Herbst and Jacobson 2003), maturidade e sexo dos indivíduos (Bolten and Bjorndal 1992, Hamann et al. 2006), condições de migração, reprodução e dieta (Stamper and Harms 2005, Whiting et al. 2007).

Devido a uma grande variedade de razões, dados de referência ainda não estão disponíveis para a maioria das populações de tartarugas marinhas ao redor do mundo, incluindo populações ameaçadas de tartaruga verde (*Chelonia mydas*) (Hamann et al. 2006, Flint et al. 2010).

Atualmente os estudos com essa espécie estão principalmente restritos a algumas populações na Bahamas (Bolten and Bjorndal 1992), Taiwan (Fong et al. 2010), Estados Unidos (Aguirre et al. 1995, Anderson et al. 2011), Emirados Árabes Unidos (Hasbún et al. 1998), Venezuela (Montilla et al. 2008, Prieto-Torres et al. 2013), Uruguai (Ferrando 2010) e Austrália (Flint et al. 2010, Whiting et al. 2007) (Tabela 2).

Tabela 2. Trabalhos que estabeleceram valores sanguíneos de referência para populações de *Chelonia mydas*

Fonte	Local	Número amostral	Classe etária	Período	Método de captura
Bolten and Bjorndal (1992)	Bahamas	100	Juvenil	Abril de 1988	Mergulho livre
Hasbún et al. (1998)	Emirados Árabes Unidos	62	Adulto, sub-adulto e juvenil	–	Rede de emalhe
Aguirre and Balazs (2000)	Havaí	90	Juvenil	1991 – 1995	Rede de emalhe e mergulho
Hamann et al. (2006)	Austrália	35	Adulto e sub-adulto	Abril de 2002	Rodeo
Whiting et al. (2007)	Austrália	110	Juvenil	–	Rodeo e Rede de emalhe
Montilla et al. (2008)	Venezuela	28	Adulto e sub-adulto	Abril a Agosto de 2004	Rede de emalhe
Ferrando (2010)	Uruguai	39	Juvenil	Janeiro, Fevereiro e Março de 2007 e 2010	Rede de emalhe
Flint et al. (2010)	Austrália	211	Adulto, sub-adulto e juvenil	Junho e Julho de 2007	Rodeo
Fong et al. (2010)	Taiwan	27	Adulto e sub-adulto	Março de 2007 a Novembro de 2008	Rede de emalhe
Labrada-Martagón et al. (2010)	México	43	Adulto, sub-adulto e juvenil	2005 – 2007	Rede de emalhe
Prieto-Torres et al. (2013)	Venezuela	59	Adulto	Julho a Setembro de 2010	Captura passiva e mergulho livre
Lewbart et al. (2014)	Galápagos	28	Adulto e sub-adulto	Junho e Julho de 2003	Mergulho livre
Page-Karjian et al. (2014)	Porto Rico	79	Sub-adulto e juvenil	2005 – 2007	Rede de emalhe
Santos et al. (2015)	Brasil	95	Juvenil	Junho de 2001 a Julho de 2004	Rede de emalhe, Tarrafa

Rodeo= técnica para capturar tartarugas que estão descansando na superfície, se necessário um barco persegue a tartaruga e o mergulhador se joga na água para capturá-la

O único trabalho encontrado com *Chelonia mydas* no Brasil é de Santos et al. (2015) que determinaram os padrões sanguíneos de uma população de juvenis selvagens no Espírito Santo, comparando animais saudáveis e com fibropapilomatose.

A tartaruga verde é uma espécie bem distribuída em águas tropicais e subtropicais, próximas aos continentes e ao redor de ilhas, sendo rara em águas temperadas (Márquez 1990). No Brasil, elas podem ser encontradas por toda a costa, mas desovam principalmente nas ilhas oceânicas de Trindade (ES), Atol das Rocas (RN) e Fernando de Noronha (PE).

Ubatuba (SP) é uma importante área de alimentação para as tartarugas dessa espécie, por isso o Projeto Tamar possui uma base para monitoramento dos animais que são capturados incidentalmente nas redes de emalhe e nos cercos flutuantes. Fazendo um trabalho de conscientização dos pescadores, da comunidade da região e dos turistas que visitam o projeto (Tamar 2015).

REFERÊNCIAS

- Aguirre A, Balazs G (2000) Blood biochemistry values of green turtles, *Chelonia mydas*, with and without fibropapillomatosis. *Comp Haematol Int* 10(3):132–137
- Aguirre A, Balazs G, Spraker T, Gross T (1995) Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiol Zool* 68:831–854
- Anderson ET, Minter LJ, Clarke EO (2011) The effects of feeding on hematological and plasma biochemical profiles in green (*Chelonia mydas*) and kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) sea turtles. *Vet Med Int* 2011:1–7
- Berkson H (1966) Physiological adjustments to prolonged diving in the pacific green turtle (*Chelonia mydas agassizii*). *Comp Biochem Physiol* 18(1):101–119
- Berkson H (1967) Physiological adjustments to deep diving in the pacific green turtle (*Chelonia mydas agassizii*). *Comp Biochem Physiol* 21(3):507–524
- Bolten A, Bjorndal K (1992) Blood profiles for a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific relationships. *J Wildl Dis* 28(3):407–413
- Ferrando V (2010) Bioquímica sanguínea de la tortuga verde juvenil (*Chelonia mydas*) en Cerro Verde, Rocha, Uruguay. Tesis Doctoral, Universidad del la República
- Flint M, Morton JM, Limpus CJ (2010) Development and application of biochemical and haematological reference intervals to identify unhealthy green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Vet J* 185:299–304
- Fong C, Chen H, Cheng I (2010) Blood profiles from wild populations of green sea turtles in Taiwan. *J Vet Med Anim Health* 2:8–10
- Gregory LF, Gross TS, Bolten AB, Bjorndal KA, Guillette LJ (1996) Plasma corticosterone concentrations associated with acute captivity stress in wild loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Gen Comp Endocrinol* 104:312–320
- Hamann M, Schäuble SC, Simon T, Evans S (2006) Demographic and health parameters of green sea turtles *Chelonia mydas* foraging in the Gulf of Carpentaria, Australia. *Endang Spec Res* 2:81–88
- Harms CA, Mallo KM, Ross PM, Segars A (2003) Venous blood gases and lactates of wild loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) following two capture techniques. *J Wildl Dis* 39:366–374
- Hasbún CR, Lawrence AJ, Naldo J, Samour JH, Al-Ghais SM (1998) Normal blood chemistry of free-living green sea turtles, *Chelonia mydas*, from the United Arab Emirates. *Comp Haematol Int* 8:174–177

- Herbst L, Jacobson ER (2003) Practical approaches for studying sea turtle health and disease. In: Lutz PL, Musick JA, Wyneken J (eds) The biology of sea turtles, vol 2. CRC Press, Washington, pp 385–410
- Hoopes LA, Landry AM, Stabenau EK (2000) Physiological effects of capturing kemp's ridley sea turtles, *Lepidochelys kempii*, in entanglement nets. *Can J Zool* 78:1941–1947
- Jessop TS (2001) Modulation of the adrenocortical stress response in marine turtles (Cheloniidae): evidence for a hormonal tactic maximizing maternal reproductive investment. *J Zool Lond* 254:57–65
- Jessop TS, Knapp R, Whittier J, Limpus CJ (2002) Dynamic endocrine responses to stress: evidence for energetic constraints and status dependence in male green turtles. *Gen Comp Endocrinol* 126:59–67
- Labrada-Martagón V, Méndez-Rodríguez LC, Gardner SC, López-Castro M, Zenteno-Savín T (2010) Health indices of the green turtle (*Chelonia mydas*) along the Pacific Coast of Baja California Sur, Mexico. I. Blood biochemistry values. *Chelonian Conserv Biol* 9(2):162–172
- Lewbart GA, Hirschfeld M, Denkinger J, Vasco K, Guevara N, García J, Muñoz J, Lohmann KJ (2014) Blood gases, biochemistry, and hematology of galapagos green turtles (*Chelonia mydas*). *PLoS ONE* 9(5): e96487
- Lutcavage ME, Lutz PL (1990) Voluntary diving metabolism and ventilation in the loggerhead sea turtle. *J Exp Mar Bio Ecol* 147(2):287–296
- Lutcavage ME, Lutz PL (1997) Diving physiology. In: Lutz PL, Musick JA (eds) The Biology of sea turtles, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, pp 277–296
- Lutcavage ME, Lutz PL, Baier H (1989) Respiratory mechanics of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Respir Physiol* 76:13–24
- Lutz PL, Bentley TB (1985) Respiratory physiology of diving in the sea turtle. *Copeia* 1985(3):671–679
- Lutz PL, Dunbar-Cooper A (1987) Variations in the blood chemistry of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*. *Fish Bull* 85:37–43
- Lutz PL, LaManna JC, Adams MR, Rosenthal M (1980) Cerebral resistance to anoxia in the marine turtle. *Respir Physiol* 41:241–251
- Márquez R (1990) Sea turtles of the World. FAO Species Catalogue, Rome
- Montilla A, Hernández J, Bravo A (2008) Valores bioquímicos en sangre de la tortuga verde (*Chelonia mydas*) presentes en la Alta Guajira, Venezuela. *Revista Científica XVIII*:431–436

