

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, BEM-ESTAR E PRODUÇÃO
ANIMAL SUSTENTÁVEL NA FRONTEIRA SUL

ANA LETÍCIA RODRIGUES MARQUES

INDICADORES DE GENOTOXICIDADE E PESQUISA DE HEMOGREGARINA EM
CÁGADOS (*Phrynops geoffroanus*) DE DIFERENTES AMBIENTES
HIDROGRÁFICOS DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU

REALEZA

2025

ANA LETÍCIA RODRIGUES MARQUES

**INDICADORES DE GENOTOXICIDADE E PESQUISA DE HEMOGREGARINA EM
CÁGADOS (*Phrynops geoffroanus*) DE DIFERENTES AMBIENTES
HIDROGRÁFICOS DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul (PPG-SBPAS) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde, Diagnóstico e Bem-estar animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Braz

REALEZA

2025

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Marques, Ana Letícia Rodrigues
INDICADORES DE GENOTOXICIDADE E PESQUISA DE
HEMOGREGARINA EM CÂGADOS (*Phrynos geoffroanus*) DE
DIFERENTES AMBIENTES HIDROGRÁFICOS DO PARQUE NACIONAL DO
IGUAÇU / Ana Letícia Rodrigues Marques. -- 2025.
49 f.:il.

Orientador: Dr. Paulo Henrique Braz

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde,
Bem-Estar e Produção Animal Sustentável Na Fronteira
Sul, Realeza,PR, 2025.

1. anormalidades nucleares. 2. ecoepidemiologia. 3.
micronúcleo. 4. *Phrynos*. I. Braz, Paulo Henrique,
orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III.
Título.

ANA LETÍCIA RODRIGUES MARQUES

**INDICADORES DE GENOTOXICIDADE E PESQUISA DE HEMOGREGARINA EM
CÁGADOS (*Phrynops geoffroanus*) DE DIFERENTES AMBIENTES
HIDROGRÁFICOS DO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul (PPG-SBPAS) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde, Diagnóstico e Bem-estar Animal.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 11/08/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Henrique Braz – UFFS
Orientador

Prof^a. Dr^a. Andrea Pires dos Santos – Purdue University
Avaliadora



Dr^a. Lina Crespo Bilhalva – UFRGS
Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda — e grande — minha família pela vida e oportunidades. Ao meu pai, Sérgio Marques, às minhas mães, Valquíria de Oliveira e Fabiane Gontijo, por abrirem, com as próprias mãos, os caminhos para que eu chegasse até aqui. Por terem feito leve em meu coração, o percurso que muitas vezes pesou em minha mente e corpo.

À minha avó Zilá dos Reis, minha raiz, por ser companhia de tantas vidas e por todas as vezes que, durante esses anos, carregou sua ternura e seu café pelos 1.303 km de distância apenas para me lembrar como é estar em casa e me sentir amada.

Aos meus irmãos, Serginho e Theo, que trazem o melhor de mim à superfície. Vocês foram capazes de compreender a minha ausência, me amar e admirar, mesmo diante dela. Espero que nossos sonhos nos levem, cada vez mais, de volta pra perto.

Ao meu amor, Marina Marangoni, por ter sido força, inspiração e carinho, a certeza mais bonita que encontrei num momento de tanta incerteza. Eu nem sempre soube pedir ajuda, mas você soube perceber quando eu precisava. Este trabalho também é fruto do teu amor paciente, da tua presença silenciosa e da tua fé em tudo que sou. Obrigada pelo abrigo nos dias difíceis e riso nos dias leves.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Henrique Braz, que me permitiu sonhar de novo e acreditou em mim. Você não só mostrou que era possível, mas me possibilitou viver cada segundo. Agradeço por todo conhecimento e paciência com os quais guiou meu aprendizado, por ter me ensinado muito além do que a vida acadêmica poderia ensinar. Entre artigos e reuniões, erros e acertos, aprendi que fazer pesquisa é também escutar, acolher, debater e crescer com o outro. Sua alegria, tranquilidade e verdade tornaram a jornada melhor do que a chegada.

Ao Vitor Mamguê, pela amizade fiel, por ser, ao mesmo tempo, lar e farol. Ao Isaac de Oliveira (*in memoriam*), que deixou marcada a impressão de cada abraço e palavras de carinho. Em meio aos altos e baixos e momentos de dúvida, vocês estiveram firmes, constantes e inteiros. Se cheguei até aqui, foi também porque tive vocês ao meu lado.

Aos meus demais amigos, em especial o Ademar Meznerovvicz, que compartilhou comigo o Plano A e o Plano B de pesquisa, além de muita parceria e bons momentos. Aos integrantes do SAAS, por terem me acolhido no meio do processo, meu respeito, admiração e carinho.

Ao Rafael Valadão, pela “coorientação” neste trabalho e por me mostrar que a paciência é tão valiosa quanto a ciência. A você e à Ana Paula, meu sincero agradecimento pela

generosidade e confiança. Obrigada por me oferecerem uma possibilidade quando eu mais precisava: uma ideia, um novo olhar e um novo caminho possível.

Por fim, agradeço ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, pela cessão do material para a realização das análises; e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa que possibilitou minha permanência e dedicação integral ao mestrado.

“Um novo tempo há de vencer pra que a gente possa florescer e, baby, amar, amar, sem temer. Eles não vão vencer, baby, nada há de ser em vão. Antes dessa noite acabar, baby, escute, é a nossa canção” (Johnny Hooker, “Flutua”).

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo identificar e quantificar eritrócitos com indicadores de dano genotóxico, bem como avaliar a infecção por hemogregarina associada a infestação por sanguessugas em indivíduos de *Phrynosoma geoffroanus*. Os animais foram coletados em quatro ambientes hidrográficos distintos do Baixo Rio Iguaçu, Paraná – BR, incluindo: dois afluentes, Rios Silva Jardim (SJ-r) e Floriano (FL-r); e duas ilhas fluviais, Ilha do Sol (SOL-i) e Ilha do Geninho (GEN-i). Um total de 56 animais foram avaliados para indicadores de genotoxicidade por alterações eritrocitárias e 58 para pesquisa parasitológica em esfregaço sanguíneo. Dados biométricos retilíneos de comprimento e largura máximos da carapaça e plastrão, bem como a massa corpórea e o sexo foram obtidos de todos os indivíduos, além de informações sobre lesões e alterações anatômicas. Após a coleta sanguínea, realizada por punção no seio venoso cervical dorsal, esfregaços sanguíneos foram confeccionados e corados pelo método de May-Grünwald Giemsa. Para determinar a frequência de micronúcleos (MNs) e anormalidades nucleares (ANs), bem como a ocorrência e parasitemia de hemogregarina, foram analisados 3.000 eritrócitos por animal. As frequências médias de MN variaram ligeiramente entre os quatro ambientes ($0,29 \pm 0,63$ em SJ-r, $0,38 \pm 0,50$ em FL-r, $0,25 \pm 0,39$ em SOL-i e ausente em GEN-i), mas sem diferenças significativas ($p=0,32$). Foram observadas ANs em 32/56 indivíduos (frequência média de 7,2/1.000 células), também sem variação entre os ambientes ($p=0,81$). As hemogregarinas apresentaram uma alta ocorrência nos animais (82,76%), enquanto a parasitemia média foi de apenas 0,33% de eritrócitos infectados. Não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de parasitismo entre os locais ($p=0,18$), mas uma correlação positiva foi identificada entre infecção e tamanho corporal ($p<0,001$). A infestação por sanguessugas ocorreu em 20,69% dos cágados e também esteve positivamente correlacionada com tamanho corporal ($p<0,001$) e com a infecção por hemogregarina ($p=0,043$). A ausência de diferenças espaciais nos indicadores genotóxicos ou parasitários pode ser influenciada pelo efeito ecológico do Parque Nacional do Iguaçu, que ajuda a mitigar a contaminação de áreas agrícolas vizinhas. Ao mesmo tempo, a presença infestação por sanguessugas pode sugerir a manutenção de características favoráveis ao vetor no PNI. Esses achados evidenciam a espécie *P. geoffroanus* como sentinela para vigilância em ecossistemas de água doce e reforçam a necessidade de monitoramentos na interface entre zonas protegidas e zonas antropogênicas impactadas.

Palavras-chave: anormalidades nucleares; ecoepidemiologia; micronúcleo; *Phrynosoma*

ABSTRACT

This study aimed to identify and quantify erythrocytes with genotoxic indicators and to assess hemogregarine infection in association with leech infestation in individuals of *Phrynops geoffroanus*. Freshwater turtles were sampled from four distinct hydrographic environments in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil, including: two tributaries, the Silva Jardim River (SJ-r) and Floriano River (FL-r); and two river islands, Ilha do Sol (SOL-i) and Ilha do Geninho (GEN-i). A total of 56 animals were evaluated for indicators of genotoxic damage based on erythrocyte alterations, and 58 were screened for hemoparasites through blood smear analysis. Linear biometric data were recorded for all individuals, including maximum carapace and plastron length and width along with body mass, sex, and the presence of anatomical lesions or abnormalities. Blood was collected via dorsal cervical venous sinus puncture, and blood smears were stained using the May-Grünwald Giemsa method. To determine the frequency of micronuclei (MNs) and nuclear abnormalities (NAs), as well as the occurrence and parasitemia of hemogregarine, 3,000 erythrocytes were analyzed per animal. Mean MN frequencies varied slightly among the four sites (0.29 ± 0.63 in SJ-r, 0.38 ± 0.50 in FL-r, 0.25 ± 0.39 in SOL-i, and absent in GEN-i), with no significant differences ($p = 0.32$). NAs were observed in 32 of 56 individuals (mean frequency of 7.2 per 1,000 cells), also without significant variation among sites ($p=0.81$). Hemogregarina infection was highly prevalent (82.76%), though the mean parasitemia was only 0.33% of erythrocytes. No significant differences in parasitism rates were detected among sampling sites ($p=0.18$), but a positive correlation was identified between infection and body size ($p<0.001$). Leech infestation was recorded in 20.69% of turtles and was also positively correlated with both body size ($p<0.001$) and hemogregarine infection ($p=0.043$). The absence of spatial differences in genotoxic indicators or parasitological parameters may reflect the ecological buffering effect of Iguaçu National Park, which likely reduces contaminant influx from neighboring agricultural zones. At the same time, the presence of leeches suggests that conditions favorable for vector persistence are maintained within the park. These findings highlight *P. geoffroanus* as a valuable sentinel species for freshwater ecosystem monitoring and emphasize the importance of surveillance at the interface between protected and anthropogenically impacted areas.

Keywords: eco-epidemiology; freshwater turtle; leech; micronuclei, nuclear abnormalities

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 1 – Mapa demonstrativo dos quatro ambientes hidrográficos distintos do Rio Iguaçu, onde foram realizadas as coletas: Ilha Geninho, Rio Floriano, Rio Silva Jardim e Ilha do Sol	23
--	----

ARTIGO I

Figure 1 – Sampling sites where <i>Phrynops geoffroanus</i> individuals were captured in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil.	31
Figure 2 – Comparison of mean frequencies of micronucleus (MNs) among groups of <i>Phrynops geoffroanus</i> from different hydrographic environments of the Lower Iguaçu River	35
Figure 3 – Photomicrographs of genotoxic alterations observed in erythrocytes of <i>Phrynops geoffroanus</i> captured in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil	36
Figure 4 – Comparison of mean frequencies of nuclear abnormalities (NAs) among groups of <i>Phrynops geoffroanus</i> from different hydrographic environments of the Lower Iguaçu River.	37

ARTIGO II

Figure 1 – Photomicrographs of blood stages of <i>Haemogregarina</i> sp. observed in erythrocytes of <i>Phrynops geoffroanus</i> captured in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil.	51
Figure 2 – Comparison of infected animals with hemogregarine among groups of <i>Phrynops geoffroanus</i> from different hydrographic environments of the Lower Iguaçu River.	52
Figure 3 – Correlation graph of infected animals with hemogregarine and leech from hydrographic environments of the Lower Iguaçu River.....	55

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Table 1 – Biometric data of <i>Phrynops geoffroanus</i> individuals captured in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil.....	34
---	----

ARTIGO II

Table 1 – Biometric data of <i>Phrynops geoffroanus</i> individuals captured in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil.....	50
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	CARACTERIZAÇÃO HÍDRICA E AMBIENTAL DO RIO IGUAÇU.....	14
2.2	ECOLOGIA E BIOLOGIA DE <i>PHRYNOPS GEOFFROANUS</i>	15
2.3	GENOTOXICIDADE ERITROCITÁRIA COMO BIOMARCADOR AMBIENTAL	16
2.4	HEMOGREGARINAS EM QUELÔNIOS	19
3	OBJETIVO	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	22
4.2	AMOSTRAGEM	23
4.3	ANÁLISES LABORATORIAIS	24
4.3.1	ANÁLISE GENOTÓXICA	25
4.3.2	PESQUISA DE HEMOGREGARINA.....	25
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5	RESULTADOS.....	27
6	ARTIGO I	28
7	ARTIGO II.....	44
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
	REFERÊNCIAS.....	62
	ANEXO A – Autorização para atividades com finalidade científica	70
	ANEXO B – Declaração de colaboração e recebimento de material biológico	74
	ANEXO C – Normas da revista Environment Science and Pollution Research	76
	ANEXO D – Normas da revista Parasitology Research.....	87

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos vem enfrentando intensa deterioração devido ao aumento das pressões antrópicas, como a expansão urbana, a industrialização e o avanço das atividades agrícolas (Bárcenas-García *et al.*, 2022; Yamamoto *et al.*, 2016; Santos; Laranja, 2024). Essas ações promovem não só alterações significativas na qualidade da água, mas interferem também no equilíbrio ecológico e na dinâmica das populações que habitam esses ambientes (Crespo-López *et al.*, 2011; Lehun *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a bacia hidrográfica do Rio Iguaçu, corresponde a um dos sistemas fluviais mais importantes da região sul do Brasil (IAT, 2016). Apesar disso, ocupa a segunda posição entre os rios mais poluídos do país, atrás apenas do Rio Tietê, no estado de São Paulo (Lehun *et al.*, 2021). Essa característica se deve às grande quantidades de resíduos e contaminantes que recebe ao abranger os estados do Paraná, Santa Catarina e parte do nordeste argentino (IAT, 2016).

Em contrapartida, a porção terminal do rio permeia um dos mais extensos remanescentes de Mata Atlântica do Brasil, o Parque Nacional do Iguaçu (PNI) (MapBiomias, 2024; Silva *et al.*, 2022). Os Parques Nacionais são Unidades de Conservação de Proteção Integral, nos quais é permitido apenas o uso indireto dos recursos naturais (Brasil, 2000). Essa categoria de área protegida desempenha um papel essencial na proteção da biodiversidade como zonas de amortecimento (*buffer zones*) (Roe; Georges, 2007). Embora essas áreas sejam conhecidas por reduzir impactos, conservar a biodiversidade e ampliar a conexão entre habitats, sua eficácia está diretamente relacionada ao uso do solo nas áreas perimetrais (Roe; Georges, 2007).

O monitoramento de impactos sofridos pelos indivíduos é essencial para a avaliação da qualidade ambiental e da efetividade de conservação dessas áreas protegidas. Os répteis têm se apresentado como excelentes bioindicadoras da saúde e funcionalidade de ecossistemas, devido a sensibilidade às condições do ambiente e a rápida respostas aos estresses ambientais (Baptista *et al.*, 2022; Carlsson, 2019; Humphries; Benitez-Nelson; Combrink, 2022).

Entre os organismos que compõem a fauna aquática e semiaquática da região do PNI, o cágado-de-barbela (*Phrynops geoffroanus*) é uma espécie amplamente distribuída (Brites; Rantin, 2004; Venancio *et al.*, 2013). Esses animais são conhecidos pela longevidade, alimentação oportunista, metabolismo lento e alta fidelidade a habitats específicos, o que os tornam suscetíveis à bioacumulação e à ação prolongada de estressores ambientais, como pesticidas, metais pesados, e agentes infecciosos ou parasitários (Fonseca *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2021; Venancio *et al.*, 2013; Vogt *et al.*, 2023).

Avaliações ecológicas por meio de biomarcadores genotóxicos, como o teste do micronúcleo (MN) e de anomalias nucleares (AN), apresentam boa sensibilidade e possibilidade de realização *in vivo* (Fenech, 2000; Poletta *et al.*, 2013). O uso dessas técnicas permite a detecção de danos diretos ao material genético, induzidos por agentes físicos, químicos ou biológicos. Quando aplicadas em conjunto, fornecem informações acerca do grau do dano e do comprometimento da saúde e reprodução das populações (Poletta *et al.*, 2013; Souto *et al.*, 2008).

Paralelamente, os quelônios também podem atuar como hospedeiros intermediários de hemoparasitos (Telford, 2009). Dentre eles, é possível citar as hemogregarinas, protozoários intracelulares transmitidos por sanguessugas (O'Donoghue, 2017; Úngari *et al.*, 2023). Altas taxas de prevalência têm sido reportadas em populações de cágados que habitam áreas degradadas, onde também se observa relação com a maior presença dos vetores (Brites; Rantin, 2004; Oliveira *et al.*, 2018).

Ainda que a infecção por hemogregarinas seja considerada de baixa patogenicidade, a cronicidade e intensas parasitemias podem desencadear alterações hematológicas e homeostáticas dos hospedeiros (Silva *et al.*, 2024). Apesar da relevância ecológica de *P. geoffroanus* e da ampla utilização de biomarcadores genotóxicos e parasitológicos em quelônios, são escassos os estudos que investigam essas relações em ambientes da bacia do Rio Iguaçu, particularmente na região do PNI (Rubio-Vargas *et al.*, 2024; Yamamoto *et al.*, 2016).

Neste contexto, o presente trabalho avalia indicadores de genotoxicidade e a ocorrência de hemogregarinas em cágados *Phrynops geoffroanus* em diferentes ambientes hidrográficos do Parque Nacional do Iguaçu. A análise comparativa entre os pontos permite uma compreensão mais abrangente e ecológica dos impactos ambientais ao longo da bacia. Espera-se produzir evidências científicas que contribuam para o monitoramento e conservação de espécies semiaquáticas e para o planejamento de ações voltadas à proteção dos ecossistemas dulcícolas em áreas de fronteira entre conservação e uso antrópico intensivo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERIZAÇÃO HÍDRICA E AMBIENTAL DO RIO IGUAÇU

O Rio Iguaçu é considerado um dos principais cursos d'água da Região Sul do Brasil, drenando uma bacia hidrográfica de aproximadamente 70.800 km² que abrange os estados do Paraná, Santa Catarina e parte do nordeste argentino. Sua nascente está localizada na Serra do Mar, no município de Curitiba-PR, e seu percurso estende-se por cerca de 1.320 km até sua confluência com o rio Paraná (IAT, 2016).

Em razão de sua extensão, a bacia do rio é dividida nas seguintes Unidades Hidrográficas de Gestão de Recursos Hídricos (Resolução N° 49 de 2006, CERH/PR): o Alto Iguaçu, porção entre a nascente e o município de Porto Amazonas; o Médio Iguaçu, que estende-se até as proximidades de União da Vitória; e o Baixo Iguaçu, correspondente ao último trecho antes da foz na região da Tríplice Fronteira entre Brasil, Argentina e Paraguai (IAT, 2016; Lehun *et al.*, 2021).

Ao longo de sua trajetória, o rio Iguaçu atravessa regiões com intensa ocupação antrópica, caracterizadas por atividades urbanas, industriais e agropecuárias. Esse uso do solo contribui para a degradação da qualidade da água e o lançamento de efluentes de diferentes naturezas. Estudos recentes indicam que o rio Iguaçu ocupa a segunda posição entre os rios mais poluídos do Brasil, atrás apenas do Rio Tietê, do estado de São Paulo (Lehun *et al.*, 2021).

Na porção terminal do rio, observa-se um contraste marcante entre suas margens esquerda e direita. A margem direita atravessa o Parque Nacional do Iguaçu (PNI), unidade de conservação federal criada em 1939 (Decreto Federal n° 1.035) com área de 185.262,5 hectares, que abriga um dos mais extensos remanescentes contínuos de Mata Atlântica do Brasil. Nessa margem, o rio recebe contribuições dos rios Floriano e Silva Jardim, cujas sub-bacias estão parcial ou totalmente inseridas no PNI (MapBiomias, 2024).

A sub-bacia do rio Floriano encontra-se quase integralmente protegida, apresentando cobertura vegetal nativa de 99,31% (calculado à partir de MapBiomias, 2024), o que favorece sua utilização como área de referência ou controle para definição de parâmetros de conservação e monitoramento (Silva *et al.*, 2022). Por outro lado, o rio Silva Jardim nasce e percorre uma região sujeita a uso agropecuário intensivo antes de adentrar a zona protegida do parque. Essa diferença no uso do solo entre as sub-bacias se reflete em sua cobertura vegetal remanescente, estimada em apenas 45,89% (MapBiomias, 2024), o que o torna potencial vetor de aporte de nutrientes, sedimentos e contaminantes ao Baixo Iguaçu (Santos; Laranja, 2024).

Já a margem esquerda do Rio Iguaçu, nesse trecho, permanece influenciada por áreas fragmentadas e regiões de uso totalmente antrópico (Mapbiomas, 2024). No leito principal do Baixo Rio Iguaçu, ocorre a formação de ilhas fluviais, que constituem habitats essenciais para diversas espécies aquáticas e semiaquáticas, como a Ilha do Sol e a Ilha do Geninho. Essas ilhas, portanto, estão sujeitas a um regime hídrico misto, resultante da combinação de águas oriundas da zona de proteção do PNI com aquelas provenientes de áreas não protegidas, de uso agroindustrial (Santos; Laranja, 2024).

O rio Iguaçu é reconhecido pelo alto índice de endemismo de sua fauna, onde cerca de 70% de suas espécies de peixes, por exemplo, não são encontradas em nenhum outro lugar do planeta (Baumgartner *et al.*, 2012; Roxo *et al.*, 2017). O local configura-se como um cenário de grande relevância ambiental, a despeito disso, suas populações aquáticas e semiaquáticas estão continuamente expostas à descarga de contaminantes em quase toda a extensão de sua bacia (Moraes *et al.*, 2024; Poletta *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2016).

Já foi relatado que o Baixo Iguaçu apresenta considerável redução da poluição em relação aos trechos associados às grandes metrópoles. Embora seja comprovada o menor valor de alguns compostos, como a cromo, fósforo alumínio e chumbo, os valores ainda estão acima do permitido pelo CONAMA (Resolução nº 357 de 2005) (Rubio-Vargas *et al.*, 2024; Yamamoto *et al.*, 2016). Estudos têm demonstrado que a poluição presente ao longo do curso de todo Rio Iguaçu causa tanto danos genotóxicos, quanto relações desequilibradas entre parasitismo e fauna local (Lehun *et al.*, 2021; Lehun; Duarte; Takemoto, 2023; Yamamoto *et al.*, 2018).

Nesse contexto, a análise dos impactos antrópicos, por meio de abordagens ecotoxicológicas, sobre a qualidade da água e a biota são importantes ferramentas na conservação ambiental (Corredor-Santamaría; Gómez; Velasco-Santamaría, 2016; Crespo-López *et al.*, 2011; Lehun, *et al.*, 2021; Mitkovska; Chassovnikarova, 2020; Zapata *et al.*, 2016).

2.2 ECOLOGIA E BIOLOGIA DE *Phrynops geoffroanus*

As tartarugas existem há cerca de 300 milhões de anos e hoje representam um dos grupos de animais mais ameaçados por pressões antrópicas (Rhodin *et al.*, 2018; Poletta *et al.*, 2013). Os cágados, répteis semiaquáticos, exercem funções ecológicas cruciais em ambientes dulcícolas: participam da ciclagem de nutrientes, controle populacional de invertebrados e pequenas presas, e contribuem para a dispersão de sementes e aumento da heterogeneidade do habitat (Bárcenas-García *et al.*, 2022; Ribeiro; Utta; Barreto, 2017).

Esses animais são excelentes organismos-sentinela pela ampla distribuição, comportamento territorial, longevidade e suscetibilidade fisiológica a contaminantes e acumulação de poluentes em tecidos ao longo do tempo (Borges *et al.*, 2022; Castaño *et al.*, 2020; Poletta *et al.*, 2013). Estudos com *Podocnemis expansa* mostraram acumulação de metais em ovos e filhotes, com transferência materna ou direta do ambiente, acarretando danos citogenéticos aos tecidos do animal (Frossard *et al.*, 2021). Além disso, presentes em todos os níveis tróficos, jovens ou adultos são capazes de acumular e biomagnificar contaminantes por meio da ingestão de grandes volumes de água, peixes e plantas, bem como pela absorção por mucosa e pele (Bárcenas-García *et al.*, 2022; Frossard *et al.*, 2013; Ribeiro; Uta; Barreto, 2017).

O cágado-de-barbela (*Phrynops geoffroanus*) é quelônio da família Chelidae amplamente distribuído em rios e córregos da América do Sul. Trata-se de um carnívoro oportunista, relativamente tolerante a ambientes impactados, sendo comumente encontrado em ambientes urbanos (Souza; Abe, 2000). No entanto, essa tolerância não o exime de efeitos subletais decorrentes de poluentes (Brites; Rantin, 2004; Venancio *et al.*, 2013).

Ao examinarem amostras biológicas de *P. geoffroanus*, diversos estudos demonstraram a sensibilidade da espécie à exposição de contaminantes por meio de alterações hematológicas, bioquímicas e genotóxicas (Brites; Rantin, 2004; Fonseca *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2021). A avaliação da saúde ambiental com base nesses organismos permite, portanto, não apenas identificar a presença de poluentes, mas também compreender os efeitos biológicos dessas pressões sobre populações nativas, subsidiando a formulação de estratégias de conservação mais eficazes e direcionadas.

2.3 GENOTOXICIDADE ERITROCITÁRIA COMO BIOMARCADOR AMBIENTAL

A bacia hidrográfica de um rio funciona como uma unidade ecológica integrada: o uso e ocupação do solo em todo o sistema repercute diretamente na qualidade da água, influenciando a saúde dos ecossistemas aquáticos (Yamamoto *et al.*, 2016). A pressão antrópica, como drenagem de áreas úmidas para expansão agrícola e a intensificação do uso de pesticidas, compromete a integridade desses sistemas e promove a contaminação de ambientes naturais.

O escoamento das áreas cultivadas transporta altos níveis de nitrogênio, fósforo, metais pesados, pesticidas e fertilizantes. Os componentes minerais diminuem a capacidade das águas superficiais de sustentar a vida vegetal e animal, elevando a eutrofização, aumentando a

turbidez e salinidade, reduzindo a penetração de luz e prejudicando zonas de desova de quelônios. Enquanto isso, a presença de hidrocarbonetos, metais pesados, herbicidas e solventes pode induzir danos diretos ao DNA das espécies (Crespo-López *et al.*, 2011).

Essas alterações provocam alterações comportamentais, fisiológicas, adaptativas e são conhecidas por contribuir para processos de carcinogênese, redução da fecundidade, longevidade, do *status* de saúde e das taxas demográficas populacionais (Frossard *et al.*, 2021; Poletta *et al.*, 2013; Shugart; Theodorakis, 1998).

Dentre a variedade de testes de curto prazo desenvolvidos para detectar danos no DNA, o teste do Micronúcleo (MN) e de outras anomalias nucleares (AN) são frequentemente utilizados pela rapidez, sensibilidade e facilidade de aplicação (Poletta *et al.*, 2013). Eles permitem a caracterização precoce dos danos sofridos em células nucleadas, como quebras de fita, ligações cruzadas e modificações de base de DNA (Fenech, 2000; Park; Choi, 2007). Portanto, compõe importantes biomarcadores em estudos ecológicos *in vivo*, especialmente com espécies que apresentam eritrócitos nucleados, como os répteis (Bonassi; Au, 2002; Poletta *et al.*, 2013).

O teste MN é uma das técnicas mais utilizadas para monitoramento *in situ* de poluição genotóxica em ambientes naturais. É feita com base na quantificação de fragmentos ou cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo principal (Fenech, 2000). O aparecimento de micronúcleos resulta tanto de quebras cromossômicas por reparo deficiente, quanto da segregação cromossômica inadequada durante a mitose (Frossard *et al.*, 2013; Hatch *et al.*, 2013). Por isso, é útil para identificar efeitos mutagênicos ou aneugênicos sofridos por células expostas a agentes genotóxicos.

O teste do micronúcleo, inicialmente desenvolvido por Schmid (1975), é definido por Fenech (2000) como um achado arredondado intracitoplasmático. O autor também estabelece os critérios para pontuação dos MNs: (i) possuir diâmetro entre 1/16 e 1/3 do diâmetro médio do núcleo principal; (ii) ausência de refratariedade do MNs; (iii) não conexão ou sobreposição com o núcleo principal (limites bem distinguíveis) e, por fim, (iv) coloração idêntica ou mais intensa ao núcleo principal.

As outras anormalidades nucleares também refletem danos ao material genético e disfunções no ciclo celular (Carrasco; Tilbury; Myers, 1990; Fenech, 2000; Schmid, 1975). Elas têm sido associadas a fatores de estresse ambiental, e podem incluir diferentes tipos morfológicos de alteração nuclear. De acordo com Carrasco *et al.* (1990) e Strunjak-Perovic *et al.* (2009), compreendendo distintos tipos morfológicos, incluindo brotos nucleares, núcleos entalhados, lobados, vacuolados e células binucleadas.

Os núcleos brotos nucleares (*blebbed nuclei*) são caracterizados desde pequenas protrusões até estruturas em forma de haste com um término arredondado completamente circunscritos com membrana nuclear. Os núcleos entalhados são caracterizados pela presença de uma fenda bem definida, de largura uniforme, que se estende até uma profundidade apreciável no núcleo (Carrasco; Tilbury; Myers, 1990; Fenech, 2000).

Núcleos lobados são determinados pela presença de evaginações maiores que as “bolhas” descritas acima, mas sem a mesma estrutura detalhada, enquanto núcleos vacuolados formam aberturas bem definidas, desprovidas de qualquer material visível (Carrasco; Tilbury; Myers, 1990; Corredor-Santamaría; Gómez; Velasco-Santamaría, 2016). Por fim, as células binucleadas são identificadas pela presença de dois núcleos, de tamanhos e coloração similares (Strunjak-Perovic *et al.*, 2009). Além dessas alterações, outras formas atípicas já foram relatadas na literatura, incluindo núcleo em forma de rim, deslocado, núcleo redondo e eritrócitos anucleados (Strunjak-Perovic *et al.*, 2009).

Estudos com quelônios demonstram que a frequência de MN e AN pode variar conforme a carga de contaminantes no ambiente, especialmente metais pesados, agrotóxicos e resíduos industriais. Frossard *et al.* (2021) revelaram um grande número de MN em eritrócitos (10-15%) de filhotes de *Podocnemis expansa* associado ao acúmulo de metais tóxicos oriundos do ambiente. Outros estudos com *Podocnemis unifilis* também demonstraram a alta ocorrência de micronúcleos e anomalias nucleares diante da exposição a metais pesados como mercúrio e cádmio (Borges *et al.*, 2022; Frossard *et al.*, 2013). Populações de *Trachemys dorbignii* exibiram MN e alta frequência de AN, como 63,8% de brotos nucleares, em ambientes de baixas concentrações de oxigênio e altos níveis de fosfato e nitrogênio, demonstrando a eficácia desse método para monitorar impactos ambientais (Silva *et al.*, 2024).

Em determinados trechos do rio Iguaçu, especialmente em áreas próximas a centros urbanos ou com intensa atividade agrícola e industrial, foram identificadas concentrações elevadas de metais e metaloides dissolvidos na água. Tais concentrações estavam associadas à bioacumulação tecidual em peixes, com altas frequências de MN e AN em eritrócitos (Rubio-Vargas *et al.*, 2024; Yamamoto *et al.*, 2016).

Embora quelônios também apresentem suscetibilidade comprovada à contaminação por metais pesados, agrotóxicos e compostos orgânicos persistentes, até o momento não existem registros na literatura científica que avaliem o *status* genotóxico de cágados na bacia hidrográfica do rio Iguaçu. Essa lacuna é particularmente relevante considerando o papel ecológico e a longevidade desses animais, bem como a importância sociocultural e ambiental do rio.

2.4 HEMOGREGARINAS EM QUELÔNIOS

As hemogregarinas são protozoários intraeritrocitários do filo Apicomplexa, com ciclo de vida heteroxênico obrigatório que envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados hematófagos (Siddall; Dessser, 2001; Úngari *et al.*, 2024). Para esses parasitos, os hospedeiros vertebrados atuam como hospedeiros intermediários, em que realizam a multiplicação e formação dos estágios sexuais imaturos nas células sanguíneas (O'Donoghue, 2017).

Já a maturação e fertilização geralmente ocorrem nos hospedeiros invertebrados, produzindo zigotos e então os esporozoítos infecciosos (Telford, 2009). As infecções são transmitidas a novos hospedeiros vertebrados quando os esporozoítos são injetados durante o repasto sanguíneo do vetor ou quando os próprios vetores infectados são ingeridos (O'Donoghue, 2017; Siddall, 1995).

Alguns estudos mais antigos propõe que as hemogregarinas consideradas com base no hospedeiro infectado (Siddall, 1995). Nesse caso, todas as hemogregarinas de quelônios são consideradas pertencentes ao gênero *Haemogregarina* (*sensu stricto*), enquanto para peixes pode-se definir os gêneros *Desseria* ou *Cyrlia* ou considerá-las como *Hemogregarina sensu lato*. Por fim, todos os membros do gênero *Haemogregarina* em cobras, crocodilos, lagartos, anfíbios, pássaros e mamíferos são considerados como o gênero *Hepatozoon*.

Apesar disso, são classificadas em quatro famílias: Haemogregarinidae (gêneros *Haemogregarina*, *Cyrlia* e *Desseria*); Hepatozoidae (gênero *Hepatozoon*); Karyolysidae (gêneros *Karyolysus* e *Hemolivia*; e, por fim, Dactylosomatidae (gêneros *Dactylosoma* e *Babesiosoma*) (Telford, 2009).

A maioria dos estudos clínicos têm se limitado aos estágios do ciclo de vida intraeritrocítico, uma vez que são facilmente detectados em esfregaços de sangue periférico (O'Donoghue, 2017). Diversas espécies foram descritas apenas com base na ocorrência do hospedeiro e seus os efeitos fisiológicos e imunológicos permanecem pouco elucidados (Úngari *et al.*, 2023). Apesar disso, há grande inconsistência na literatura acerca da identificação morfológica das formas infectantes, o que torna necessária a utilização de técnicas moleculares para diagnóstico das diferentes espécies (Dvořáková *et al.*, 2015; Rakhshandehroo; Sharifiyazdi; Ahmadi, 2016).

Um estudo molecular em cágados da Amazônia identificou sete espécies de *Haemogregarina*, incluindo *H. embaubali*, *H. goianensis*, *H. brasiliiana* e descrições de seis novas espécies, com prevalência de até 85 % em *Podocnemis* spp. (Úngari *et al.*, 2023). Outras pesquisas também demonstram altas taxas de infecção e diferentes espécies do hemoparasito

em populações de quelônios silvestres (Oliveira *et al.*, 2018; Picelli *et al.*, 2015; Úngari *et al.*, 2018, Úngari *et al.*, 2023).

Embora essas infecções sejam tradicionalmente consideradas de baixa patogenicidade, parasitemias intensas têm sido associadas a alterações hematológicas em quelônios, especialmente em áreas degradadas. Essas alterações estão correlacionadas à diminuição na condição corporal e aumento de vulnerabilidades fisiológicas (Oliveira *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2024).

Além disso, é importante ressaltar que a presença de infecção implica na necessidade de contato com o vetor que, no caso dos quelônios, é comum a sanguessuga (O'Donoghue, 2017; Telford, 2009; Úngari *et al.*, 2023). O número e a diversidade de sanguessugas estão relacionados a fatores físicos e químicos promovidos por ambientes com altos níveis de poluentes orgânicos (Cortelezzi *et al.*, 2018; Koffler; Seigel; Mendonca, 1978).

Em um estudo realizado por Brites e Rantin (2004), foi demonstrada a correlação entre infestação por sanguessugas em *P. geoffroanus* e a qualidade da água. A infestação esteve presente apenas em áreas contaminadas com efluentes domésticos e industriais. Dessa forma, a presença de sanguessugas pode não apenas atuar como vetor de hemoparasitos, mas também indicar ambientes com baixa qualidade de água e alta carga orgânica (Brites; Rantin, 2004; Cortelezzi *et al.*, 2018; McCoy *et al.*, 2007).

A associação entre a ocorrência de hemogregarinas, a abundância de vetores e a condição fisiológica dos hospedeiros é capaz de fornecer informações valiosas para o entendimento das interações entre parasitismo e qualidade ambiental. A investigação dessas relações em quelônios da bacia do rio Iguaçu, ainda inexplorada, representa uma oportunidade para integrar aspectos de ecoparasitologia e biomonitoramento em regiões sob pressão antrópica crescente.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar indicadores de genotoxicidade eritrocitária e a ocorrência de hemogregarinas em cágados em diferentes ambientes hidrográficos do Parque Nacional do Iguaçu.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar a frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares eritrocitárias entre indivíduos de *Phrynops geoffroanus* coletados no leito principal do Rio Iguaçu (em trecho sob influência direta do Parque Nacional do Iguaçu) e em seus afluentes (rios Floriano e Silva Jardim), sujeitos a distintos níveis de impacto antrópico;
- b) Determinar a ocorrência e a intensidade de infecção por parasito dos do gênero Hemogregarina de *Phrynops geoffroanus* nas diferentes localidades do Parque Nacional do Iguaçu;
- c) Avaliar a associação entre a infecção por hemogregarinas, infestação por sanguessugas e os parâmetros biométricos de *Phrynops geoffroanus* do Parque Nacional do Iguaçu;
- d) Produzir informações técnicas e científicas que subsidiem a discussão e formulação de estratégias de monitoramento ambiental e conservação de quelônios em ecossistemas dulcícolas sob influência antrópica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades de captura animal e amostragem biológica foram conduzidas como parte do Plano de Ação para a Conservação da Herpetofauna do Sul, coordenado pelo Centro de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios (ICMBio/RAN), e foram autorizadas pelo Sistema de Informação e Autorização para a Biodiversidade (SISBIO/ICMBio) sob a licença nº 91311-2 (Anexo A). Os materiais utilizados foram, portanto, cedidos pelo RAN/ICMBio para realização da pesquisa (Anexo B).

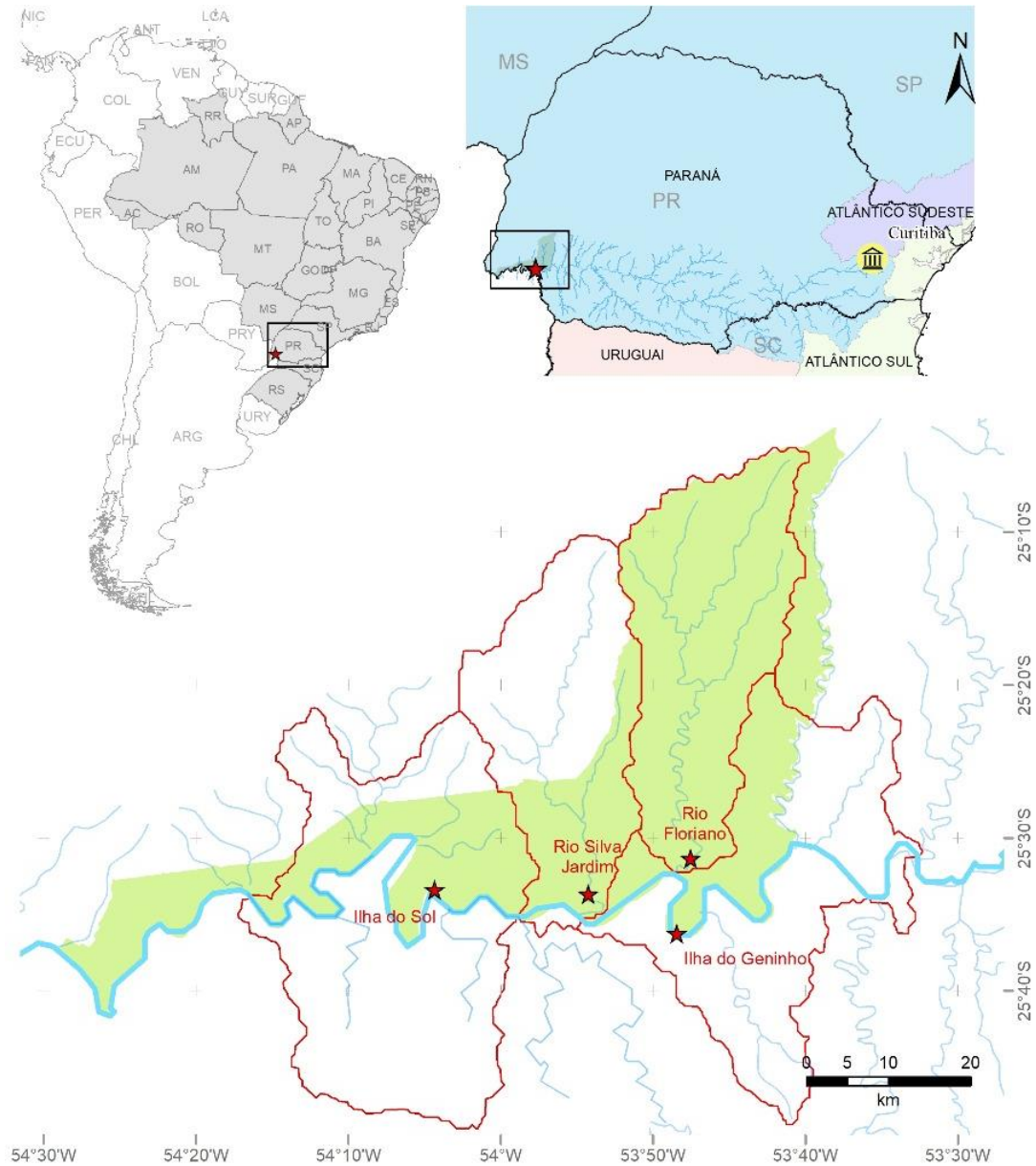
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Os espécimes foram capturados em quatro ambientes hidrográficos distintos da Bacia Hidrográfica do Rio Iguaçu: Ilha Geninho (25°36'02"S 53°48'48"W), Rio Floriano (25°32'10"S 53°48'36"W), Rio Silva Jardim (25°34'56"S 53°54'29"W) e, finalmente, Ilha do Sol (25°33'30"S 54°04'07"W) (Figura 1).