- Page-Karjian A, Rivera S, Torres F, Diez C, Moore D, Van Dam R, Brown C (2014) Baseline blood values for healthy free-ranging green sea turtles (*Chelonia mydas*) in Puerto Rico. *Comp Clin Pathol* DOI 10.1007/s00580-014-1947-1
- Prieto-Torres DA, Hernández JL, Henríquez ARB, Alvarado MC, Dávila MJ (2013) Blood biochemistry of the breeding population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the Aves Island Wildlife Refuge, Venezuela. *South Am J Herpetol* 8:147–154
- Renous S, Lapparent de Broin F, Depecker M, Davenport J, Bels V (2008) Evolution of locomotion in aquatic turtles. In: Wyneken J, Godfrey MH, Bels V (eds) *Biology of turtles*. CRC Press, Boca Raton, pp 97–138
- Santos MRD, Martins AS, Baptistotte C, Work TM (2015) Health condition of juvenile *Chelonia mydas* related to fibropapillomatosis in southeast Brazil. *Dis Aquat Organ* 115:193–201
- Sasso CR, Epperly SP (2006) Seasonal sea turtle mortality risk from forced submergence in bottom trawls. *Fish Res* 81:86–88
- Snoddy JE, Landon M, Blanvillain G, Southwood A (2009) Blood biochemistry of sea turtles captured in gillnets in the Lower Cape Fear River, North Carolina, USA. *J Wildl Manage* 73(8):1394–1401
- Snoddy JE, Williard AS (2010) Movements and post-release mortality of juvenile sea turtles released from gillnets in the lower Cape Fear River, North Carolina, USA. *Endanger Species Res* 12:235–247
- Stabenau EK, Heming TA, Mitchell JF (1991) Respiratory, acid–base and ionic status of kemp’s ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*) subjected to trawling. *Comp Biochem Physiol A* 99:107–111
- Stabenau EK, Vietti KRN (2003) The physiological effects of multiple forced submergences in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Fish Bull* 101(4):889–899
- Stamper M, Harms C (2005) Relationship between barnacle epibiotic load and hematologic parameters in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*), a comparison between migratory and residential animals in Pamlico Sound, North Carolina. *J Zoo Wildl Med* 36:635–641
- Tamar (2015) Bases- Ubatuba. Oficial website. <http://www.tamar.org.br/base.php?cod=21>. Accessed 26 April 2015
- Whiting SD, Guinea ML, Limpus CJ, Fomiatti K (2007) Blood chemistry reference values for two ecologically distinct populations of foraging green turtles, eastern Indian Ocean. *Comp Clin Path* 16:109–118
- Williard A, Parga M, Sagarminaga R, Swimmer Y (2015) Physiological ramifications for loggerhead turtles captured in pelagic longlines. *Biol Lett* 11:20150607

Wingfield JC, Maney DL, Breuner CW, Jacobs JD, Lynn S, Ramenofsky M, Richardson RD (1998) Ecological bases of hormone-behavior interactions: the “emergency life history stage”. *Am Zool* 38:191–206

Wood SC, Gatz RN, Glass ML (1984) Oxygen transport in the green sea turtle. *J Comp Physiol B* 154(3):275–280

ARTIGO CIENTÍFICO

Efeitos fisiológicos da captura incidental e da sazonalidade em juvenis de tartaruga verde

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Naturwissenschaften*

(a tradução para o inglês está sendo feita)

1 **Efeitos fisiológicos da captura incidental e da sazonalidade em juvenis**
2 **de tartaruga verde**

3 Camila Miguel¹, Betânia Souza de Freitas¹, Guendalina Turcato Oliveira¹

4

5 ¹Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfofisiológicas -
6 Laboratório de Fisiologia da Conservação. Avenida Ipiranga, 6681 (Prédio 12, Bloco C, Sala 250), Porto
7 Alegre- RS, CEP 90619-900, Brasil

8

9 Autor correspondente:

10 Camila Miguel

11 miguelitz@hotmail.com

12 +55 54 91435503 (telefone)

13 +55 5434622232 (fax)

RESUMO

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

A pesca é uma das principais ameaças enfrentadas pelas tartarugas marinhas, porém os efeitos fisiológicos causados durante a captura nos diferentes artefatos de pesca são pouco estudados. O objetivo deste trabalho é estabelecer valores sanguíneos de referência para uma população de *Chelonia mydas* juvenis e compará-los com animais capturados incidentalmente pela pesca na mesma área, levando em conta a variação sazonal. Para tanto, coletou-se sangue de 96 tartarugas saudáveis, durante o verão e o inverno, nos três métodos de captura (mergulho livre, cerco flutuante e rede de emalhe). As amostras de sangue foram analisadas quanto as concentrações de glicose, lactato, proteínas totais, ácido úrico, albumina, lipídios totais, triglicerídeos, colesterol VLDL, colesterol total e corticosterona. Tartarugas capturadas no verão tiveram níveis mais elevados de glicose, proteínas totais, ácido úrico e albumina, e concentrações mais baixas de lipídios totais, em relação ao inverno. Apesar do cerco flutuante ser um mecanismo passivo de captura, seis dos dez parâmetros avaliados foram significativamente diferentes dos valores basais obtidos para espécie. A captura em redes de emalhe causou maiores perturbações que o cerco flutuante e todos os parâmetros avaliados diferiram-se significativamente dos valores obtidos para os animais capturados em mergulho livre (valores de referência). Esses resultados indicam que a captura incidental causa distúrbios nos parâmetros fisiológicos, ao quais podem ser utilizados como importantes marcadores em programas que visem auxiliar na reabilitação de tartarugas após a captura. Além disso, os valores de referência obtidos também podem ser utilizados para futuras comparações com populações da mesma espécie e com indivíduos afetados pelo estresse ou doenças.

Palavras-chave: corticosterona, valores de referência, bioquímica sanguínea, cerco flutuante, rede de emalhe

INTRODUÇÃO

39

40 As tartarugas marinhas enfrentam diversas ameaças ao longo do seu ciclo de vida,
41 no entanto, a captura incidental em artefatos de pesca é o principal fator de declínio das
42 populações ao redor do mundo (National Research Council 1990, Wallace et al. 2010).

43 A pesca é um problema de crescente preocupação, pois apesar das tartarugas, na
44 maioria das vezes, serem liberadas vivas, o destino final delas é desconhecido (Gearhart
45 2001). Sendo que, perturbações graves nas funções fisiológicas normais e lesões sofridas
46 durante o entrelaçamento nas redes de pesca podem levar a uma mortalidade não
47 documentada após a soltura (Harms et al. 2003, Stabenau and Vietti 2003, Snoddy et al.
48 2009).

49 Snoddy and Williard (2010) avaliaram por telemetria os movimentos de tartarugas
50 marinhas após a liberação das redes de emalhe e verificaram que 7,1 a 28,6% dos animais
51 vieram a óbito após a soltura. Eles também observaram diferenças nos íons do plasma
52 (K^+ , Cl^- e Na^+) e nos níveis de lactato entre as tartarugas que tiveram uma mortalidade
53 confirmada e as que sobreviveram.

54 Sabe-se que durante a submersão forçada as tartarugas marinhas apresentam
55 respostas fisiológicas diferentes daquelas demonstradas em um mergulho normal
56 (Stabenau et al. 1991, Lutcavage and Lutz 1997). Essas diferenças ocorrem
57 principalmente em função do comportamento agressivo que esses animais apresentam na
58 tentativa de se libertarem das redes, acelerando o metabolismo e consumindo rapidamente
59 as reservas de oxigênio, resultando em um baixo tempo de tolerância à anoxia (Lutcavage
60 and Lutz 1997).

61 Os esforços para escapar das redes e alcançar a superfície para respirar, também
62 resultam em distúrbios metabólicos. Tartarugas presas em rede de emalhe e rede de

63 arrasto de camarão apresentaram acidose metabólica e respiratória, com elevadas
64 concentrações de lactato, PCO_2 e PO_2 no sangue, mudanças nas concentrações de íons
65 (Na^+ , K^+ , Cl^-), assim como diminuição do pH e aumento da frequência respiratória
66 (Stabenau et al. 1991, Hoopes et al. 2000, Harms et al. 2003, Stabenau and Vietti 2003).

67 Em contraste, tartarugas cabeçudas capturadas em espinhel e em cerco flutuante,
68 não apresentaram grandes perturbações nos níveis de lactato, glicose e pH no sangue, o
69 que pode ser explicado pelo livre acesso a superfície, durante a permanência nesses
70 artefatos de pesca. Porém, as concentrações encontradas ainda estão acima dos valores de
71 referência estabelecidos para essa espécie (Harms et al. 2003, Williard et al. 2015).

72 Gregory et al. (1996) observaram que a captura em artefatos de pesca pode
73 desencadear uma resposta sistêmica ao estresse, resultando em elevados níveis de
74 corticosterona e glicose. Snoddy et al. (2009) verificaram que tartarugas verdes
75 capturadas em rede de emalhe apresentaram concentrações de corticosterona muito acima
76 dos valores basais estabelecidos para a espécie. No entanto, tartarugas cabeçudas presas
77 em espinhel tiveram níveis mais baixos desse hormônio (Williard et al. 2015).

78 Sabe-se que essas respostas fisiológicas podem persistir após a liberação das redes,
79 dependendo da extensão dos ferimentos ou do estresse vivenciado, afetando assim as
80 chances de sobrevivência desses animais. Stabenau and Vietti (2003) observaram que
81 após a soltura, as tartarugas passaram longos períodos na superfície para se recuperar e
82 restaurar a homeostase para os níveis pré-submersão. Contudo, dependendo de quanto
83 tempo a tartaruga ficou submersa e quantas vezes seguidas ela foi exposta a esta situação,
84 esse período pode se estender por até 20 horas (Lutz and Dunbar-Cooper 1987). Além
85 disso, esse tempo na superfície pode deixar as tartarugas vulneráveis a outras ameaças,
86 como predadores e colisões com embarcações (Snoddy et al. 2009).