Os rios Floriano e Silva Jardim são tributários do Rio Iguaçu, localizados em uma zona crítica de transição entre fragmentos florestais nativos e áreas ambientalmente impactadas. A sub-bacia do Rio Floriano (FL-r) está inteiramente dentro do PNI, especificamente em sua zona intangível, a qual objetiva manter os atributos naturais em seu estado mais primitivo. Dessa forma, é possível sua utilização como área de referência ou controle para definição de parâmetros de conservação e monitoramento (Silva *et al.*, 2022). Em contraste, a nascente e o trecho inicial do Rio Silva Jardim (SJ-r) estão localizados fora dos limites do PNI, em uma região ocupada por atividades agrícolas e pastoris, tornando-o mais vulnerável à interferência antrópica. Consequentemente, a cobertura vegetal das duas sub-bacias, calculada a partir dos dados do MapBiomas (2024), difere significativamente: 99,31% no rio Floriano e 45,89% no rio Silva Jardim.

Já as Ilhas do Sol (SOL-i) e Geninho (GEN-i) estão localizadas no leito principal do Rio Iguaçu, e recebem influência direta de efluentes oriundos de margens com características ambientais contrastantes. No lado norte do rio, está localizado o PNI, enquanto o lado sul é marcado por intensa atividade agropecuária e presença de empreendimentos industriais, com baixa cobertura vegetal. Essa configuração geográfica faz com que SOL-i e GEN-i estejam submetidas a um regime hídrico misto, combinando a influência de águas mais preservadas, oriundas da zona protegida do PNI, com águas de maior carga antrópica vindas de áreas não protegidas.

Figura 1 – Mapa demonstrativo dos quatro ambientes hidrográficos distintos do Rio Iguaçu, onde foram realizadas as coletas: Ilha Geninho, Rio Floriano, Rio Silva Jardim e Ilha do Sol



Fonte: Arquivo pessoal (2025).

4.2 AMOSTRAGEM

Para a captura dos animais, foram utilizadas armadilhas do tipo covo (*funnel trap*), medindo 80 x 46 x 20 cm, malha de 15 mm, iscadas com uma mistura de carne moída, fígado bovino, sardinha entalada, abacaxi e ração seca para gatos. As iscas eram armazenadas em recipiente que não possibilitava o acesso dos cães para real consumo do conteúdo. A fim de

evitar afogamento dos quelônios, as armadilhas possuíam um sistema de flutuação, que permitia cerca de 30% de emersão de sua estrutura. As armadilhas foram instaladas ao longo das margens dos ambientes, registradas e numeradas em um equipamento de GPS, no período da manhã (8h), revisadas e retiradas após 24 horas.

Os indivíduos que não pertenciam à espécie estudada, foram imediatamente devolvidos ao ambiente natural. Os cágados capturados foram contidos manualmente, identificados e etiquetados quanto ao local da armadilha e levados à base de pesquisa do ICMBio. Posteriormente, foram registrados os parâmetros biométricos, com o auxílio de um paquímetro digital, incluindo comprimento e largura máxima da carapaça, comprimento e largura máxima do plastrão (em centímetros) e massa corporal (em gramas).

A determinação do sexo foi baseada no comprimento da cauda e na posição da cloaca em relação à carapaça, conforme descrito por Rueda-Almonacid et al. (2007). Além disso, foi realizada a inspeção visual de alterações, como a presença de lesões, deformidades na carapaça e número de ectoparasitos.

A coleta de sangue foi realizada por punção do seio venoso cervical dorsal, respeitando os limites de 0,5 a, no máximo, 0,8% do peso corporal em gramas. Para tanto, foi feita a antisepsia da região e utilizada uma seringa descartável 1 mL equipada com uma agulha 21 G 1/4 (calibre 30 × 0,8 mm).

Imediatamente após a coleta, dois esfregaços sanguíneos foram preparados utilizando lâminas de vidro com ponta fosca 27 x 76 mm limpas identificadas e deixadas para secagem sob temperatura ambiente. Após realizados todos os procedimentos previstos pelo Programa de Monitoramento, os animais foram devolvidos no exato local de suas capturas, com o auxílio das marcações de GPS.

4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal da Fronteira Sul. As lâminas de esfregaços sanguíneos foram fixadas com metanol absoluto por 10 minutos e coradas pelo método de May-Grünwald Giemsa. Posteriormente, foram analisadas em microscópio óptico com ampliação de 1000x e imersão em óleo para lâminas, seguindo a técnica de Zig-Zag, para evitar repetições. As lâminas codificadas e randomizadas foram pontuadas às cegas por um único observador. Para cada indivíduo, 3.000 eritrócitos foram avaliados para quantificar a presença de alterações genotóxicas e de hemoparasitos.

4.3.1 INDICADORES DE GENOTOXICIDADE

Os critérios para pontuação dos micronúcleos (MNs) seguiram o proposto por Fenech (2000), de modo que foram considerados apenas aqueles que apresentaram as seguintes características: (i) diâmetro entre 1/16 e 1/3 do diâmetro médio do núcleo principal; (ii) ausência de refratariedade do MNs; (iii) não conexão ou sobreposição com o núcleo principal (limites bem distinguíveis) e, por fim, (iv) coloração idêntica ou mais intensa ao núcleo principal.

As anormalidades nucleares foram classificadas de acordo com Carrasco et al. (1990) e Strunjak-Perovic et al. (2009), compreendendo distintos tipos morfológicos. Os núcleos *blebbed* (bolhas) (i) foram caracterizados de pequenas protrusões até estruturas em forma de haste com um término arredondado completamente circunscritos com membrana nuclear. Núcleos lobados (ii) foram determinados quando apresentavam evaginações maiores que as “bolhas” descritas acima, mas sem a mesma estrutura detalhada. Núcleos vacuolados (iii) aberturas bem definidas, desprovidas de qualquer material visível. Os núcleos entalhados (iv) foram caracterizados pela presença de uma fenda bem definida, de largura uniforme, que se estendia até uma profundidade apreciável no núcleo. Células binucleadas (v) foram identificadas pela presença de dois núcleos, de tamanhos e coloração similares. Além dessas alterações, outras formas atípicas foram registradas, incluindo núcleo em forma de rim (vi), deslocado (vii), núcleo redondo (viii) e eritrócitos anucleados (ix).

4.3.2 PESQUISA DE HEMOGREGARINA

A pesquisa de hemogregarinas foi realizada por meio da análise morfológica direta de esfregaços sanguíneos corados, empregando o mesmo conjunto de lâminas utilizadas na avaliação dos indicadores de genotoxicidade, bem como a mesma metodologia de leitura. Foram avaliadas a presença e a morfologia dos hemoparasitos, além da quantificação dos mesmos. As análises permitiram, portanto, estimar a ocorrência de infecção nos animais e estimar a intensidade parasitária.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram conduzidas no *software* RStudio (R Core Team, 2023), utilizando os pacotes *tidyverse*, *vegan*, *car*, *rstatix*, *FSA* e *ggpubr*. Para avaliar a normalidade da distribuição dos dados de cada variável contínua, aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk. A homogeneidade das variâncias foi testada com o teste de Levene. Com base nos

pressupostos da normalidade, os dados foram expressos em média $\pm$ DP (desvio-padrão) ou mediana e intervalo interquartil [25-75].

A fim de detectar as diferenças entre os grupos ambientais, optou-se pela realização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste post hoc de Dunn com correção de Bonferroni. As correlações entre as variáveis contínuas (como frequência de biomarcadores genotóxicos, intensidade de ecto e hemoparasitos e medidas biométricas) foram investigadas por meio dos testes de correlação de Spearman.

Para variáveis categóricas, as associações entre os grupos e a ocorrência de infecção por hemogregarinas e infestação por sanguessugas foram avaliadas por meio do teste do qui-quadrado. Adicionalmente, foi testada a associação entre a presença de hemogregarinas e a infestação por sanguessugas utilizando o mesmo teste, considerando ambas as variáveis como dicotômicas.

5 RESULTADOS

Os resultados da pesquisa foram descritos na forma de dois artigos científicos, conforme estabelece a normatização de trabalhos acadêmicos do Programa de Pós-graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul (PPG-SBPAS).

Os dados e discussões referentes a avaliação de genotoxicidade estão relatadas na Sessão 6. Artigo I, seguindo as normas pertinentes do periódico “Environmental Science and Pollution Research” (Anexo C). Já os dados e discussões pertinentes à pesquisa de hemogregarinas encontram-se na Sessão 7. Artigo II, nas normas pertinentes do periódico “Parasitology Research” (Anexo D).

6 ARTIGO I

Genotoxic biomarkers in *Phrynops geoffroanus* from distinct hydrographic environments in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil

Ana L. R. Marques^{a*}; Rafael M. Valadão^b; Patrick L. B. Gonsales^b; Ana P. G. Lustosa^b; Marina Marangoni^a; Ademair F. F. Meznerovvich^a; Paulo H. Braz^c

^a Post-graduation Program in Health, Welfare and Sustainable Animal Production in the Fronteira Sul, Federal University of the Fronteira Sul, Paraná, 85770-000, Brazil.

^b Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio), Brazil.

^c Professor of Federal University of the Fronteira Sul, Paraná, 85770-000, Brazil.

***Corresponding author:** Edmundo Gaievski Avenue, 1000, Highway BR 182 - Km 466, PO Box 253, Rural Area, Realeza - PR, 85770-000, Brazil. Email: marquesrana@gmail.com

Telephone: +55 (61) 996098624

Abstract

This study evaluated genotoxicity indicators (micronuclei (MNs) and nuclear abnormalities (NAs)) in populations of *Phrynops geoffroanus* from four distinct environments in the Lower Iguaçu River. A total of 56 animals were collected from the Silva Jardim River (SJ-r), Floriano River (FL-r), and Geninho (GEN-i) and Sol (SOL-i) islands. Mean MN frequency varied among groups, being 0.29 ± 0.63 in SJ-r, 0.38 ± 0.50 in FL-r, 0.25 ± 0.39 in SOL-i, and absent in GEN-i, with no statistically significant differences between sites ($p = 0.32$). NAs were detected in 32 individuals, with a mean frequency of 7.2 per 1,000 cells, also showing no significant variation among environments ($p = 0.81$). These results suggest relative homogeneity among sampled environments, possibly influenced by the filtering role of the Iguaçu National Park, which mitigates contamination originating from adjacent rural properties. Despite low frequencies of indicators of genotoxic damage observed, the presence of nuclear alterations typical of genetic stress reinforces the importance of continuous monitoring of these environments and conservation of protected areas to maintain ecological integrity.

Keywords: erythrocytic, micronuclei, nuclear abnormalities, Iguaçu National Park, freshwater turtles

Introduction

The Iguaçu River is one of the main watercourses in the southern region of Brazil, with a drainage basin of approximately 70,800 km² encompassing the states of Paraná, Santa Catarina, and part of northeastern Argentina. Originating in the municipality of Curitiba, in the state of Paraná (PR), the river stretches for 1,320 km and is traditionally divided into three segments: Upper, Middle, and Lower Iguaçu (Lehun et al. 2021).

The Upper Iguaçu encompasses the stretch between its source and the city of Porto Amazonas, characterized by urbanized areas, the presence of dams, and high anthropogenic impact (Morais et al. 2024; Lehun et al. 2021). The Middle Iguaçu extends to the region of União da Vitória, traversing areas that include remnants of Atlantic Forest and agricultural land use. Finally, the Lower Iguaçu, the terminal section before the confluence with the Paraná River, runs through the vicinity of Iguaçu National Park (INP), an area of significant ecological preservation (Morais et al. 2024).

According to data from MapBiomas Brasil (2024), despite hosting the Iguaçu National Park (INP) as an important conservation unit, the Lower Iguaçu region had only 28.80% forest cover in 2023. In contrast, approximately 67.58% of its hydrographic area is predominantly occupied by agricultural fields and pasture.

Agricultural occupation, pasture establishment, and land use directly influence the contamination of freshwater ecosystems (Singh et al. 2022; Yamamoto et al. 2018). Fertilizers and pesticides are considered the main pollutants derived from these activities (Jadon et al. 2022; Santos and Laranja 2024). These substances often contain chemical compounds such as heavy metals, which are known to be associated with adverse health effects in exposed organisms, promoting physiological imbalances, genetic instability, and impairments in growth and development (Crespo-López et al. 2011; Poletta et al. 2013).

In this context, the use of biomarkers to assess environmental quality and species health status enables the early detection of biological damage caused by such chemical substances or other environmental stressors (Crespo-López et al. 2011; Frossard et al. 2021; Poletta et al. 2013; Silva et al. 2024).

DNA damage assessment has been widely used as a method to quantify cellular events induced by aquatic contaminants (Park and Choi 2007; Silva et al. 2024). Among the main available tests are the quantification of micronuclei (MNs) and other nuclear abnormalities (NAs) in erythrocytes, which are capable of indicating genotoxic and mutagenic effects

(Bonassi and Au 2002; Poletta et al. 2013). These are also simple, minimally invasive methods that do not require animal euthanasia (Poletta et al. 2013).

For the effective application of such biomarkers, it is essential to select sentinel organisms that are representative of the studied environments and responsive to environmental changes. The Geoffroy's Side-necked Turtle [*Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812)] is a freshwater chelonian endemic to South America (Vogt et al. 2023). With generalist habits, it is widely distributed throughout Brazil and inhabits a broad range of habitats (Venancio et al. 2013; Vogt et al. 2023). These traits, combined with its opportunistic diet, long life spans and high site fidelity make the species an ideal for monitoring ambient areas (Zapata et al. 2016; Castaño et al. 2020).

The present study aimed to report genotoxicity indicators in *Phrynops geoffroanus* populations from four distinct hydrographic environments of the Iguaçu River, in order to investigate the environmental impacts to which the species is exposed. The results aim to contribute to the understanding of this chelonian's use as a bioindicator of impacted ecosystem quality and to support conservation and management strategies.

Materials and Methods

Animal capture and biological sampling activities were conducted as part of the Action Plan for the Conservation of Southern Herpetofauna coordinated by the Research and Conservation Center for Reptiles and Amphibians (ICMBio/RAN), and were authorized by the Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO/ICMBio) under permit n°. 91311-2.

Study Area Characterization

Specimens were captured in four distinct hydrographic environments of the Iguaçu River: Geninho Island (25°36'02"S 53°48'48"W), Floriano River (25°32'10"S 53°48'36"W), Silva Jardim River (25°34'56"S 53°54'29"W), and, finally, Sol Island (25°33'30"S 54°04'07"W) (Figure 1).

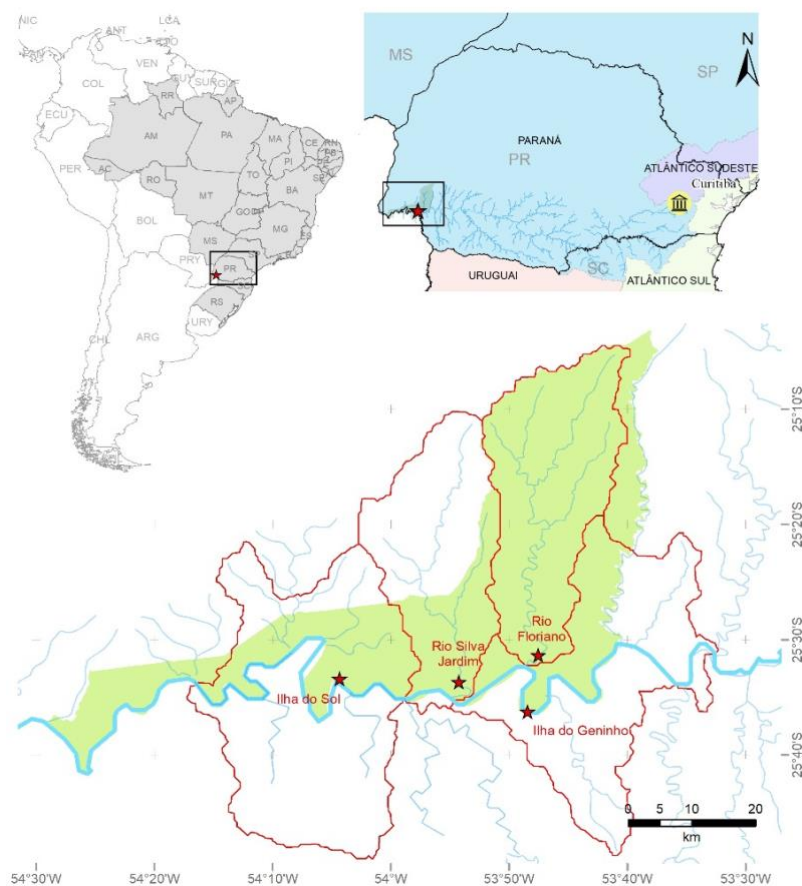
The Floriano and Silva Jardim rivers are tributaries of the Lower Iguaçu located in a critical transition zone between native forest fragments and environmentally impacted areas. The Floriano River (FL-r) sub-basin lies entirely within the strict protected zone of the INP,

favoring its use as a reference or control area for defining conservation and monitoring parameters (Silva et al. 2022).

In contrast, the headwaters and initial stretch of the Silva Jardim River (SJ-r) are located outside the park boundaries, in a region occupied by agricultural and pastoral activities, making it more vulnerable to anthropogenic interference. Consequently, the vegetation cover of the two sub-basins differs significantly: 99.31% in the Floriano River and 45.89% in the Silva Jardim River.

Sol Island (SOL-i) and Geninho Island (GEN-i) are located in the main channel of the Lower Iguaçu River and are directly influenced by tributaries whose banks exhibit contrasting environmental characteristics. The northern bank of the river lies within the boundaries of PNI, the southern bank is characterized by intensive agricultural and industrial use. This geographical configuration exposes the islands to a mixed hydrological regime, combining inputs from relatively pristine waters originating in the protected zone of the PNI with more anthropogenically impacted waters from unprotected surrounding areas.

Figure 1 – Sampling sites where *Phrynops geoffroanus* individuals were captured in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil.



Capture, Biometric Measurements, and Blood Sampling

For animal capture, funnel traps were used in the control area, baited with a mixture of ground beef, bovine liver, pineapple, canned sardines and dry cat food. Each captured individual was individually marked by making unique combinations of notches on the marginal scutes of their carapace, allowing for future identification (Ferner 1979). Subsequently, biometric parameters were recorded, including maximum carapace length (MCL) and width (MCW), maximum plastron length (MPL) and width (MPW) (in centimeters), and body mass (in grams).

Sex determination was based on tail length and the position of the cloaca relative to the carapace, as described by Rueda-Almonacid et al. (2007), (e.g. in Chelidae, males exhibit longer tails than females; Brito et al. 2022). Additionally, external visual alterations were noted, such as the presence of lesions, carapace deformities, and visible ectoparasites. Blood collection was performed by puncture of the dorsal cervical venous sinus, using a 1 mL heparinized disposable syringe fitted with a 30 × 0,8 mm gauge needle. For each animal, two blood smears were prepared immediately after collection using clean microscope slides.

Genotoxic Analyses

Blood smear slides were fixed with absolute methanol for 10 minutes and stained using the May-Grünwald Giemsa method. Subsequently, the slides were analyzed under a light microscope using a 1000× oil immersion objective. For each individual, 3,000 erythrocytes were evaluated to quantify the presence of micronuclei (MNs) and nuclear abnormalities (NAs).

MNs were scored following the criteria proposed by Fenech (2000), whereby only those presenting the following features were considered: (i) a diameter between 1/16 and 1/3 of the mean diameter of the main nucleus; (ii) absence of refractility; (iii) no physical connection or overlap with the main nucleus, with clearly distinguishable boundaries; and (iv) coloration equal to or more intense than that of the main nucleus.

Nuclear abnormalities were classified according to the morphological criteria described by Carrasco et al. (1990) and Strunjak-Perović et al. (2009), encompassing distinct structural alterations. Blebbed nuclei (i) were characterized by small protrusions of the nuclear membrane, ranging from minor bulges to elongated stalk-like structures with rounded ends, fully enclosed by nuclear membrane. Lobulated nuclei (ii) were defined by the presence of larger evaginations compared to blebs, lacking detailed compartmentalization. Vacuolated nuclei (iii) exhibited

well-defined internal voids devoid of visible cytoplasmic or chromatin material. Notched nuclei (iv) were identified by deep, uniform-width indentations that extended into the nuclear area. Binucleated cells (v) displayed two nuclei of similar size, shape, and staining intensity within the same cytoplasm. Additionally, atypical nuclear morphologies were recorded, including kidney-shaped (vi), displaced (vii), round nuclei (viii), and anucleated erythrocytes (ix). All morphological analyses were performed by a single pathologist evaluator with experience in blood smear interpretation ensuring standardization and reliability of the data obtained.

Statistical Analysis and Data Interpretation

Data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) for parametric data or median [interquartile range 25–75] for non-parametric data. For comparison purposes, the assessment of genotoxic potential was performed following the formula proposed by Zapata et al. (2016), expressed as MNs per 1,000 cells: MN frequency = (number of cells containing micronuclei $\times$ 1000) / total number of cells counted. Kruskal-Wallis tests were used to compare MN and NA counts among sampling sites. Spearman's rank correlation tests were applied to assess associations between MN test results and NAs, as well as to examine their relationship with turtle body size. In all cases, a 95% confidence level ($p < 0.05$) was considered statistically significant. Statistical analyses were conducted using RStudio software (version 2025.05.1+513).

Results and Discussion

In total, data and biological samples from 56 individuals of *Phrynops geoffroanus* captured during the monitoring period were analyzed. The data obtained regarding body parameters and general condition of the animals are presented in Table 1. Several individuals exhibited lesions, both acquired and congenital, affecting structures such as the carapace, plastron, and limbs.

Females ($n = 30$) were smaller and lighter than males ($n = 11$), with statistical significance determined at $p < .001$, consistent with findings reported in previous literature for the species (Souza and Abe 2000; Rueda-Almonacid et al. 2007). Others 15 specimens were classified as juveniles or could not be sexed.

Table 1 – Biometric data of *Phrynops Geoffroanus* individuals captured in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil

	Female (n=30)	Male (n=11)	No sexed (n=15)
MCL (cm)	172.12 [153.18 - 213.37]*	246.39 ± .70.56*	118.58 [108.81 - 138.88]*
MCW (cm)	141.80 [132.62 - 175.38]*	186.35 ± 45.64*	100.67 [94.02 - 112.56]*
MPL (cm)	168.54 ± 39.83*	206.25 ± 63.07*	108.59 [99.86 - 115.67]*
MPW (cm)	113.24 [103.64 - 141.15]*	146.51 ± 37.03*	76.13 [70.93 - 84.50]*
BM (g)	540 [389 – 1007.5]*	1468.64 ± 1063.76*	170 [138.75 - 225]*

Note: maximum carapace length (MCL) and width (MCW), maximum plastron length (MPL) and width (MPW) and body mass (BM). Asterisks indicate significance values ($p < 0.001$).

In studies evaluating genotoxicity in reptiles, baseline values of MNs and NAs were considered independent of clutch origin, sex, and body size. This not only demonstrates the suitability of these techniques as accurate biomonitoring tools, but also highlights the feasibility of studies without strict sample stratification (Poletta et al. 2013). Accordingly, and due to differences in sample size among environments, males, females, and unsexed individuals were analyzed together for the genotoxic assessments.

Based on their capture site, individuals were assigned to four groups: Silva Jardim River (SJ-r), Florianio River (FL-r), Geninho Island (GEN-i), and Sol Island (SOL-i). The number of individuals varied across environments. The majority of turtles were captured at tributaries, with 29 individuals in SJ-r and 14 in FL-r. In contrast, fewer animals were recorded in island environments, with 8 individuals in SOL-i and 5 in GEN-i.

Although considered a highly adaptable species, the Geoffroy's side-necked turtle is most commonly found in slow-moving rivers, streams, and lagoons bordered by gallery forests with closed canopy cover (Souza and Abe 2000; Rueda-Almonacid et al. 2007; Müller et al. 2019). Geninho and Sol Islands are located in the main channel of the Lower Iguaçu River, an area characterized by natural rapids and abrupt water level fluctuations influenced by the operation of the Lower Iguaçu Hydroelectric Power Plant (IAT 2016; Lahun et al. 2021). These fluctuations may reduce habitat stability, affecting the availability of basking, refuge, and foraging sites, as well as impairing turtle movement and residency in these areas (Bárcenas-García et al. 2022).

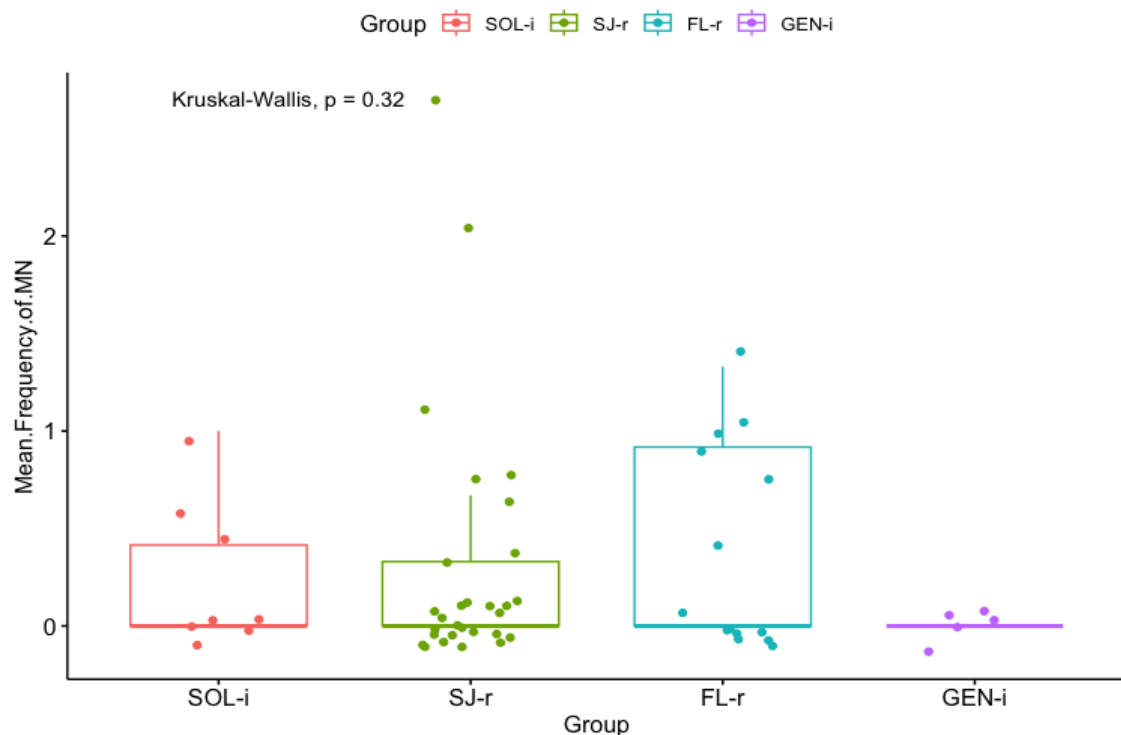
In contrast, tributary rivers such as the Florianio and Silva Jardim exhibit narrower, more sheltered channels with less direct influence from hydroelectric operations and greater riparian vegetation cover, as they are protected within the boundaries of the Iguaçu National Park

(MapBiomass 2024). Thus, the higher density of individuals recorded in these tributaries may reflect not only an ecological preference for physical stability and resource availability, but also possible indirect effects of anthropogenic pressures such as damming and alterations in the flood pulse within the main stretches of the Iguaçu River (Bárceñas-García et al. 2022).

Micronuclei (MNs) were observed in 17 of the 56 individuals analyzed. Among the sampling groups, FL-r showed the highest proportion of individuals with MNs, with 42.8% (6/14) of the animals exhibiting this erythrocytic alteration. In contrast, no MNs were observed in any individuals from the GEN-i group.

The mean MN frequency per 1,000 erythrocytes varied among groups: 0.29 ± 0.63 in SJ-r (range: 0 to 3 MNs/1,000 cells), 0.38 ± 0.50 in FL-r (0 to 1 MN/1,000), 0.25 ± 0.39 in SOL-i (0 to 1 MN/1,000), and complete absence in GEN-i. Despite these numerical differences, no statistically significant difference was detected among groups ($p = 0.32$), which may be attributed to both the low magnitude of values and the high intraindividual variability, as well as the relatively small sample size in the island groups (Figure 2).

Figure 2 – Comparison of mean frequencies of micronucleus (MNs) among groups of *Phrynos geoffroanus* from different hydrographic environments of the Lower Iguaçu River



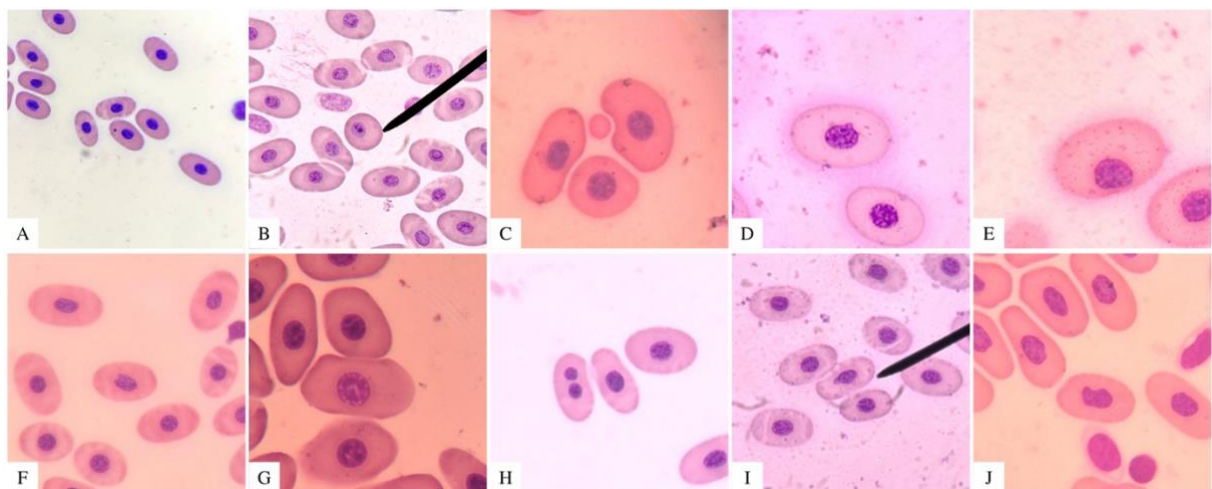
Note: Groups correspond to sampling sites: Silva Jardim River (SJ-r), Floriano River (FL-r), Geninho Island (GEN-i), and Sol Island (SOL-i).

Analysis of morphometric parameters showed no significant correlation with MN frequency, including carapace length, carapace width, and body mass ($p > 0.3$ for all comparisons). These findings are consistent with previous studies that found no direct relationship between the physical size of chelonians and the occurrence of genetic damage (Zapata et al. 2016).

Micronuclei are considered markers of the final stage of DNA damage, arising during cell division as a consequence of chromosome breakage or the loss of fragments that are not incorporated into the main nucleus (Fenech 2000; Silva et al. 2024). Other studies on genotoxic damage have reported baseline mean frequencies of 0.78 ± 0.58 in *Trachemys callirostris*, 3.56 ± 1.39 , in *Phrynops hilarii*, and 1.2 in *Trachemys dorbigni* (Latorre et al. 2015; Zapata et al. 2016). MN frequencies below 3 per 1,000 cells have been described as expected in wild, healthy reptile populations (Borges et al. 2022; Castaño et al. 2020; Poletta et al. 2013). Therefore, the low frequency observed in the animals of this study may reflect a basal condition, compatible with the normal functioning of cellular repair mechanisms.

Regarding nuclear abnormalities (NAs), all previously described categories were observed, including vacuolated, anucleated, and binucleated erythrocytes, as well as blebbed, round, kidney-shaped, notched, lobed, and displaced nuclei (Figure 3). Among the 56 individuals analyzed, 32 exhibited at least one of these alterations, with a total mean frequency of 7.2%.

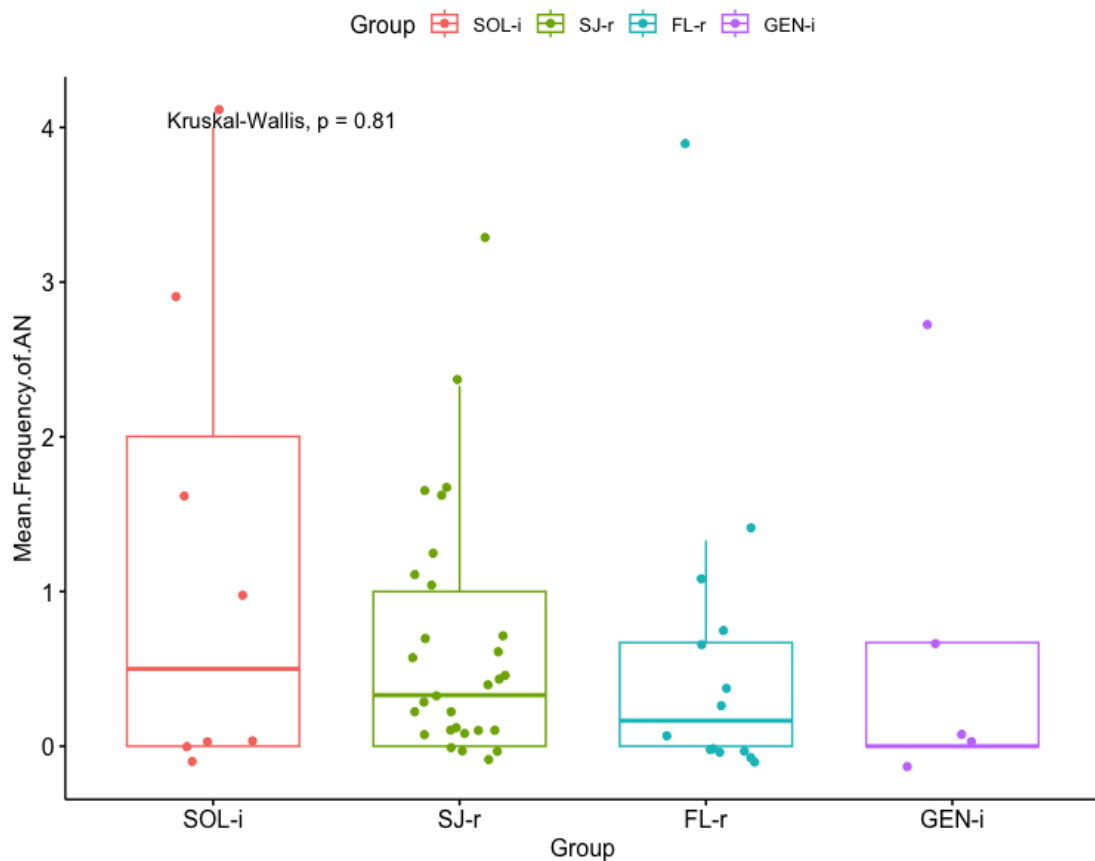
Figure 3 – Photomicrographs of genotoxic indicators observed in erythrocytes of *Phrynops geoffroanus* captured in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil



Note: (A) Micronucleus; (B–J) Nuclear Abnormalities, including (B) round nucleus, (C) anucleated cell, (D) blebbed nucleus, (E) displaced nucleus, (F) notched nucleus, (G) vacuolated nucleus, (H) binucleated erythrocytes, (I) lobed nucleus, and (J) kidney-shaped nucleus. Staining: May-Grünwald-Giemsa; Objective: 100× with immersion oil.

Mean frequencies of NAs showed slight variation among groups: 0.65 ± 0.82 in SJ-r (range: 0 to 3 NAs/1,000 cells), 0.59 ± 1.07 in FL-r (0 to 4 NAs/1,000), 1.21 ± 1.56 in SOL-i (0 to 4 NAs/1,000), and 0.67 ± 1.16 in GEN-i (0 to 3 NAs/1,000). Although statistical analysis did not reveal significant differences among environments ($p = 0.81$), the presence of these alterations is biologically relevant, as they are associated with disturbances in the early stages of cell division, particularly in DNA replication and chromosomal segregation processes (Poletta et al. 2013; Mitkovska and Chassovnikarova 2020).

Figure 4 – Comparison of mean frequencies of nuclear abnormalities (NAs) among groups of *Phrynosops geoffroanus* from different hydrographic environments of the Lower Iguaçu River.



Note: Groups correspond to sampling sites: Silva Jardim River (SJ-r), Floriano River (FL-r), Geninho Island (GEN-i), and Sol Island (SOL-i).

Among the identified abnormalities, *blebbed* nuclei were by far the most frequent type, with a mean of 0.26 ± 0.44 per 1,000 cells, observed in 39.29% of the individuals. This finding corroborates the results of Silva et al. (2024), who also reported a predominance of this

alteration in *Trachemys dorbigni* collected from environments with anthropogenic disturbance. This nuclear alteration is considered an early indicator of genomic instability and has been associated with environmental exposure to xenobiotics, particularly pesticides and heavy metals (Mitkovska and Chassovnikarova 2020; Borges et al. 2022).

The correlation test revealed a positive association between micronucleus and NA counts ($p = 0.001$; $\rho = 0.430$). The correlation between these biomarkers has been reported in other studies involving reptiles and fish exposed to persistent organic pollutants, heavy metals, and urban waste (Corredor-Santamaría et al. 2016; Silva et al. 2024), reinforcing their utility as complementary tools in ecotoxicological biomonitoring programs.

The absence of significant differences in genotoxic biomarkers among the evaluated environments may be related to the role of the Iguaçu National Park (INP) as an “ecological filter,” since all four sampling sites are located within or adjacent to the park boundaries (Silva et al. 2022). The results suggest that natural protective mechanisms provided by remnants of native vegetation, combined with the park's status as a conservation unit, may help mitigate the influx of diffuse pollutants from surrounding areas, particularly those originating from nearby rural properties (Duan et al. 2021; Wang et al. 2024).

However, the influence of agricultural activities near the boundaries of the INP should not be underestimated. Adjacent farms, often associated with intensive use of fertilizers and pesticides, may represent a constant source of contaminants entering the tributaries and, consequently, the main channel of the Iguaçu River through processes such as leaching and surface runoff, especially during periods of heavy rainfall (Lehun et al. 2021; Wang et al. 2024).

Furthermore, in both the MN and AN evaluations, numerous outliers were observed (Figure 4). Although such values may reflect genuine biological variation, their high frequency in this study suggests a notable limitation related to sample size, which compromises representativeness and restricts the power of statistical analyses. Additionally, the low sampling density, particularly in the island areas, may have obscured ecologically relevant patterns and hindered the detection of significant differences among groups.

Phrynops geoffroanus, a freshwater turtle species widely distributed in South America, exhibits generalist habits and an opportunistic omnivorous diet, feeding on invertebrates, fish, fruits, and even carrion (Ribeiro et al. 2017). While this ecological plasticity favors adaptation to a variety of habitats, it also increases the species' susceptibility to contaminant bioaccumulation in aquatic ecosystems, whether through ingestion, dermal contact, or respiration (Venancio et al. 2013). Although the species is not currently classified as threatened and shows some resilience to environmental disturbances, the results obtained in this study may

serve as a baseline for future long-term monitoring efforts. These data are also relevant for guiding conservation unit management strategies, providing evidence regarding the ecological tolerance limits of the species in the face of chronic contaminant exposure.

Conclusion

This study highlights the usefulness of *Phrynops geoffroanus* as a bioindicator of environmental quality in aquatic habitats of the Lower Iguaçu River. The low frequency of genotoxic biomarkers and the absence of significant differences among groups suggest that Iguaçu National Park may function as a barrier to environmental contamination. Conversely, this pattern may also reflect, and reinforce, the idea that this species is well adapted to anthropogenically altered environments. These findings underscore the importance of maintaining and monitoring protected areas, particularly those bordering agricultural landscapes. Future research involving broader sampling efforts and interregional and interspecific comparisons is recommended to enhance understanding of the environmental impacts on freshwater turtle populations, reduce potential biases related to species adaptability, and inform effective conservation strategies.

Acknowledgments

The present work was carried out with the support of the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil.