87 Desse modo, a avaliação bioquímica do sangue no momento em que a tartaruga
88 é capturada pode fornecer informações valiosas sobre as condições fisiológicas do animal
89 e qual o melhor tratamento após a liberação das redes, assim como, ajudar na tomada de
90 decisão para mitigar a mortalidade e as lesões sofridas durante a captura. Porém, como
91 esses parâmetros avaliam mecanismos e vias metabólicas em situações fisiológicas
92 específicas e de curto prazo é importante considerar as variações sazonais.

93 Devido à escassez de trabalhos sobre a influência da sazonalidade nos efeitos
94 fisiológicos durante a captura em diferentes artefatos de pesca, assim como valores de
95 referência para esta espécie no Brasil. O presente estudo tem como objetivo estabelecer
96 valores sanguíneos de referência para uma população de juvenis de *Chelonia mydas*,
97 verificando a variação sazonal desses parâmetros. Assim como, avaliar os efeitos
98 fisiológicos da captura incidental em redes de emalhe e cerco flutuante e comparar os
99 resultados com indivíduos capturados por mergulho livre.

100

101

MATERIAL E MÉTODOS

102 *Área de estudo e período*

103 Ubatuba (23°26'S e 45°05'W) está localizada no litoral norte do estado de São
104 Paulo, Brasil. Sua costa possui 100 km de extensão e alterna entre praias e costões
105 rochosos. Comunidades tradicionais, que possuem a pesca artesanal como segunda fonte
106 de renda, ocupam muitas praias da região.

107 Ubatuba também é uma importante área de alimentação de tartarugas verdes juvenis
108 no Brasil e devido a sobreposição desse habitat com a pesca artesanal, muitas capturas
109 incidentais ocorrem nessa área (Gallo et al. 2006).

110 Esse estudo foi realizado de Janeiro a Março (verão) e de Julho a Setembro de 2015
111 (inverno).

112

113 *Métodos de captura*

114 As tartarugas foram capturadas usando três diferentes técnicas:

115 Cerco flutuante: é uma armadilha feita de redes ancoradas no fundo do mar, que se
116 estendem pela coluna de água. Não é um método seletivo de espécies e os peixes
117 capturados permanecem vivos e nadando no círculo formado pelas redes. Do mesmo
118 modo, as tartarugas capturadas por esse método geralmente não se emaranham nas redes
119 e podem subir a superfície para respirar, permanecendo vivas até os pescadores checarem
120 as redes, o que ocorre de uma a três vezes por dia. Desse modo, o tempo máximo de
121 permanência de uma tartaruga no cerco flutuante foi de 12 horas.

122 Rede de emalhe: é geralmente colocada em águas com 2 a 15 metros de
123 profundidade por um a três pescadores usando uma canoa. Elas podem ser colocadas na
124 superfície ou no fundo do mar. As redes possuem um comprimento de 50 a 100 metros,
125 altura de 1,5 a 3 metros e malha de 10 a 14 centímetros. As redes de emalhe permanecem
126 no máximo 7 horas mar, até a chegada dos pescadores. Apesar do tempo prolongado,
127 nenhuma tartaruga morreu nesse método de captura e o tempo que cada uma permaneceu
128 nas redes é inestimado.

129 Mergulho livre: as tartarugas foram capturadas em águas rasas por mergulhadores
130 usando snorkel, máscaras e nadadeiras. Assim que uma tartaruga era avistada, ela era
131 perseguida e capturada e então carregada para a beira da praia para a coleta de dados. Os
132 resultados obtidos nesse método foram utilizados para estabelecer valores de referência
133 dos parâmetros bioquímicos e corticosterona, e como controle para a comparação entre
134 os demais métodos.

135 O estresse da captura e manuseio podem influenciar os valores obtidos, por isso
136 todas as tartarugas foram manuseadas da mesma forma e as amostras de sangue foram
137 obtidas em aproximadamente 5 minutos após a captura.

138

139 *Coletas de amostras*

140 Foram tomadas medidas do comprimento curvilíneo da carapaça (CCC) e largura
141 curvilínea da carapaça (LCC) de cada tartaruga, com uma fita métrica plástica com
142 precisão de $\pm 0,1$ cm, de acordo com Bolten (1999). Uma balança de mola (dinamômetro)
143 com precisão de 0,1 kg foi utilizada para pesar os animais.

144 Somente juvenis (CCC < 65 cm) foram incluídos nesse estudo. Como o sexo dos
145 animais juvenis não pode ser determinado através de um exame externo (Bolten and
146 Bjorndal 1992) e não foi utilizado laparoscopia, esse parâmetro não foi incluído nas
147 análises.

148 Para identificar os indivíduos, as tartarugas foram duplamente anilhadas (uma
149 anilha foi aplicada em cada nadadeira frontal), com anilhas metálicas (National Band and
150 Tag Company, USA, style 681), de acordo com Limpus (1992), antes da liberação do
151 animal. O estado de saúde foi determinado através de avaliação visual (Bjorndal et al.
152 2000). Tartarugas em ótimas condições físicas, sem lesões e/ou ferimentos externos e sem
153 evidência de emagrecimento ou doença (fibropapilomatose) foram classificadas como
154 saudáveis. Tartarugas em más condições e/ou com anormalidades clínicas foram
155 classificadas como doentes e não foram utilizadas nesse estudo.

156 A temperatura da superfície do mar nos dias e locais das coletas dos animais foi
157 obtida através do site da NOAA (<http://www.noaa.gov/>).

158

159 *Coleta de sangue e preparação das amostras*

160 Amostras de sangue (2 mL) foram coletadas do seio cervical dorsal (Owens and
161 Ruiz 1980), com uma agulha 21G esterilizada e transferidas para um tubo com heparina
162 (BD, Vacutainer®). As amostras foram mantidas em uma caixa de isopor com gelo até o
163 processamento. O plasma foi separado por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos e
164 posteriormente congelado e armazenado a -20 °C até o momento das análises.

165

166 *Bioquímica do plasma*

167 Os parâmetros bioquímicos foram analisados em duplicata, através de
168 espectrofotometria e kits comerciais (Labtest®), de acordo com as instruções do
169 fabricante. Os seguintes kits foram utilizados: proteínas totais (Ref.: 99-250), glicose
170 (Ref.: 133-1/500), lactato (Ref.: 138-1/50), triglicerídeos (Ref.: 87-2/100), colesterol total
171 (Ref.: 76-2/100), ácido úrico (Ref.: 140-1/250) e albumina (Ref.: 19).

172 O colesterol VLDL foi calculado a partir dos resultados dos triglicerídeos, pela
173 fórmula: Triglicerídeos / 5 = colesterol VLDL. A concentração de lipídios totais foi
174 determinada em um espectrofotômetro a 510 nm, usando o método da sulfofosfovanilina,
175 de acordo com Frings and Dunn (1970).

176

177 *Corticosterona*

178 As concentrações plasmáticas de corticosterona foram determinadas utilizando o
179 kit Corticosterone ELISA (ENZO Life Sciences®) de acordo com as instruções do
180 fabricante (ADI-900-097). As amostras foram primeiramente diluídas em 10 µL de
181 reagente de deslocamento de esteróide (1:100 vezes em água deionizada) para cada 10µL
182 de plasma. Após, as amostras foram diluídas 40 vezes em um tampão de ensaio fornecido
183 pelo fabricante. A curva padrão foi preparada em uma solução tampão com concentrações

184 conhecidas de corticosterona (160, 800, 4000, 20000 e 100.000 pg/mL). Todas as
185 amostras foram analisadas em uma única placa e o coeficiente de variação intra ensaio
186 foi de 1,37%. A absorbância foi lida em 405 nm, utilizando um leitor de ELISA. A curva
187 padrão gerada no ensaio foi utilizada para calcular a concentração de corticosterona nas
188 amostras, por interpolação.

189

190 *Análise estatística*

191 Foram calculadas as médias, os desvios padrões da média, os erros padrões e os
192 intervalos de referência para cada parâmetro. Para determinar a normalidade e
193 homogeneidade dos dados utilizou-se o teste Kolmogorov-Smirnov e Levene,
194 respectivamente. A comparação entre os métodos de captura (cerco flutuante, rede de
195 emalhe e mergulho livre) foi avaliada por Kruskal-Wallis (dados que não apresentaram
196 distribuição normal; com teste complementar de Dunn) ou Análise de variância de uma
197 via- ANOVA (dados com distribuição normal; com teste complementar de Bonferroni
198 quando $p > 0,05$ ou Games-Howell quando $p < 0,05$).

199 Para analisar se os valores dos parâmetros sanguíneos diferiram-se entre as estações
200 (verão e inverno), utilizou-se o teste t de Student ou Mann-Whitney. A relação dos
201 parâmetros sanguíneos com o tamanho corporal (CCC) e a temperatura da água foi
202 avaliada usando correlação de Pearson.

203 As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Para o tratamento
204 estatístico foi utilizado o software *Statistical Package for Social Science (SPSS)*, versão
205 19.0 para Windows.

206

RESULTADOS

207

208 Um total de 96 tartarugas foram capturadas durante o verão e o inverno de 2015,
209 nos três diferentes métodos de captura (verão: 2 animais em rede de emalhe, 19 animais
210 em cerco flutuante e 12 animais em mergulho livre; inverno: 34 animais em rede de
211 emalhe, 10 animais em cerco flutuante e 19 animais em mergulho livre) e todas foram
212 consideradas saudáveis e sem fibropapilomatose.

213 As tartarugas capturadas ao longo do estudo eram juvenis e a média do CCC e do
214 LCC foi de $43,6 \pm 8,87$ cm (31,5 – 68 cm) e $39,5 \pm 7,4$ cm (28,5 – 63 cm), respectivamente.
215 Já o peso teve uma média de $10,9 \pm 7,5$ kg (3,5 – 34 kg). Não houve diferenças
216 significativas entre o tamanho das tartarugas e os diferentes métodos de captura (CCC:
217 $p= 0,070$; LCC: $p= 0,086$; Peso $p= 0,092$) e nem entre as estações avaliadas (CCC: $p=$
218 $0,165$; LCC: $p= 0,123$; Peso $p= 0,160$).