References

- Bárcenas-García A, Michalski F, Morgan WH, et al (2022) Impacts of Dams on Freshwater Turtles: A Global Review to Identify Conservation Solutions. *Trop Conserv Sci* 15:1–21. <https://doi.org/10.1177/19400829221103709>
- Bonassi S, Au WW (2002) Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat Res Mutat Res* 511:73–86. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00003-0)
- Borges AO, Erickson J, Silva LD, et al (2022) Mercury bioaccumulation, genotoxic and biochemical biomarkers reveal the health status of yellow-spotted Amazon River turtles

- (*Podocnemis unifilis*) in an environmental protection area in the Amazon. *Acta Amaz* 52:254–263. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202201230>
- Brito ES, Vogt RC, Ferraz RHS, et al (2022) Sexual dimorphism and morphometrics in two populations of the Neotropical freshwater turtle *Mesoclemmys vanderhaegei* (Testudines, Chelidae). *Iheringia. Série Zoologia*, 112:e2022004. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2022004>
- Carrasco KR, Tilbury KL, Myers MS (1990) Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. *Can J Fish Aquat Sci* 47:2123–2136. <https://doi.org/10.1139/f90-237>
- Castaño GV, Cabagna Zenklusen M, Prieto Y, Manzano AS (2020) Analysis of genotoxicity in erithrocytes of turtles (*Phrynops hilarii*) from anthropized and natural sites of entre ríos, argentina. *J Basic Appl Genet* 31:15–22. <https://doi.org/10.35407/bag.2020.31.01.02>
- Corredor-Santamaría W, Serrano Gómez M, Velasco-Santamaría YM (2016) Using genotoxic and haematological biomarkers as an evidence of environmental contamination in the Ocoa River native fish, Villavicencio—Meta, Colombia. *Springerplus* 5:351. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1753-0>
- Crespo-López ME, Macêdo GL, Arrifano GPF, et al (2011) Genotoxicity of mercury: Contributing for the analysis of Amazonian populations. *Environ Int* 37:136–141. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.08.009>
- Duan Y, Tang J, Li Z, et al (2021) Vegetated Buffer Zone Restoration Planning in Small Urban Watersheds. *Water* 13:3000. <https://doi.org/10.3390/w13213000>
- Fenech M (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 455:81–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- Ferner JW (1979) A review of working techniques for reptiles and amphibians. *SSAR Herpetological Circulars* 1979:9-41.
- Frossard A, Coppo GC, Lourenço AT, et al (2021) Metal bioaccumulation and its genotoxic effects on eggs and hatchlings of giant Amazon river turtle (*Podocnemis expansa*).

- Ecotoxicology 30:643–657. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02384-8>
- Jadon N, Sharma HK, Guruaribam N, Chauhan AKS (2022) Recent scenario of agricultural contaminants on water resources. Elsevier, pp 225–246
- Latorre MA, González ECL, Siroski PA, Poletta GL (2015) Basal frequency of micronuclei and hematological parameters in the Side-necked Turtle, *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835). *Acta Herpetol* 10:31–37. https://doi.org/10.13128/Acta_Herpetol-14988
- Lehun AL, Mendes AB, Takemoto RM, Bueno Krawczyk AC de D (2021) Genotoxic effects of urban pollution in the Iguaçu River on two fish populations. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng* 56:984–991. <https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1956229>
- Mapbiomas Project (2024) Collection 9 of the Annual Land Cover and Land Use Maps of Brazil (1985–2023). MapBiomass Data 1. DOI: 10.58053/MapBiomass/XXUKA8
- Mitkovska V, Chassovnikarova T (2020) Chlorpyrifos levels within permitted limits induce nuclear abnormalities and DNA damage in the erythrocytes of the common carp. *Environ Sci Pollut Res* 27:7166–7176. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07408-9>
- Morais TP, Barreto LS, Souza TL, et al (2024) Assessing the pollution and ecotoxicological status of the Iguaçu River, southern Brazil: A review. *Integr Environ Assess Manag* 20:1280–1305. <https://doi.org/10.1002/ieam.4865>
- Park SY, Choi J (2007) Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environ Int* 33:817–822. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.03.014>
- Pinheiro Müller MM, Ortega Z, Castro Antunes P, et al (2019) The home range of adult *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae) in relation to sex and body mass. *Herpetozoa* 32:259–265. <https://doi.org/10.3897/herpetozoa.32.e38237>
- Poletta GL, Siroski PA, Amavet PS, et al (2013) Reptiles as animal models: Examples of their utility in genetics, immunology and toxicology. In: Lutterschmidt WI (ed) *Reptiles in Research: Investigations of Ecology, Physiology and Behavior from Desert to Sea*, UK ed. Nova Science Pub Inc, pp 1–39

- Ribeiro LE de S, Utta AC da S, Barreto L (2017) Diet of phrynops geoffroanus (Schweigger 1812) (Chelidae) in an environmental protection area in the Amazon region of Maranhão state, Brazil. *Herpetol Conserv Biol* 12:556–564
- Rueda-Almonacid JV, Carr JL, Mittermeier RA, et al (2007) Las tortugas y los crocodilianos de los países andinos del trópico. Panamericana, Formas e Impresos, S. A., Colombia
- Santos MJ de J, Laranja RE de P (2024) Influence of agriculture on surface water quality in three lentic environments in a conservation unit of Brazil. *Int J Environ Sci Technol* 21:4295–4306. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-05296-8>
- Silva DT, Guedes T de A, França RT, et al (2024) Hematological and genotoxic biomarkers in a natural population of freshwater turtles *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) living in an urban area in Southern Brazil. *Environ Sci Pollut Res* 31:37215–37228. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33515-3>
- Silva JFM, Obeso MP, Makrakis MC, Makrakis S (2022) Environmental analysis of land use and occupation in nine watersheds contributing to the Iguaçu River, Brazil. *Res Soc Dev* 11:e66111334868. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i13.34868>
- Singh N, Poonia T, Siwal SS, et al (2022) Challenges of water contamination in urban areas. Elsevier, pp 173–202
- Souza FL, Abe AS (2000) Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting a polluted urban river in south-eastern Brazil. *J Zool* 252:437–446. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2000.tb01226.x>
- Strunjak-Perovic I, Coz-Rakovac R, Popovic N, Jadan M (2009) Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. *Fish Physiol Biochem* 35:287–291. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9208-3>
- Venancio LPR, Silva MIA, da Silva TL, et al (2013) Pollution-induced metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles. *Ecotoxicol Environ Saf* 97:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.035>
- Vogt R, Bataus YSL, Rodrigues J, et al (2023) *Phrynops geoffroanus*. Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade - SALVE. Instituto Chico Mendes de

Conservação da Biodiversidade – ICMBio. doi.org/10.37002/salve.ficha.20831

Wang D, Gao X, Wu S, et al (2024) A Comprehensive Review on Ecological Buffer Zone for Pollutants Removal. *Water* 16:2172. <https://doi.org/10.3390/w16152172>

Yamamoto FY, Diamante GD, Santana MS, et al (2018) Alterations of cytochrome P450 and the occurrence of persistent organic pollutants in tilapia caged in the reservoirs of the Iguaçu River. *Environ Pollut* 240:670–682. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.019>

Zapata LM, Bock BC, Orozco LY, Palacio JA (2016) Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotoxicol Environ Saf* 127:108–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.016>

Statements and Declarations

Funding: This work was supported by Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

Competing Interests: The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Author Contributions: All authors contributed to the study conception and design. Material preparation and data collection were performed by Rafael Martins Valadão and Patrick Luiz Bola Gonsales. Laboratorial and statistical analysis were performed by Ana Letícia Rodrigues Marques, Paulo Henrique Braz, Marina Marangoni and Ademar Francisco Fagundes Mezneroviscz. The first draft of the manuscript was written by Ana Letícia Rodrigues Marques and all authors commented on previous versions of the manuscript. Paulo Henrique Braz and Rafael Valadão were responsible for the coordination and supervision of the study. All authors read and approved the final manuscript.

7 ARTIGO II

Occurrence and parasitemia of hemogregarines in *Phrynops geoffroanus* from the Iguaçu River, Paraná, Brazil

Ana L. R. Marques^{a*}; Rafael M. Valadão^b; Patrick L. B. Gonsales^b; Ana P. G. Lustosa^b; Marina Marangoni^a; Ademair F. F. Meznerovvich^a; Paulo H. Braz^c

^a Post-graduation Program in Health, Welfare and Sustainable Animal Production in the Fronteira Sul, Federal University of the Fronteira Sul, Paraná, 85770-000, Brazil.

^b Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio), Brazil.

^c Professor of Federal University of the Fronteira Sul, Paraná, 85770-000, Brazil.

***Corresponding author:** Edmundo Gaievski Avenue, 1000, Highway BR 182 - Km 466, PO Box 253, Rural Area, Realeza - PR, 85770-000, Brazil. Email: marquesrana@gmail.com

Telephone: +55 (61) 996098624

Abstract

This study aimed to investigate the occurrence and parasitemia of hemogregarines in *Phrynops geoffroanus* individuals collected from hydrographic environments, as well as to evaluate the association between infection, host biometric parameters, and leech infestation. 58 individuals were captured across two islands and two tributaries of the Iguaçu River, and 3,000 erythrocytes per animal were analyzed on blood smears. A high infection occurrence was observed (82.76%), but the mean parasitemia was low (0.33%). No differences in infection rates were found among sampling sites ($\chi^2 = 4.89$; $p = 0.18$). A positive correlation was found between hemogregarine infection and host body size ($r_s = 0.632$; $p < 0.001$), suggesting that larger or older individuals are more likely to be infected. Leech infestation was recorded in 20.69% of the turtles, with similar frequencies among the sampled environments. The presence of leeches was positively correlated with both host body size ($r_s = 0.512$; $p < 0.001$) and hemogregarine infection ($r_s = 0.267$; $p = 0.043$), reinforcing the role of leeches as biological vectors. The detection of leeches within a protected area such as PNI suggests low levels of agrochemicals that are toxic to these vectors, such as atrazine, highlighting the park's buffering role against anthropogenic pressures. These findings underscore the importance of eco-epidemiological surveillance of hemoparasites in aquatic reptiles and support the use of *P. geoffroanus* as a bioindicator of environmental health in transitional zones between protected areas and agricultural landscapes.

Keywords: eco-epidemiology; freshwater turtle; leech; Iguaçu National Park

Statements and Declarations

Funding: This work was supported by Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

Competing Interests: The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

1 Introduction

2
3 Hemogregarines are intracellular blood parasites of the filo Apicomplexa, widely
4 distributed among various ectothermic vertebrates such as fish, amphibians, and reptiles
5 (Telford 2009; Nardini et al. 2013). These hemoparasites exhibit a heteroxenous life cycle that
6 involves biological vectors for maturation, reproduction, and transmission to the vertebrate host
7 (Nardini et al. 2013; O'Donoghue 2017).

8 In chelonians, hemogregarine infections have been reported at varying frequencies,
9 influenced by factors such as age, body size, seasonality, vector presence in the environment,
10 and the characteristics of aquatic habitat (Brites and Rantin 2004; Picelli et al. 2015; Oliveira
11 et al. 2018; Úngari et al. 2018).

12 Although hemogregarines are considered to have low pathogenicity, studies suggest that
13 intense or chronic infections may result in important subclinical effects, including
14 hematological, biochemical and reproductive alterations, particularly in individuals exposed to
15 environmental stressors (Nardini et al. 2013; O'Donoghue 2017).

16 Therefore, their occurrence in natural freshwater populations can provide valuable
17 insights into host–environment interactions, as well as the factors that influence population
18 health, ecological balance, and parasite dynamics (Brites and Rantin 2004; McCoy et al. 2007;
19 Cortelezzi et al. 2018).

20 The Geoffroy's side-necked turtle [*Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812)] is a
21 freshwater species widely distributed across rivers and streams in South America. It is an
22 opportunistic carnivore, relatively tolerant to impacted environments, and commonly found in
23 urban areas (Souza & Abe, 2000). However, this tolerance does not exempt it from experiencing
24 sublethal effects caused by pollutants (Venancio et al. 2013; Vogt et al. 2023).

Iguaçu National Park (PNI), one of the largest remaining tracts of Atlantic Forest in southern Brazil, is a priority area for the conservation and monitoring of wildlife and environmental health (Lehun et al. 2021). However, its borders and surrounding areas are subject to intense agricultural activity, making it vulnerable to water contamination, habitat loss, and exposure to agrochemicals that may directly or indirectly affect aquatic biodiversity (Morais et al. 2024).

This study aimed to describe the occurrence and parasitemia of hemogregarines in free-ranging *P. geoffroanus* individuals captured in different hydrographic environments within PNI, as well as to assess the associations between infection, host biometric parameters, and leech infestation. The findings can contribute to a better understanding of parasite ecology in freshwater turtles, parasitological patterns, and their potential implications for wildlife health.

Materials and Methods

Study Area and Animal Sampling

The study was conducted between March and April 2025 in areas of the Iguaçu National Park (PNI), located in southwestern Paraná, Brazil. The park harbors one of the most important remnants of Atlantic Forest and represents a transitional zone between preserved environments and regions subjected to intensive agricultural and livestock activities.

Sampling was organized into four sites: two islands located in the main channel of the Iguaçu River, Ilha do Sol (SOL-i) and Ilha do Geninho (GEN-i); and two of its tributaries, the Silva Jardim River (SJ-r) and the Floriano River (FL-r). The FL-r is located entirely within the boundaries of the PNI, in a strictly protected area composed of preserved native vegetation (Silva et al. 2022). In contrast, the headwaters and upper section of the SJ-r are situated outside the park, in a region occupied by agricultural and pastoral activities, making it more vulnerable

to contamination and anthropogenic disturbance. SOL-i and GEN-i are located in the main channel of the Lower Iguaçu River and represents a mixed hydrological regime.

Turtles were captured using funnel traps placed along the banks and shallow zones of the water bodies. The bait consisted of a mixture of ground beef, bovine liver, pineapple, canned sardines and dry cat food. Each captured individuals was individually marked by making unique combinations of notches on the marginal scutes of their carapace, allowing for future identification (Ferner 1979). Biometric measurements were then taken, including maximum carapace length and width (in centimeters) and body mass (in grams). Sex was determined based on tail length and the position of the cloaca, as described by Rueda-Almonacid et al. (2007). Additionally, each turtle was visually inspected for the presence of external ectoparasites, such as leeches, and both the number of parasites and their attachment sites on the host were recorded.

Blood Collection and Sample Preparation

Blood samples were collected by venipuncture of the dorsal cervical sinus using sterile heparinized syringes (1 mL) fitted with 30 × 0,8 mm gauge needles. Blood smears were prepared immediately after collection on clean, air-dried glass slides. The slides were fixed in absolute methanol for 10 minutes and stained using the May-Grünwald-Giemsa method. Smears were subsequently examined under a light microscope at 1000× magnification using oil immersion.

Parasitological Assessment

Individuals were considered positive for hemogregarines when intracellular structures consistent with any developmental stage of the parasite were observed. Parasitic intensity was determined based on the number of parasitic forms detected per 3,000 erythrocytes per individual (Godfrey et al. 1987). Occurrence was calculated as the proportion of infected individuals within the sampled population.

Data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test, and homogeneity of variances using Levene’s test. Based on these results, data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) for parametric variables or as median and interquartile range [25–75] for non-parametric data. Differences in infection rate and parasitic intensity among sampling sites were analyzed using the Kruskal–Wallis test, according to statistical assumptions. For categorical variables, such as the presence of hemogregarines or leeches, Pearson’s chi-square test was applied. Correlations between parasitic infection and biometric parameters or leech burden were assessed using Spearman’s rank correlation test. All statistical analyses were performed in R (R Core Team, 2023), using the packages tidyverse, vegan, car, and ggpubr. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results and discussion

This is the first report of hemogregarine occurrence and parasitemia in free-ranging *Phrynops geoffroanus* within the Iguaçu National Park (PNI). In total, data and biological samples from 58 individuals captured during the monitoring period were analyzed. Information on body parameters and general condition is presented in Table 1. Females (n=31) were significantly smaller and lighter than males (n = 12), with statistical significance at $p < .001$,

consistent with previous findings for the species (Souza and Abe 2001; Rueda-Almonacid et al. 2007). An additional 15 individuals were classified as juveniles or could not be sexed.

Table 1 – Biometric data of *Phrynops geoffroanus* individuals captured in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil.

	Female (n=31)	Male (n=12)	No sexed (n=15)
MCL (cm)	171.44 [153.15 - 206.20]	249.53 ± 68.15	118.58 [108.81 - 138.88]
MCW (cm)	141.47 [132.63 - 174.98]	189.75 ± 45.09	100.67 [94.02 - 112.56]
MPL (cm)	168.14 ± 39.28	209.84 ± 61.40	108.59 [99.86 - 115.67]
MPW (cm)	112.88 [103.76 - 140.05]	147.89 ± 35.63	76.13 [70.93 - 84.50]
BM (g)	530 [393 - 1005]	1502.08 ± 1020.85	170 [138.75 - 225]

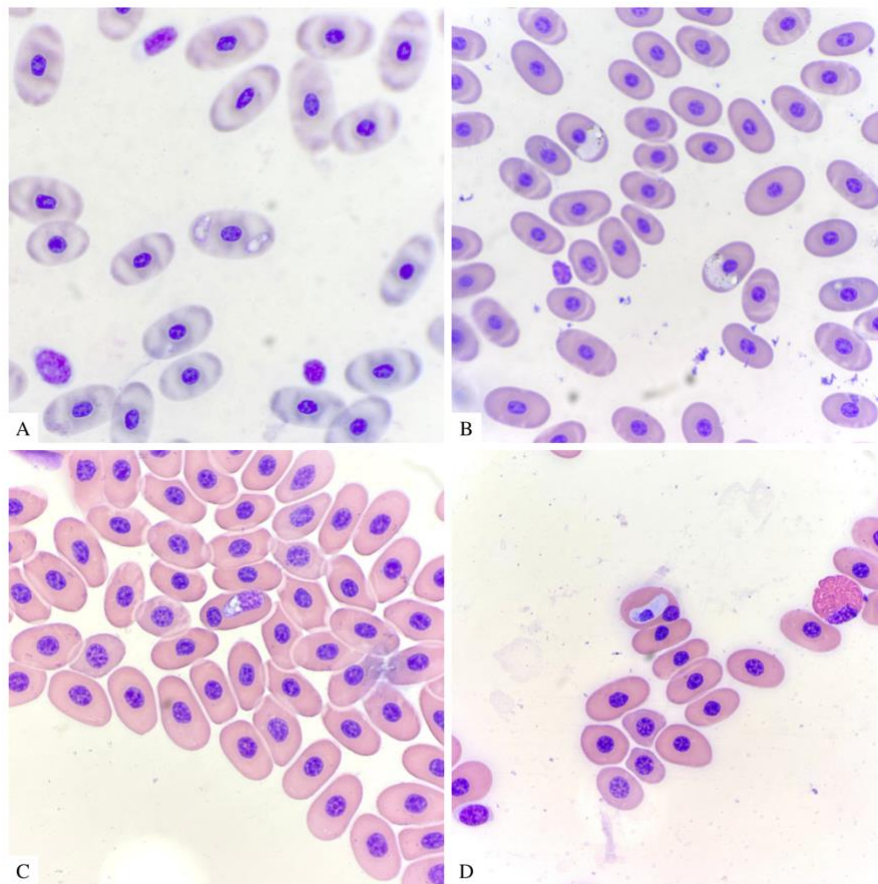
Note: maximum carapace length (MCL) and width (MCW), maximum plastron length (MPL) and width (MPW) and body mass (BM).

A hemogregarine infection occurrence among the individuals examined was 82.76% (48/58). This finding reveals a high infection rate, whereas other studies have reported occurrences below 30% or even a complete absence of infection in *P. geoffroanus* populations (Brites and Rantin 2004; Oliveira et al. 2018). In contrast, the mean parasitemia intensity among infected turtles was 0.33% per animal. This represents one of the lowest levels of parasitic intensity recorded in freshwater turtles from natural environments in Brazil (Picelli et al. 2015; Oliveira et al. 2018). Nonetheless, values below 0.34% have been reported for three freshwater turtle species in Costa Rica (Central America) (Rossow et al. 2013).

Different blood stages of *Haemogregarina* sp. were observed within erythrocytes; however, none were found in leukocytes (Figure 1). Trophozoites were small, lacked a visible nucleus, and exhibited an eccentric cytoplasmic vacuole without displacing the host cell

nucleus. Pre-meronts appeared larger, with dispersed chromatin in the parasite's cytoplasm and variable vacuolation. Immature gamonts were curved, contained parasitophorous vacuoles, and had diffuse chromatin. Mature gamonts caused noticeable erythrocyte deformation and nuclear displacement (Goes et al. 2018; Úngari et al. 2018).

Figure 1 – Photomicrographs of blood stages of *Haemogregarina* sp. observed in erythrocytes of *Phrynosoma geoffroanus* captured in the Lower Iguaçu River, Paraná, Brazil.



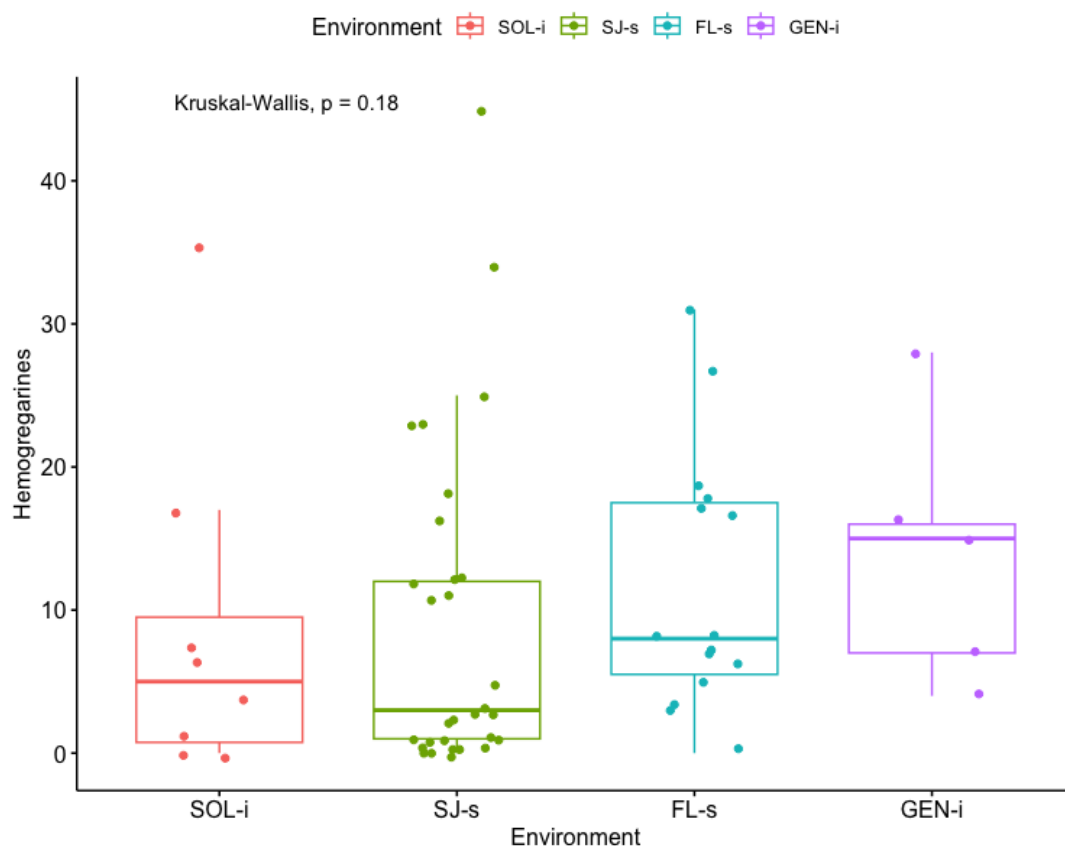
Note: (A) trophozoites; (B) meronts; (C) vacuolated gamonts; and (D) mature gamonts. Staining: May-Grünwald-Giemsa; Objective: 100× with immersion oil.

Most clinical studies have also been limited to the morphological stages of the intraerythrocytic life cycle, as these are easily detected in peripheral blood smears (O'Donoghue, 2017). Given the wide range of described species, there is considerable

inconsistency in the literature regarding the morphological identification of infective forms, which underscores the need for molecular techniques to diagnose the different species (Dvořáková et al., 2015; Rakhshandehroo, Sharifiyazdi & Ahmadi, 2016).

Among the sampling sites, infection was most prevalent in the GEN-i (100%; 5/5) and FL-r (93.33%; 14/15) groups, while SJ-r and SOL-i showed lower rates of 76.67% and 75%, respectively (Figure 2). Despite the variation in percentages, no statistically significant differences were found between groups ($\chi^2 = 4.89$; $df = 3$; $p = 0.18$).

Figure 2 – Comparison of infected animals with hemogregarine among groups of *Phrynos geoffroanus* from different hydrographic environments of the Lower Iguaçu River.



Note: Groups correspond to sampling sites: Silva Jardim River (SJ-r), Floriano River (FL-r), Geninho Island (GEN-i), and Sol Island (SOL-i).

A strong positive correlation was observed between hemogregarine infection and biometric parameters ($r_s = 0.632$; $p < 0.001$), suggesting that larger or older individuals are more likely to be infected. This pattern has also been described in other turtle species, such as *Podocnemis unifilis*, *Podocnemis expansa* and *Mesoclemmys vanderhaegei*, where age and body size were associated with increased parasite loads (Picelli et al. 2015; Goes et al. 2018; Úngari et al. 2023).

Additionally, a strong correlation was found between leech infestation and body size ($r_s = 0.512$; $p < .001$), indicating that larger individuals are more frequently parasitized by these vectors. Thus, in environments where leeches are present, hemogregarine infections may occur continuously, maintaining persistent parasitemia levels (Siddall and Desser 2001; McCoy et al. 2007; Picelli et al. 2015).

Leech infestation was recorded in only 20.69% (12/58) of the individuals, with similar frequencies across environments: FL-r (20%), GEN-i (20%), SOL-i (23.33%), and SJ-r (12.5%). The sampling period encompassed the beginning and end of the summer season; thus, the low infestation rates are likely related to the reproductive behavior of the turtles. During this time, individuals spend more time in terrestrial environments, which reduces both their exposure to and the presence of these aquatic ectoparasites (Koffler et al. 1978; Brites and Rantin 2004; McCoy et al. 2007).

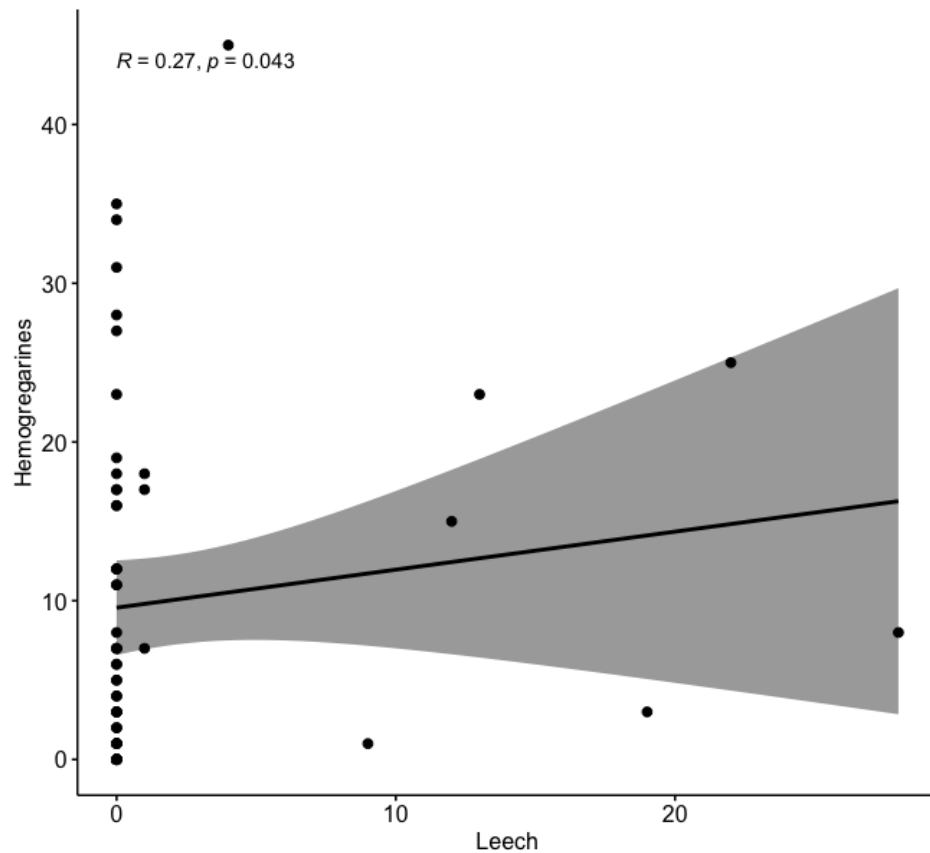
The most commonly parasitized regions were the pelvic and thoracic limb cavities, consistent with findings reported by Brites and Rantin (2004). These areas provide greater attachment opportunities for leeches and offer protection from external factors, such as abrasion, water flow, and desiccation during basking periods (Brites and Rantin 2004). The same authors reported the absence of leech attachment in the cervical region of the species, attributed to the neck-retraction mechanism (Pleurodira) and the thick skin in that area.

However, in the present study, leeches were observed on the cervical region of four individuals. No infestations were recorded on the carapace, oral cavity, or cloaca.

Brites and Rantin (2004) demonstrated a relationship between leech presence and high parasitemia rates in *P. geoffroanus* specimens collected from urban environments. The authors suggested that this association was related to higher levels of organic pollutants, particularly organochlorine compounds, which promote the proliferation of these ectoparasites. In contrast, in rural areas with high levels of atrazine-based pesticide residues, the absence of leeches was attributed to the herbicide's toxicity, which negatively affects their survival (Brites and Rantin 2004; Cortelezzi et al. 2018). Similarly, studies that reported an absence of hemogregarine infection in *P. expansa* and *P. geoffroanus* have linked this to the absence of leech infestation in the individuals or their surrounding environment (Picelli et al. 2015; Oliveira et al. 2018).

In the present study, leech presence was positively associated with hemogregarine infection ($r_s = 0.267$; $p = 0.043$), supporting the hypothesis that these ectoparasites act as vectors (Figure 3) (Siddall and Dessler 2001; Telford 2009). The observed data dispersion, marked by a high frequency of individuals without visible leech infestation yet presenting hemogregarine infection, supports the hypothesis of seasonal variation in ectoparasite occurrence (Koffler et al. 1978; Brites and Rantin 2004; McCoy et al. 2007). This pattern suggests that individuals exhibiting high parasitemia levels were likely exposed to leeches prior to the sampling period.

Figure 3 – Correlation graph of infected animals with hemogregarine and leech from hydrographic environments of the Lower Iguaçu River



Conclusion

This study reports a high occurrence of hemogregarine infection in free-ranging *Phrynops geoffroanus* from Iguaçu National Park (PNI), coupled with low parasitemia intensity. Infection was positively correlated with body size and leech infestation, reinforcing the role of these ectoparasites as vectors and suggests that PNI maintains ecological conditions to their persistence. The study absence of molecular techniques for hemogregarine identification at the genus and species levels, which restricted the taxonomic resolution of the parasites observed.

In addition, the sampling was carried out exclusively in protected environments, which, although located in sub-basins subjected to different degrees of anthropogenic influence, did

not include highly degraded areas. These factors may limit broader ecological inferences; however, they do not diminish the relevance of the findings, which provide novel insights into host-parasite interactions in chelonians from a region of high conservation value. These findings highlight the importance of continued investigation into the ecological role of vectors, as well as the potential chronic pathophysiological effects of hemoparasites in wild turtle populations.

References

- Brites, V. L. de C., & Rantin, F. T. (2004). The Influence of Agricultural and Urban Contamination on Leech Infestation of Freshwater Turtles, *Phrynosoma Geoffroyi*, taken from Two Areas of the Uberabinha River. *Environmental Monitoring and Assessment*, 96(1–3), 273–281. <https://doi.org/10.1023/B:EMAS.0000031733.98410.3c>
- Cortezzi, A., Gullo, B. S., Simoy, M. V., Cepeda, R. E., Marinelli, C. B., Rodrigues Capítulo, A., & Berkunsky, I. (2018). Assessing the sensitivity of leeches as indicators of water quality. *Science of the Total Environment*, 624, 1244–1249. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.236>
- Ferner JW (1979) A review of working techniques for reptiles and amphibians. SSAR Herpetological Circulars 1979:9-41.
- Godfrey, R., Fedynich, A., & Pence, D. (1987). Quantification Smears. *Journal of Wildlife*, 23(4), 558–565.
- Goes, V. C., Brito, E. S., Valadão, R. M., Gutierrez, C. O., Picelli, A. M., & Viana, L. A. (2018). Haemogregarine (Apicomplexa: Adeleorina) infection in Vanderhaege's toad-headed turtle, *Mesoclemmys vanderhaegei* (Chelidae), from a Brazilian Neotropical

- savanna region. *Folia Parasitologica*, 65. <https://doi.org/10.14411/FP.2018.012>
- Koffler, B. R., Seigel, R. A., & Mendonca, M. T. (1978). The Seasonal Occurrence of
Leeches on the Wood Turtle, *Clemmys insculpta* (Reptilia, Testudines, Emydidae).
Journal of Herpetology, 12(4), 571. <https://doi.org/10.2307/1563364>
- Lehun AL, Mendes AB, Takemoto RM, Bueno Krawczyk AC de D (2021) Genotoxic effects
of urban pollution in the Iguaçu River on two fish populations. *J Environ Sci Heal - Part
A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng* 56:984–991.
<https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1956229>
- McCoy, J. C., Failey, E. L., Price, S. J., & Dorcas, M. E. (2007). An assessment of leech
parasitism on semi-aquatic turtles in the Western Piedmont of North Carolina.
Southeastern Naturalist, 6(2), 191–202. [https://doi.org/10.1656/1528-7092\(2007\)6\[191:AAOLPO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1656/1528-7092(2007)6[191:AAOLPO]2.0.CO;2)
- Morais, T. P., Barreto, L. S., Souza, T. L., Pozzan, R., Vargas, D. Á. R., Yamamoto, F. Y.,
Prodocimo, M. M., Neto, F. F., Randi, M. A. F., & Ribeiro, C. A. de O. (2024).
Assessing the pollution and ecotoxicological status of the Iguaçu River, southern Brazil:
A review. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 20(5), 1280–1305.
<https://doi.org/10.1002/ieam.4865>
- Nardini, G., Leopardi, S., & Bielli, M. (2013). Clinical Hematology in Reptilian Species.
Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice, 16(1), 1–30.
<https://doi.org/10.1016/j.cvex.2012.09.001>
- O'Donoghue, P. (2017). Haemoprotozoa: Making biological sense of molecular phylogenies.
International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 6(3), 241–256.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.08.007>

- 253 Oliveira, J. P. de, André, M. R., Alves Júnior, J. R. F., Lustosa, A. P. G., & Werther, K.
 254 (2018). Molecular detection of hemogregarines and haemosporidians in Brazilian free-
 255 living testudines. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7(1),
 256 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.01.008>
- 257 Picelli, A. M., Carvalho, A. V. de, Viana, L. A., & Malvasio, A. (2015). Prevalence and
 258 parasitemia of Haemogregarina sp. in Podocnemis expansa (Testudines:
 259 Podocnemididae) from the Brazilian Amazon. *Revista Brasileira de Parasitologia*
 260 *Veterinária*, 24(2), 191–197. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015033>
- 261 Rossow, J. A., Hernandez, S. M., Sumner, S. M., Altman, B. R., Crider, C. G., Gammage, M.
 262 B., Segal, K. M., & Yabsley, M. J. (2013). Haemogregarine infections of three species of
 263 aquatic freshwater turtles from two sites in Costa Rica. *International Journal for*
 264 *Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2(1), 131–135.
 265 <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.02.003>
- 266 Rueda-Almonacid, J. V., Carr, J. L., Mittermeier, R. A., Rodríguez-Mahecha, J., Mast, R. B.,
 267 Vogt, R. C., Rhodin, A. G. J., de la Ossa -Velásquez, J., Rueda, J., Goettsch Mittermeier,
 268 C., de la Ossa-Velásquez, J., Rueda, N., & Mittelbach, C. G. (2007). Las tortugas y los
 269 crocodilianos de los países andinos del trópico. In R. A. Mittermeier & A. Rylands
 270 (Eds.), *Las tortugas y los cocodrilianos de los países andinos del trópico. Serie de guías*
 271 *tropicales de campo N° 6*. Panamericana, Formas e Impresos, S. A.
 272 [https://www.researchgate.net/publication/261875715_Las_Tortugas_y_los_Cocodriliano](https://www.researchgate.net/publication/261875715_Las_Tortugas_y_los_Cocodrilianos_de_los_Paises_Andinos_del_Tropico)
 273 [s_de_los_Paises_Andinos_del_Tropico](https://www.researchgate.net/publication/261875715_Las_Tortugas_y_los_Cocodrilianos_de_los_Paises_Andinos_del_Tropico)
- 274 Siddall, M. E., & Dessler, S. S. (2001). Transmission of Haemogregarina balli from painted
 275 turtles to snapping turtles through the leech Placobdella ornata. *Journal of Parasitology*,
 276 87(5), 1217–1218. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1217:tohbfp\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[1217:tohbfp]2.0.co;2)

- 277 Silva, J. F. M., Obeso, M. P., Makrakis, M. C., & Makrakis, S. (2022). Environmental
 278 analysis of land use and occupation in nine watersheds contributing to the Iguaçu River,
 279 Brazil. *Research, Society and Development*, 11(13), e66111334868.
 280 <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i13.34868>
- 281 Souza, F. L., & Abe, A. S. (2001). Population Structure and Reproductive Aspects of the
 282 Freshwater Turtle, *Phrynops geoffroanus*, Inhabiting an Urban River in Southeastern
 283 Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 36(1), 57–62.
 284 <https://doi.org/10.1076/snfe.36.1.57.8887>
- 285 Telford, S. R. (2009). *Hemoparasites of the Reptilia : color atlas and text*. CRC Press ; Taylor
 286 & Francis.
- 287 Úngari, L. P., Santos, A. L. Q., da Silva, R. J., & O'Dwyer, L. H. (2023). Hemogregarine
 288 Diversity Infecting Brazilian Turtles with a Description of Six New Species of
 289 Haemogregarina (Apicomplexa: Adeleorina: Haemogregarinidae). *Diversity*, 15(2), 296.
 290 <https://doi.org/10.3390/d15020296>
- 291 Úngari, L. P., Santos, A. L. Q., O'Dwyer, L. H., da Silva, M. R. L., de Melo Fava, N. N.,
 292 Paiva, G. C. M., de Melo Costa Pinto, R., & Cury, M. C. (2018). Haemogregarina
 293 podocnemis sp. nov.: description of a new species of Haemogregarina Danilewsky 1885
 294 (Adeleina: Haemogregarinidae) in free-living and captive yellow-spotted river turtles
 295 Podocnemis unifilis (Testudines: Podocnemididae) from Brazil. *Parasitology Research*,
 296 117(5), 1535–1548. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5817-7>
- 297 Venancio, L. P. R., Silva, M. I. A., da Silva, T. L., Moschetta, V. A. G., de Campos Zuccari,
 298 D. A. P., Almeida, E. A., & Bonini-Domingos, C. R. (2013). Pollution-induced
 299 metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles. *Ecotoxicology and*
 300 *Environmental Safety*, 97, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.03>

301 Vogt R, Bataus YSL, Rodrigues J, et al (2023) *Phrynops Geoffroanus*. Sistema de Avaliação
302 do Risco de Extinção da Biodiversidade - SALVE. Instituto Chico Mendes de
303 Conservação da Biodiversidade – ICMBio. doi.org/10.37002/salve.ficha.20831

304

305

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa destaca a baixa frequência de biomarcadores genotóxicos e ausência de diferenças entre os pontos hidrográficos sugerem que o Parque Nacional do Iguaçu pode atuar como uma barreira à contaminação. Enquanto isso, a alta ocorrência de infecção por hemogregarinas esteve correlacionada com a infestação por sanguessugas, o que demonstra condições ecológicas propícias à persistência do vetor. Por fim, ressalta-se a importância da investigação contínua e do monitoramento de áreas protegidas, particularmente aquelas que fazem fronteira com atividades agrícolas, bem como dos potenciais efeitos sofridos pelas populações silvestres. Pesquisas futuras devem focar em amostragens de longo-tempo a fim de fortalecer a compreensão dos efeitos e para subsidiar estratégias de conservação eficazes.