219 Observou-se uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre o tamanho corporal
220 (CCC) e os valores de proteínas totais ($r= 0,576$), glicose ($r= 0,230$), albumina ($r= 0,524$),
221 lipídios totais ($r= - 0,336$), triglicerídeos ($r= 0,334$) e colesterol VLDL ($r= 0,334$).

222 A temperatura da água nos locais de coletas dos animais teve uma média de $28,3^{\circ}\text{C}$
223 no verão e $21,6^{\circ}\text{C}$ no inverno. Encontrou-se uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre
224 a temperatura da água e as concentrações de proteínas totais ($r= 0,681$), glicose ($r= 0,380$),
225 albumina ($r= 0,741$), ácido úrico ($r= 0,210$), lipídios totais ($r= - 0,680$), triglicerídeos ($r=$
226 $0,222$) e colesterol VLDL ($r= 0,222$).

227

228 *Valores de referência*

229 Considerou-se como valores sanguíneos de referência os resultados obtidos em
230 tartarugas capturadas no mergulho livre, durante o verão e o inverno e, estes se encontram

231 na Tabela 1. Assim como, os valores já estabelecidos para outras populações de tartarugas
232 verdes juvenis ao redor do mundo.

233 Tartarugas capturadas no verão apresentaram um aumento de 40,2 % nos níveis de
234 glicose ($p= 0,002$), 56,30% nos níveis de proteínas totais ($p= 0,002$), 39,1% nos níveis de
235 ácido úrico ($p= 0,05$) e 43,54% nos níveis de albumina ($p= 0,002$) com relação aos valores
236 encontrados para o inverno. Já as concentrações de lipídios totais apresentaram um
237 comportamento inverso, com valores 60,75% mais baixos nos meses de verão em relação
238 aos de inverno ($p= 0,002$).

239 Os níveis de lactato ($p= 0,976$), triglicerídeos ($p= 0,059$), colesterol VLDL ($p=$
240 $0,060$), colesterol total ($p= 0,610$) e corticosterona ($p= 0,628$) não apresentaram
241 diferenças significativas entre as duas estações do ano estudadas.

242

243 *Diferenças entre os métodos de captura*

244 Ao comparar os valores para os diferentes métodos de captura (Fig.1 e Fig.2), pode-
245 se observar que os níveis de glicose, lactato e corticosterona apresentaram diferenças
246 significativas entre todos os métodos de captura ($p < 0,05$), nas duas estações avaliadas.
247 Sendo que no verão, os níveis de glicose foram 101,4% e 69,44% mais elevados em
248 tartarugas capturadas em rede de emalhe e cerco flutuante, respectivamente, em
249 comparação com as capturadas por mergulho livre. Já os níveis de lactato tiveram um
250 aumento de 126,8% (cerco) e 250% (rede) em relação ao mergulho livre. A concentração
251 de corticosterona em tartarugas capturadas por mergulho livre foi dez vezes menor que
252 as tartarugas capturadas em rede de emalhe e 5 vezes menor que as capturadas em cerco
253 flutuante.

254 Os níveis de triglicerídeos e colesterol VLDL não apresentaram diferenças
255 significativas entre o mergulho livre e o cerco flutuante (triglicerídeos: $p= 0,058$;

256 colesterol VLDL: $p= 0,059$), já os valores encontrados para a rede de emalhe foram
257 significativamente diferentes dos demais métodos ($p < 0,05$). Onde os indivíduos
258 capturados por rede apresentaram valores 21% menores no verão e 29% menores no
259 inverno, que os animais capturados em cerco e mergulho.

260 Tartarugas capturadas por mergulho livre apresentaram níveis mais baixos de
261 proteínas totais, ácido úrico e colesterol total, sendo estes 54,04%, 103,46% e 147,12%
262 respectivamente, menores que os encontrados por indivíduos capturados em rede de
263 emalhe ($p < 0,05$). As tartarugas capturadas em cerco flutuante não apresentaram
264 diferenças significativas nos valores de proteínas totais entre os demais métodos, no
265 inverno ($p= 0,787$). Porém, no verão os valores foram 54,23% maiores que as tartarugas
266 capturadas por mergulho livre ($p = 0,001$). Já os valores de ácido úrico tiveram o padrão
267 inverso, não diferindo entre os demais métodos, no verão ($p= 0,263$) e apresentando níveis
268 43,9% maiores que os animais capturados por mergulho livre no inverno ($p = 0,002$).

269 Os níveis de albumina não diferiram entre os métodos de captura durante o verão
270 ($p= 0,125$), porém, no inverno as tartarugas capturadas em mergulho livre apresentaram
271 níveis 30,5% maiores que as capturadas por rede de emalhe ($p < 0,05$). Já os indivíduos
272 capturados por cerco flutuante não apresentaram diferenças entre os outros dois métodos
273 ($p= 0,071$). As concentrações de lipídios totais não tiveram diferenças significativas entre
274 os métodos ($p= 0,877$).

275 Apesar do número amostral muito baixo para tartarugas capturadas em rede de
276 emalhe durante o verão ($n=2$), os valores encontrados para estes animais estão dentro do
277 padrão encontrado para tartarugas capturadas pelos outros métodos, nas diferentes
278 estações. E por isso, eles estão representados nos gráficos e foram incluídos na análise
279 estatística.

280

DISCUSSÃO

281

282 Diversos trabalhos avaliaram a bioquímica sanguínea das tartarugas marinhas ao
283 redor do mundo, sendo consenso entre os autores que devem ser estabelecidos valores
284 sanguíneos de referência para as tartarugas marinhas saudáveis, em nível populacional e
285 por área geográfica. Considerando-se idade, sexo, variações sazonais, condições de
286 migração, reprodução e dieta (Aguirre and Balazs 2000, Stamper and Harms 2005,
287 Whiting et al. 2007, Prieto-Torres et al. 2013), para assim conseguir comparar com
288 animais enfermos ou afetados pelo estresse. Este estudo é o primeiro a estabelecer valores
289 sanguíneos de referência para uma população de tartarugas verdes juvenis na costa
290 sudeste do Brasil e verificar a influência da sazonalidade sobre estes.

291 De modo geral, a concentração da maioria dos parâmetros analisados neste
292 trabalho foram similares aos encontrados para juvenis da mesma espécie em outros
293 lugares do mundo (Tabela 1). No entanto, a concentração média de proteínas totais
294 (inverno) e de colesterol total estão abaixo dos valores já estabelecidos. Sendo que, o
295 menor valor relatado para proteínas totais foi para uma população de juvenis no Uruguai
296 e de colesterol total para o Havaí. Porém, os resultados encontrados no Uruguai e Havaí
297 estão entre o intervalo de valores quantificados para os dois metabólitos nesse estudo. De
298 maneira oposta, as concentrações médias de albumina (verão) e triglicérides estão acima
299 dos valores já estabelecidos por outros autores, mas também se encontram dentro da faixa
300 limite de valores observados.

301 Os níveis mais elevados de corticosterona, verificados nesse estudo (Tabela 1),
302 podem estar relacionados a diferenças nas metodologias utilizadas, que podem gerar
303 resultados distintos. No presente trabalho avaliou-se as concentrações de corticosterona
304 através de enzimaensaio, enquanto que Aguirre et al. (1995) e Jessop and Hamann

305 (2005) utilizaram radioimunoensaio. Devido ao enzimaensaio ser mais sensível,
306 isso pode sugerir um maior nível de estresse na população estudada.

307 A sazonalidade não teve influência nas concentrações de corticosterona,
308 confirmando a hipótese de que esse hormônio não é primordial durante os processos
309 diários e sazonais, onde suas concentrações basais podem regular o comportamento e a
310 fisiologia do animal, sem induzir uma resposta de emergência (Landys et al. 2006).

311 Sabe-se que a migração, o processo reprodutivo e as enfermidades provocam
312 mudanças nos níveis de corticosterona em tartarugas marinhas (Aguirre et al. 1995,
313 Jessop 2001, Hamann et al. 2002, Jessop et al. 2002), fazendo com que estes, muitas
314 vezes, fiquem acima dos valores basais. Todavia, a população avaliada neste estudo é
315 composta por indivíduos juvenis, residentes e saudáveis, o que pode ser outro fator pelo
316 qual os níveis de corticosterona não apresentaram influências sazonais.

317 Tartarugas capturadas durante o verão apresentaram níveis de glicose maiores
318 do que no inverno. A elevação desses níveis pode ser atribuído ao aumento de
319 glicocorticóides (estresse) durante a captura (Gregory and Schmid 2001), porém, a
320 concentração de corticosterona permaneceu inalterada durante as estações avaliadas,
321 indicando que este hormônio não teve influência nesses valores.

322 Contudo, o aumento nos níveis de glicose, juntamente com o ácido úrico podem
323 estar associados a um maior consumo de carboidratos e proteínas, respectivamente,
324 durante esse período (Labrada-Martagón et al. 2010). Tartarugas verde são consideradas
325 forrageadoras e é esperado que elas tenham uma dieta predominantemente herbívora
326 (Mortimer 1982). No entanto, sua alimentação pode variar conforme a disponibilidade
327 de alimentos no seu ambiente, podendo se alimentar de moluscos, crustáceos e outros
328 animais, quando a grama marinha e as algas estão escassas (Garnett et al. 1985).

329 Sabe-se que o ácido úrico pode ser um indicador do aumento do
330 catabolismo/digestão de proteínas em répteis (Maixner et al. 1987), assim, os resultados
331 do presente estudo (aumento dos níveis de proteínas totais e albumina no verão), podem
332 estar associados a uma dieta omnívora e um ambiente com bastante disponibilidade e
333 variedade de alimentos. Labrada-Martagón et al. (2010) relataram o mesmo padrão
334 sazonal de proteínas totais e glicose em tartarugas verdes juvenis no México e concluíram
335 que durante o verão os indivíduos apresentavam melhores condições nutricionais, devido
336 a maior quantidade e/ou melhor qualidade de alimentos disponíveis.

337 A diminuição dos níveis de proteínas totais, albumina e glicose no inverno pode
338 estar relacionada com a diminuição da taxa metabólica, disponibilidade de alimentos e/ou
339 temperatura da água (Moon et al. 1999). Tartarugas verdes submetidas à baixas
340 temperaturas (simulando condições de inverno), apresentaram valores mais baixos de
341 proteína total, o que foi justificado pelo menor consumo de alimento nestas condições,
342 onde a taxa metabólica encontra-se diminuída (Southwood et al. 2003a). Semelhante a
343 esse resultado, Osborne et al. (2010) encontraram uma relação entre a temperatura da
344 água e a concentração plasmática de proteínas, sendo que nos meses mais frios a
345 concentração foi menor. Do mesmo modo, encontrou-se uma correlação positiva entre a
346 temperatura da água e os níveis de glicose, proteínas totais, ácido úrico e albumina, e uma
347 correlação negativa com os níveis de lipídios totais.

348 Bonnet (1979) observou que tartarugas verdes juvenis que ficaram 5 dias sem se
349 alimentar, apresentaram níveis reduzidos de glicose e proteínas e níveis elevados de
350 lipídios, padrão semelhante ao encontrado neste estudo, no inverno. Portanto, a
351 temperatura da água pode estar influenciando as concentrações desses metabólitos,
352 juntamente com a diminuição do metabolismo e a disponibilidade de alimentos.

353 Nas tartarugas marinhas, os lipídios são armazenados nas camadas subcutâneas
354 e como gordura visceral (Derickson 1976, Kwan 1994). Os quais fornecem um estoque
355 de energia que pode ser mobilizado para a manutenção dos processos metabólicos,
356 durante épocas de baixa oferta de alimento e /ou reprodução, particularmente durante a
357 síntese de hormônios sexuais, gametogênese, vitelogênese (Derickson 1976, Kwan 1994,
358 Hamann et al. 2002, Hamann et al. 2003). O aumento nas concentrações de lipídios totais
359 circulantes, observado no inverno, pode estar associado a perdas de energia, devido a uma
360 redução na oferta de alimentos e/ou na atividade de forrageamento (Koch et al. 2007),
361 fazendo com que ocorra uma mudança no substrato metabólico e induza o catabolismo
362 das reservas energéticas. A diminuição dos valores de proteínas totais, albumina e glicose
363 aliados a uma possível diminuição da taxa metabólica, já verificada por outros autores
364 (Southwood et al. 2003a) corroboram esta hipótese.

365 Observações em campo e estudos com monitoramento remoto indicam que as
366 tartarugas verdes juvenis permanecem ativas durante os meses de inverno, no entanto
367 diferenças significativas nos padrões de mergulho podem ocorrer (Mendonca 1983,
368 Southwood et al. 2003b). Na Flórida, por exemplo, tartarugas verdes juvenis aumentam
369 seus movimentos diários, se alimentam em águas mais profundas e passam menos tempo
370 forrageando durante os meses mais frios (18 °C) (Mendonca 1983). Em contraste, na
371 Austrália, juvenis de *Chelonia mydas* passam um tempo significativamente maior em
372 águas rasas e apresentam mergulhos mais longos durante o inverno (21,3°C) (Southwood
373 et al. 2003b).

374 Durante a captura dos indivíduos para o presente estudo, observou-se que as
375 tartarugas permanecem ativas nos meses mais frios (21,6°C), porém não foi feito um
376 acompanhamento do comportamento desses animais durante o período de coletas. No
377 entanto, os níveis baixos e a não variação do lactato durante as estações, sugerem que

378 esses animais não estejam utilizando a via anaeróbica para a produção de ATP, durante
379 suas atividades diárias, já que mergulhos longos estão associados com aumentos
380 significativos do lactato plasmático (Lutcavage et al. 1989). Pode-se dizer que os valores
381 basais desse metabólito não sofrem alterações sazonais nessa população.

382 Ao comparar os resultados obtidos nos diferentes métodos de captura (Fig.1 e
383 Fig.2), pode-se observar que as tartarugas capturadas em redes de emalhe apresentaram
384 níveis de lactato 4 vezes maiores (verão: 12,33 mmol/L, inverno: 9,58 mmol/L), que os
385 valores basais obtidos por mergulho livre. Enquanto que as tartarugas capturadas no cerco
386 flutuante apresentaram concentrações 2 vezes maiores desse metabólito (verão: 7,99
387 mmol/L, inverno: 4,83 mmol/L).

388 Estes aumentos também foram verificados por Harms et al. (2003) que avaliaram
389 os efeitos da rede de arrasto e do cerco flutuante em tartarugas cabeçudas e relataram
390 valores de lactato após a captura de 1,3 mmol/L para o cerco e 15,8 mmol/L para a rede
391 de arrasto. Tartarugas verdes capturadas em rede de emalhe também apresentaram valores
392 elevados de lactato (30,6 mmol/L) (Snoddy et al. 2009), assim como tartarugas cabeçudas
393 capturadas em espinhel (7,2 mmol/L) (Williard et al. 2015).

394 Essas diferenças entre os métodos podem ser explicadas pelo fato de que durante a
395 captura em rede de emalhe e de arrasto, as tartarugas ficam emaranhadas e normalmente
396 sofrem submersão forçada. O que não acontece durante a captura pelo cerco flutuante e
397 espinhel, os quais possibilitam o livre acesso a superfície. No entanto, durante a captura
398 em cerco flutuante, as tartarugas fazem tentativas contínuas e de intensidade variáveis
399 para tentar escapar das redes (Harms et al. 2003), e isso pode estar ocasionando as
400 elevações de lactato no plasma, devido a ativação do metabolismo anaeróbico.

401 O aumento do lactato é indicativo de uma acidose metabólica originada pela
402 submersão forçada (hipóxia) e luta intensa, que resulta em uma mudança da respiração

403 aeróbica para anaeróbica (Stabenau et al. 1991, Hoopes et al. 2000, Harms et al. 2003,
404 Stabenau and Vietti 2003, Snoddy et al. 2009). Durante a hipóxia, a produção de energia
405 na ausência de oxigênio é feita através da glicólise anaeróbia, que utiliza a glicose como
406 substrato, elevando os níveis desse metabólito no sangue (Clark and Miller 1973). A
407 elevada taxa de glicose nessa situação mantém os níveis de ATP e homeostase iônica no
408 cérebro, reduzindo a demanda metabólica para um nível atendido pela glicólise
409 anaeróbica e aumentando o tempo de tolerância a hipóxia e/ou anoxia (Lutz and Bentley
410 1985, Lutcavage and Lutz 1997).

411 No presente estudo, os níveis de glicose tiveram o mesmo padrão que os níveis de
412 lactato, onde as tartarugas capturadas em rede de emalhe e cerco flutuante apresentaram
413 valores mais elevados (verão: rede: 231,04 mg/dL, cerco: 194,34 mg/dL; inverno: rede:
414 151,71 mg/dL, cerco: 111,05 mg/dL) do que os basais (verão: 114,69 mg/dL, inverno:
415 68,58 mg/dL). Esses aumentos nos níveis de glicose parecem sugerir que a espécie está
416 mobilizando os estoques de glicogênio para a obtenção de ATP através do metabolismo
417 anaeróbico (Clark and Miller 1973). A hiperglicemia também foi relatada nos estudos
418 sobre o metabolismo anaeróbico em tartarugas de água doce (*Pseudemys scripta elegans*)
419 por Clark and Miller (1973) e por Keiver et al. (1992) em *Chrysemys picta* submetidas ao
420 mergulho forçado a 22°C.

421 Sabe-se que níveis elevados de glicose também podem estar associados a indução
422 de uma resposta sistêmica ao estresse (Wingfield et al. 1998). Aguirre et al. (1995),
423 Gregory et al. (1996) e Snoddy et al. (2009) relataram níveis elevados de glicose e
424 corticosterona em tartarugas submetidas ao estresse do manuseio e captura. Como já
425 mencionado, as tartarugas capturadas neste estudo (rede e cerco) apresentaram níveis
426 elevados de glicose, os quais foram similares ao padrão obtido para a corticosterona
427 (Fig.2). Sendo que, os indivíduos capturados em rede de emalhe apresentaram os valores

428 mais elevados de corticosterona (verão: 36,8 ng/mL, inverno: 31,0 ng/mL) e os
429 capturados em cerco flutuante tiveram uma elevação moderada (verão: 17,6 ng/mL,
430 inverno: 16,1 ng/mL), quando comparados com indivíduos capturados por mergulho livre
431 (verão: 3,6 ng/mL, inverno: 3,0 ng/mL).

432 Em situações de estresse, os glicocorticóides, em conjunto com as catecolaminas
433 irão provocar alterações metabólicas visando mobilizar e fornecer energia para o
434 organismo, através da lipólise da proteólise e da gliconeogênese, dando subsídios para
435 que o corpo possa restabelecer a homeostase (Jacob and Oomen 1992, Wingfield et al.
436 1998). Assim sendo, os elevados níveis de proteínas totais e ácido úrico encontrados em
437 tartarugas capturadas em rede de emalhe e cerco flutuante podem estar associados com a
438 indução do catabolismo de proteínas pela corticosterona.

439 Esperava-se que os níveis de lipídios totais também estivessem elevados, no
440 entanto, as concentrações de lipídios totais, triglicerídeos e colesterol VLDL foram
441 menores ou iguais às encontradas para os valores de referência. A diminuição dos níveis
442 de triglicerídeos, aliada a diminuição dos níveis de colesterol VLDL pode estar associada
443 a sua maior captação por outros tecidos, em especial os músculos esqueléticos, para
444 produção de energia e/ou pela diminuição/ausência da atividade alimentar sofrida
445 durante o período de captura. Innis et al. (2010) também relataram níveis reduzidos de
446 triglicerídeos em tartarugas de couro capturadas por artefatos de pesca e acreditam que
447 essa diminuição esteja relacionada com o fato das tartarugas não se alimentarem durante
448 o emaranhamento. Em contrapartida, os níveis elevados de colesterol total podem estar
449 relacionados a sua mobilização no plasma para a síntese de corticosterona (Tóth et al.
450 1997).

451 Determinar a bioquímica sanguínea de populações selvagens é de extrema
452 importância para que se possa delimitar os padrões de normalidade dos constituintes

453 plasmáticos e assim utilizá-los como auxílio no diagnóstico de doenças, condições de
454 estresse e reabilitação. Para tanto, necessita-se de métodos de captura que não influenciem
455 as concentrações dos metabólitos e hormônios, para que não haja uma interpretação
456 errada desses resultados. Por isso, é importante a avaliação dos efeitos fisiológicos no
457 diferentes métodos de captura, para entender os padrões metabólicos apresentados em
458 cada um e verificar se eles estão influenciando no metabolismo normal dos animais
459 (Hoopes et al. 2000).

460 No presente estudo, esperava-se que as diferenças nos parâmetros bioquímicos
461 entre as tartarugas capturados em cerco flutuante e mergulho livre fossem mínimas. No
462 entanto, apesar do cerco flutuante ser um mecanismo passivo de captura, que permite o
463 livre acesso a superfície para respirar (Harms et al. 2003), seis dos dez parâmetros
464 avaliados foram significativamente diferentes dos valores obtidos para os animais
465 capturados em mergulho livre (valores de referência). A captura em redes de emalhe
466 causou maiores perturbações do que o cerco flutuante. Sendo que, todos os parâmetros
467 avaliados diferiram-se significativamente dos valores basais obtidos para espécie, na
468 mesma área de estudo e no mesmo período. O que indica que o cerco flutuante e a rede
469 de emalhe não são os métodos mais adequados de captura para o estabelecimento de
470 valores de referência, pois eles podem alterar o metabolismo normal do animal e assim
471 influenciar na concentração dos metabólitos avaliados.

472 Como já visto, a sazonalidade também tem um papel importante no metabolismo
473 intermediário dos animais, sendo indispensável sua avaliação durante o estabelecimento
474 de valores de referência para uma espécie.

475 Este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos da captura incidental em rede de emalhe
476 e cerco flutuante e compará-los com os valores de referência estabelecidos para a espécie
477 na mesma área e no mesmo período, levando em conta a variação sazonal. Os valores de

478 referência encontrados podem ser utilizados para futuras comparações com populações
479 da mesma espécie e com indivíduos afetados por situações de estresse ou doenças. Já os
480 resultados obtidos pela captura incidental em rede de emalhe e cerco flutuante podem ser
481 utilizados por projetos de conservação desses animais, em áreas que ocorrem essas
482 capturas, para ajudar na tomada de decisão quanto à soltura imediata ou reabilitação do
483 animal, e na mitigação da mortalidade e de injúrias causadas por esses artefatos.

484

485

AGRADECIMENTOS

486 Gostaríamos de agradecer o imenso apoio do Projeto TAMAR –Ubatuba durante
487 todo o período de desenvolvimento deste projeto, principalmente ao José Henrique
488 Becker. Aos pescadores de Ubatuba pela grande ajuda durante a captura dos animais em
489 rede de emalhe e cerco flutuante. Ao Fernando Alvarenga, Renato Velloso, Antonio
490 Mauro Corrêa, Lucas Borsatto, Fernando Cortez Marques, Andrei Santo Antonio, Vander
491 Bertoldo, Lucas R. Ferreira e todos os estagiários que ajudaram na obtenção dos dados
492 no campo e na captura dos animais por mergulho livre.

493 Este trabalho teve o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
494 Superior (CAPES), Brasil, pela concessão da bolsa de mestrado e do Programa de
495 Excelência Acadêmica (Proex) pela ajuda financeira para a realização do projeto.

496

497

REFERÊNCIAS

498

499 Aguirre A, Balazs G (2000) Blood biochemistry values of green turtles, *Chelonia mydas*,
500 with and without fibropapillomatosis. *Comp Haematol Int* 10(3):132–137

501

502 Aguirre A, Balazs G, Spraker T, Gross T (1995) Adrenal and hematological responses to
503 stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without
504 fibropapillomas. *Physiol Zool* 68:831–854

505

506 Bjorndal KA, Bolten AB, Chaloupka MY (2000) Green turtle somatic growth model:
507 evidence for density-dependence. *Ecol Appl* 10:269–282

508
509 Bolten AB (1999) Techniques for measuring sea turtles. In: Eckert KL, Bjorndal KA,
510 Abreu-Grobois FA, Donnelly M (eds) Research and management techniques for
511 the conservation of sea turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group
512 Publication No. 4, Washington, DC, pp 110–114
513

514 Bolten AB, Bjorndal KA (1992) Blood profiles for a wild population of green turtles
515 (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specific and sex-specific
516 relationships. *J Wildl Dis* 28(3):407–413
517

518 Bonnet B (1979) Influence of the nutritional conditions on the organic composition of
519 blood and urine in the juvenile sea turtle *Chelonia mydas*. *Aquaculture* 16:253–
520 260
521

522 Clark VM, Miller AT (1973) Studies on anaerobic metabolism in the fresh-water turtle
523 (*Pseudemys scripta elegans*). *Comp Biochem Physiol A* 44:55–62
524

525 Derickson WK (1976) Lipid storage and utilization in reptiles. *Am Zool* 16:711–723
526

527 Ferrando V (2010) Bioquímica sanguínea de la tortuga verde juvenil (*Chelonia mydas*)
528 en Cerro Verde, Rocha, Uruguay. Tesis Doctoral, Universidad de la República
529

530 Frings C, Dunn R (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids
531 based on the sulfophosphovanillin reaction. *Am J Clin Pathol* 53:89–91
532

533 Gallo BMG, Macedo S, Giffoni BB, Becker JH, Barata PCR (2006) Sea turtle
534 conservation in Ubatuba, Southeastern Brazil, a feeding area with incidental
535 capture in coastal fisheries. *Chelonian Conserv Biol* 5(1):93–101
536

537 Garnett ST, Price IR, Scott FJ (1985) The diet of the green turtle, *Chelonia mydas*, in
538 Torres Strait. *Austral Wildl Res* 12:103–112
539

540 Gearhart J (2001) Sea turtle bycatch monitoring of the 2000 fall flounder gillnet fishery
541 of southeastern Pamlico Sound, North Carolina. North Carolina Department of
542 Environment and Natural Resources, Division of Marine Fisheries, Morehead City,
543 USA
544

545 Gregory LF, Gross TS, Bolten AB, Bjorndal KA, Guillette LJ (1996) Plasma
546 corticosterone concentrations associated with acute captivity stress in wild
547 loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Gen Comp Endocrinol* 104:312–320
548

549 Gregory LF, Schmid JR (2001) Stress responses and sexing of wild kemp's ridley sea
550 turtles (*Lepidochelys kempii*) in the northeastern Gulf of Mexico. *Gen Comp*
551 *Endocrinol* 124:66–74
552

553 Hamann M, Limpus CJ, Whittier JM (2002) Patterns of lipid storage and mobilisation in
554 the female green sea turtle (*Chelonia mydas*) *J Comp Physiol B* 172: 485–493
555

- 556 Hamann M, Limpus CJ, Whittier JM (2003) Seasonal variation in plasma catecholamines
557 and adipose tissue lipolysis in adult female green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Gen*
558 *Comp Endocrinol* 130(3):308–316
559
- 560 Hamann M, Schäuble SC, Simon T, Evans S (2006) Demographic and health
561 parameters of green sea turtles *Chelonia mydas* foraging in the Gulf of
562 Carpentaria, Australia. *Endang Spec Res* 2:81–88
563
- 564 Harms CA, Mallo KM, Ross PM, Segars A (2003) Venous blood gases and lactates of
565 wild loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) following two capture techniques. *J*
566 *Wildl Dis* 39:366–374
567
- 568 Hoopes LA, Landry AM, Stabenau EK (2000) Physiological effects of capturing kemp's
569 ridley sea turtles, *Lepidochelys kempii*, in entanglement nets. *Can J Zool* 78:1941–
570 1947
571
- 572 Innis C, Merigo C, Dodge K, Tlusty M, Dodge M, Sharp B, Myers A, McIntosh A, Wunn
573 D, Perkins C, Herdt TH, Norton T, Lutcavage M (2010) Health evaluation of
574 leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in the Northwestern Atlantic during
575 direct capture and fisheries gear disentanglement. *Chelonian Conserv Biol*
576 9(2):205–222
577
- 578 Jacob V, Oomen VO (1992) A comparison of the effects of corticosterona and cortisol on
579 the intermediary metabolism of *Calotes versicolor*. *Gen Comp Endocrinol* 85:86–
580 90
581
- 582 Jessop TS (2001) Modulation of the adrenocortical stress response in marine turtles
583 (Cheloniidae): evidence for a hormonal tactic maximizing maternal reproductive
584 investment. *J Zool Lond* 254:57–65
585
- 586 Jessop TS, Hamann M (2005) Interplay between age class, sex and stress response in
587 green turtles (*Chelonia mydas*). *Aust J Zool* 53:131–136
588
- 589 Jessop TS, Knapp R, Whittier J, Limpus CJ (2002) Dynamic endocrine responses to
590 stress: evidence for energetic constraints and status dependence in male green
591 turtles. *Gen Comp Endocrinol* 126:59–67
592
- 593 Keiver KM, Weinberg J, Hochachka PW (1992) The effect of anoxic submergence and
594 recovery on circulating levels of catecholamines and corticosterone in the turtle,
595 *Chrysemys picta*. *Gen Comp Endocrinol* 85:308–315
596
- 597 Koch V, Brooks L, Nichols WJ (2007) Population ecology of the green/black turtle
598 (*Chelonia mydas*) in Bahía Magdalena, Mexico. *MarBiol* 153(1):33–46
599
- 600 Kwan D (1994) Fat reserves and reproduction in the green turtle, *Chelonia mydas*. *Aust*
601 *Wild Res* 21:257–266
602
- 603 Labrada-Martagón V, Méndez-Rodríguez LC, Gardner SC, López-Castro M, Zenteno-
604 Savín T (2010) Health indices of the green turtle (*Chelonia mydas*) along the

605 Pacific Coast of Baja California Sur, Mexico. I. Blood biochemistry values.
606 Chelonian Conserv Biol 9(2):162–172
607

608 Landys MM, Ramenofsky M, Wingfield (2006) Actions of glucocorticoids at a seasonal
609 baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life
610 processes. Gen Comp Endocrinol 148:132–149
611

612 Lewbart GA, Hirschfeld M, Denkinger J, Vasco K, Guevara N, García J, Muñoz J,
613 Lohmann KJ (2014) Blood gases, biochemistry, and hematology of Galapagos
614 green turtles (*Chelonia mydas*). PLoS ONE 9(5): e96487
615

616 Limpus CJ (1992) Estimation of tag loss in marine turtle research. Wildl Res 19:457–469
617

618 Lutcavage ME, Lutz PL (1997) Diving physiology. In: Lutz PL, Musick JA (eds) The
619 Biology of sea turtles, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, pp 277–296
620

621 Lutcavage ME, Lutz PL, Baier H (1989) Respiratory mechanics of the loggerhead sea
622 turtle, *Caretta caretta*. Respir Physiol 76:13–24
623

624 Lutz PL, Bentley TB (1985) Respiratory physiology of diving in the sea turtle. Copeia
625 1985(3):671–679
626

627 Lutz PL, Dunbar-Cooper A (1987) Variations in the blood chemistry of the loggerhead
628 sea turtle, *Caretta caretta*. Fish Bull 85:37–43
629

630 Maixner JM, Ramsey EC, Arp LH (1987) Effects of feeding on serum uric acid in
631 captive reptiles. J Zoo Anim Med 18:62–65
632

633 Mendonca M (1983) Movements and feeding ecology of immature green turtles
634 (*Chelonia mydas*) in a Florida Lagoon. Copeia 1983:1013–1023
635

636 Moon DY, Owens DW, MacKenzie DS (1999) The effects of fasting and increased
637 feeding on plasma thyroid hormones, glucose, and total protein in sea turtles. Zool
638 Sci 16:579–586
639

640 Mortimer JA (1982) Feeding ecology of sea turtles. In: Bjorndal KA (ed) Biology and
641 conservation of sea turtles. Smithsonian Institution Press: Washington, DC, p 103
642

643 National Research Council (1990) Decline of the sea turtles: causes and prevention.
644 National Academy Press, Washington, DC
645

646 Osborne AG, Jacobson ER, Bresette MJ, Singewald DA, Scarpino RA, Bolten AB
647 (2010) Reference intervals and relationships between health status, carapace
648 length, body mass, and water temperature and concentrations of plasma total
649 protein and protein electrophoretogram fractions in Atlantic loggerhead sea turtles
650 and green turtles. J Am Vet Med Assoc 237(5):561–561
651

652 Owens DW, Ruiz GJ (1980) New methods of obtaining blood and cerebrospinal fluid
653 from marine turtles. Hepetol 36:17–20
654

655 Prieto-Torres DA, Hernández JL, Henríquez ARB, Alvarado MC, Dávila MJ (2013)
656 Blood biochemistry of the breeding population of green turtles (*Chelonia mydas*)
657 in the Aves Island Wildlife Refuge, Venezuela. *South Am J Herpetol* 8:147–154
658

659 Santos MRD, Martins AS, Baptistotte C, Work TM (2015) Health condition of juvenile
660 *Chelonia mydas* related to fibropapillomatosis in southeast Brazil. *Dis Aquat*
661 *Organ* 115:193–201
662

663 Snoddy JE, Landon M, Blanvillain G, Southwood A (2009) Blood biochemistry of sea
664 turtles captured in gillnets in the Lower Cape Fear River, North Carolina, USA. *J*
665 *Wildl Manage* 73(8):1394–1401
666

667 Snoddy JE, Williard AS (2010) Movements and post-release mortality of juvenile sea
668 turtles released from gillnets in the lower Cape Fear River, North Carolina, USA.
669 *Endanger Species Res* 12:235–247
670

671 Southwood AL, Darveau CA, Jones DR (2003a) Metabolic and cardiovascular
672 adjustments of juvenile green turtles to seasonal changes in temperature and
673 photoperiod. *J Exp Biol* 206:4521–4531
674

675 Southwood AL, Reina RD, Jones VS, Jones DR. (2003b) Seasonal diving patterns and
676 body temperatures of juvenile green turtles at Heron Island, Australia. *Can J Zool*
677 81:1014–1024
678

679 Stabenau EK, Heming TA, Mitchell JF (1991) Respiratory, acid–base and ionic status
680 of kemp’s ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*) subjected to trawling. *Comp*
681 *Biochem Physiol A* 99:107–111
682

683 Stabenau EK, Vietti KRN (2003) The physiological effects of multiple forced
684 submergences in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Fish Bull* 101(4):889–
685 899
686

687 Stamper M, Harms C (2005) Relationship between barnacle epibiotic load and
688 hematologic parameters in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*), a comparison
689 between migratory and residential animals in Pamlico Sound, North Carolina. *J Zoo*
690 *Wildl Med* 36:635–641
691

692 Tóth IE, Szabo D, Bruckner GG (1997) Lipoproteins, lipid droplets, lysosomes, and
693 adrenocortical steroid hormone synthesis: morphological studies. *Microsc Res*
694 *Tech* 36:480–492
695

696 Wallace BP, Lewison RL, McDonald SL, McDonald RK, Kot CY, Kelez S, Bjorkland
697 RK, Finkbeiner EM, Helmbrecht S, Crowder LB (2010) Global patterns of marine
698 turtle bycatch. *Conserv Lett* 3:131–142
699

700 Williard A, Parga M, Sagarminaga R, Swimmer Y (2015) Physiological ramifications
701 for loggerhead turtles captured in pelagic longlines. *Biol Lett* 11:20150607
702

- 703 Wingfield JC, Maney DL, Breuner CW, Jacobs JD, Lynn S, Ramenofsky M, Richardson
704 RD (1998) Ecological bases of hormone-behavioral interactions: the ‘emergency
705 life history stage’. *Am Zool* 38:191–206
706
- 707 Whiting SD, Guinea ML, Limpus CJ, Fomiatti K (2007) Blood chemistry reference
708 values for two ecologically distinct populations of foraging green turtles, eastern
709 Indian Ocean. *Comp Clin Path* 16:109–118

710 **Fig.1** Níveis plasmáticos de glicose, lactato, proteínas totais, ácido úrico, albumina,
711 lipídios totais, triglicérides, colesterol VLDL e colesterol total encontrados em juvenis
712 de *Chelonia mydas*, submetidos a três diferentes métodos de captura, durante o verão e
713 o inverno. As barras representam a média \pm erro padrão. Letras diferentes significam
714 diferenças estatísticas entre os métodos ($p < 0,05$), sendo letras minúsculas utilizadas
715 para o verão e letras maiúsculas para o inverno. Asterisco (*) significa diferenças
716 estatísticas entre as estações ($p < 0,05$)

717

718 **Fig.2** Níveis plasmáticos de corticosterona em juvenis de tartarugas verdes, capturados
719 em três diferentes métodos (mergulho livre, cerco flutuante e rede de emalhe), durante o
720 verão e o inverno

721 **Tabela 1** Valores sanguíneos de referência de *Chelonia mydas* juvenis em Ubatuba, Brasil, durante o verão e o inverno e valores encontrados para a mesma espécie na literatura

Parâmetro	Verão			Inverno			Valores de referência para outras populações de juvenis
	n	Média ± desvio padrão	Variação (mínimo-máximo)	n	Média ± Desvio padrão	Variação (mínimo-máximo)	
Glicose (mg/dL)*	12	114,69 ± 15,0	(86,91 – 141,20)	19	68,58 ± 12,12	(48,04 – 87,25)	34,95 ^e ; 89,3 ^j ; 114,7 ^c ; 114,0 ^a ; 118,62 ^f ; 123,65 ^h ; 129,74 ^g
Lactato (mmol/L)	12	3,52 ± 1,25	(1,87 – 5,62)	19	3,68 ± 1,46	(1,70 – 6,73)	3,73 ⁱ
Proteínas totais (g/dL)*	12	5,31 ± 2,29	(2,7 – 9,0)	19	2,32 ± 0,81	(0,95 – 3,46)	3,39 ^g ; 3,7 ^j ; 3,99 ^e ; 4,65 ^h ; 5,0 ^c ; 5,1 ^a ; 5,46 ^h
Ácido úrico (mg/dL)*	12	4,04 ± 1,0	(2,47 – 6,16)	19	2,46 ± 1,39	(0,71 – 6,91)	1,1 ^j ; 1,28 ^g ; 1,5 ^c ; 2,15 ^h ; 2,7 ^f ; 5,1 ^a
Albumina (g/dL)*	12	2,09 ± 0,41	(1,42 – 2,6)	19	1,18 ± 0,61	(0,20 – 2,43)	1,0 ⁱ ; 1,26 ^h ; 1,5 ^a ; 1,52 ^g ; 1,7 ^c ; 1,83 ^e
Lipídios totais (mg/dL)*	12	197,95 ± 46,44	(109,22 – 257,11)	19	318,21 ± 143,58	(138,23 – 573,38)	-
Triglicerídeos (mg/dL)	12	206,22 ± 142,53	(99,21 – 503,44)	19	199,61 ± 72,55	(37,50 – 306,03)	89,6 ^j ; 124,0 ^c ; 141,88 ^h ; 172,0 ^a ; 181,8 ^b
Colesterol VLDL (mg/dL)	12	41,24 ± 28,51	(19,84 – 100,69)	19	39,92 ± 14,51	(7,50 – 61,21)	-
Colesterol total (mg/dL)	12	82,64 ± 33,23	(49,80 – 140,81)	19	88,99 ± 57,49	(15,0 – 223,0)	99,1 ^c ; 113,6 ^j ; 164,8 ^h ; 217,0 ^a
Corticosterona (ng/mL)	12	3,6 ± 2,37	(1,4 – 7,7)	19	3,0 ± 2,25	(0,9 – 8,5)	0,7 ^b ; 1,6 ^d

722 ^a Bolten and Bjorndal (1992) – Bahamas

723 ^b Aguirre et al. (1995) – Havaí

724 ^c Aguirre and Balazs (2000) – Havaí

725 ^d Jessop and Hamann (2005) - Austrália

726 ^e Hamann et al (2006) – Austrália

727 ^f Whiting et al. (2007) – Austrália

728 ^g Ferrando (2010) – Uruguai

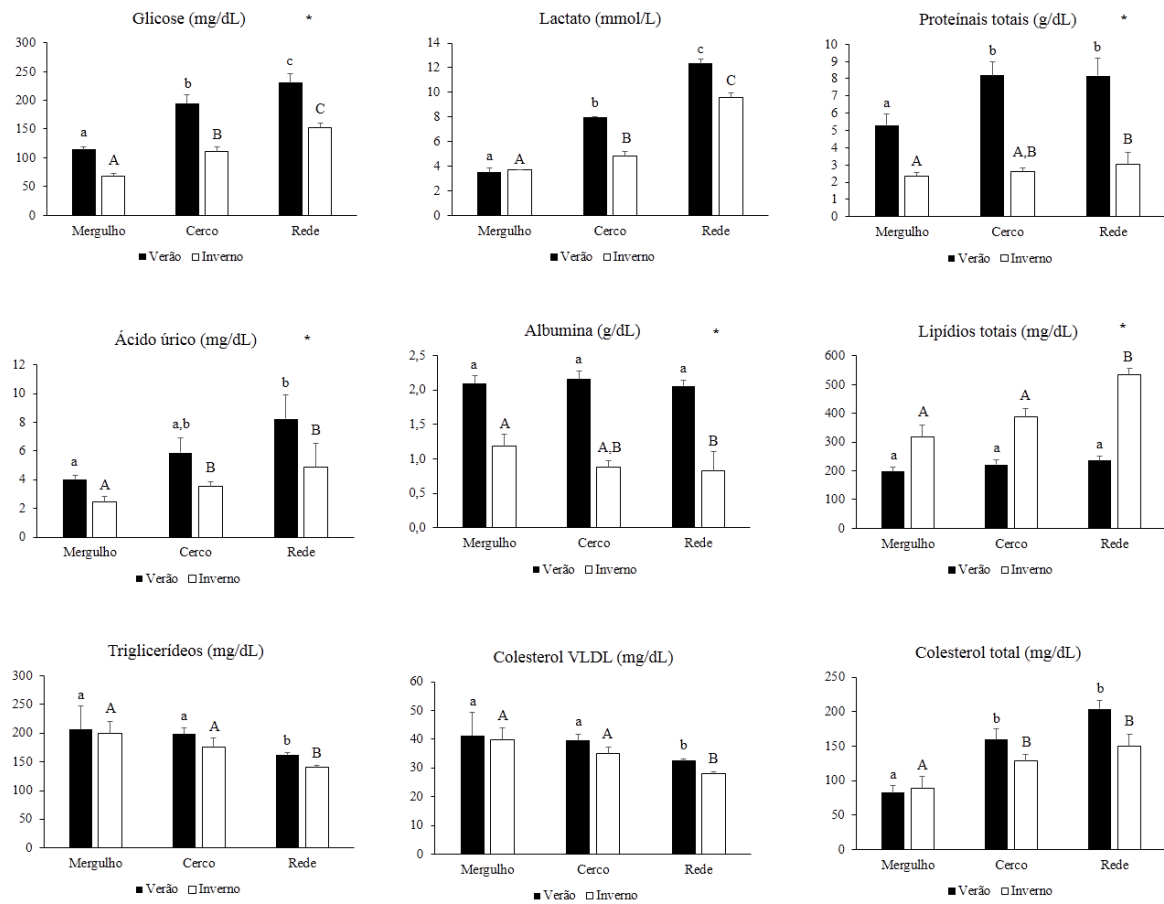
729 ^h Labrada-Martagón et al. (2010) – México

730 ⁱ Lewbart et al. (2014) – Galápagos

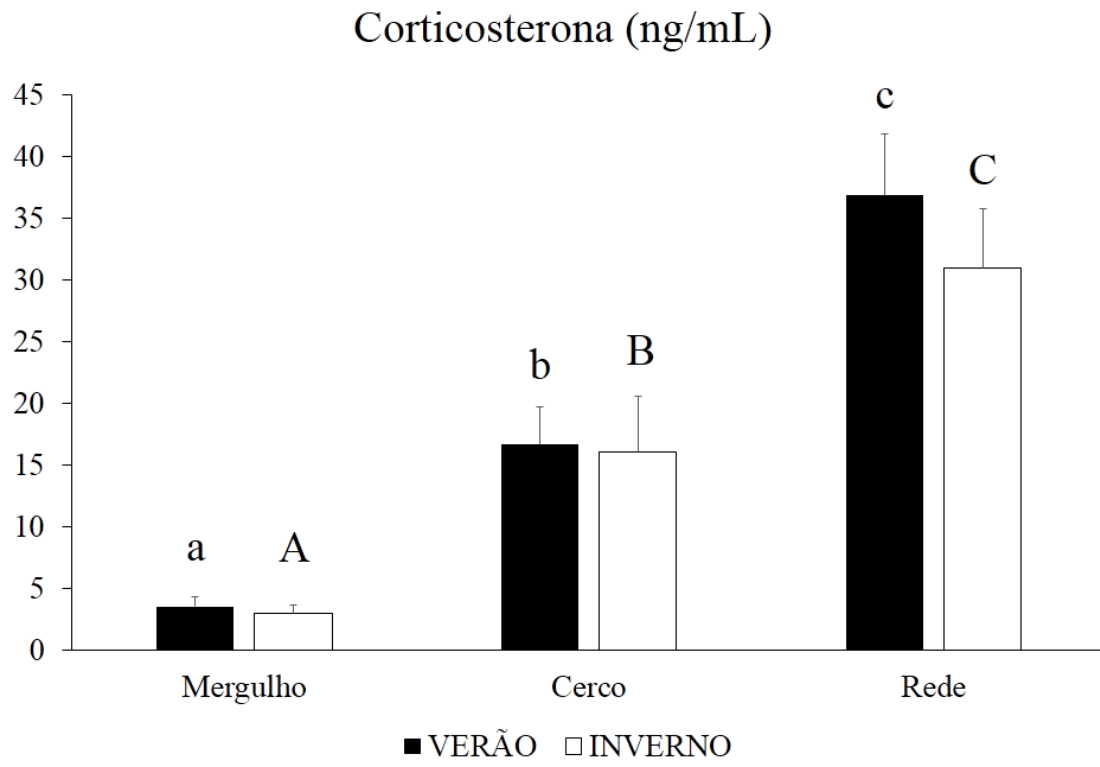
731 ^j Santos et al (2015) – Brasil

732 Asterisco significa diferenças significativas entre verão e inverno (p < 0,05)

733 **Fig.1**
734



735



NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

The Science of Nature

Naturwissenschaften

Instructions for Authors

Original Articles

must present scientific results that are essentially new and that have not been published or are being considered for publication elsewhere. The length of Original Articles should ideally not exceed ten printed pages, which corresponds to about 30 to 35 manuscript pages (doublespaced, including everything from the title page to the last figure). For the publication of unusually long methodological descriptions and data or figures that are not core to the message of the publication, the publication of Electronic Supplementary Material is encouraged. It is generally acknowledged that the range of research areas covered by the journal may require variable article lengths; in the end manuscript length must be justified by contents! However, preference is given to concise manuscripts that are preferably even shorter than 10 print pages.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The email address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 260 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other statistical data).
Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.
Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SPECIFIC REMARKS

- Use a normal, plain font (e.g., 12point Times Roman) for text.
- Please do not forget to add consecutive linenumbers throughout manuscript (not just pagebypage).
- The use of footnotes is discouraged

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses, chronologically.

Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731–738. doi: 10.1007/s0042100809558

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

Please list all authors of a publication.

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig.1

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material)

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.