REFERÊNCIAS

- BAPTISTA, C. J.; SEIXAS, F.; GONZALO-ORDEN, J. M.; OLIVEIRA, P. A. Biomonitoring metals and metalloids in wild mammals: invasive versus non-invasive sampling. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], vol. 29, no. 13, p. 18398–18407, 2022. DOI: 10.1007/s11356-022-18658-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18658-5>.
- BÁRCENAS-GARCÍA, A.; MICHALSKI, F.; MORGAN, W. H.; SMITH, R. K.; SUTHERLAND, W. J.; GIBBS, J. P.; NORRIS, D. Impacts of Dams on Freshwater Turtles: A Global Review to Identify Conservation Solutions. **Tropical Conservation Science**, [s. l.], vol. 15, p. 1–21, 2022. DOI: 10.1177/19400829221103709. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/19400829221103709>.
- BAUMGARTNER, G.; PAVANELLI, C. S.; BAUMGARTNER, D.; BIFI, A. G.; DEBONA, T.; FRANA, V. A. **Peixes do baixo rio Iguaçu**. 1st ed. [s. l.]: EDUEM, vol. 1, 2012. DOI: <https://doi.org/10.7476/9788576285861>. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/sn23w>.
- BONASSI, S.; AU, W. W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, [s. l.], vol. 511, no. 1, p. 73–86, 2002. DOI 10.1016/S1383-5742(02)00003-0. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574202000030>.
- BORGES, Â. O.; ERICKSON, J.; SILVA, L. A. da; FANTINI, C.; DOMINGOS-MOREIRA, F. X. V. Mercury bioaccumulation, genotoxic and biochemical biomarkers reveal the health status of yellow-spotted Amazon River turtles (*Podocnemis unifilis*) in an environmental protection area in the Amazon. **Acta Amazonica**, [s. l.], vol. 52, no. 3, p. 254–263, 2022. DOI: 10.1590/1809-4392202201230. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672022000300254&tlng=en.
- BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. [Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.]. Brasília, DF: CONAMA, 2005. Disponível em: <https://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=2747>.
- BRASIL. Decreto-lei nº 1.035, de 10 de janeiro de 1939. Cria o Parque Nacional do Iguaçu e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 867, 10 jan. 1939. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/declei/1930-1939/decreto-lei-1035-10-janeiro-1939-372797-publicacaooriginal-1-pe.html>.
- BRASIL. Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § 1º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 1, 18 jul. 2000. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9985.htm.
- BRITES, V. L. de C.; RANTIN, F. T. The Influence of Agricultural and Urban Contamination on Leech Infestation of Freshwater Turtles, *Phrynops Geoffroyanus*, taken from Two Areas of the Uberabinha River. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.],

vol. 96, no. 1–3, p. 273–281, 2004. DOI: 10.1023/B:EMAS.0000031733.98410.3c.
Disponível em: <http://link.springer.com/10.1023/B:EMAS.0000031733.98410.3c>.

CARLSSON, G. Effect-based environmental monitoring for thyroid disruption in Swedish amphibian tadpoles. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], vol. 191, no. 7, p. 454, 2019. DOI: 10.1007/s10661-019-7590-1. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10661-019-7590-1>.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, [s. l.], vol. 47, no. 11, p. 2123–2136, 1990. DOI: 10.1139/f90-237. Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/f90-237>.

CASTAÑO, G. V.; CABAGNA ZENKLUSEN, M.; PRIETO, Y.; MANZANO, A. S. Analysis of genotoxicity in erythrocytes of turtles (*Phrynops hilarii*) from anthropized and natural sites of entre ríos, argentina. **Journal of Basic and Applied Genetics**, [s. l.], vol. 31, no. 1, p. 15–22, 2020. DOI: 10.35407/bag.2020.31.01.02. Disponível em: <https://www.scielo.org.ar/pdf/bag/v31n1/v31n1a02.pdf>.

CORREDOR-SANTAMARÍA, W.; GÓMEZ, M. S.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M. Using genotoxic and haematological biomarkers as an evidence of environmental contamination in the Ocoa River native fish, Villavicencio-Meta, Colombia. **SpringerPlus**, [s. l.], vol. 5, no. 1, p. 351, 2016. DOI: 10.1186/s40064-016-1753-0. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4801821/>.

CORTELEZZI, A.; GULLO, B. S.; SIMOY, M. V.; CEPEDA, R. E.; MARINELLI, C. B.; RODRIGUES CAPÍTULO, A.; BERKUNSKY, I. Assessing the sensitivity of leeches as indicators of water quality. **Science of the Total Environment**, [s. l.], vol. 624, p. 1244–1249, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.236. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717336707>.

CRESPO-LÓPEZ, M. E.; MACÊDO, G. L.; ARRIFANO, G. P. F.; PINHEIRO, M. da C. N.; DO NASCIMENTO, J. L. M.; HERCULANO, A. M. Genotoxicity of mercury: Contributing for the analysis of Amazonian populations. **Environment International**, [s. l.], vol. 37, no. 1, p. 136–141, 2011. DOI: 10.1016/j.envint.2010.08.009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412010001595?via%3Dihub>.

DVOŘÁKOVÁ, N.; KVIČEROVÁ, J.; HOSTOVSKÝ, M.; ŠIROKÝ, P. Haemogregarines of freshwater turtles from Southeast Asia with a description of *Haemogregarina sacaliae* sp. n. and a redescription of *Haemogregarina pellegrini* Laveran and Pettit, 1910. **Parasitology**, [s. l.], vol. 142, no. 6, p. 816–826, 2015. DOI: 10.1017/S0031182014001930. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifider/S0031182014001930/type/journal_article.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], vol. 455, no. 1–2, p. 81–95, 2000. DOI: 10.1016/S0027-5107(00)00065-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510700000658>.

FONSECA, C. F.; SILVA, I. J. S.; RODRIGUES, S. M.; SILVA, B. H. S.; SOARES, P. C.; MOURA, G. J. B.; OLIVEIRA, J. B. Evaluation of metal exposure through the composition of essential and toxic micro-minerals in freshwater turtles (*Phrynops geoffroanus*) from a Brazilian river. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], vol. 30, no. 19, p. 54871–54884, 2023. DOI: 10.1007/s11356-023-26127-w. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-023-26127-w>.

FROSSARD, A.; COPPO, G. C.; LOURENÇO, A. T.; HERINGER, O. A.; CHIPPARI-GOMES, A. R. Metal bioaccumulation and its genotoxic effects on eggs and hatchlings of giant Amazon river turtle (*Podocnemis expansa*). **Ecotoxicology**, [s. l.], vol. 30, no. 4, p. 643–657, 2021. DOI: 10.1007/s10646-021-02384-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-021-02384-8>.

FROSSARD, A.; FERREIRA, P. D.; CARNEIRO, M. T. W. D.; HERINGER, O. A.; ENDRINGER, D. C.; GOMES, L. C. Effect of dietary cadmium on fitness, growth, genotoxicity and accumulation in the Yellow-spotted River Turtle, *Podocnemis unifilis*. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], vol. 140–141, p. 239–241, 2013. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.06.002. Disponível em: <https://sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X13001458?via%3Dihub>.

HATCH, E. M.; FISCHER, A. H.; DEERINCK, T. J.; HETZER, M. W. Catastrophic Nuclear Envelope Collapse in Cancer Cell Micronuclei. **Cell**, [s. l.], vol. 154, no. 1, p. 47–60, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.007. Disponível em: https://cell.com/cell/fulltext/S0092-8674%2813%2900709-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867413007095%3Fshowall%3Dtrue

HUMPHRIES, M.; BENITEZ-NELSON, N.; COMBRINK, X. Trace Metal Accumulation in Eggs of Wild Nile Crocodiles (*Crocodylus niloticus*) from Lake St Lucia, South Africa: Implications for Biomonitoring in a Global Biodiversity Hotspot. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, [s. l.], vol. 83, no. 3, p. 214–225, 2022. DOI: 10.1007/s00244-022-00960-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-022-00960-5>.

INSTITUTO ÁGUA E TERRA. **Qualidade das Águas da Bacia do Iguaçu**: Baixo, médio, alto iguaçu e ribeira, 2016-2023. Curitiba, PR: IAT, 2016. Disponível em: <https://www.iat.pr.gov.br/Pagina/Monitoramento-da-Qualidade-das-Aguas>.

KOFFLER, B. R.; SEIGEL, R. A.; MENDONÇA, M. T. The Seasonal Occurrence of Leeches on the Wood Turtle, *Clemmys insculpta* (Reptilia, Testudines, Emydidae). **Journal of Herpetology**, [s. l.], vol. 12, no. 4, p. 571, 1978. DOI: 10.2307/1563364. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/1563364?origin=crossref>.

LEHUN, A. L.; DUARTE, G. S. C.; TAKEMOTO, R. M. Nematodes as indicators of environmental changes in a river with different levels of anthropogenic impact. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], vol. 95, no. 4, 2023. DOI: 10.1590/0001-3765202320200307. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652023000701001&tlng=en.

LEHUN, A. L.; MENDES, A. B.; TAKEMOTO, R. M.; BUENO KRAWCZYK, A. C. de D. Genotoxic effects of urban pollution in the Iguaçu River on two fish populations. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, [s. l.], vol. 56, no. 9, p. 984–991, 2021. DOI: 10.1080/10934529.2021.1956229. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10934529.2021.1956229>.

MAPBIOMAS PROJECT. **Collection 9 of the Annual Land Cover and Land Use Maps of Brazil (1985–2023)**. MapBiomass Data, v. 1, 2024. DOI: 10.58053/MapBiomass/XXUKA8. Disponível em: <https://tinyurl.com/yqf86qgf>.

MCCOY, J. C.; FAILEY, E. L.; PRICE, S. J.; DORCAS, M. E. An assessment of leech parasitism on semi-aquatic turtles in the Western Piedmont of North Carolina. **Southeastern Naturalist**, [s. l.], vol. 6, no. 2, p. 191–202, 2007. DOI: 10.1656/1528-7092(2007)6[191:AAOLPO]2.0.CO;2. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/4541015>.

MITKOVSKA, V.; CHASSOVNIKAROVA, T. Chlorpyrifos levels within permitted limits induce nuclear abnormalities and DNA damage in the erythrocytes of the common carp. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], vol. 27, no. 7, p. 7166–7176, 27 Mar. 2020. DOI: 10.1007/s11356-019-07408-9. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-019-07408-9>.

MORAIS, T. P.; BARRETO, L. S.; SOUZA, T. L.; POZZAN, R.; VARGAS, D. Á. R.; YAMAMOTO, F. Y.; PRODOCIMO, M. M.; NETO, F. F.; RANDI, M. A. F.; RIBEIRO, C. A. de O. Assessing the pollution and ecotoxicological status of the Iguaçu River, southern Brazil: A review. **Integrated Environmental Assessment and Management**, [s. l.], vol. 20, no. 5, p. 1280–1305, 2024. DOI: 10.1002/ieam.4865. Disponível em: <https://academic.oup.com/ieam/article/20/5/1280/7821712>.

O'DONOGHUE, P. Haemoprotozoa: Making biological sense of molecular phylogenies. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, [s. l.], vol. 6, no. 3, p. 241–256, 2017. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2017.08.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221322441730069X?via%3Dihub>.

OLIVEIRA, J. P. de; ANDRÉ, M. R.; ALVES JÚNIOR, J. R. F.; LUSTOSA, A. P. G.; WERTHER, K. Molecular detection of hemogregarines and haemosporidians in Brazilian free-living testudines. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, [s. l.], vol. 7, no. 1, p. 75–84, Apr. 2018. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2018.01.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.01.008>.

PARANÁ. Conselho Estadual de Recursos Hídricos. **Resolução nº 49 CERH/PR, de 20 de dezembro de 2006**. [Dispõe sobre a instituição de Regiões Hidrográficas, Bacias Hidrográficas e Unidades Hidrográficas de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado do Paraná]. Curitiba, PR: CERH/PR, 2006. Disponível em: https://www.sedest.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/migrados/File/r492006.pdf.

PARK, S. Y.; CHOI, J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. **Environment International**, [s. l.], vol. 33, no. 6, p. 817–822, 2007. DOI: 10.1016/j.envint.2007.03.014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412007000700>.

PICELLI, A. M.; CARVALHO, A. V. de; VIANA, L. A.; MALVASIO, A. Prevalence and parasitemia of *Haemogregarina* sp. in *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) from the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], vol. 24, no. 2, p. 191–197, 2015. DOI: 10.1590/S1984-29612015033. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612015000200191&lng=en&tlng=en.

POLETTA, G. L.; SIROSKI, P. A.; AMAVET, P. S.; ORTEGA, H. H.; MUDRY, M. D. Reptiles as animal models: Examples of their utility in genetics, immunology and toxicology. In: LUTTERSCHMIDT, W. I. (ed.). **Reptiles in Research: Investigations of Ecology, Physiology and Behavior from Desert to Sea**. UK: Nova Science Pub Inc, 2013. p. 1–39.

RAKSHANDEHROO, E.; SHARIFIYAZDI, H.; AHMADI, A. Morphological and molecular characterisation of *Haemogregarina* sp. (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) from the blood of the Caspian freshwater turtle *Mauremys caspica* (Gmelin) (Geoemydidae) in Iran. **Systematic Parasitology**, [s. l.], vol. 93, no. 5, p. 517–524, 2016. DOI: 10.1007/s11230-016-9643-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11230-016-9643-y>.

RHODIN, A. G. J.; IVERSON, J. B.; BOUR, R.; FRITZ, U.; GEORGES, A.; SHAFFER, H. B.; VAN DUK, P. P. **Turtles of the World: Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status**. 8. ed. Arlington: Chelonian Research Foundation and Turtle Conservancy, 2021. DOI: 10.3854/crm.8.checklist.atlas.v9.2021. Disponível em: <https://iucn-tftsg.org/checklist>.

RIBEIRO, L. E. de S.; UTTA, A. C. da S.; BARRETO, L. Diet of phrynos geoffroanus (Schweigger 1812) (chelidae) in an environmental protection area in the amazon region of Maranhão state, Brazil. **Herpetological Conservation and Biology**, [s. l.], vol. 12, no. 2, p. 556–564, 2017. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/17074>.

ROE, J. H.; GEORGES, A. Heterogeneous wetland complexes, buffer zones, and travel corridors: Landscape management for freshwater reptiles. **Biological Conservation**, [s. l.], vol. 135, no. 1, p. 67–76, 2007. DOI: 10.1016/j.biocon.2006.09.019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006320706004198>.

ROXO, F. F.; DIAS, A. C.; SILVA, G. S. C.; OLIVEIRA, C. Two new species of *Curculionichthys* (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Amazonas basin, Brazil. **Zootaxa**, [s. l.], vol. 4341, no. 2, p. 258–270, 2017. DOI: 10.11646/zootaxa.4341.2.5. Disponível em: <https://www.mapress.com/zt/article/view/zootaxa.4341.2.5>.

RUBIO-VARGAS, D. A.; MORAIS, T. P. de; RANDI, M. A. F.; FILIPAK NETO, F.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; MARTINS, C. de C.; OLIVEIRA, A. P.; NAZÁRIO, M. G.; FERREIRA, F. C. A. da S.; OPUSKEVITCH, I.; PENNER, D.; ESQUIVEL-MUELBERT, J.; MELA PRODOCIMO, M.; DE SOUZA, C.; CHOUERI, R. B.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Multispecies and multibiomarker assessment of fish health from Iguaçu River reservoir, Southern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], vol. 196, no. 6, 2024. DOI: 10.1007/s10661-024-12720-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-024-12720-0>.

SANTOS, R. L.; CORREIA, J. M. S.; PAIM, A. P. S.; OLIVEIRA, L. L. S. S.; DINIZ, G. T.

N.; SANTOS, E. M. Metallic elements in aquatic herpetofauna (Crocodylia; Testudines) from a lentic Atlantic rainforest environment in northeastern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], vol. 193, no. 5, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1007/s10661-021-09076-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-021-09076-0>.

SANTOS, M. J. de J.; LARANJA, R. E. de P. Influence of agriculture on surface water quality in three lentic environments in a conservation unit of Brazil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [s. l.], vol. 21, no. 4, p. 4295–4306, 2024. DOI: 10.1007/s13762-023-05296-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13762-023-05296-8>.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, [s. l.], vol. 31, no. 1, p. 9–15, 1975. DOI: 10.1016/0165-1161(75)90058-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165116175900588>.

SHUGART, L.; THEODORAKIS, C. New trends in biological monitoring: Application of biomarkers to genetic ecotoxicology. **Biotherapy**, [s. l.], vol. 11, no. 2–3, p. 119–127, 1998. DOI: doi.org/10.1023/A:1007911027243. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1007911027243>.

SIDDALL, M. E.; DESSER, S. S. Transmission of Haemogregarina balli from painted turtles to snapping turtles through the leech Placobdella ornata. **Journal of Parasitology**, [s. l.], vol. 87, no. 5, p. 1217–1218, 2001. DOI: doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[1217:tohbfp]2.0.co;2. Disponível em: <https://tinyurl.com/yuxeseyyp>.

SIDDALL, M. E. Phylogeny of Adeleid Blood Parasites with a Partial Systematic Revision of the Haemogregarine Complex. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, [s. l.], vol. 42, no. 2, p. 116–125, 1995. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1995.tb01551.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1550-7408.1995.tb01551.x>.

SILVA, D. T.; GUEDES, T. de A.; FRANÇA, R. T.; MARTINS, C. de M. G.; LOEBMANN, D. Hematological and genotoxic biomarkers in a natural population of freshwater turtles Trachemys dorbigni (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) living in an urban area in Southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], vol. 31, no. 25, p. 37215–37228, 2024. DOI: 10.1007/s11356-024-33515-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-024-33515-3>.

SILVA, J. F. M.; OBESO, M. P.; MAKRAKIS, M. C.; MAKRAKIS, S. Environmental analysis of land use and occupation in nine watersheds contributing to the Iguaçu River, Brazil. **Research, Society and Development**, [s. l.], vol. 11, no. 13, p. e66111334868, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i13.34868. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/34868>.

SOUTO, R.; BORGES, F. R. C.; CUNHA, D. M. da C.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; CRUZ, A. D. da. O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativa de dano genético: aspectos citotécnicos. **Estudos**, [s. l.], vol. 35, no. 1/2, p. 171–178, 2008. DOI: doi.org/10.18224/est.v37i2.1481. Disponível em: <https://seer.pucgoias.edu.br/index.php/estudos/article/view/1481>.

SOUZA, F. L.; ABE, A. S. Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle,

Phrynops geoffroanus, inhabiting a polluted urban river in south-eastern Brazil. **Journal of Zoology**, [s. l.], vol. 252, no. 4, p. 437–446, 2000. DOI: 10.1111/j.1469-7998.2000.tb01226.x. Disponível em: <https://zslpublications.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-7998.2000.tb01226.x>.

STRUNJAK-PEROVIC, I.; COZ-RAKOVAC, R.; TOPIC POPOVIC, N.; JADAN, M. Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], vol. 35, no. 2, p. 287–291, 2009. DOI: 10.1007/s10695-008-9208-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10695-008-9208-3>.

TELFORD, S. R. **Hemoparasites of the Reptilia : color atlas and text**. [S. l.]: CRC Press ; Taylor & Francis, 2009. DOI: doi.org/10.1201/9781420080414. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781420080414/hemoparasites-reptilia-jr-sam-telford>.

ÚNGARI, L. P.; OCEGUERA-FIGUEROA, A.; TORRES-CARRERA, G.; NETHERLANDS, E. C.; SANTOS, A. L. Q.; DA SILVA, R. J.; O'DWYER, L. H. Unoculubranchiobdella sp. (Hirudinea: Ozobranchidae) as a vector for Haemogregarina spp. in freshwater turtles from Brazil. **Parasitology Research**, [s. l.], vol. 123, no. 6, 2024. DOI: doi.org/10.1007/s00436-024-08271-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-024-08271-5>.

ÚNGARI, L. P.; SANTOS, A. L. Q.; DA SILVA, R. J.; O'DWYER, L. H. Hemogregarine Diversity Infecting Brazilian Turtles with a Description of Six New Species of Haemogregarina (Apicomplexa: Adeleorina: Haemogregarinidae). **Diversity**, [s. l.], vol. 15, no. 2, p. 296, 2023. DOI: 10.3390/d15020296. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-2818/15/2/296>.

ÚNGARI, L. P.; SANTOS, A. L. Q.; O'DWYER, L. H.; DA SILVA, M. R. L.; DE MELO FAVA, N. N.; PAIVA, G. C. M.; DE MELO COSTA PINTO, R.; CURY, M. C. Haemogregarina podocnemis sp. nov.: description of a new species of Haemogregarina Danilewsky 1885 (Adeleina: Haemogregarinidae) in free-living and captive yellow-spotted river turtles Podocnemis unifilis (Testudines: Podocnemididae) from Brazil. **Parasitology Research**, [s. l.], vol. 117, no. 5, p. 1535–1548, 2018. DOI: 10.1007/s00436-018-5817-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-018-5817-7>.

VENANCIO, L. P. R.; SILVA, M. I. A.; DA SILVA, T. L.; MOSCHETTA, V. A. G.; DE CAMPOS ZUCCARI, D. A. P.; ALMEIDA, E. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Pollution-induced metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], vol. 97, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.06.035. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651313002984?via%3Dihub>.

VOGT, R.; BATAUS, Y.S.L.; RODRIGUES, J.; UHLIG, V.M.; BALESTRA, R.A.M.; BARRETO, L.N.; BRESSAN, R.F.; BRITO, E.S.; CARVALHO, V.T.; FALCON, G.B.; FERRARA, C.R.; MARQUES, T.S.; MATIAS, F.; SOUZA, F.L.; TINÔCO, M.S.; VALADÃO, R.M. **Phrynops geoffroanus. Sistema de Avaliação do Risco de Extinção da Biodiversidade - SALVE**. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, 2023. DOI: doi.org/10.37002/salve.ficha.20831. Disponível em:

<https://salve.icmbio.gov.br>.

YAMAMOTO, F. Y.; DIAMANTE, G. D.; SANTANA, M. S.; SANTOS, D. R.; BOMBARDELI, R.; MARTINS, C. C.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHLENK, D. Alterations of cytochrome P450 and the occurrence of persistent organic pollutants in tilapia caged in the reservoirs of the Iguaçu River. **Environmental Pollution**, [s. l.], vol. 240, p. 670–682, 2018. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.04.019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749117319838?via%3Dihub>.

YAMAMOTO, F. Y.; PEREIRA, M. V. M.; LOTTERMANN, E.; SANTOS, G. S.; STREMEL, T. R. O.; DORIA, H. B.; GUSO-CHOUERI, P.; CAMPOS, S. X.; ORTOLANI-MACHADO, C. F.; CESTARI, M. M.; NETO, F. F.; AZEVEDO, J. C. R.; RIBEIRO, C. A. O. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçu River (Southern Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], vol. 23, no. 18, p. 18111–18128, 2016. DOI: 10.1007/s11356-016-6924-6. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-016-6924-6>.

ZAPATA, L. M.; BOCK, B. C.; OROZCO, L. Y.; PALACIO, J. A. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], vol. 127, p. 108–116, 2016. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.01.016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651316300161?via%3Dihub>.

ANEXO A – Autorização para atividades com finalidade científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 91311-2	Data da Emissão: 31/03/2025 16:32:55	Validade*: 07/12/2024
De acordo com o art. 31 da Portaria ICMBio nº 748/2022, esta autorização possui vigência equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto e validade de um ano, devendo ser revalidada anualmente, através da apresentação do relatório anual de atividades, no prazo de até 30 dias após o aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Ana Paula Gomes Lustosa	CPF: 633.493.451-15
Título do Projeto: Monitoramento de quelônios sob diferentes níveis de impacto de hidrelétricas no Parque Nacional do Iguaçu	
Nome da Instituição: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 08.829.974/0001-94

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Monitoramento de P.williamsi	03/2025	01/2026
2	Monitoramento de P.williamsi	02/2024	03/2025

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Rafael Martins Valadao	PESQUISADOR	050.946.066-62	Brasileira
2	Carlos Eduardo Vargas Grou	PESQUISADOR	083.603.199-79	Brasileira
3	LILIAN FREITAS BASTOS	COLABORADORA	015.540.541-17	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0913110220250331

Página 1/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 91311-2	Data da Emissão: 31/03/2025 16:32:55	Validade*: 07/12/2024
De acordo com o art. 31 da Portaria ICMBio nº 748/2022, esta autorização possui vigência equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto e validade de um ano, devendo ser revalidada anualmente, através da apresentação do relatório anual de atividades, no prazo de até 30 dias após o aniversário de sua emissão.		
Dados do titular		
Nome: Ana Paula Gomes Lustosa	CPF: 633.493.451-15	
Título do Projeto: Monitoramento de quelônios sob diferentes níveis de impacto de hidrelétricas no Parque Nacional do Iguaçu		
Nome da Instituição: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 08.829.974/0001-94	

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em áreas indispensáveis à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Todos os membros da equipe de pesquisa devem estar cientes das recomendações e boas práticas a serem seguidas neste momento de emergência zoonossária no Brasil devido à gripe aviária. Informe-se na página do CEMAVE na Internet: https://www.gov.br/bricmbio/pt-br/assuntos/centros-de-pesquisa/omave/destaques/gripe-aviaria/gripe-aviaria-1 .
3	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
4	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de atender às exigências e obter as autorizações previstas em outros instrumentos legais relativos ao registro de agrotóxicos (Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, entre outros).
5	Este documento não dispensa o cumprimento da Lei nº 13.123/2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade.
6	As atividades de campo exercidas por pessoas natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia (Decreto nº 98.830, de 15/01/90).
7	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena, da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Portaria Nº748/2022, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
9	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação do disposto nesta portaria ou em legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, pode, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou cassada pelo Instituto Chico Mendes, por meio da Coordenação Gestora do Sisbio, e está sujeito às sanções previstas na legislação vigente.
11	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
12	Caso seja identificada a ocorrência de espécie exótica dentro ou no entorno de UNIDADE DE CONSERVAÇÃO FEDERAL, além de descrever no relatório de atividades, o pesquisador deve informar à equipe gestora com maior brevidade possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0913110220250331

Página 2/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 91311-2	Data da Emissão: 31/03/2025 16:32:55	Validade*: 07/12/2024
De acordo com o art. 31 da Portaria ICMBio nº 748/2022, esta autorização possui vigência equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto e validade de um ano, devendo ser revalidada anualmente, através da apresentação do relatório anual de atividades, no prazo de até 30 dias após o aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Ana Paula Gomes Lustosa	CPF: 633.493.451-15
Título do Projeto: Monitoramento de quelônios sob diferentes níveis de impacto de hidrelétricas no Parque Nacional do Iguaçu	
Nome da Instituição: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 08.829.974/0001-94

Outras ressalvas

1		COINF
2	1)As pesquisas deverão ser agendadas com no mínimo 15 (quinze) dias de antecedência junto ao Parque Nacional do Iguaçu, através do endereço eletrônico pesquisa.pri@icmbio.gov.br informando a data e a localidade a ser acessada. Levar a campo a autorização SISBio obtida. 2)Encaminhar para o mesmo endereço eletrônico, imediatamente após cada etapa de incursão a campo, as respectivas coordenadas de referência e/ou tracking efetuado (em arquivo formato .kmz), assim como o número da autorização Sisbio a que se refere a pesquisa e a data em que foi efetuada a atividade. 3)É proibida a abertura de qualquer picada ou transecto na região da Trilha do Monitoramento. Qualquer atividade nesta trilha deve ser previamente comunicada pelo endereço eletrônico pesquisa.pri@icmbio.gov.br, devido a possíveis restrições ou impossibilidade de uso, principalmente nos meses de março, abril e outubro. 4)Todos os equipamentos e materiais utilizados deverão ser retirados ao término das atividades, sendo de responsabilidade do pesquisador e sua equipe/colaboradores. Deverá ser dada especial atenção para que todos os produtos utilizados em campo sejam devidamente recolhidos e encaminhados para fora da UC. 5)Na eventual observação de vestígios de caça, pesca ou extração de palmito no interior do PARNA Iguaçu, encaminhar informação (coordenadas geográficas e registro fotográfico sempre que possível) para o endereço eletrônico parnaproteção@icmbio.gov.br.	PARNA Iguaçu

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Entorno do PARNA Iguaçu	Foz do Iguaçu-PR	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal
2	Parque Nacional do Iguaçu	PR	Mata Atlântica	Não	Dentro de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Levantamento de dados abióticos em UC federal	Dentro de UC Federal
2	Captura de animais silvestres in situ	Dentro de UC Federal
3	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
4	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
5	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Dentro de UC Federal
6	Marcação de animais silvestres in situ	Dentro de UC Federal
7	Marcação de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
8	Observação e gravação de imagem ou som de táxon em UC federal	Dentro de UC Federal

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0913110220250331

Página 3/5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 91311-2	Data da Emissão: 31/03/2025 16:32:55	Validade*: 07/12/2024
De acordo com o art. 31 da Portaria ICMBio nº 748/2022, esta autorização possui vigência equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto e validade de um ano, devendo ser revalidada anualmente, através da apresentação do relatório anual de atividades, no prazo de até 30 dias após o aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Ana Paula Gomes Lustosa	CPF: 633.493.451-15
Título do Projeto: Monitoramento de quelônios sob diferentes níveis de impacto de hidrelétricas no Parque Nacional do Iguaçu	
Nome da Instituição: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	CNPJ: 08.829.974/0001-94

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Marcação de animais silvestres in situ	Phrynops williamsi	-
2	Captura de animais silvestres in situ	Phrynops williamsi	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Phrynops williamsi	-
4	Observação e gravação de imagem ou som de táxon em UC federal	Phrynops williamsi	-
5	Observação e gravação de imagem ou som de táxon em UC federal	Testudinidae	-
6	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Testudinidae	-
7	Captura de animais silvestres in situ	Testudinidae	-
8	Marcação de animais silvestres in situ	Testudinidae	-

A quantidade prevista só é obrigatória para atividades do tipo "Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ". Essa quantidade abrange uma porção territorial mínima, que pode ser uma Unidade de Conservação Federal ou um Município.

A quantidade significa: por espécie X localidade X ano.

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Répteis)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue, Outras amostras biológicas(Fragmento de tecido e fragmento de carapaça), Ectoparasita, Ovos, Secreção, Fezes
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Funil trap, Puçá, Outros métodos de captura/coleta(Tramell net)
3	Método de marcação (Répteis)	Corte de escudos marginais
4	Método de observação e registro (Répteis)	Foto-identificação

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ	Laboratório
2	ASSOCIACAO INSTITUTO TECNOLOGICO VALE - ITV	Outro
3	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº Portaria ICMBio nº 748/2022. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0913110220250331

Página 4/5

ANEXO B – Declaração de colaboração e recebimento de material biológico

02071.000040/2022-67
Número SEI:021293230



**MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE E MUDANÇA DO CLIMA
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE RÉPTEIS E ANFÍBIOS -
RAN**

Rua 2,49, Edif. Walter Bittar, 2º Andar, - Bairro Setor Central - Goiânia - CEP 74013-020

Telefone: (61)2028-8880/(61)2028-8708

DECLARAÇÃO

Goiânia, na data da assinatura eletrônica.

Declaração de colaboração entre o ICMBio/RAN e o Prof. Dr. Dr. Paulo Henrique Braz em ações relacionadas à conservação de quelônios.

Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios (ICMBio/RAN) certifica que o Professor Dr. Paulo Henrique Braz, C.P.F: 022.712.201-14, é parceiro do RAN na implementação dos Planos de Ação para a Conservação da Herpetofauna do Sul e Plano de Ação para a Conservação da Herpetofauna do Sudeste.

Sempre que possível, o professor acompanha as expedições em campo e faz análises relacionadas à medicina da conservação para subsidiar ações de manejo e conservação das espécies alvo. Além disso, recebe material biológico (sangue, esfregaços, fezes, secreções, etc.) para análises parasitárias e ecofisiológicas.

O ICMBio já elaborou 96 Planos de Ação para Espécies Ameaçadas de Extinção – PAN, trata-se de um instrumento de gestão e de políticas públicas, construído de forma participativa, a ser utilizado para o ordenamento e a priorização de ações para a conservação de espécies e ambientes naturais, com um objetivo estabelecido em um horizonte temporal definido. Ou seja, é um instrumento de gestão oficial do governo brasileiro, por meio de portaria publicada pelo ICMBio.

No âmbito do ICMBio/RAN, coordenamos quatro PAN, de maneira que o Dr. Paulo Henrique Braz colabora na implementação para a conservação de quelônios alvo em dois deles (Herpetofauna do Sul e Herpetofauna do Sudeste), com previsão de contribuir futuramente com ações de conservação no segundo ciclo do Plano de Ação Nacional para a Conservação da Ictiofauna, Herpetofauna e Primatas do Cerrado, Pantanal e Amazônia, em ações voltadas para o “cágado-do-pantanal”.

Atenciosamente,

RAFAEL ANTÔNIO MACHADO BALESTRA
Coordenador do ICMBio/RAN



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Antônio Machado Balestra, Coordenador(a)**, em 17/04/2025, às 15:36, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.icmbio.gov.br/autenticidade> informando o código verificador **021293735** e o código CRC **C7AF74D9**.

ANEXO C – Normas da revista Environment Science and Pollution Research

10/07/2025, 16:40

Submission guidelines | Environmental Science and Pollution Research

Peer-reviewed contributions:

- ☐ Research Articles (full papers)
- ☐ Short Original Communications and Discussion Articles
- ☐ Review Articles

Please ensure that the length of your paper is in harmony with your research area and with the science presented.

All papers – excluding Editorials, Letters to the Editor, Conference Reports – are subject to peer-review by a minimum of two and a maximum of three experts.

Letters to the Editor

Please provide the following details within your manuscript:

- ☐ full title of the article you are commenting on
- ☐ corresponding author of the article you are commenting on
- ☐ DOI of the article that you are commenting on

The title of your letter should be structured as follows:

- ☐ Comments on “Title of the Article”

or

- ☐ Answer to “Comments on “Title of the Article”

Make sure to cite the article or comment you are referring to in the reference list of your letter.

Other contributions:

Apart from the strictly scientific contributions as research articles (short and full papers) and reviews, ESPR publishes:

- ☐ News & views from research and technology, legislation and regulation, hardware and software, education, literature, institutions, organizations, conferences.
- ☐ Commentary and editorials round out the journal's contents.

ESPR does not accept papers dealing with the functioning of diesel and engines (only papers focused on emissions will be considered), nor dealing with tourism, pharmacology, and mechanical engineering related to wind/solar energy.

[Back to top](#) ↑

Manuscript Submission

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 co-authors, 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.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright

owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Source Files

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

Additional information to Online Submission

Please refer to the section below entitled “At revision stage” for specific instructions regarding files to include upon submission of a revised article.

[Back to top](#) ↑

Title Page

The title page should include:

- ☐ The name(s) of the author(s)
- ☐ A concise and informative title
 - Please avoid acronyms in the title of your article
 - For local studies, please indicate the name of the region and country in the title.
- ☐ The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- ☐ The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

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.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Please alphabetize according to the following rules: 1) For one author, by name of author, then chronologically; 2) For two authors, by name of author, then name of coauthor, then chronologically; 3) For more than two authors, by name of first author, then chronologically.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. “<https://doi.org/abc>”).

☐ 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.
<https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

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* 965:325–329

☐ Article by DOI

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

Additional Information for Reference list

- ☐ For three authors, by name of first author, then name of first coauthor, then name of second coauthor, then chronologically. Etc...
- ☐ The names of all authors should be provided, as the usage of “et al” in long author lists is no longer accepted.

Specific Remarks

- ☐ Online documents: wikipedia documents are not acceptable as references.
- ☐ Language: References should be in English with an appropriate title in English. If it's in a different language the language should be indicated Zhu J, Wu F-C, Deng Q-J, Shao S-X, Mo C-L, Pan X-L, Li W, Zhang R-Y (2009) Environmental characteristics of water near the Xikuangshan antimony mine. *Acta Scientiae Circumstantiae* 29:655–661 (in Chinese)

- The names of ALL authors should be provided in full. The use of “et al” in long author lists is not anymore accepted.
- For original Research Articles (full papers) and short Original Communications: No more than 5 self-citations are allowed per author (and co-author) in the bibliography of their article.

[Back to top](#) ↑

Statements & Declarations

The following statements must be included in your submitted manuscript under the heading 'Statements and Declarations'. This should be placed after the References section. Please note that submissions that do not include required statements will be returned as incomplete.

Funding

Please describe any sources of funding that have supported the work. The statement should include details of any grants received (please give the name of the funding agency and grant number).

Example statements:

“This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...]). Author A.B. has received research support from Company A.”

“The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.”

Competing Interests

Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests

within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work.

Example statements:

“Financial interests: Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company N. Author D has received travel support from Company O. Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M and Company N.”

“The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.”

Please refer to the “Competing Interests” section below for more information on how to complete these sections.

Author Contributions

Authors are encouraged to include a statement that specifies the contribution of every author to the research and preparation of the manuscript.

Example statement:

“All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.”

Please refer to the “Authorship Principles ” section below for more information on how to complete this section.

[Back to top](#) ↑

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 lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

[Back to top](#) ↑

Artwork and Illustrations Guidelines

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. MS Office 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., Fig1.eps.

Line Art

- ☐ Definition: Black and white graphic with no shading.
- ☐ Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- ☐ All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- ☐ Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- ☐ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- ☐ Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- ☐ If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- ☐ Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- ☐ Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- ☐ Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- ☐ Color art is free of charge for print and online publication.
- ☐ Color illustrations should be submitted as RGB.

Figure Lettering

- ☐ To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- ☐ Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- ☐ Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- ☐ Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- ☐ Do not include titles or captions within your illustrations.

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 [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

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.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

ANEXO D – Normas da revista Parasitology Research

10/07/2025, 16:50

Submission guidelines | Parasitology Research

response to all reviewers' remarks when you submit the revised manuscript.

[Back to top](#) ↑

Preprint Policy

Springer accepts posting of preprints of primary research manuscripts on preprint servers, authors' or institutional websites. Details of our policy on posting, licensing, citation of preprints and communications with the media about preprints of primary research manuscripts may be found [here](#)..

Authors should disclose details of preprint posting, including DOI and licensing terms, upon submission of the manuscript or at any other point during consideration at a Springer journal. Once the preprint is published, it is the author's responsibility to ensure that the preprint record is updated with a publication reference, including the DOI and a URL link to the published version of the article on the journal website.

Preprints may be cited in the reference list of articles under consideration at Springer journals as shown below:

Babichev, S. A., Ries, J. & Lvovsky, A. I. Quantum scissors: teleportation of single-mode optical states by means of a nonlocal single photon. Preprint at <http://arxiv.org/abs/quant-ph/0208066> (2002). .

Costs of Colour Illustrations

- ☐ Online publication of color illustrations is always free of charge.

[Back to top](#) ↑

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- ☐ The name(s) of the author(s)
- ☐ The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- ☐ A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- ☐ If available, the 16-digit [ORCID](#) of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Large Language Models (LLMs), such as [ChatGPT](#), do not currently satisfy our [authorship criteria](#). Notably an attribution of authorship carries with it accountability for the work, which cannot be effectively applied to LLMs. Use of an LLM should be properly documented in the Methods section (and if a Methods section is not available, in a suitable alternative part) of the manuscript. The use of an LLM (or other AI-tool) for "AI assisted copy editing" purposes does not need to be declared. In this context, we define the term "AI assisted copy editing" as AI-assisted improvements to human-generated texts for readability and style, and to ensure that the texts are free of errors in grammar, spelling, punctuation and tone. These AI-assisted improvements may include wording and formatting changes to the texts, but do not include generative editorial work and autonomous content creation. In all cases, there

must be human accountability for the final version of the text and agreement from the authors that the edits reflect their original work.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

- ☐ Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials
- ☐ Trial registration number and date of registration, followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

Keywords

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

Statements and Declarations

The following statements should be included under the heading "Statements and Declarations" for inclusion in the published paper. Please note that submissions that do not include relevant declarations will be returned as incomplete.

- ☐ **Competing Interests:** Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Please refer to “Competing Interests and Funding” below for more information on how to complete this section.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

[Back to top](#) ↑

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- ☐ Use a normal, plain font (e.g., 10-point 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. We recommend using [Springer Nature's LaTeX template](#).

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 lower-case 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.

Important note:

Authors are requested to **use automatic continuous line numbering throughout the manuscript and in double space.**

[Back to top](#) ↑

Scientific style

- ☐ Please always use internationally accepted signs and symbols for units ([SI units](#)).

Nomenclature

The International Code of Zoological Nomenclature (ICZN) must be observed. Genus and species names should be in italics. Authors of scientific names of the genus and species group should not be italicized. At first mention, a specific name should be cited with nomenclatural author and year, e.g. *Catenula lemnae* (in italics) Dugès, 1832. When three or more joint authors have been

responsible for a name, then the citation of the name of the authors may be expressed by use of the term "et al." following the name of the first author, provided that all authors of the name are cited in full elsewhere in the same work, either in the text or in a bibliographic reference. Authors unfamiliar with the taxonomy of the group to which a species belongs should consult an expert to ensure that it is properly identified and that the correct name is used.

[Back to top](#) ↑

References

Citation

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

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Please alphabetize according to the following rules: 1) For one author, by name of author, then chronologically; 2) For two authors, by name of author, then name of coauthor, then chronologically; 3) For more than two authors, by name of first author, then chronologically.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. "https://doi.org/abc").

☐ 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.
<https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

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*. <https://doi.org/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](#)

- ☐ Definition: Black and white graphic with no shading.
- ☐ Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- ☐ All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- ☐ Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- ☐ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- ☐ Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- ☐ If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- ☐ Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- ☐ Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- ☐ Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- ☐ Color art is free of charge for online publication.
- ☐ If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check

this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- ☐ If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- ☐ Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- ☐ To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- ☐ Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- ☐ Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- ☐ Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- ☐ Do not include titles or captions within your illustrations.

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 [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

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.

Figure Placement and Size

- ☐ Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.
- ☐ When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- ☐ For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- ☐ For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- ☐ All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- ☐ Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- ☐ Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Generative AI Images

Please check [Springer's policy on generative AI images](#) and make sure your work adheres to the principles described therein.

[Back to top](#) ↑

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- ☐ Supply all supplementary material in standard file formats.
- ☐ Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding