Lilian Cristina da Silveira

Variação sazonal do metabolismo energético no primeiro ciclo anual de lagartos teiú *Tupinambis merianae*: correlatos com atividades diárias, adiposidade e proteção antioxidante

São Paulo
2015

Lilian Cristina da Silveira

Variação sazonal do metabolismo energético no primeiro ciclo anual de lagartos teiú *Tupinambis merianae*: correlatos com atividades diárias, adiposidade e proteção antioxidante

Seasonal variation in energy metabolism during the first annual cycle of tegu lizards *Tupinambis merianae*: correlates with daily activities, adiposity and antioxidant protection

Tese apresentada ao Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Silvia Cristina Ribeiro de Souza

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica

Silveira, Lilian Cristina da
Variação sazonal do metabolismo energético no primeiro ciclo anual de lagartos teiú *Tupinambis merianae*: correlatos com atividades diárias, adiposidade e proteção antioxidante.
145 páginas
Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Depressão metabólica
2. Metabolismo energético
3. Teiú (*Tupinambis merianae)*

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me capacitado e sustentado.

Agradeço à Profa. Dra. Silvia Cristina Ribeiro de Souza, pela orientação dedicada, conhecimentos compartilhados e pelo exemplo de profissional. Muito obrigada por sempre ter me tratado com tanto cuidado e carinho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Alexis Welker, pela orientação no capítulo de proteção antioxidante e pelos conhecimentos compartilhados de maneira generosa ao longo de todo desenvolvimento do estudo.

Ao Prof. Dr. Fábio Siviero e à Profa. Dra. Alison Colquhoun por partilharem seu tempo e conhecimento na realização de discussões e testes de biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Fernando Gomes e ao Técnico Eduardo pela assistência na realização da dosagem de corticosterona.

Aos Técnicos do departamento de Biociências, em especial ao Márcio, Taís, Vagner e Manoel pela ajuda na manutenção dos animais no biotério e realização dos experimentos.

Aos colegas de laboratório Rafael e Nina e à técnica Thaís pela ajuda na análise de vídeos. Ao colega Flavio Marques da Silva Ayorsa Filho pelas ilustrações gentilmente cedidas.

Aos amigos e colegas do Departamento de Fisiologia pelas conversas e momentos de descontração e aos funcionários pela presteza e solicitude, em especial à Roseli e Gisele.

Ao funcionário da marcenaria Otaviano de Carvalho Ferreira que montou a gaiola utilizada para a realização das filmagens.

Aos meus pais, Luis Carlos da Silveira e Eliane Barbosa da Silveira, e meus avós, Luis Alves Barbosa e Narciza da Conceição Barbosa, pelo apoio, cuidado e amor que sempre tiveram por mim.

Ao meu noivo Rafael pelo companheirismo e por estar sempre presente.

Aos Profs. Drs. Dênis Andrade e Augusto Abe da UNESP - Rio Claro, que gentilmente disponibilizaram os animais para a realização dos experimentos desta tese, sem os quais este trabalho não teria acontecido.

À Capes pela bolsa concedida. *Muito obrigada a todos!*

ÍNDICE

Lista de Figuras vii
Lista de abreviaturas e siglas ix
Resumo xi
Abstract xiii
I. Introdução Geral e Revisão de Literatura 1
1.1. Introdução 2
1.2. Revisão de Literatura 7
1.2.1. Dormência sazonal e regulação da massa corpórea 7
1.2.2. Papel dos glicocorticoides na dormência sazonal 16
1.2.3. Sazonalidade, espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes 21
1.2.3.1. Espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes 21
1.2.3.2. Dormência sazonal e estresse oxidativo 28

II. Mudanças no padrão de atividades diárias relacionadas com as demandas de crescimento e armazenamento de substratos no primeiro ciclo anual do lagarto hibernante *Tupinambis merianae* 35
Resumo 36
Abstract 37
2.1. Introdução 38
2.2. Material e Métodos 42
2.2.1. Animais experimentais e manutenção 42
2.2.2. Análise morfométrica 43
2.2.3. Análise do comportamento e da ingestão alimentar 44
2.2.4. Grupos experimentais e coleta de tecidos 45
2.2.5. Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona (CORT) 46
2.2.6. Análise estatística 46
2.3. Resultados 47
2.3.1. Tamanho, Massa Corpórea e Adiposidade 47
2.3.2. Comportamento e atividade 48
2.3.3. Níveis plasmáticos de CORT 51
2.4. Discussão 52
2.5. Figuras 66

III. Proteção antioxidante e estresse oxidativo em função do jejum e depressão metabólica no primeiro ciclo anual de lagartos teiú 74
Resumo 75
Abstract 76
3.1. Introdução 77
3.2. Material e Métodos 81
3.2.1. Animais experimentais e manutenção 81

3.2.2. Grupos experimentais e coleta de amostras 82
3.2.3. Preparação dos extratos para as medidas de atividade enzimática 83
3.2.4. Ensaios enzimáticos 83
3.2.5. Determinação do índice de peroxidação lipídica – TBARS 86
3.2.6. Determinação da concentração de glutationa.....86
3.2.7. Determinação da concentração de proteínas carboniladas (PC) 87
3.2.8. Análise estatística.....88
3.3. Resultados 89
3.4. Discussão 96
3.5. Figuras.....113

IV. Considerações Finais 125
V. Referências Bibliográficas 129

Lista de Figuras

Figura 1.1. Esquema geral simplificado do ciclo anual da massa corpórea, ingestão de alimento e metabolismo em um roedor hibernante de laboratório.. 12

Figura 1.2. Estados fisiológicos e níveis de mediadores primários (catecolaminas, citocinas e GCs) frente a diferentes demandas da história de vida. 17

Figura 2.1. Caixas de manutenção dos lagartos teiú em cativeiro..... 42

Figura 2.2. Temperaturas máxima e mínima nas regiões próximas à pedra (região de aquecimento) e próximas ao abrigo (região de resfriamento) e umidade relativa do ar nas caixas onde os teiús juvenis foram mantidos no ano de 2013..... 66

Figura 2.3. Massa corpórea e comprimento rostro-cloacal; taxas de variação diárias de massa corpórea e comprimento rostro-cloacal; massa relativa dos corpos gordurosos abdominais de teiús jovens durante o primeiro ciclo anual de atividades..... 67

Figura 2.4. Atividade diária em horas e porcentagem de teiús observados na superfície da caixa durante o período experimental. 69

Figura 2.5. Assoalhamento, assoalhamento por hora de atividade diária, atividade locomotora**,** atividade locomotora por hora de atividade diária e tempo sobre a pedra por evento de subida na pedra..... 70

Figura 2.6. Atividade alimentar, proporção de animais que comem e ingestão de alimento. 72

Figura 2.7. Níveis plasmáticos de corticosterona durante o primeiro ciclo anual de atividades de teiús..... 73

Figura 3.1. Atividade da enzima citrato sintase (CS) no fígado e rim, coração e pulmão de lagartos teiú em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera..... 114

Figura 3.2 – Atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no fígado e rim de lagartos teiú em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera..... 114

Figura 3.3 – Atividade da glutationa redutase (GR), glutationa-S-transferase (GST) e catalase (CAT) no fígado, rim, coração e pulmão de lagartos teiú em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera..... 115

Figura 3.4 – Atividade da superóxido dismutase total (SOD Total) e da superóxido dismutase dependente de manganês (Mn-SOD) no fígado, rim, coração e pulmão de lagartos teiú em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera..... 116

Figura 3.5 - Atividade da glutationa peroxidase total (GPX total) e glutationa peroxidase dependente de selênio (Se-GPX) no fígado de lagartos teiú em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. 117

Figura 3.6 – Concentração de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), equivalentes de glutationa (Eq-GSH) e razão GSSG:GSH no fígado de teiús em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. 118

Figura 3.7 – Concentração de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), equivalentes de glutationa (Eq-GSH) e razão GSSG:GSH no rim de teiús em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. 119

Figura 3.8 – Concentração de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), equivalentes de glutationa (Eq-GSH) e razão GSSG:GSH no coração de teiús em diferentes fases do ciclo anual. 120

Figura 3.9 – Concentração de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), equivalentes de glutationa (Eq-GSH) e razão GSSG:GSH no pulmão de teiús em diferentes fases do ciclo anual. 121

Figura 3.10 – Concentração de TBARS no fígado, rim e pulmão de teiús em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. 122

Figura 3.11 - Concentração de proteínas carboniladas (PC) no fígado, rim, coração e pulmão de teiús em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera 123

Figura 4.1 – Correlação entre a concentração de proteínas carboniladas no pulmão a taxa de variação de massa corpórea (A) e a taxa de variação de comprimento rostro-cloacal (B) na fase de atividade de início de outono..... 128

Lista de abreviaturas e siglas

CAT	Catalase
CORT	Corticosterona
CS	Citrato sintase
CuZn-SOD	Superóxido dismutase dependende de cobre e zinco
EC-SOD	Superóxido dismutase extracelular
G6PDH	Glicose-6-fosfato-desidrogenase
GCs	Glicocorticoides
GPX	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa transferase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HO•	Radical hidroxila
MDA	Malondialdeído
Mn-SOD	Superóxido dismutase dependende de manganês
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidada
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida
O_2	Oxigênio
O_2^-•	Radical superóxido
PUFA	Ácidos graxo poli-insaturado
RCS	Espécie reativa de carbono
RONS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RS	Espécie reativa

Se-GPX	Glutationa peroxidase dependente de selênio
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
XDH	Xantina desidrogenase
XO	Xantina oxidase
Vmáx	Velocidade máxima

RESUMO

Lagartos teiú eclodem no verão e enfrentam o desafio de crescer e armazenar substratos em um curto período de tempo, antes do início do período de jejum e depressão metabólica (≈80%) a temperaturas amenas durante o inverno (≈17 ºC). No despertar, o aumento do metabolismo e a reperfusão de órgãos favoreceriam a ocorrência de estresse oxidativo. Na primeira parte do presente estudo investigou-se os ajustes que compatibilizam as demandas em teiús neonatos, especialmente na pré-hibernação, por meio da gravação do comportamento em vídeo e da análise da massa dos corpos gordurosos abdominais e do nível plasmático de corticosterona (CORT) durante o primeiro ciclo anual. No início do outono a massa corpórea dos teiús foi 27 g e o comprimento rostro-cloacal 9,3 cm e aumentaram 40% e 20%, respectivamente, ao longo do outono, enquanto que as taxas diminuíram progressivamente até atingirem o valor zero no início do inverno. Na primavera, a massa corpórea dos teiús aumentou 80% em relação ao despertar e dobrou em relação ao final do verão; o comprimento acumulou um aumento de 27% em relação ao final do verão. A massa relativa dos corpos gordurosos foi 3,7% no início do outono e diminuiu nos meses subsequentes; no despertar, este estoque acumulou uma perda de 63% da sua massa. No início do outono 74% dos teiús estavam ativos por 4,7 h e permaneceram 2 h assoalhando diariamente; ao longo do outono o número de animais ativos e o tempo em atividade diminuíram até que todos se tornaram inativos. Na primavera 83% dos teiús estavam ativos por 7 h e permaneceram 4 h assoalhando. Um padrão sazonal similar foi observado na atividade locomotora e na alimentação. No outono, a alimentação cessou antes da atividade diária e os teiús tornaram-se afágicos algumas semanas antes da entrada em hibernação. Os maiores níveis de CORT foram observados no início do outono, reduzindo progressivamente até valores 75 e 86% menores na dormência e despertar, respectivamente; na primavera os níveis de CORT foram 32% menores em comparação com o início do outono. Este padrão sugere um papel da CORT nos ajustes que promovem a ingestão de alimento e a deposição de substratos energéticos no outono. A redução da atividade geral no final do outono contribuiria para a economia energética e manutenção da massa corpórea, apesar da redução da ingestão de alimento. O curso temporal das alterações fisiológicas e comportamentais em neonatos reforça a ideia de que a dormência sazonal nos teiús é o resultado da expressão de um ritmo endógeno. Na segunda parte do estudo foi investigada a hipótese de que ocorreriam ajustes das defesas antioxidantes durante a hibernação, em antecipação ao despertar. Foram analisados marcadores de estresse oxidativo e antioxidantes em vários órgãos de teiús em diferentes fases

do primeiro ciclo anual. A CS, um indicador do potencial oxidante, não variou no fígado e foi menor no rim e no pulmão na hibernação. As enzimas antioxidantes revelaram (1) um efeito abrangente de redução das taxas na hibernação e despertar; por exemplo, GR e CAT foram menores em todos órgãos analisados e a GST tendeu a diminuir no fígado e no rim, embora constante no coração e no pulmão. A G6PDH no fígado e no rim não variou. (2) No fígado, a GST, a Se-GPX e o teor de TBARS foram maiores na atividade de outono em relação à primavera e a Se-GPX permaneceu elevada na hibernação. (3) No fígado, a SOD foi maior na hibernação e despertar em relação ao outono e a Mn-SOD seguiu este padrão. Em contraste, no rim, coração e pulmão a SOD foi menor na hibernação e as taxas se recuperaram no coração e pulmão no despertar. A Mn-SOD seguiu este padrão no pulmão. A concentração e o estado redox da glutationa não variaram no fígado, rim e coração; no pulmão o teor de Eq-GSH e GSH foi menor na hibernação, com tendência à recuperação no despertar. O teor de PC no rim foi maior na hibernação e diminuiu no despertar. No fígado, as alterações no jejum se assemelham às sazonais, como sugerem a inibição da CAT e GR e aumento da Se-GPX. Os efeitos do jejum na primavera no rim diferem dos efeitos sazonais, como sugerem a redução do teor de Eq-GSH e GSH e o aumento da razão GSSG:GSH, a redução da G6PDH e o aumento de PC. No conjunto, houve um efeito predominante de redução das taxas enzimáticas na hibernação e no despertar, exceto pelas taxas aumentadas da SOD e Se-GPX no fígado e pela recuperação da SOD no coração e da GR, SOD e Mn-SOD no pulmão no despertar. As elevadas taxas das enzimas antioxidantes no teiú em comparação a outros ectotermos e a ausência de evidências de estresse oxidativo no despertar sugerem que a atividade enzimática remanescente é suficiente para prevenir danos aos tecidos face às flutuações do metabolismo.

Palavras-chave: antecipação, hibernação, dormência sazonal, sazonalidade, lagarto teiú, *Tupinambis merianae*, corticosterona, lipídios, estresse oxidativo, antioxidantes.

ABSTRACT

The tegu lizards hatch during the summer, when they face the challenge of growing and storing substrates during a short time before going into fasting and metabolic depression (≈80% at 17 ºC) during winter. The reactivation of metabolism and of blood perfusion during arousal could favor the occurrence of oxidative stress in the tissues. The first part of his study investigated adjustments which potentially conciliate energy demands in neonatal tegus, particularly during pre-hibernation, by video recording of animal behavior and by measuring the mass of fat bodies and levels of plasma corticosterone (CORT) during the annual cycle. In the early autumn the body mass of the tegu was 27 g and the rostro-cloacal length was 9.3 cm, which increased 40% and 20%, respectively, while the rates decreased progressively until reach zero in winter. In spring activity body mass increased 80% in relation to values during arousal and duplicated in relation to late summer. The fat bodies mass relative to body mass was 3.7% in early autumn, and decreased during the subsequent months accumulating a mass loss of 63% during arousal. In early autumn, 74% of the tegus were active for 4.7 h and they basked for 2 h daily; during the autumn the number of animals and the time spent in activity decreased until they become totally inactive. In spring 83% of the tegus were active for 7 h and they basked for 4 h daily. Similar seasonal pattern was observed in the locomotory and feeding activities. In the autumn, feeding was interrupted prior to the interruption of daily activity and the tegus were aphagic a few weeks before the entry into hibernation. The CORT level was the highest in early autumn and reduced progressively to 75% and 86% during winter and arousal in early spring, respectively; later during spring the levels were 32% lower than the autumn levels. These changes suggest a role of CORT in the adjustments which promote food intake and substrate storage during the autumn. Despite a reduced food intake, the widespread decrease of daily activities in late autumn would contribute to energy saving and body mass maintenance. The time course of physiological and behavioral changes in neonates reinforces the idea of an endogenous rhythm underlying seasonal dormancy in the tegu. The second part of this study investigated the hypothesis of adjustments in antioxidant system preparatory to the moment of arousal by the analysis of markers of oxidative stress and of antioxidants in several organs of neonatal tegus, during different phases of the annual cycle and during starvation in the spring. The Vmax of CS, an indicator of the oxidative potential, did not vary in the liver and was smaller in the kidney and lung of dormant tegus. The antioxidant enzymes revealed (1) a widespread effect of lowering rates during dormancy and arousal; for instance, GR and CAT were lower in all organs examined and GST had a

tendency to be lower in the liver and in the kidney tissues, although it was constant in the heart and in the lung. (2) In the liver, GST and Se-GPX, and the levels of TBARs were higher in the autumn than in the spring activity. (3) In the liver, SOD was higher during dormancy and arousal in relation to the autumn, and Mn-SOD followed this pattern. Contrastingly, SOD in the kidney, heart and lung was lower during dormancy, and rates recovered in the heart and lung during arousal before food intake. The Mn-SOD followed this pattern in the lung. The glutathione concentration and the redox balance did not change in the liver, kidney and heart; in the lung, the levels of Eq-GSH and GSH were lower and had a tendency to increase during arousal. Importantly, carbonyl proteins were increased in the kidney during dormancy and recovered during arousal. The effects of starvation during spring differed of those of fasting during winter in the kidney, as shown by the lower Eq-GSH levels and increased GSSG:GSH ratio, the lower G6PDH, and the increased carbonyl proteins. In the liver, changes during starvation followed seasonal patterns, as shown by increased Se-GPX, and decreased CAT and GR, together indicating a consistent effect exerted by interruption of food intake. The high rates of antioxidant enzymes in neonatal tegus compared with other ectotherms, and the absence of evidence of oxidative stress at arousal suggest that remaining enzyme activities are sufficient to prevent tissue damage that could be caused by the metabolic fluctuations during the annual cycle in the tegu.

Keywords: hibernation, seasonality, tegu lizard, *Tupinambis merianae*, corticosterone, glucocorticoids, oxidative stress, antioxidants, anticipation, fat stores

1.1. Introdução Geral

A dormência sazonal é um fenômeno de ampla ocorrência nos animais e considerado um dos exemplos mais fascinantes de flexibilidade fenotípica. A dormência sazonal é caracterizada por jejum e uma acentuada depressão das taxas de consumo de O_2, acompanhada de diminuição ou interrupção de diversos processos fisiológicos, e um exemplo clássico deste fenômeno é a hibernação (CAREY; ANDREWS; MARTIN, 2003; GUPPY; WITHERS, 1999; HELDMAIER; ORTMANN; ELVERT, 2004). A sobrevivência durante os meses de jejum e hipometabolismo depende de ajustes metabólicos antecipatórios, que favorecem o armazenamento de substratos energéticos e promovem uma redução coordenada e gradual das taxas de produção e consumo de energia no animal, o que prolonga o tempo de sobrevivência com base nos estoques de nutrientes. Uma vez que a oferta de O_2 no ambiente não é um fator limitante para a maioria dos hibernantes, lipídio é o principal substrato armazenado e posteriormente utilizado como fonte de energia, resultando em variações sazonais marcantes da adiposidade nos hibernantes. Durante o estado hipometabólico a ventilação é interrompida por fases de apneia que podem durar até 20 min, juntamente com uma redução do fluxo sanguíneo em alguns órgãos, e estes ajustes provavelmente resultam em hipóxia nos tecidos (ANDRADE; ABE, 1999; CAREY; ANDREWS; MARTIN, 2003; KUDEJ; VATNER, 2003). No despertar, a reativação do metabolismo e o rápido aumento das taxas de consumo de O_2, juntamente com a reperfusão de órgãos hipoperfundidos, criam condições que favorecem a ocorrência de estresse oxidativo (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002).

O primeiro ciclo anual de um hibernante é potencialmente desafiador, devido à limitação de tempo para crescimento e armazenamento de lipídios antes que a disponibilidade de alimento se torne reduzida no inverno. No caso de animais que armazenam energia no órgão adiposo, um tamanho corpóreo mínimo é necessário para acomodar o aumento da adiposidade. Portanto, a aquisição de energia nos neonatos destina-se, num primeiro momento, aos processos relacionados com o crescimento e, posteriormente, em algum momento do outono deve haver uma mudança na estratégia de alocação de energia de modo a inibir o consumo com crescimento e priorizar o armazenamento na forma de estoques lipídicos. Paralelamente, o sistema de proteção antioxidante deve exibir ajustes que previnem um aumento excessivo de danos a macromoléculas em face da elevada intensidade metabólica desta fase. Diante destas demandas energéticas conflitantes no primeiro ciclo anual de animais

que exibem hibernação, uma multiplicidade de ajustes fisiológicos e comportamentais deve ocorrer de modo a viabilizar a alocação de recursos coordenada no tempo e compatível com a sobrevivência dos jovens até que a alimentação seja retomada na primavera.

Um modelo geral para a sequência temporal dos eventos que dão suporte ao armazenamento de lipídios em mamíferos hibernantes foi proposto por Dark (2005). De acordo com o modelo, uma diminuição da taxa metabólica aproximadamente na metade do verão, antes da diminuição da ingestão de alimento, possibilitaria um aumento acelerado da deposição de lipídios no outono; posteriormente, no final do verão ou início do outono, ocorreria a redução gradual da ingestão de alimento, porém o ajuste metabólico permitiria que a massa corpórea continuasse aumentando até atingir o máximo no fim do outono. No entanto, a relação temporal entre os ajustes fisiológicos e comportamentais que antecedem a hibernação é variável entre espécies de mamíferos (GIROUD et al., 2014; SHERIFF et al., 2013) e possivelmente nos demais grupos de vertebrados. Estas variações reversíveis da adiposidade são controladas por mecanismos endógenos que geram, por vias ainda pouco compreendidas, um aumento do apetite, da ingestão de alimento e de fatores lipogênicos na fase de armazenamento de lipídios; e posteriormente, possibilitam o estabelecimento de um estado de anorexia voluntária e inatividade associado com o a redução progressiva da adiposidade ao longo da dormência sazonal (MROSOVSKY; POWLEY, 1977; SCHWARTZ; HAMPTON; ANDREWS, 2015). Evidências indicam que em hibernantes os hormônios glicocorticoides (GCs) atuariam promovendo a deposição de lipídios durante os meses que antecedem a hibernação (BOSWELL; WOODS; KENAGY, 1994; DALLMAN et al., 1993; DARK, 2005). Este importante componente do fenômeno de hibernação é pouco estudado, particularmente em animais jovens, nos quais a demanda de energia associada ao armazenamento de substratos precisa ser compatibilizada com as demandas do crescimento e manutenção do organismo.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são gerados continuamente por uma variedade de processos celulares e o estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção desses radicais excede a taxa de eliminação pelo sistema de proteção antioxidante (SIES, 1986). As variações da taxa metabólica e do grau de oxigenação dos tecidos criam condições que propiciam um aumento da produção de ROS durante o ciclo anual de hibernantes. Storey (1996) propôs que animais que vivenciam amplas flutuações da taxa de produção de ROS podem exibir um dentre três diferentes padrões de ajuste do sistema de proteção antioxidante: (1) manutenção de níveis de antioxidantes constitutivamente altos de modo que o organismo esteja apto a lidar

com o aumento de ROS a qualquer instante (2) aumento das defesas antioxidantes em resposta ao hipometabolismo, de modo que as defesas estejam prontas em antecipação ao aumento da produção de ROS no despertar e/ou (3) maior resistência ao acúmulo de moléculas danificadas durante o despertar e ênfase nos mecanismos de reparação e eliminação. Evidências a favor da última alternativa são raras e a 'escolha' entre as duas primeiras parece ser determinada pela frequência com que a espécie vivencia o estresse na natureza (STOREY, 1996). Dentre os animais que apresentam dormência sazonal, o segundo padrão é mais frequente que o primeiro (BUZADZIC et al., 1990; EDDY; MCNALLY; STOREY, 2005; PAGE et al., 2010); no entanto, os resultados são altamente espécie- e tecido-específicos e ainda não possibilitam um entendimento mais amplo dos fatores que determinam a 'escolha' do ajuste do sistema de proteção antioxidante na dormência sazonal.

Diversas evidências sugerem um nível elevado de produção de ROS nas fases iniciais do desenvolvimento ontogenético, o que estaria associado à elevada taxa metabólica nesta fase (METCALFE; ALONSO-ALVAREZ, 2010). Estudos que investiguem um possível papel de ajustes do sistema antioxidante em animais juvenis são raros (BAKER; COSTANZO; LEE, 2007). Em hibernantes, a ocorrência de jejum e depressão metabólica durante esta fase do ciclo de vida possivelmente impõe condições limitantes para a sobrevivência dos neonatos. No primeiro ciclo anual pode-se supor que os níveis de produção de ROS seriam elevados, especialmente no outono em decorrência da atividade metabólica aumentada, face às múltiplas demandas do desenvolvimento, crescimento e preparação para os meses de hibernação.

Lagartos teiú *Tupinambis merianae*, comuns no sudeste brasileiro, exibem dormência sazonal no outono e inverno, quando a temperatura média e a umidade relativa do ar são mais baixas. O ciclo anual dos eventos inclui uma fase de preparação para a hibernação, caracterizada por uma redução gradual da atividade e pelo acúmulo de lipídios, seguindo-se uma fase em que a taxas de consumo de O_2 diminuem progressivamente até valores 70-80% menores em relação aos valores de repouso na atividade (MILSOM et al., 2012; SOUZA et al., 2004). Estudos prévios com teiús recém-eclodidos sugerem que o nível de adiposidade no final do outono influencia o momento do início, a duração e a magnitude da depressão metabólica, bem como as chances de sobrevivência dos neonatos (SOUZA et al., 2004). Adicionalmente, os autores observaram que o grau de inibição metabólica no primeiro ciclo anual é maior em animais de menor massa corpórea, com menor capacidade de armazenamento de substratos, provavelmente diminuindo a taxa de mobilização dos estoques

lipídicos e ampliando as chances de sobrevivência dos pequenos neonatos durante o jejum prolongado e o despertar. Em contraste com a hibernação em pequenos mamíferos, que ocorre em baixas temperaturas ambientais (por exemplo, 2-3ºC) e é interrompida por múltiplos episódios de despertar, a hibernação nos teiús ocorre em temperaturas amenas (~17ºC) e aparentemente é um estado contínuo, que se estende ao longo de vários meses. Embora ainda não se conheça a causa evolutiva dos episódios de despertar, várias hipóteses têm sido propostas para explicar o seu significado funcional. Por exemplo, a hibernação confere resistência à isquemia seguida de reperfusão em intestino de mamíferos hibernantes, que seria induzida por um aumento moderado da geração de ROS durante os múltiplos episódios de despertar (KURTZ et al., 2006). A inexistência de ciclos de torpor-despertar (MILSOM et al., 2008) e o estado de dormência a uma temperatura corpórea elevada no teiú levanta a questão sobre como e quando ocorreria a regulação do sistema antioxidante nesses animais, de modo a garantir a viabilidade do organismo ao final dos meses de jejum e hipometabolismo.

Com base no exposto, um dos objetivos do presente estudo foi investigar as alterações no padrão de atividades diárias que compatibilizam as demandas de crescimento e de armazenamento de lipídios durante o primeiro ciclo anual de teiús. Com base no modelo proposto por Dark (2005), as taxas de crescimento e de ganho de massa e a atividade diária foram analisados em diferentes fases do ciclo anual de maneira a testar a hipótese de que o ganho de massa corpórea na segunda metade do outono seria potencializado por uma redução da atividade diária, antes que a ingestão de alimento diminua, acompanhando a inibição do metabolismo característica desta fase (SOUZA et al., 2004). Assim, na segunda metade do outono a energia utilizada para o crescimento dos neonatos seria realocada para a formação de estoques lipídicos, permitindo que os animais alcancem rapidamente os níveis de adiposidade adequados à sobrevivência durante o prolongado jejum na dormência de inverno. Adicionalmente, os níveis de GCs estariam aumentados no outono, em associação com as elevadas taxas de deposição de lipídios. O segundo objetivo do trabalho foi investigar a ocorrência de estresse oxidativo e de ajustes no sistema de proteção antioxidante no primeiro ciclo anual de teiús. As atividades de enzimas antioxidantes, os níveis de glutationa e de marcadores de danos a macromoléculas foram analisados no fígado, rim, coração e pulmão de teiús recém-eclodidos em diferentes fases do ciclo anual. Esta análise teve como hipótese o aumento do potencial do sistema de proteção antioxidante durante a dormência em teiús jovens, assegurando a integridade celular e prevenindo o excessivo aumento do nível de moléculas danificadas no momento do despertar. Devido aos efeitos pró-oxidantes do jejum

(SORENSEN et al., 2006), analisou-se também a hipótese de que a interrupção da alimentação durante a dormência sazonal seria um componente importante da resposta de ajuste sazonal. Ao analisar o sistema de proteção antioxidante e marcadores de dano oxidativo nestes órgãos dos teiús, pretendemos traçar prováveis relações entre as alterações observadas e peculiaridades funcionais dos órgãos no contexto da dormência sazonal, sem o efeito abrangente da redução da temperatura corpórea que acompanha a dormência sazonal na maioria dos estudos com mamíferos hibernantes.

1.2. Revisão de Literatura

1.2.1. Dormência sazonal e regulação da massa corpórea

A habilidade de deprimir a taxa metabólica de repouso é de ampla ocorrência nos animais e pode estar associada à dormência sazonal, como nos casos de estivação e hibernação, ou dissociada da dormência sazonal, como no torpor diário, sono e anidrobiose, extensamente revisados na literatura (CAREY; ANDREWS; MARTIN, 2003; GUPPY; WITHERS, 1999; STOREY; STOREY, 2004). A estivação possibilita que muitos animais, incluindo anuros, peixes e caramujos, sobrevivam a fases de calor e escassez de água. Já a hibernação geralmente está associada aos efeitos combinados de temperaturas reduzidas e escassez de alimento no inverno. Beija-flores e alguns pequenos mamíferos apresentam torpor diário, um estado de hipometabolismo semelhante à hibernação, mas com apenas algumas horas de duração, que está associado à fase do dia na qual a disponibilidade de alimento é reduzida. Tartarugas sobrevivem longos períodos em anóxia, sem acesso ao ar atmosférico, embaixo da camada de gelo que se forma nos lagos durante o inverno. Seja em condições anóxicas ou na presença de oxigênio, a depressão metabólica estende o tempo de sobrevivência dos organismos ao reduzir a demanda de energia e a velocidade de utilização das reservas de substratos. Na maioria dos casos, a taxa metabólica é reduzida para 5–40% da taxa metabólica de repouso, mas alguns organismos como esporos e cistos sofrem depressão metabólica ainda maior e, em muitos casos, a taxa metabólica simplesmente não pode ser detectada, uma condição denominada criptobiose. Deste modo, a redução da velocidade dos processos metabólicos representa uma extensão do tempo biológico e, em alguns casos, a supressão completa e reversível do metabolismo induz um estado ‘ametabólico’, cujo significado seria o ‘escape’ reversível do tempo (CAREY; ANDREWS; MARTIN, 2003; HOCHACHKA; GUPPY, 1987).

A depressão metabólica é um dos aspectos mais importantes do fenômeno de dormência sazonal. A terminologia usada na literatura que trata deste fenômeno varia em função do critério adotado pelo autor, o que a torna redundante e confusa; neste trabalho, o termo ‘hibernação’ foi empregado para designar a dormência que ocorre durante os meses de inverno e o termo ‘estivação’ foi empregado para nomear a dormência durante os meses de verão (DARK, 2005; MILSOM et al., 2012; STOREY; STOREY, 2012). A dormência

sazonal é caracterizada pela presença de dois componentes principais, o jejum e a depressão metabólica, acompanhados de uma diminuição ou interrupção de diversos processos fisiológicos (revisão em HOCHACHKA; GUPPY, 1987). Ao permanecer em jejum o animal obtém economia energética significativa associada com a inibição dos processos de digestão e absorção de nutrientes, além do custo envolvido com a manutenção dos órgãos que participam desses processos. Paralelamente à inibição da taxa dos processos que produzem e consomem energia nas células, há uma inibição da locomoção e uma diminuição das frequências cardíaca e respiratória, da filtração glomerular e da atividade elétrica cerebral. No conjunto, estes ajustem promovem uma redução das taxas de consumo de O_2 na hibernação que pode alcançar 95% em esquilos terrícolas e 80% em lagartos teiú (CAREY; ANDREWS; MARTIN, 2003; SOUZA et al., 2004). Esses ajustes resultam em extensão do tempo de sobrevivência com base nos estoques de nutrientes acumulados na fase de preparação para a dormência.

Diversos animais desenvolveram a habilidade de ‘prever’ fases em que as condições ambientais tornam-se desfavoráveis, ou ótimas, para determinadas funções, por meio de um sistema temporizador interno e da percepção de sinais ambientais cíclicos, tais como fotoperíodo, temperatura e umidade. Alguns ritmos anuais persistem mesmo na ausência destas pistas ambientais, com um período aproximado de 365 dias. Estes ritmos endógenos são denominados ritmos circanuais e são ajustados aos ciclos ambientais através de agentes sincronizadores (FARNER, 1985). Uma das primeiras comprovações da existência de ritmo circanual foi obtida em estudos sobre o ritmo de hibernação em esquilos (PENGELLEY; FISHER, 1963). Esses pesquisadores mantiveram os esquilos isolados durante três anos, em condições constantes de fotoperíodo, temperatura e disponibilidade de alimento. Mesmo nessas condições, os animais apresentaram variações cíclicas de massa corpórea, de consumo de alimento e de hibernação, com um período aproximado de 12 meses. Esses experimentos desmistificaram a ideia de que o animal entra em hibernação em decorrência da indisponibilidade de alimento e das baixas temperaturas ambientais, como uma reação direta e passiva a esses fatores ambientais.

A hibernação em mamíferos consiste de uma sequência de fases de torpor, com duração entre uma a três semanas, intercalada por episódios de despertar, com duração de menos de 24h, quando os animais acordam, elevam a temperatura corpórea e restabelecem todas as funções fisiológicas. Este padrão de hibernação pode ainda ser dividido em quatro fases: entrada em torpor, manutenção do torpor, despertar e eutermia. Estas quatro fases se

repetem ao longo dos meses de hibernação, até o momento em que o animal retoma a eutermia e não mais ingressa em torpor. Este padrão de hibernação consome substancialmente mais energia quando comparado à dormência sazonal contínua, apresentada por ursos e certas espécies de anfíbios e répteis. Na marmota, 72% da energia consumida durante toda a hibernação é gasta no momento do despertar (17%) e durante os períodos de eutermia (57%) (HELDMAIER; ORTMANN; ELVERT, 2004). A importância fisiológica dos episódios de eutermia ainda não é conhecida e a resposta para esta questão permanece como um dos grandes desafios para os estudiosos do fenômeno de hibernação (VAN BREUKELEN; MARTIN, 2015). Especula-se que os episódios de despertar tenham um papel no reconhecimento de patógenos e iniciação de resposta imune, além de reposição de mRNAs e proteínas degradados durante o hipometabolismo (PRENDERGAST et al., 2002; VAN BREUKELEN; MARTIN, 2015). Além disso, tem sido proposto que os episódios de despertar possam estar relacionados com um prolongamento do ritmo circadiano, ou ainda com mudanças na concentração de metabólitos, seja a depleção de fatores críticos para manutenção do torpor ou acúmulo de fatores inibitórios do torpor (VAN BREUKELEN; MARTIN, 2015). Nos mamíferos, a entrada em hibernação é caracterizada pela redução em uníssono das frequências cardíaca e ventilatória e da taxa metabólica que, associadas a ajustes hipotalâmicos, contribuem para uma acentuada redução da temperatura corpórea. Durante as fases de torpor, a temperatura corpórea destes animais é regulada num novo patamar que se situa 2 a 3 ºC acima da temperatura do abrigo, e pode chegar a valores tão baixos quanto 0 ºC, de modo que a contribuição do efeito termodinâmico para a redução do metabolismo parece ser predominante (HELDMAIER; ORTMANN; ELVERT, 2004; STOREY; STOREY, 2004). Em contraste com hibernantes clássicos, outros animais apresentam depressão metabólica de magnitude semelhante a temperaturas corpóreas relativamente altas (HELDMAIER; ORTMANN; ELVERT, 2004). Os lagartos teiú *Tupinambis merianae*, da América do Sul, apresentam dormência sazonal nos meses de inverno tropical a temperaturas amenas, por volta de 17 – 20 ºC (SOUZA et al., 2004). Os lêmures *Cheirogaleus mudius*, da ilha de Madagastar, hibernam no interior dos ocos das árvores por até 7 meses, apesar de temperaturas ambientais que podem alcançar até 30 ºC durante o dia (DAUSMANN et al., 2005). Nestes primatas parece haver uma maior contribuição de mecanismos intrínsecos e menor influência do efeito termodinâmico de redução da temperatura corpórea para a inibição metabólica do que o observado em pequenos roedores. Os mecanismos intrínsecos podem consistir em expressão gênica diferencial ou alterações pós-tradução de proteínas enzimas que

contribuem para a inibição das taxas de consumo e produção de energia nas células (STOREY; STOREY, 2004).

O ciclo anual de um hibernante adulto típico, como o esquilo terrícola e o lagarto teiú, pode ser dividido em três fases: (1) uma fase de aumento da massa corpórea devido ao armazenamento de substratos, geralmente iniciada na primavera ou no verão após o final da atividade reprodutiva; (2) uma fase de perda de massa corpórea, que começa no final do verão ou início do outono e é caracterizada pela imergência do animal em tocas e início da hibernação; (3) e a fase reprodutiva na primavera (DARK, 2005). Na maioria dos casos de hibernação e estivação a oferta de oxigênio (O_2) no ambiente não é um fator limitante ao metabolismo e os lipídios são o principal substrato armazenado, de modo que estes animais apresentam amplas variações da adiposidade ao longo do ano. Esquilos, por exemplo, dobram sua massa corpórea e triplicam a massa do tecido adiposo branco durante a fase que antecede a dormência (CAREY; ANDREWS; MARTIN, 2003; DARK, 2005). Lagartos teiú jovens, em crescimento, armazenam cerca de 3% da massa corpórea na forma de lipídios em corpos gordurosos abdominais, além do depósito subcutâneo na cauda (SOUZA et al., 2004), e a quantidade de gordura armazenada possivelmente é ainda maior nos animais adultos, dado que possuem um maior volume corpóreo relativamente à massa. Em ambos exemplos citados, o armazenamento de grande quantidade de lipídios na fase que antecede a dormência sazonal é um evento rigorosamente controlado, através de uma série de ajustes da fisiologia e do comportamento que ainda não são completamente compreendidos e parecem variar de acordo com os diferentes compromissos envolvidos na história de vida das espécies.

Antes do primeiro inverno, animais hibernantes neonatos precisam não somente acumular reservas energéticas em quantidade suficiente para sobreviver aos meses de jejum e depressão metabólica, mas também sustentar o processo de crescimento e desenvolvimento ontogenético. O processo de crescimento estrutural é um dos maiores desafios no início da vida do indivíduo e pode ter consequências importantes para o valor adaptativo do adulto (DMITRIEW, 2011). No caso de animais que armazenam energia na forma de lipídios no órgão adiposo, um tamanho corpóreo mínimo é necessário para acomodar o aumento da adiposidade. Portanto, em algum momento do outono deve haver uma mudança na estratégia de alocação de energia de modo a inibir o consumo com crescimento e priorizar o armazenamento na forma de estoques lipídicos. Uma evidência indireta deste compromisso é a correlação negativa entre taxa de crescimento e a quantidade de reservas energéticas na cobra *Vipera berus* (FORSMAN; LINDELL, 1991). Deste modo, os hibernantes precisam

otimizar a alocação diferencial de energia e tempo para os processos de crescimento, armazenamento de lipídios, bem como manutenção do organismo durante os meses de verão e outono, de modo a atingir um tamanho e composição corpóreos adequados até o momento do início da hibernação.

O tamanho corpóreo no início da hibernação é um importante determinante da probabilidade de sobrevivência à hibernação e a massa corpórea necessária para sobreviver à hibernação depende de fatores como a temperatura no hibernáculo, duração da fase de hibernação e, para algumas espécies, a disponibilidade de alimento no momento da emergência da hibernação (PILASTRO; GOMIERO; MARIN, 1994). Em mamíferos, os fatores que influenciam mais fortemente a massa corpórea no início da hibernação parecem ser a massa corpórea no momento do nascimento, a taxa de crescimento e a duração da fase ativa (ALLAINÉ; GRAZIANI; COULON, 1998; WOODS; ARMITAGE, 2003). Em roedores da espécie *Glis glis*, a massa corpórea dos filhotes correlaciona-se positivamente com a massa corpórea da mãe e negativamente com o tamanho da ninhada; no início da hibernação, os filhotes que nasceram mais tarde na estação ativa pesam menos que aqueles que nasceram mais cedo (PILASTRO; GOMIERO; MARIN, 1994). Além disso, o momento do nascimento dos filhotes parece estar relacionado com a condição corporal das fêmeas; fêmeas com condição corporal ruim postergam a gravidez e a lactação ocorre quando a disponibilidade de alimento no ambiente é máxima, enquanto que fêmeas com boa condição corporal se reproduzem antes e perdem peso durante a lactação, porém elas e seus filhotes têm mais tempo para desfrutar de condições ambientais favoráveis antes da hibernação. Evidências sugerem que esquilos hibernantes apresentam taxas de desenvolvimento mais elevadas em comparação com espécies não hibernantes, o que teria uma importância adaptativa já que estes animais precisam crescer rápido e armazenar uma quantidade adequada de gordura em um intervalo de tempo muito restrito de modo a sobreviver ao período de inatividade e jejum (CLARK, 1970). Fatores ambientais tais como a qualidade e a disponibilidade do alimento também afetam o crescimento de hibernantes jovens, no entanto, fatores internos como um ritmo endógeno, parecem ser de grande influência na definição do momento da interrupção da ingestão de alimento e do crescimento. Filhotes de marmota interrompem o crescimento cerca de duas semanas antes da hibernação mesmo na presença de alimento fornecido artificialmente, sugerindo a existência de um controle endógeno (WOODS; ARMITAGE, 2003).

Um modelo dos eventos que favorecem o acúmulo de lipídios em hibernantes adultos

foi proposto por Dark (2005) segundo o qual as alterações de taxa metabólica (TM), ingestão de alimentos e massa corpórea são ligeiramente dessincronizadas no ciclo anual (DARK, 2005). Na primavera e no início do verão a ingestão de alimento e a TM são intensas e uma diminuição da TM aproximadamente na metade do verão, antes da diminuição da ingestão de alimentos, possibilita um aumento acelerado da deposição de lipídios. No final do verão ou início do outono ocorre redução da ingestão alimentar, antes que a massa corpórea atinja o máximo, geralmente observado no fim do outono. Na primavera, quando os animais despertam, a TM eleva-se antes que a ingestão de alimentos seja restabelecida e ocorre diminuição da massa corpórea mesmo após o início da alimentação (Fig. 1.1). Embora ingestão alimentar, TM e massa corpórea sejam supostamente controladas por um temporizador endógeno, o controle da massa corpórea parece ser a função crítica e os outros dois processos, subservientes (DARK, 2005). Uma notável semelhança foi observada na sequência temporal destes eventos em pequenos mamíferos e em lagartos teiú, ressaltando a importância da fase de antecipação e de mecanismos reguladores dos níveis de adiposidade na preparação para a hibernação (SOUZA et al., 2004). A análise sistemática das variações sazonais da ingestão de alimento, gasto energético e adiposidade em diferentes espécies e contextos pode fornecer importantes informações sobre as semelhanças ou divergências deste modelo proposto na literatura, possibilitando o estabelecimento de relações com aspectos da ecologia e história de vida dos animais. Em particular, os eventos que dão suporte à formação de estoques energéticos são pouco compreendidos em animais jovens, nos quais esta demanda precisa ser compatibilizada com a demanda do crescimento e desenvolvimento ontogenético.

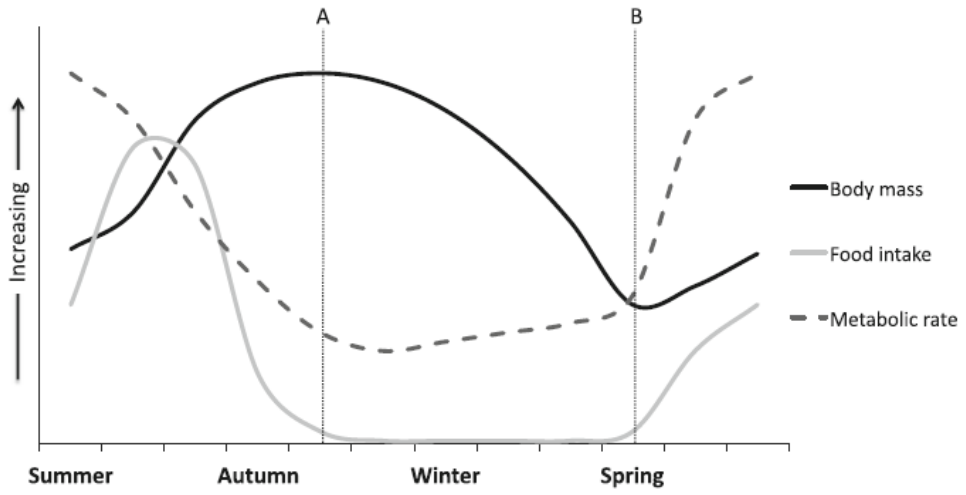

Figura 1.1 – Esquema geral simplificado do ciclo anual da massa corpórea, ingestão de alimento e metabolismo em um roedor hibernante de laboratório. A, início da hibernação; B, final da hibernação. Fonte: Florant e Healy (2011).

A ideia de que as alterações da massa corpórea em animais hibernantes são produto de uma mudança programada do nível ideal de adiposidade não é recente. Há mais de 35 anos foi proposto que as variações anuais da massa corpórea em animais hibernantes eram o resultado de um mecanismo que estabeleceria um ponto de regulação diferente (‘sliding set-point’) para cada momento do ciclo anual, provavelmente regulado pelo hipotálamo (MROSOVSKY; POWLEY, 1977). Lesões cerebrais que produzem obesidade em ratos de laboratório também aumentam a massa corpórea em hibernantes, mas o ciclo anual de deposição de gordura persiste (BARNES; MROSOVSKY, 1974). Esquilos terrícolas submetidos à remoção cirúrgica de porções substanciais do tecido adiposo na fase de ganho ou perda de massa recuperam a massa corpórea até níveis apropriados para o momento do ciclo anual dois meses depois (DARK; FORGER; ZUCKER, 1984). Em contraste, após três meses, ratos não recuperam o tecido adiposo removido cirurgicamente e manifestam somente recuperação parcial após seis meses (FAUST; JOHNSON; HIRSCH, 1979 apud DARK; FORGER; ZUCKER, 1984). Em conjunto, estes estudos evidenciam que os ciclos anuais de deposição e mobilização de lipídios em animais que apresentam dormência sazonal são rigidamente controlados e defendidos, provavelmente por um mecanismo central que se utiliza de um sinal proveniente do órgão adiposo que informa a quantidade total de reservas e, desta forma, possibilita o ajuste da adiposidade do animal ao momento de seu ciclo anual de atividades. Estudos recentes fornecem informações acerca dos mecanismos que geram este ‘ponto de regulação’ e que controlam o balanço energético em hibernantes, porém o mecanismo neural endógeno que aumenta e posteriormente reduz o apetite em hibernantes ainda não foi elucidado (FLORANT; HEALY, 2011). O conhecimento nesta área com animais hibernantes não acompanhou o ritmo do avanço com animais de laboratório, muito em função da dificuldade em se estudar animais de genoma e transcriptoma desconhecidos, sobretudo quando se trata de ectotermos. Por outro lado, diversos estudos nas últimas décadas mostraram que a regulação periférica dos mecanismos lipogênicos e lipolíticos em adipócitos é o resultado do balanço entre fatores que promovem o armazenamento de lipídios (insulina, enzimas lipogênicas) e aqueles que promovem a sua liberação (catecolaminas, enzimas lipolíticas) (revisão em DARK, 2005). Além destes fatores, os glicocorticóides (GCs) são hormônios importantes na regulação do fluxo de energia nos adipócitos (PECKETT; WRIGHT; RIDDELL, 2011). Embora sejam mais prontamente lembrados como hormônios que promovem mobilização de energia em situações de emergência, tem sido proposto que níveis basais aumentados de GCs atuariam sinergicamente com a insulina, promovendo a deposição de lipídios durante os meses que antecedem a hibernação (BOSWELL; WOODS;

KENAGY, 1994; DALLMAN et al., 1993; DARK, 2005). Além disso, há fortes evidências de que sinais endócrinos provenientes do tecido adiposo branco, como a leptina, estão envolvidos na regulação do metabolismo energético também em hibernantes e esta é uma área de pesquisa de grande efervescência nos últimos anos (revisão em FLORANT; HEALY, 2011).

A leptina é um hormônio peptídico de 16kDa, sintetizado principalmente nos adipócitos e, em roedores de laboratório, a sua concentração plasmática é positivamente relacionada à quantidade de lipídios depositados no tecido adiposo branco (ZHANG et al., 1994). Embora esteja envolvida na regulação de diversos processos, como reprodução, termogênese e resposta imune, sua função mais proeminente em roedores de laboratório é a regulação da ingestão de alimento e do gasto energético e, no geral, níveis elevados de leptina resultam em diminuição da ingestão de alimentar, aumento do gasto energético e diminuição adiposidade (AHIMA; FLIER, 2000); assim, em roedores de laboratório este hormônio atuaria de modo a 'defender' o nível de adiposidade do animal em um patamar relativamente estável através, principalmente, da sua atuação em núcleos hipotalâmicos.

Embora a quantidade de estudos ainda seja reduzida, diferentes tipos de ajustes no modo de secreção e atuação da leptina têm sido observados em animais que apresentam variações sazonais da adiposidade, o que tem estimulado a formulação de hipóteses sobre a sua função ancestral (COPELAND et al., 2011; HUKSHORN; SARIS, 2004; SCHRADIN et al., 2014). A concentração plasmática de leptina exibe uma correlação positiva com o aumento da massa adiposa e tamanho do adipócito em marmotas (FLORANT et al., 2004). A resistência aos efeitos da leptina pode ser consequência de deficiências no transporte do hormônio, na expressão dos receptores ou na sinalização intracelular, permitindo que animais sazonais se esquivem do efeito anorexigênico da leptina e alcancem a adiposidade necessária para sobreviver à dormência. Em contraste, em morcegos e em lagartos hibernantes observou-se uma diminuição da secreção de leptina na fase de aumento da massa adiposa, indicando que o sinal anorexigênico da leptina encontra-se ausente na fase de aumento da adiposidade (KRONFELD-SCHOR et al., 2000; PAOLUCCI; ROCCO; VARRICCHIO, 2001; SPANOVICH; NIEWIAROWSKI; LONDRAVILLE, 2006). A existência de um mecanismo de dissociação destes eventos permitiria a manutenção da ingestão de alimentos e diminuição da taxa metabólica, favorecendo o acúmulo de lipídios.

A ausência de uma relação positiva entre os níveis de adiposidade e de leptina também foi observada em animais não hibernantes, como o roedor africano *Rhabdomys*

pumilio (SCHRADIN et al., 2014), levando à formulação de hipóteses para explicar o modo de atuação da leptina nos animais em que este tipo de regulação ocorre. De acordo com a 'hipótese ecológica' proposta por Schradin et al. (2014), em um contexto com estações com baixa disponibilidade de alimento, no qual o armazenamento de lipídios é importante para a sobrevivência do animal, os níveis de leptina podem estar dissociados da quantidade de tecido adiposo. Segundo o autor, espécies que vivem em ambientes com flutuações sazonais da disponibilidade de alimento teriam baixos níveis de leptina quando a disponibilidade de alimento for alta, mesmo que o nível de adiposidade do animal já esteja elevado, possibilitando o armazenamento adicional de lipídios e aumentando as chances de sobrevivência na estação com baixa disponibilidade de alimento; em contraste, os níveis de leptina seriam altos na estação com baixa disponibilidade de alimento, de modo a inibir o comportamento de busca de alimento. Portanto, sugere-se que a leptina não seria uma molécula anti-obesidade, mas sim um importante sinal nos ciclos alimentação-jejum, e que o seu papel principal seria evitar a morte por inanição (HUKSHORN; SARIS, 2004). Ao longo da evolução, adaptações ao jejum foram favorecidas na medida em que aumentam a taxa de sobrevivência dos animais que habitam ambientes sujeitos à variação da disponibilidade de alimentos. Há evidências mostrando que camundongos e peixes submetidos a jejum apresentam diminuição da concentração de leptina plasmática; nos dois casos, a diminuição dos níveis deste hormônio ocorre sem uma diminuição correspondente da adiposidade, indicando uma dissociação entre as duas variáveis (AHIMA; FLIER, 2000; JOHNSON; JOHNSON; LONDRAVILLE, 2000).

Os mecanismos envolvidos no controle da saciedade e na manutenção do estado de anorexia voluntária em hibernantes ainda não são conhecidos e têm sido alvo de muitos estudos recentes (FLORANT; HEALY, 2011). Parte das dificuldades enfrentadas resulta da diversidade de estratégias de história de vida empregadas pelos animais. Por exemplo, algumas espécies se mantêm completamente afágicas durante toda a estação de hibernação e consomem somente as reservas energéticas endógenas; outras espécies utilizam as fases de eutermia para ingerir alimento estocado no interior do hibernáculo (FLORANT; HEALY, 2011). Em esquilos terrícolas, a análise do transcriptoma hipotalâmico durante a atividade de outono mostrou que diversos genes associados com o comportamento alimentar e obesidade são hiper-regulados no final do outono, quando os animais encontram-se hipofágicos, em comparação com animais hiperfágicos no início do outono, dentre eles o gene que codifica o receptor de leptina (SCHWARTZ; HAMPTON; ANDREWS, 2015). Adicionalmente,

observou-se um aumento da concentração plasmática de leptina na fase hipofágica e o conjunto das evidências levou os autores a sugerir um papel da leptina como um sinal de saciedade, que promoveria interrupção da ingestão de alimento no final do outono. Adicionalmente, evidências indicam a atuação de outros hormônios na regulação sazonal da massa corpórea e do comportamento alimentar, como grelina e GCs, além de nutrientes como ácidos graxos livres (FLORANT; HEALY, 2011).

1.2.2. Papel dos glicocorticoides na dormência sazonal

Glicocorticoides (GC) são hormônios esteroides produzidos no córtex da glândula supra-renal (SHERWOOD; KLANDORF; YANCEY, 2005). A síntese e a liberação de GC são estimuladas pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cuja liberação é estimulada pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e pela arginina vasopressina (AVP), peptídeos produzidos no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. Este eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA) é ativado pelo estresse (físico ou psicológico) através de projeções de várias outras regiões cerebrais para o PVN. O eixo HPA de vertebrados é um sistema fisiológico com estrutura e função muito conservados, o que é atribuído ao papel central que este sistema desempenha, mediando a resposta adaptativa dos organismos às alterações ambientais previsíveis e imprevisíveis (DENVER, 2009). O principal GC em humanos e peixes é o cortisol, enquanto em ratos, camundongos, aves, répteis e anfíbios é a corticosterona (CORT). Os GCs, juntamente com as catecolaminas, estão envolvidos na resposta a situações de estresse em todos os vertebrados, no entanto, exceto por alguns efeitos comportamentais rápidos, os GCs demoram minutos a horas para exercerem seus efeitos fisiológicos através de regulação da transcrição de genes, enquanto as catecolaminas atuam de forma mais imediata (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Os principais efeitos metabólicos de GCs são o aumento das taxas de catabolismo de proteínas e lipídios e da gliconeogênese hepática e inibição da captação de glicose pelos tecidos periféricos, o que resulta em um aumento da concentração plasmática de glicose. GCs também atuam no cérebro aumentando o apetite, o comportamento de busca por alimento e a atividade locomotora, assim, regulando comportamentos que controlam o gasto e a aquisição de energia.

Eventos ou condições que ameaçam a sobrevivência do animal podem ocorrer de maneira previsível (como o inverno) ou imprevisível (como um predador) e os animais respondem a estes dois tipos de desafio com ajustes distintos do comportamento e da fisiologia. Segundo McEwen e Wingfield (2003) o conceito de alostase enfatiza o processo através do qual a fisiologia dos organismos é ajustada em face de mudanças ambientais. Estes autores sugeriram que as catecolaminas e os GCs seriam importantes mediadores da alostase, ao atuarem regulando processos comportamentais e fisiológicos de acordo com três estados fisiológicos, denominados 'A', 'B' e 'C', conforme a Figura 1.2 abaixo (revisão em LANDYS; RAMENOFSKY; WINGFIELD, 2006).

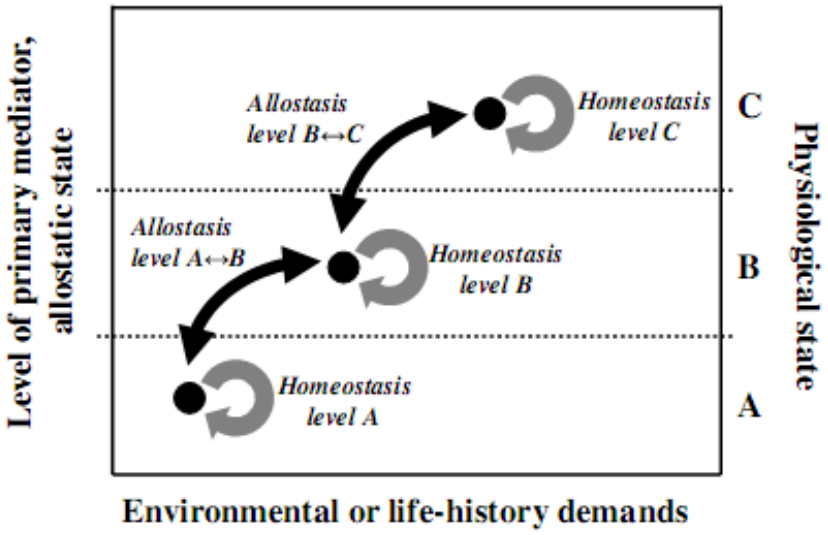

Figura 1.2 – Estados fisiológicos e níveis de mediadores primários (catecolaminas, citocinas e GCs) frente a diferentes demandas da história de vida. Fonte: Landys, Ramenofsky e Wingfield (2006).

De acordo com este modelo, o estado fisiológico 'A' é caracterizado pelo animal em repouso e na ausência de estressores, no qual a ação destes hormônios mantêm os sistemas internos em nível basal de modo a sustentar as exigências básicas da vida. A secreção constitutiva de GCs no estado 'A' é importante para funções básicas como balanço hidromineral e fornecimento de glicose para as células. O estado fisiológico 'B' é caracterizado por uma carga alostática associada com mudanças previsíveis no ambiente ou fases da história de vida (migração, hibernação, reprodução) nas quais os sistemas fisiológicos operam em um patamar aumentado e uma concentração aumentada de GCs teria a função de mediar os ajustes fisiológicos necessários. Uma vez que tais demandas podem ser antecipadas ou os animais possuem em seu repertório a capacidade de apresentar ajustes, elas não representam estímulos nocivos. Sobreposto ao estado fisiológico B, estaria o estado 'C', o

qual é deflagrado por eventos imprevisíveis tais como um encontro com um predador, infecções e instabilidade social; nestas situações, a carga alostática excede a habilidade imediata dos animais de lidar com estes desafios e as respostas hormonais mediariam os ajustes necessários à sobrevivência. Nestas circunstâncias, ocorre aumento da concentração de GCs de níveis basais até níveis máximos dentro de minutos após uma ameaça (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). No estado 'C', alguns dos efeitos metabólicos de GCs incluem um aumento da gliconeogênese hepática, inibição da captação de glicose por tecidos periféricos, causando mobilização da energia e seu direcionamento para os músculos, além de mudanças fisiológicas e comportamentais como a inibição da reprodução dado que os recursos são predominantemente usados para a manutenção e sobrevivência (ROMERO; DICKENS; CYR, 2009; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Estes ajustes comportamentais e fisiológicos a estímulos nocivos são altamente conservados entre os vertebrados e tem sido estudados extensivamente ao longo dos últimos anos (revisão em SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Por outro lado, embora existam diversas evidências da ação de GCs nos estados fisiológicos 'A' e 'B', esta área tem sido pouco explorada e o conhecimento ainda é repleto de lacunas. Os efeitos distintos dos GCs podem resultar da concentração do hormônio e de sua ligação a diferentes populações de receptores. Evidências sugerem a existência de pelo menos três tipos de receptores de GCs: receptores de baixa afinidade (GR), receptores de alta afinidade (MR) e um receptor não-genômico associado à membrana (mGR); aparentemente, MR satura em concentrações baixas de GCs, enquanto níveis mais altos são necessários para ocupar GR (LANDYS; RAMENOFSKY; WINGFIELD, 2006).

Embora sejam mais prontamente lembrados como hormônios que promovem mobilização de energia em situações de emergência, sabe-se que GCs desempenham funções anabólicas em mamíferos (DALLMAN et al., 1993; ROMERO, 2002). Estudos sobre a variação sazonal dos níveis plasmáticos de GCs em hibernantes (estado fisiológico 'B') sugerem que níveis basais aumentados destes hormônios atuariam sinergicamente com a insulina, promovendo a deposição de lipídios durante os meses que antecedem a hibernação (BOSWELL; WOODS; KENAGY, 1994; DALLMAN et al., 1993; DARK, 2005). Porém, padrões conflitantes foram observados e não se pode descartar a hipótese de que a perturbação gerada pela manipulação do animal tenha influenciado alguns resultados (ARMITAGE, 1991; BOONSTRA et al., 2001; BOSWELL; WOODS; KENAGY, 1994; ROMERO; REED, 2005). Por este motivo, serão citados a seguir apenas estudos nos quais a coleta do sangue foi

realizada no intervalo de 3 min a partir do momento da captura do animal. Na cobra *Thamnophis sirtalis parietalis* a concentração basal de CORT é maior no verão, juntamente com o maior índice de condição corporal, e ambos diminuem no outono antes da entrada em hibernação (MOORE et al., 2000). No esquilo do gênero *Tamias* níveis aumentados de GCs foram observados nos meses que antecedem a hibernação (KENAGY; PLACE, 2000; PLACE; KENAGY, 2000), do mesmo modo que em esquilos terrícolas (NUNES et al., 2006) e no pequeno morcego marrom (REEDER et al., 2004). A variação sazonal dos níveis de GCs em esquilos aparentemente consiste em um ritmo circanual, gerado por um temporizador endógeno (NUNES et al., 2006). No conjunto, estes dados fortemente sugerem um papel de GCs na fase de armazenamento de reservas energéticas que antecede a hibernação, muito embora a natureza fisiológica desta relação não seja conhecida.

Um dos prováveis mecanismos através dos quais os GCs favoreceriam o aumento da adiposidade seria o aumento da ingestão de alimento. Em ratos selvagens, a adrenalectomia diminui a ingestão alimentar e este efeito pode ser revertido com a administração de baixas doses de CORT (CASTONGUAY, 1991). Em ratos que não expressam o gene da leptina, a adrenalectomia causa redução da ingestão de alimento até um nível inferior ao observado nos ratos selvagens e reverte o fenótipo obeso, em parte devido a uma recuperação da expressão de genes relacionados com o controle do apetite no hipotálamo (MAKIMURA et al., 2000). Adicionalmente, a adrenalectomia aumenta a sensibilidade à leptina e à insulina em ratos selvagens (CHAVEZ et al., 1997; ZAKRZEWSKA et al., 1997). A interação de GCs com a insulina é complexa e, de uma forma geral, enquanto GCs aumentam a motivação para a alimentação, a insulina modula a escolha do alimento para uma maior preferência por alimentos gordurosos (DALLMAN et al., 2007; LA FLEUR, 2006; LA FLEUR et al., 2004).

Devido à multiplicidade de funções que os GCs exercem no organismo, níveis aumentados destes hormônios na fase que antecede a hibernação podem desencadear diferentes efeitos, além do aumento da ingestão alimentar e da taxa de deposição de lipídios. Por exemplo, os GCs modulam o comportamento termorregulatório em répteis, de modo que níveis aumentados de CORT aumentam a procura por fontes de calor (PREEST; CREE, 2008) ou por locais de resfriamento (BELLIURE; CLOBERT, 2004), dependendo da espécie. Por outro lado, a concentração plasmática de CORT aumenta em répteis cuja temperatura corpórea encontra-se elevada (TELEMECO; ADDIS, 2014; WOODLEY et al., 2003), ou baixa (DUPOUÉ et al., 2013). No conjunto, esses dados sugerem uma relação bidirecional entre os GCs e a temperatura corpórea em répteis. Adicionalmente, vários estudos têm

mostrado uma correlação positiva entre os níveis de GCs e a intensidade da atividade locomotora em diversos vertebrados (BELLIURE; CLOBERT, 2004; revisão em LANDYS; RAMENOFSKY; WINGFIELD, 2006). Frente às evidências da literatura, é provável que a CORT desempenhe uma função abrangente na coordenação dos ajustes comportamentais e fisiológicos no ciclo diário e anual dos vertebrados.

Em muitos vertebrados os níveis basais de GCs exibem um padrão diário de variação e as maiores concentrações são observadas pouco antes do início da fase ativa (revisão em DICKMEIS; WEGER; WEGER, 2013). Uma maior concentração de GCs nos momentos do ciclo diário que antecedem o início da atividade seria importante ao preparar o organismo para o aumento da demanda de energia e para o enfrentamento de estressores. O mesmo argumento tem sido usado para justificar as variações sazonais deste hormônio (ROMERO, 2002; LANDYS; RAMENOFSKY; WINGFIELD, 2006). Sugere-se que GCs sejam importantes mediadores de ajustes fisiológicos em fases do ciclo anual caracterizadas por uma elevada demanda energética e/ou por uma probabilidade elevada de exposição a estressores, como durante a fase reprodutiva, a migração e pré-hibernação. Esta justificativa é coerente com a 'hipótese preparatória' e também com a 'hipótese metabólica', propostas por Romero (2002), para explicar a função adaptativa das variações sazonais de GCs em diversos contextos. A 'hipótese preparatória' propõe que níveis aumentados de GCs ocorreriam na fase do ano com maior probabilidade de ocorrência de situações adversas, desencadeando ajustes regulatórios das respostas cardiovascular, imune, cognitiva e metabólica ao estresse. De acordo com a 'hipótese metabólica', dada a função de GCs na mobilização de energia, principalmente em situações de ameaça, os níveis de GCs seriam maiores em fases de maior demanda energética. Por fim, a 'hipótese comportamental' propõe que as variações anuais dos níveis de GCs resultariam de diferentes necessidades de expressar (ou não expressar) comportamentos mediados por GCs em diferentes momentos do ciclo anual. Segundo Romero (2002), as três hipóteses acima provavelmente contribuem para as variações sazonais do nível de GCs em diferentes espécies e contextos (migração, reprodução, hibernação), mas a contribuição relativa de cada uma delas deve ser diferente em diferentes espécies.

De acordo com as hipóteses acima, concentrações sazonalmente aumentadas de GCs supostamente foram favorecidas evolutivamente por conferirem uma vantagem ao animal em determinadas fases. No entanto, nos vertebrados, concentrações cronicamente aumentadas de GCs (associadas ao estado fisiológico C, seja devido a estresse crônico, administração farmacológica ou na síndrome de Cushing), estão associadas a um aumento da

susceptibilidade a patologias e redução do valor adaptativo em populações naturais (COSTANTINI; MARASCO; MØLLER, 2011). Diversas evidências sugerem que a etiologia que associa os níveis cronicamente aumentados de GCs ao aumento da susceptibilidade a diversas patologias seria o aumento do estresse oxidativo (MCINTOSH; SAPOLSKY, 1996; SATO et al., 2010; YOU et al., 2009). Embora a natureza da interação entre GCs e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ainda não seja completamente compreendida, estas evidências sugerem que GCs podem afetar a geração de ROS bem como o sistema antioxidante. Por exemplo, no rato, o estresse induzido por imobilização induz um aumento da geração de ROS e diminui a produção de antioxidantes, o que pode ser atenuado pela administração de glutationa (LIU; WANG; MORI, 1994). Em cultura de células de neurônios do hipocampo, uma região com elevada concentração de receptores para GCs, níveis fisiológicos de GCs aumentam a concentração de ROS e potencializam a toxicidade de uma droga que induz a formação de ROS (MCINTOSH; SAPOLSKY, 1996). De acordo com a meta-análise de Costantini, Marasco e Møller (2011), embora existam evidências contra e a favor do efeito pró-oxidante de GCs, as evidências a favor significativamente mais fortes e sugerem uma relação entre o estrese fisiológico e o estresse oxidativo.

1.2.3. Sazonalidade, espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes

1.2.3.1. Espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes

Um dos grandes acontecimentos na história da vida na terra foi o surgimento da capacidade de usar o O_2 no processo de geração de energia (revisão em STAMATI; MUDERA; CHEEMA, 2011). No entanto, este acontecimento veio acompanhado da desvantagem da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), a qual impõe um custo elevado para o organismo, dado que ROS podem danificar macromoléculas e ameaçar a viabilidade celular. Neste cenário, acredita-se que defesas antioxidantes tenham aparecido antes do aumento da concentração de O_2 na atmosfera e, posteriormente, estas foram mantidas e aprimoradas pela seleção natural em decorrência da vantagem seletiva que conferiram aos organismos (STAMATI; MUDERA; CHEEMA, 2011). Mais que isso, os organismos se adaptaram e evoluíram para utilizar estas moléculas ‘nocivas’ em seu benefício como moduladores químicos de um grande número de processos vitais relacionados com o metabolismo energético, respostas ao estresse, apoptose, inflamação e detecção de O_2 (revisão

em SENA; CHANDEL, 2012). ROS são gerados continuamente por uma variedade de processos celulares e o estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção desses radicais excede a taxa de eliminação pelo sistema de proteção antioxidante (SIES, 1986); implícito nesta definição está que o estresse oxidativo é uma variável contínua que nunca é zero. O compromisso entre os custos e os benefícios da geração aeróbica de energia e da geração de ROS é um tópico interessante que permeia diversas áreas da biologia (ISAKSSON; SHELDON; ULLER, 2011; MONAGHAN; COSTANTINI, 2014; PAMPLONA; COSTANTINI, 2011).

O termo ‘espécie reativa’ (RS) ou ‘radical livre’, é usado para nomear qualquer átomo ou molécula com um elétron não pareado na camada eletrônica mais externa. O oxigênio diatômico (O_2) é um radical livre com dois elétrons de spins paralelos não pareados e, em concentração elevada, é tóxico. O termo ‘espécie reativa de oxigênio’ (ROS) é geralmente usado para se referir a uma molécula, radical ou não-radical, que contém oxigênio, capaz de iniciar uma reação deletéria. Os oxidantes derivados do óxido nítrico (NO) são chamados ‘espécies reativas de nitrogênio’ (RONS). Adicionalmente, a oxidação de carboidratos e lipídios (particularmente ácidos graxos poli-insaturados, PUFA) origina um novo tipo de radical denominado ‘espécie reativa de carbono’ (RCS). RCS têm uma meia vida da ordem de minutos e horas, muito maior em comparação com ROS e RONS os quais têm uma meia vida da ordem de microssegundos e nanosegundos. Além disso, RCS são moléculas não carregadas, que podem migrar através das membranas e do citoplasma e causar danos em locais distantes do local de sua origem. Dadas estas características, RCS podem ser mais destrutivos que ROS e RONS (PAMPLONA; COSTANTINI, 2011).

Em condições fisiológicas normais, o metabolismo mitocondrial é a principal fonte de ROS na maioria das células (BICKLER; BUCK, 2007; KOWALTOWSKI et al., 2009). No processo de respiração mitocondrial o O_2 é totalmente reduzido a H_2O, porém, uma fração do O_2 que chega à mitocôndria é reduzida parcialmente formando o radical superóxido ($O_2^{-}\bullet$), principalmente nos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons (revisão em KOWALTOWSKI et al., 2009). Cerca de 0,1-2% do O_2 consumido nas mitocôndrias é constantemente convertido a $O_2^{-}\bullet$, dependendo do tecido e concentração de substratos, e a maior parte do ROS intracelular é derivado do $O_2^{-}\bullet$ (TAHARA; NAVARETE; KOWALTOWSKI, 2009). O $O_2^{-}\bullet$ sofre dismutação não enzimática a uma taxa significativa no pH fisiológico, mas a reação é consideravelmente acelerada pela ação das enzimas superóxido dismutases (SODs). Nesta reação é formado peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma

molécula menos reativa, mas permeável às membranas, a qual pode se difundir dentro da célula com maior facilidade e causar danos longe do local em que foi produzida. O H_2O_2 é removido por enzimas antioxidantes presentes no citosol, como a catalase (CAT) e glutationa peroxidases (GPXs). No entanto, o H_2O_2 não eliminado pode oxidar ferro II a ferro III e dar origem ao radical hidroxila (HO•) (reação de Fenton). O ferro III é reduzido novamente a ferro II pelo O_2^-•, facilitando a contínua formação de HO• pela reação de Fenton. O conjunto da reação de Fenton mais a redução do ferro III mediada pelo superóxido é conhecido como reação de Haber–Weiss (HABER; WEISS, 1934). Não há nenhum controle ou defesa contra as reações causadas pelo HO•. Estes processos químicos justificam, em termos evolutivos, a necessidade de manter íons metálicos no interior da estrutura das proteínas, o que pode ser considerado uma defesa antioxidante (HERMES-LIMA, 2004). Além do metabolismo mitocondrial, outras fontes de ROS nas células incluem a degradação de ácidos graxos nos peroxissomos (β-oxidação), a atividade da xantina oxidase e NADPH oxidases, o sistema citocromo P450, as ciclooxigenases e as lipooxigenases (COVARRUBIAS et al., 2008).

A taxa de produção de ROS correlaciona-se com o potencial da membrana mitocondrial interna, o qual tende aumentar com a oxidação de nutrientes e diminuir com a formação de ATP e com o grau de desacoplamento mitocondrial (revisão em MURPHY, 2009). O gradiente de prótons regula a taxa de fluxo reverso de elétrons na cadeia respiratória, local da geração de ROS, deste modo, o desacoplamento entre a fosforilação oxidativa do ADP e a passagem de prótons do espaço intermembrana para o interior da mitocôndria aumenta a taxa de respiração e inibe a liberação de ROS (BICKLER; BUCK, 2007; KOWALTOWSKI et al., 2009). Quanto mais reduzida estiver a cadeia transportadora de elétrons, maior a tendência de ocorrer redução monoeletrônica do O_2 a O_2^-• (BARJA, 2007). Assume-se geralmente que uma taxa metabólica elevada resulta em uma maior taxa de produção de ROS, o que de fato pode ser verdadeiro em um contexto de taxa de oxidação de substratos e potencial de membrana mitocondrial também elevados. No entanto, esta correlação não é observada quando a taxa metabólica elevada é resultado de desacoplamento mitocondrial; nesta condição, uma menor liberação de ROS seria esperada (revisão em WELKER et al., 2013). Pelos mesmos motivos, uma taxa metabólica inibida pode não ser um indicador inequívoco de uma menor taxa de produção de ROS.

Adicionalmente, a produção mitocondrial de ROS é induzida em resposta ao estresse e sugere-se que estas moléculas atuariam como um ‘alarme’, que notificaria a célula sobre mudanças no ambiente extracelular. De acordo com o modelo proposto por Sena e Chandel

(2012), este ‘sistema de alarme’ estaria baseado na proporcionalidade entre a quantidade de ROS produzida e a gravidade do estressor; um estressor incompatível com a viabilidade celular induziria a produção de grande quantidade de ROS, que causaria dano celular indiscriminado seguido de morte celular, enquanto um estressor de intensidade moderada induziria a produção de uma menor quantidade de ROS, que atuariam promovendo ajustes da fisiologia celular que favoreceriam a sobrevivência da célula. Na condição basal, ou seja, na ausência de estresse celular, existe um ‘tônus’ de produção de ROS cuja importância funcional, se existente, ainda não é bem conhecida.

Um repertório muito diverso de mecanismos de defesa contra os danos causados por RS evoluiu nos animais, contudo, as defesas antioxidantes básicas são altamente conservadas entre os organismos. Antioxidantes podem ser definidos como qualquer mecanismo, estrutura e/ou substância que previne, retarda, remove ou protege contra uma reação oxidativa não enzimática a uma molécula. O sistema antioxidante pode ser categorizado em (1) antioxidantes não enzimáticos provenientes da dieta e endógenos, (2) enzimas antioxidantes, (3) mecanismos de reparo de danos e (4) susceptibilidade inerente das biomoléculas ao dano oxidativo. Quando a capacidade deste sistema é superada pela taxa de produção de RS, ocorre um grau variável de prejuízo à função e integridade estrutural de biomoléculas, com consequências potenciais para as células e tecidos (ISAKSSON; SHELDON; ULLER, 2011; MONAGHAN; COSTANTINI, 2014; PAMPLONA; COSTANTINI, 2011). O sistema antioxidante envolve uma multiplicidade de genes, vias metabólicas e famílias de moléculas; um grau variável de integração é observado entre diferentes antioxidantes (PAMPLONA; COSTANTINI, 2011). Nesta breve revisão serão apresentados aspectos básicos da bioquímica dos antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos, os quais foram analisados na terceira parte do presente estudo.

Existem antioxidantes não enzimáticos hidrofílicos, encontrados nos compartimentos citosólico, mitocondrial e nuclear, e hidrofóbicos, encontrados em lipoproteínas e membranas (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999). Os principais antioxidantes não enzimáticos lipofílicos são o tocoferol (vitamina E) e os carotenoides, os quais são ambos adquiridos pela dieta; os principais antioxidantes não enzimáticos hidrofílicos são a glutationa e o ascorbato (vitamina C), os quais são produzidos endogenamente pela maioria dos animais (PAMPLONA; COSTANTINI, 2011).

A glutationa é um tripeptídeo (ácido glutâmico-cisteína-glicina) encontrado em concentrações milimolares em plantas, animais, fungos e bactérias, sendo o grupo tiol da

cisteína responsável pela sua função antioxidante (HERMES-LIMA, 2004). A maioria da glutationa celular (85-90%) encontra-se no citosol, com o restante em organelas (incluindo mitocôndria, matriz nuclear e peroxissomos); também está presente no meio extracelular. A glutationa é normalmente encontrada na sua forma reduzida, GSH, sendo sua concentração de 5 a 150 vezes maior do que a concentração de sua forma oxidada, GSSG, dependendo da espécie e tecido considerados. A razão GSH:GSSG é usada como um indicador do estado redox das células e situa-se abaixo de 10 sob condições fisiológicas normais. A GSH desempenha diversas funções, tais como a neutralização de RS diretamente, regeneração da vitamina 'E' além de atuar como substrato para enzimas antioxidantes como GPX e GST. A síntese de GSH ocorre constitutivamente em todos os tipos celulares, embora sua síntese possa aumentar em resposta ao estresse e o fígado seja o maior exportador deste tripeptídeo. A concentração celular de GSH diminui drasticamente em resposta a má nutrição proteica, estresse oxidativo, envelhecimento e muitas condições patológicas (HERMES-LIMA, 2004; PAMPLONA; COSTANTINI, 2011).

As enzimas envolvidas na defesa antioxidante atuam de maneira coordenada, de modo que as enzimas SODs, CAT e GPXs atuam diretamente na eliminação de ROS, enquanto que enzimas secundárias atuam no metabolismo da glutationa. As enzimas da família superóxido dismutase catalisam a dismutação do $O_2^{-}\bullet$ em O_2 e H_2O_2, menos reativo, prevenindo a formação de radicais mais tóxicos como o HO• e peroxihidroxila (CHEN et al., 1998). Estas enzimas ocorrem em virtualmente todos os organismos multicelulares e em algum grau nos organismos unicelulares. Basicamente, existem três formas de SOD: duas contêm cobre e zinco na sua estrutura sendo uma delas encontrada no citosol e espaço intermembranas da mitocôndria (CuZn-SOD) e a outra extracelular, encontrada no sangue (EC-SOD); uma outra forma de SOD contém manganês na sua estrutura e é encontrada somente na matriz mitocondrial (Mn-SOD). A atividade da Mn-SOD é cerca de 1 a 10% da atividade total da SOD nas células (atividade da CuZn-SOD e da Mn-SOD somadas). A abundância destas enzimas e a sua presença em ambos os compartimentos mitocondriais atestam a importância da remoção adequada do $O_2^{-}\bullet$ gerado na mitocôndria (KOWALTOWSKI et al., 2009). Roedores de laboratório geneticamente modificados que não expressam Mn-SOD apresentam diversas complicações neurológicas, cardíacas e motoras e sobrevivem apenas poucos dias após o nascimento (LEBOVITZ et al., 1996; LI et al., 1995). A atividade das enzimas Mn-SOD e CuZn-SOD é altamente regulada pelo estado redox das células, de modo que em condições de estresse oxidativo é comum observar um aumento da

atividade de ambas enzimas. Em contraste, diversas condições genéticas e patológicas estão associadas a uma menor atividade da SOD e um estado de estresse oxidativo (HERMES-LIMA, 2004).

Embora menos reativo que o O_2^{-}•, a maior estabilidade e capacidade de se difundir rapidamente dentro da célula torna o H_2O_2 potencialmente danoso (HERMES-LIMA, 2004). Outras enzimas atuam na eliminação do H_2O_2 produzido pela SOD e por outras reações, incluindo peroxiredoxinas, GPXs e CAT (SENA; CHANDEL, 2012). As peroxiredoxinas são enzimas encontradas em concentração elevada nas células e com alta afinidade pelo H_2O_2 que parecem estar envolvidas na eliminação de H_2O_2 quando esta molécula encontra-se em uma faixa de concentração nanomolar, associada com a sinalização celular. As GPXs possuem constantes catalíticas similares, mas são menos abundantes e parecem estar envolvidas na eliminação de concentrações mais elevadas de H_2O_2, potencialmente danosas à célula. Já a CAT possui uma afinidade ainda menor pelo H_2O_2 e atua em concentrações ainda mais altas de H_2O_2 (KOWALTOWSKI et al., 2009). A CAT catalisa a dismutação do H_2O_2 em oxigênio e água e está presente na maioria dos organismos, incluindo vertebrados, invertebrados, plantas, fungos e bactérias. Esta enzima é encontrada no interior das células, principalmente nos interior dos peroxissomos, mas pequenas quantidades também são encontradas nas mitocôndrias do coração de mamíferos, locais de intensa produção de H_2O_2 (HERMES-LIMA, 2004).

Nas células animais, as proteínas de duas famílias de genes não relacionadas têm atividade de glutationa peroxidase: as GPXs dependente de selênio (Se-GPX) e as glutationa transferases (GST). A expressão destes genes é variável entre diferentes espécies e tecidos e, além disso, o uso de diferentes condições de ensaio pode gerar dados mais inclusivos ou exclusivos quanto às atividades detectadas (ESWORTHY; CHU; DOROSHOW, 1999). Na literatura, dados de atividade glutationa peroxidase podem se referir a uma única proteína ou a um grupo de proteínas. As Se-GPX são enzimas que contém o selênio em seus sítios ativos e catalisam a redução do H_2O_2 e alguns hidroperóxidos orgânicos, como ácidos graxos peroxidados e substratos artificiais como o hidroperóxido de cumeno, usando a GSH e formando GSSG. As GSTs constituem uma família de enzimas multifuncionais envolvidas na conjugação da GSH com xenobióticos e produtos de peroxidação lipídica, porém não degradam o H_2O_2. A atividade da classe alfa de GSTs é medida juntamente com a Se-GPX quando a atividade GPX total é medida usando hidroperóxido de cumeno (GRUNDY; STOREY, 1998). Órgãos com taxa metabólica elevada, como fígado, pulmão e rim, produzem

mais H_2O_2 nas mitocôndrias e têm atividade elevada da Se-GPX em comparação com outros tecidos; uma exceção é o cérebro, o qual tem uma taxa metabólica elevada, mas baixos níveis de Se-GPX. O fígado de mamíferos é particularmente rico em GSTs que representam 5-10% do total de proteínas citosólicas (HERMES-LIMA, 2004).

A glutationa redutase (GR) reduz uma molécula de GSSG a duas moléculas de GSH, disponibilizando este substrato para as atividades de Se-GPXs e GSTs. Nesta reação, a GR utiliza nicotinamida-adenina-dinucleotídeo em sua forma reduzida (NADPH), transformando-a em sua forma oxidada (NADP). O NADPH é regenerado pela atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH). Existem muitas evidências de que a G6PDH, uma enzima limitante de taxa da via das pentoses fosfato, desempenha papel fundamental na modulação das defesas antioxidantes em mamíferos, uma vez que o NADPH gerado na reação catalisada por esta enzima é considerado essencial para a atividade das enzimas antioxidantes (HERMES-LIMA, 2004).

A análise de marcadores da capacidade antioxidante é insuficiente para se obter informações acerca da ocorrência de estresse oxidativo, sendo recomendável que o estudo destes marcadores seja sempre associado com a análise de pelo menos um marcador de dano oxidativo (COSTANTINI; VERHULST, 2009). Apesar da existência de um sistema de defesa antioxidante tão complexo, mesmo em condições basais ainda ocorre algum dano oxidativo às macromoléculas e a presença de sistemas de reparo e/ou degradação de moléculas danificadas previne o seu acúmulo na célula. (PAMPLONA; COSTANTINI, 2011). Ao contrário da situação do DNA, a maioria dos danos oxidativos a proteínas é irreversível e a única maneira de evitar o acúmulo de proteínas danificadas é através da sua degradação. Uma concentração aumentada de agregados de proteínas carboniladas tem sido associada com diversas doenças em humanos, como doença de Alzheimer e diabetes (revisão em DALLE-DONNE et al., 2006). As proteínas carboniladas são o principal produto do ataque de RS a proteínas cuja concentração é um marcador de estresse oxidativo bem aceito na literatura. Grupos carbonil podem ser introduzidos em proteínas através da reação direta da proteína com ROS ou da reação da proteína com moléculas como açúcares e lipídios que previamente foram danificados por ROS, formando RCS (DALLE-DONNE et al., 2006).

A peroxidação lipídica é considerada a maior causa de dano e morte celular. Basicamente, a peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, na maioria dos casos catalisada por metais de transição, na qual oxidantes fortes causam a quebra de fosfolipídios que contem PUFA (HERMES-LIMA, 2004). A peroxidação lipídica nas membranas biológicas pode ter

diversos níveis de severidade dependendo da natureza e concentração do oxidante, variando de reduções da fluidez local até a completa ruptura da integridade da bicamada lipídica. A iniciação da peroxidação lipídica envolve a retirada de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno de um PUFA (LH), causado por espécies oxidantes e formando um radical lipídico centrado no carbono (L•), o qual tende a estabilizar por meio de ressonância eletrônica formando um dieno conjugado. O próximo passo da via de peroxidação é a reação do dieno conjugado com o oxigênio formando o radical peroxila (LOO•). A propagação da peroxidação lipídica ocorre pela reação do LOO• com um grupo metileno em um PUFA não oxidado para render um hidroperóxido lipídico (LOOH) e outro radical lipídico centrado no carbono (L•), o qual pode reagir com o O_2 e iniciar uma reação em cadeia. A terminação da cadeia de peroxidação é causada (1) pela reação entre duas espécies lipídicas radicais formando um produto não-radicalar, (2) decomposição do LOOH, LO• e LOO•, ou (3) presença de antioxidante lipossolúvel como o alfa-tocoferol (HERMES-LIMA, 2004). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da peroxidação lipídica e ele reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em temperatura alta e pH ácido. Embora este ensaio não seja específico para o MDA, dado que outros aldeídos formados durante a lipoperoxidação também reagem com o TBA, ele pode ser usado como indicador do grau de peroxidação do tecido (HERMES-LIMA, 2004).

1.2.3.2. Dormência sazonal e estresse oxidativo

Os vertebrados, principalmente os mamíferos, no geral são muito sensíveis ao estresse induzido por flutuações de temperatura, oxigênio, salinidade ou disponibilidade de água e alimento no seu ambiente, quando comparados com outros organismos como invertebrados e plantas (VAN BREUKELEN; KRUMSCHNABEL; PODRABSKY, 2010). As células de vertebrados são particularmente sensíveis a flutuações da concentração de oxigênio, seja de origem exógena ou endógena, causada por alterações do fluxo sanguíneo, as quais acarretam tanto na ausência quanto na repentina abundância de O_2 no interior das células. No entanto, existem animais que exibem uma resistência elevada ao estresse oxidativo causado por eventos de isquemia seguidos de reperfusão, como as espécies que exibem dormência sazonal. Em hibernantes, a ventilação no estado dormente é interrompida por fases de apneia que podem durar até 20 min, juntamente com uma redução do fluxo sanguíneo em órgãos como rins, trato gastrointestinal e córtex cerebral, o que provavelmente

resulta em hipóxia nos tecidos (ANDRADE D V; ABE, 1999; CAREY; ANDREWS; MARTIN, 2003; KUDEJ; VATNER, 2003). No despertar, a reativação do metabolismo e o rápido aumento da tensão e das taxas de consumo de O_2, juntamente com a reperfusão de órgãos hipoperfundidos, criam condições que podem favorecer um aumento das taxas de produção de ROS e a ocorrência de estresse oxidativo (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002). Esta situação é similar à que ocorre, por exemplo, na isquemia do miocárdio e no transplante de órgãos em humanos, quando a hipóxia seguida de reoxigenação pode resultar em danos celulares irreversíveis (LI; JACKSON, 2002). Esquilos terrícolas do ártico sofrem hipoxemia sistêmica no momento do despertar, quando a elevada demanda metabólica associada à termogênese e reativação do metabolismo não é acompanhada pela disponibilidade de oxigênio (MA et al., 2005). No entanto, este quadro de hipóxia, aparentemente não resulta em danos oxidativos no cérebro dos animais, evidenciando a existência de mecanismos que protegem estes animais no momento do despertar. Além destes fatores, o jejum que acompanha todo o período de dormência, isoladamente é capaz de causar um efeito pró-oxidante devido aos efeitos somados do esgotamento dos antioxidantes provenientes da dieta, da redução da taxa de produção de antioxidantes endógenos e de um aumento da produção de ROS (DOMENICALI et al., 2001; MORALES et al., 2012; ROBINSON et al., 1997). A resistência de animais hibernantes ao estresse seria mediada, em parte, por uma maior capacidade antioxidante, a qual amenizaria os danos a macromoléculas devido ao estresse oxidativo no despertar (BICKLER; BUCK, 2007; CAREY; ANDREWS; MARTIN, 2003; HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002).

A isquemia é caracterizada por uma hipóxia gradual devido à interrupção do fluxo sanguíneo para o tecido ou órgão; a interrupção do fornecimento de O_2 é o aspecto mais importante, mas durante a isquemia também ocorre a interrupção do fornecimento de substratos e da eliminação de produtos tóxicos (HERMES-LIMA, 2004). Durante a isquemia, a cadeia transportadora de elétrons permanece em estado reduzido, uma vez que existe pouco ou nenhum O_2 que possa ser convertido a H_2O pela citocromo oxidase, e a taxa de produção de ROS é mínima. No entanto, a taxa de geração mitocondrial de ROS aumenta em certas espécies de animais durante transições entre diferentes condições de disponibilidade de O_2 como (1) de normóxia para hipóxia/anóxia, (2) de hipóxia/anóxia para normóxia e (3) durante hiperóxia (revisão em WELKER et al., 2013). Além disso, pode ocorrer um aumento da produção de ROS durante hipóxia, possivelmente relacionado com o aumento da concentração de succinato, um metabólito que fornece elétrons para a cadeia respiratória,

aumenta o potencial da membrana mitocondrial interna e causa uma maior taxa de liberação de ROS (MURPHY, 2009). ROS produzidos na mitocôndria durante a hipóxia desempenhariam uma função importante na sinalização que dispara os ajustes à hipóxia, como por exemplo, através da ativação da via do fator de transcrição induzido por hipóxia HIF-1 (revisão em WELKER et al., 2013). Após a isquemia/hipoxemia, a reperfusão torna o O_2 disponível para diversas reações. Assim como ocorre em condições fisiológicas normais, uma das principais fontes de ROS na reperfusão é a mitocôndria. Quanto mais reduzida estiver a cadeia respiratória, maior a disponibilidade de elétrons que podem 'vazar' e maior a produção de superóxido (HERMES-LIMA, 2004). Adicionalmente, parte do aumento da produção de ROS na reperfusão é explicada pela reação da xantina oxidase (XO); durante a isquemia/hipoxemia, a constante degradação do ATP, juntamente com a diminuição da capacidade de sua síntese, resulta em acúmulo de hipoxantina e na conversão proteolítica de xantina desidrogenase (XDH) em XO. Durante a reperfusão, a XO reduz a hipoxantina formando xantina e reduz xantina formando ácido úrico e, em ambas reações, há formação de O_2^-• e H_2O_2. A contribuição quantitativa destas reações para a formação de ROS varia entre diferentes tecidos (HERMES-LIMA, 2004). Estas reações produzem ROS com uma intensidade que muitas vezes supera a capacidade do sistema antioxidante e, neste momento de estresse oxidativo, ocorrem danos a componentes celulares importantes, incluindo peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA, os quais podem acarretar em morte celular (MA et al., 2005). A adição de antioxidantes na solução de reperfusão pode ter efeito benéfico contra os danos oxidativos na reperfusão no coração, rim e cérebro (HERMES-LIMA, 2004). Camundongos alterados geneticamente, que expressam SOD em concentrações elevadas, não apresentam danos significativos após eventos de isquemia/reperfusão do miocárdio (WANG et al., 1998). Estes estudos evidenciam o papel de ROS nas lesões observadas após eventos de isquemia/reperfusão e a importância de ajustes do sistema antioxidante na proteção contra estas lesões.

No contexto do fenômeno de dormência sazonal, a forma mais direta e energeticamente viável de evitar o estresse oxidativo supostamente seria a inibição da produção de ROS. Medidas diretas da taxa de produção de ROS são complexas e muito sujeitas a erros metodológicos, de modo que poucos estudos analisaram a produção de ROS em animais que exibem dormência sazonal. Em um estudo com esquilos terrícolas, a produção mitocondrial de ROS no fígado no músculo esquelético, estimada através da liberação de H_2O_2, é similar em animais ativos no verão, nos episódios de eutermia na

hibernação ou em torpor, mas encontra-se inibida por um efeito da redução da temperatura (BROWN et al., 2012). Em contraste, no músculo esquelético de sapos estivantes a produção mitocondrial de ROS com diferentes substratos e a liberação de ROS por molécula de oxigênio consumida mostraram uma inibição de 88 e 94% respectivamente, indicando uma inibição intrínseca da produção de ROS na estivação, independente da inibição da respiração mitocondrial (REILLY et al., 2013). Este efeito sazonal aparentemente varia entre os tecidos, uma vez que o fluxo respiratório e a produção de ROS no músculo cardíaco não se alteraram durante a estivação em relação ao patamar de atividade. Estes autores sugerem que, na estivação, algum grau de desacoplamento mitocondrial induzido por ácidos graxos, os quais constituem o substrato energético preferencial na dormência sazonal aeróbia, poderia contribuir para a inibição da produção de ROS nesta fase (REILLY et al., 2013). Deste modo, o conhecimento sobre a produção de ROS no estado hipometabólico é escasso e divergente; adicionalmente, os ajustes que ocorrem durante a transição entre diferentes intensidades metabólicas são praticamente desconhecidos, dada a dificuldade em se realizar tais medidas.

Um aumento da resistência a eventos de isquemia seguidos de reperfusão tem sido descrito em diversas espécies como um aspecto importante do fenótipo hibernante (Lindell *et al*., 2005; Kurtz *et al*., 2006; Dave *et al*., 2006; Stenzel-Poore *et al*., 2003). Em esquilos terrícolas, os rins de animais em torpor são mais tolerantes à 72h de armazenamento em hipotermia em comparação com os rins de esquilos eutérmicos e do rato, conforme indicado pela taxa de sobrevivência dos animais após o transplante do órgão (GREEN, 2000). O ‘fenótipo hibernante’ confere maior resistência à isquemia seguida de reperfusão ao fígado de esquilos terrícolas em comparação com o rato ou com esquilos ativos durante o verão (LINDELL et al., 2005). Estes resultados sugerem que na mesma espécie há uma mudança fisiológica sazonal entre um fenótipo menos resistente (verão-atividade) para um fenótipo mais resistente (inverno-hibernação). Além disso, a maior resistência à isquemia seguida de reperfusão foi observada não somente no fígado de animais em torpor, mas também nos episódios de despertar, sugerindo um mecanismo dependente de pré-condicionamento associado com a preparação para a hibernação, o qual é independente da hipotermia e hipometabolismo. Marmotas nas quais um infarto do miocárdio foi induzido por oclusão coronariana seguida de reperfusão exibem uma notável resistência a danos após a reperfusão durante o inverno, mas não no verão (YAN et al., 2015). O que dispara a proteção cardíaca no inverno não é conhecido, mas os autores sugerem que o mecanismo estaria relacionado a fatores que ativam outros componentes da adaptação do órgão à hibernação, por exemplo, a

manutenção do fluxo sanguíneo no miocárdio, envolvendo vasodilatação dependente do óxido nítrico (KUDEJ; VATNER, 2003). Apesar destes dados sugerirem uma elevada resistência ao estresse oxidativo em hibernantes, evidências de estresse foram encontradas no intestino (CAREY; FRANK; SEIFERT, 2000) e no tecido adiposo marrom (ORR et al., 2009) de esquilos durante o torpor e no despertar, respectivamente. No entanto, na grande maioria dos estudos com animais que apresentam dormência sazonal, nenhum sinal de estresse oxidativo é observado após a reativação do metabolismo, indicando a existência de ajustes das defesas antioxidantes compatíveis com os desafios inerentes ao fenômeno de dormência sazonal (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002; RAMOS-VASCONCELOS; HERMES-LIMA, 2003).

A dormência sazonal no primeiro ano de vida tem sérias implicações do ponto de vista do estresse oxidativo, uma vez que várias evidências sugerem um nível elevado de estresse oxidativo nas fases iniciais do desenvolvimento ontogenético, o que estaria associado à elevada taxa metabólica nesta fase (revisão em METCALFE; ALONSO-ALVAREZ, 2010). Evidências com aves indicam que o risco de estresse oxidativo constitui um dos limitantes da taxa de crescimento, o que pode contribuir para explicar porque a maioria dos animais não cresce a uma velocidade correspondente à taxa máxima possível (DMITRIEW, 2011). Sugere-se que a prevenção do estresse oxidativo seria uma importante pressão seletiva atuando nos fenótipos dos organismos ao longo das suas vidas e de seus descendentes, gerando diversos *trade-offs* na história de vida dos organismos (METCALFE; ALONSO-ALVAREZ, 2010).

Storey (1996) propôs que animais que vivenciam amplas flutuações da taxa de produção de ROS podem exibir um dentre três diferentes padrões de ajuste do sistema de proteção antioxidante: (1) manutenção de níveis de antioxidantes constitutivamente altos, de modo que o organismo esteja apto a lidar com o aumento de ROS a qualquer instante; (2) aumento das defesas antioxidantes em resposta ao hipometabolismo, de modo que as defesas estejam prontas em antecipação ao aumento da produção de ROS no despertar; e/ou (3) maior resistência ao acúmulo de moléculas danificadas durante o despertar e ênfase nos mecanismos de reparação e eliminação. Evidências a favor da última alternativa são raras e a ‘escolha’ entre as duas primeiras parece ser determinada pela frequência com que a espécie vivencia o estresse na natureza (STOREY, 1996). De acordo com esta teoria, animais que convivem rotineiramente com situações de ampla variação da disponibilidade e/ou do consumo de oxigênio possuiriam defesas antioxidantes constitutivamente mais altas, em relação a animais

que raramente vivenciam estas situações. Este é o caso da tartaruga de água doce *Trachemys scripta,* que, além hibernar em condições anóxicas, realiza mergulhos prolongados na fase ativa, quando ajustes circulatórios podem causar hipóxia severa em alguns órgãos (WILLMORE; STOREY, 1997). Esta tartaruga apresenta concentração elevada de algumas enzimas antioxidantes e de glutationa em vários órgãos e um nível reduzido de peroxidação lipídica após a reoxigenação pós-anóxia.

Outros animais que vivenciam e resistem a grandes flutuações no consumo de oxigênio apresentam aumento das defesas antioxidantes em resposta ao hipometabolismo, de modo que as defesas estejam prontas em antecipação ao aumento da produção de ROS no momento do despertar. Este padrão de ajuste parece contraditório, dado que a depressão metabólica é associada com uma inibição geral da síntese proteica, porém tem sido observado em vários animais e foi interpretado como uma 'preparação para o estresse oxidativo' (HERMES-LIMA; STOREY; STOREY, 1998). Um dos estudos que suportam esta teoria foi realizado com cobras *Thamnophis sirtalis parietalis,* as quais são altamente tolerantes ao congelamento e anóxia (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002). Em normóxia, a concentração de antioxidantes no musculo esquelético, fígado e pulmão destas cobras situa-se em um patamar semelhante ao de outros ectotermos. No entanto, quando submetidas à anóxia, ocorre um aumento da atividade da SOD no músculo esquelético e fígado e da concentração de GSH no fígado. Uma vez que em condição de anóxia não há geração de ROS, o aumento de antioxidantes é considerado um ajuste antecipatório que prepara as cobras para o momento da re-oxigenação.

Dentre os animais que apresentam dormência sazonal, ajustes das defesas antioxidantes em 'preparação para o estresse oxidativo' são mais frequentes que a manutenção de níveis constitutivamente altos de antioxidantes. No peixe pulmonado *Protopterus dolloi* houve um aumento da atividade de várias enzimas antioxidantes no cérebro e em menor extensão no coração, após 60 dias de estivação (PAGE et al., 2010). Estes ajustes não estão associados com o jejum, uma vez que não ocorreram em um grupo de peixes pulmonados submetidos à restrição de alimento. No esquilo terrícola *Citellus citellus* houve aumento da concentração de SOD, GPX e de ascorbato no tecido adiposo marrom, de GPX no fígado e ascorbato no plasma durante a hibernação (BUZADZIC et al., 1990). O aumento das defesas antioxidantes no tecido adiposo marrom seria especialmente importante no momento do despertar, devido à intensa atividade metabólica e à termogênese. Outros estudos têm mostrado aumento de antioxidantes em vários órgãos durante o torpor em esquilos, inclusive

no tecido adiposo branco (NI; STOREY, 2010; ROUBLE; TESSIER; STOREY, 2014), e no coração de morcegos (EDDY; MCNALLY; STOREY, 2005). Estas evidências suportam a ideia de que um aumento das defesas antioxidantes é um dos componentes do fenótipo hibernante. No entanto, os resultados são altamente espécie- e tecido-específicos e ainda não possibilitam um entendimento mais amplo dos fatores que determinam a 'escolha' do ajuste do sistema de proteção antioxidante na dormência sazonal. Por exemplo, uma inibição da atividade de enzimas antioxidantes foi observada em diversos órgãos de sapos em estivação (GRUNDY; STOREY, 1998), no fígado de esquilos em torpor (BUZADZIC et al., 1990) e no intestino de lagartos teiú (WELKER, 2009). No intestino de lagartos teiú, apesar da inibição da atividade de enzimas (GST, GPX e CAT), os marcadores de danos oxidativos a macromoléculas sugerem que o sistema antioxidante permanece eficiente e previne o estresse oxidativo durante a hibernação e o despertar.

Grande parte da economia energética durante o estado hipometabólico envolve depressão acentuada das taxas de síntese proteica e transcrição gênica (CAREY; ANDREWS; MARTIN, 2003). Desse modo, é razoável supor que somente proteínas de extrema relevância para a manutenção do organismo teriam a sua expressão e síntese aumentadas durante a dormência. A tese principal que dá suporte à hipótese de 'preparação para o estresse oxidativo' tem sido que mudanças profundas da perfusão e da atividade metabólica nos tecidos na transição para o estado hipometabólico criariam condições hipóxicas que poderiam aumentar a produção mitocondrial de ROS. Considerando que a expressão de diversos genes relacionados com a função antioxidante é estimulada por ROS e que a hipóxia aumenta a produção de ROS, a expressão de antioxidantes endógenos pode ser ativada por um aumento da produção de ROS na transição para o estado hipometabólico (HERMES-LIMA; STOREY; STOREY, 1998; STOREY; STOREY, 2012; WELKER et al., 2013). Deste modo, os genes antioxidantes seriam ativados na transição para o hipometabolismo, antes da depressão metabólica profunda e da depressão das taxas de transcrição e tradução, assim, as defesas estariam prontas no momento do despertar (CAREY; ANDREWS; MARTIN, 2003; STOREY; STOREY, 2012). Além disso, a manutenção de uma capacidade antioxidante elevada durante a dormência poderia ser vantajoso, na medida em que contribui para a preservação das macromoléculas de danos causados por ROS, aumentando assim a sua meia-vida (GIRAUD-BILLOUD et al., 2013).

IV. Considerações finais

O presente estudo com teiús neonatos contribui para o conhecimento sobre os ajustes que compatibilizam as demandas do crescimento e do armazenamento de lipídios e sobre os ajustes que compatibilizam a capacidade do sistema de proteção antioxidante com as flutuações da taxa de produção de ROS ao longo do primeiro ciclo anual de um animal hibernante. Seja na forma do armazenamento de substratos no outono, seja na forma do aumento seletivo da atividade de enzimas antioxidantes durante a dormência de inverno e o despertar, a antecipação de ajustes fisiológicos se destaca no presente estudo como componente central do fenômeno de dormência sazonal. Estes ajustes antecipatórios e as alterações espontâneas do comportamento em animais neonatos corroboram as evidências de que o padrão sazonal de atividades dos teiús é o resultado da expressão de um ritmo endógeno.

Na segunda parte do estudo, os resultados refutaram a hipótese de que haveria uma diminuição da taxa de crescimento antes da diminuição da taxa de ganho de massa corpórea nos teiús durante o outono. Essa hipótese baseou-se na premissa de que nesta fase haveria uma maior ênfase na alocação de energia para o armazenamento de lipídios em detrimento do crescimento dos animais. Ao contrário, estas duas taxas diminuíram paralelamente a partir da segunda metade do outono, acompanhando a redução progressiva da atividade geral e da alimentação, o que no conjunto resultou na estabilização da massa corpórea nas semanas finais do outono. Além disso, a sequência temporal dos ajustes em teiús neonatos difere do modelo proposto na literatura para mamíferos adultos, segundo o qual o ganho de massa corpórea na segunda metade do outono seria potencializado por uma redução da atividade diária, antes da redução da alimentação (revisão em DARK, 2005; FLORANT; HEALY, 2011). Em contraste com este modelo, a taxa de ganho de massa corpórea e a atividade geral diminuíram simultaneamente em teiús neonatos, supostamente acompanhando a inibição gradual das taxas do metabolismo aeróbio que ocorrem no outono (SOUZA et al., 2004). Os elevados níveis plasmáticos de CORT, juntamente com a intensa alimentação e o alto grau de adiposidade, constituem evidências fortes do papel de GCs nos ajustes que promovem a ingestão de alimento e a deposição de substratos energéticos nos teiús. Destaca-se, ainda, o estado voluntário de anorexia dos teiús no fim do outono, a despeito de possuírem uma reduzida massa corpórea e um curto período de tempo disponível para crescimento e armazenamento de substratos até o inverno. Esta observação reforça a interpretação de que

um temporizador endógeno estaria envolvido no controle da sazonalidade nos teiús e constitui um estímulo para futuros estudos sobre os mecanismos que promovem as alterações do apetite, do gasto energético e da capacidade de absorção e processamento de nutrientes em teiús neonatos.

Na terceira parte do estudo, os resultados mostraram um efeito predominante de queda da atividade de várias enzimas antioxidantes durante a hibernação. Estes resultados refutam a hipótese de um aumento abrangente da capacidade antioxidante nos tecidos do teiú durante a hibernação, como preparação para o momento de despertar, com exceção da elevada taxa de atividade da SOD no fígado de animais durante a hibernação e o despertar. No entanto, destaca-se no conjunto dos dados a recuperação das taxas da SOD e da GR no coração e no pulmão de animais em jejum durante o despertar, enquanto que nos demais tecidos um aumento de atividade enzimática foi detectado somente após a retomada da alimentação. Estes resultados sugerem que a preparação do sistema de proteção antioxidante para o despertar em órgãos vitais, cuja função é exigida mais rapidamente, ocorre por meio de ajustes seletivos. A ausência de evidências de estresse oxidativo nos tecidos em geral indica que o aumento da produção de ROS causado pela reativação do metabolismo e retomada da alimentação não excede a capacidade de remoção desses metabólitos. Por outro lado, a concentração elevada de TBARS e da enzima GST no fígado de animais em atividade de outono sugere uma importante relação entre o aumento dos níveis de adiposidade e a produção de ROS no contexto da sazonalidade, um tema de grande interesse científico e ainda inexplorado.

Face às evidências da literatura, o presente estudo foi conduzido sob a premissa de que os níveis de produção de ROS seriam ajustados durante o primeiro ciclo anual dos teiús em função da atividade metabólica aumentada no outono, face às múltiplas demandas do desenvolvimento, crescimento e preparação para os meses de hibernação, ou da reativação do metabolismo durante o despertar. No início do outono, o nível de proteínas carboniladas no pulmão dos teiús é 80% maior do que nas demais fases do ano e exibe uma correlação positiva com as taxas de crescimento (P=0,0381, R=0,899) e com o ganho de massa corpórea dos animais (P=0,0124, R=0,952, Fig. 4.1).

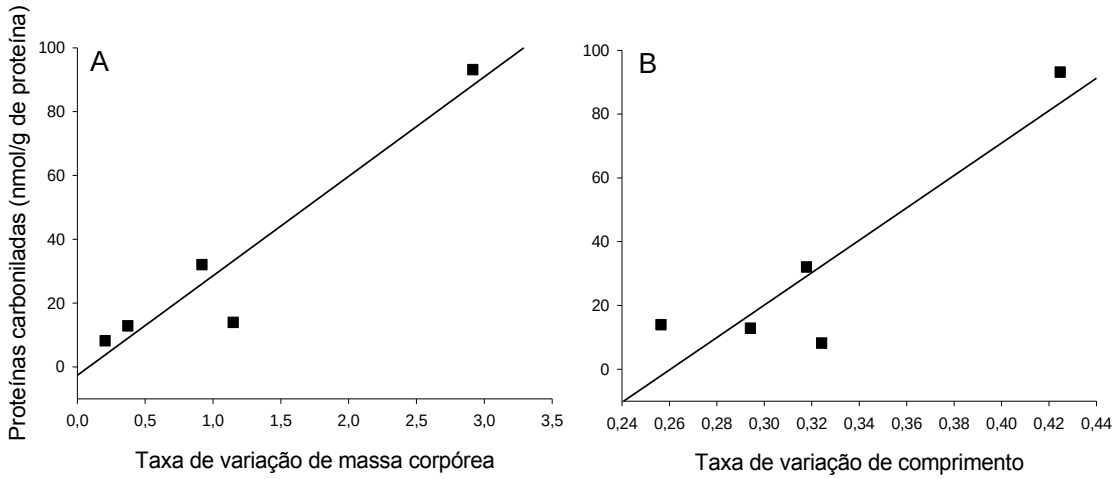

Figura 4.1 – Correlação entre a concentração de proteínas carboniladas no pulmão a taxa de variação de massa corpórea (A) e a taxa de variação de comprimento rostro-cloacal (B) na fase de atividade de início de outono.

Estes resultados constituem forte evidência de que a elevada taxa metabólica massa-específica nesta fase de intenso crescimento e deposição de lipídios estaria associada a um aumento da ventilação e um maior nível de estresse oxidativo no pulmão dos teiús. Desse modo, o estresse oxidativo e os ajustes da proteção antioxidante neste tecido seriam marcadores importantes do compromisso entre o crescimento, o armazenamento de lipídios e a manutenção da integridade de macromoléculas em lagartos teiú jovens.

V. Referências Bibliográficas

ABE, A. Estivation in South American amphibians and reptiles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 1241–1247, 1995.

ABE, A. S. Observations on dormancy in tegu lizards – *Tupinambis teguixim* (Reptilia, Teiidae). **Naturalia**, v. 8, p. 235-239, 1983.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.

AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Leptin. **Annual Review of Physiology**, v. 62, p. 413–37, 2000.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 373–382, 1981.

ALLAINÉ, D.; GRAZIANI, L.; COULON, J. Postweaning mass gain in juvenile alpine marmots *Marmota marmota*. **Oecologia**, v. 113, n. 3, p. 370–376, 1998.

AMIR-AHMADY, B.; SALATI, L. M. Regulation of the processing of glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA by nutritional status. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 13, p. 10514–10523, 2001.

ANDRADE D V; ABE, A. S. Gas exchange and ventilation during dormancy in the tegu lizard *Tupinambis merianae*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 3677–3685, 1999.

ARMITAGE, K. B. Factors affecting corticosteroid concentrations in yellow-bellied marmots. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 98A, n. 1, p. 47–54, 1991.

ASIMAKIS, G. K.; LICK, S.; PATTERSON, C. Postischemic Recovery of Contractile Function is Impaired in SOD2+/- but Not SOD1+/- Mouse Hearts. **Circulation**, v. 105, n. 8, p. 981–986, 2002.

BAGNYUKOVA, T. .; STOREY, K. .; LUSHCHAK, V. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, n. 1, p. 21–28, 2003.

BAKER, P. J.; COSTANZO, J. P.; LEE, R. E. Oxidative stress and antioxidant capacity of a terrestrially hibernating hatchling turtle. **Journal of Comparative Physiology B**., v. 177, n. 8, p. 875–883, 2007.

BARJA, G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. **Rejuvenation Research**, v. 10, n. 2, p. 215–224, 2007.

BARNES, D. S.; MROSOVSKY, N. Body weight regulation in ground squirrels and hypothalamically lesioned rats : Slow and sudden set point changes. **Physiology and Behaviour**, v. 12, p. 251–258, 1974.

BELLIURE, J.; CLOBERT, J. Behavioral sensitivity to corticosterone in juveniles of the wall lizard, *Podarcis muralis*. **Physiology & Behavior**, v. 81, p. 121–127, 2004.

BEN-HAMO, M. et al. Waking to drink: rates of evaporative water loss determine arousal frequency in hibernating bats. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 4, p. 573–577, 2013.

BERGMEYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analysis**. Wheinheim: Verlag Chemical, 1984.

BERLETT, B. S. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 33, p. 20313–20316, 1997.

BERTOLUCCI, C.; FOÀ, A.; TOSINI, G. The circadian organization of reptiles. In: **Biological Rhythms**. Springer Berlin Heidelberg , p. 129–143, 2002.

BICKLER, P. E.; BUCK, L. T. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. **Annual Review of Physiology**, v. 69, p. 145–170, 2007.

BIEBER, C. et al. Body mass dependent use of hibernation: Why not prolong the active season, if they can? **Functional Ecology**, v. 28, p. 167–177, 2014.

BOONSTRA, R. et al. Seasonal changes in glucocorticoid and testosterone concentrations in free-living arctic ground squirrels from the boreal forest of the Yukon. **Canadian Journal of Zoology**, v. 79, n. 1, p. 49–58, 2001.

BOSWELL, T.; WOODS, S. C.; KENAGY, G. J. Seasonal changes in body mass, insulin, and glucocorticoids of free-living golden-mantled ground squirrels. **General and Comparative Endocrinology**, 1994.

BROWN, J. C. L. et al. Mitochondrial metabolic suppression and reactive oxygen species production in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 1, p. R15–28, 2012.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302–310, 1978.

BUETTNER, G. R. et al. A New paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H_2O_2 in cells and thereby their biological state. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, p. 1338–1350, 2006.

BURK, R. F. et al. Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, p. 43–46,1978.

BUZADZIC, B. et al. Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus* 2. The effect of hibernation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 407–413, 1990.

CAREY, H. V; ANDREWS, M. T.; MARTIN, S. L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1153–1181, 2003.

CAREY, H. V; FRANK, C. L.; SEIFERT, J. P. Hibernation induces oxidative stress and activation of NF-kappaB in ground squirrel intestine. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 170, p. 551–559, 2000.

CAREY, H. V; RHOADS, C. A; AW, T. Y. Hibernation induces glutathione redox imbalance in ground squirrel intestine. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 173, p. 269–276, 2003.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 14, p. 5475–5480, 1975.

CASE, T. J. Seasonal aspects of thermoregulatory behavior in the Chuckawalla, *Sauromalus obesus* (Reptilia, Lacertilia, Iguanidae). **Journal of Herpetology**, v. 10, n. 2, p. 85–95, 1976.

CASTONGUAY, T. W. Glucocorticoids as modulators in the control of feeding. **Brain Research Bulletin**, v. 27, p. 423–428, 1991.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 949–962, 1999.

CHAVEZ, M. et al. Adrenalectomy increases sensitivity to central insulin. **Physiology & Behavior**, v. 62, n. 3, p. 631–634, 1997.

CHEN, Z. et al. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 30, n. 11, p. 2281–2289, 1998.

CLARK, T. W. Early growth, development, and behavior of the Richardson ground squirrel (*Spermophilus richardsoni elegans*). **American Midland Naturalist**, v. 83, n. 1, p. 197–205, 1970.

COPELAND, D. L. et al. Leptin in teleost fishes: an argument for comparative study. **Frontiers in Physiology**, v. 2, p. 1–11, 2011.

COSTANTINI, D.; MARASCO, V.; MØLLER, A. P. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 181, p. 447–456, 2011.

COSTANTINI, D.; VERHULST, S. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? **Functional Ecology**, v. 23, p. 506–509, 2009.

COVARRUBIAS, L. et al. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? **Developmental Biology**, v. 320, p. 1–11, 1 2008.

CURRAN-EVERETT, D.; BENOS, D. J. Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society. **Advances in Physiology Education**, v. 28, n. 1-4, p. 85–87, 2004.

CURRIE, S. E.; NOY, K.; GEISER, F. Passive rewarming from torpor in hibernating bats: minimizing metabolic costs and cardiac demands. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, n. 1, p. R34–R41, 2015.

DA SILVEIRA, L. C. et al. Cardiac hypertrophy and structural and metabolic remodeling related to seasonal dormancy in the first annual cycle in tegu lizards. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 165, p. 371–380, 2013.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clinica Chimica Acta, v. 329, n. 1-2, p. 23–38, 2003.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389–406, 2006.

DALLMAN, M. F. et al. Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 14, n. 4, p. 303–347, 1993.

DALLMAN, M. F. et al. Glucocorticoids and insulin both modulate caloric intake through actions on the brain. **The Journal of Physiology**, v. 583, n. 2, p. 431–436, 2007.

DARK, J. Annual lipid cycles in hibernators: integration of physiology and behavior. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, p. 469–497, 2005.

DARK, J.; FORGER, N. G.; ZUCKER, I. Rapid recovery of body mass after surgical removal of adipose tissue in ground squirrels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 2270–2272, 1984.

DAUSMANN, K. H. et al. Hibernation in the tropics: lessons from a primate. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 175, n. 3, p. 147–155, 2005.

DAVE, K. R. et al. The arctic ground squirrel brain is resistant to injury from cardiac arrest during euthermia. **Stroke**, v. 37, n. 5, p. 1261–5, 2006.

DENVER, R. J. Structural and functional evolution of vertebrate neuroendocrine stress systems. **Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology: Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1163, p. 1–16, 2009.

DICKMEIS, T.; WEGER, B. D.; WEGER, M. The circadian clock and glucocorticoids - Interactions across many time scales. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 380, p. 2–15, 2013.

DMITRIEW, C. M. The evolution of growth trajectories: What limits growth rate? **Biological Reviews**, v. 86, p. 97–116, 2011.

DOMENICALI, M. et al. Food deprivation exacerbates mitochondrial oxidative stress in rat liver exposed to ischemia-reperfusion injury. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 105–110, 2001.

DUPOUÉ, A. et al. Influence of temperature on the corticosterone stress-response: An experiment in the Children's python (*Antaresia childreni*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 193, p. 178–184, 2013.

EDDY, S. F.; MCNALLY, J. D.; STOREY, K. B. Up-regulation of a thioredoxin peroxidase-like protein, proliferation-associated gene, in hibernating bats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 435, n. 1, p. 103–11, 2005.

EPPERSON, L. E.; DAHL, T. A.; MARTIN, S. L. Quantitative analysis of liver protein expression during hibernation in the golden-mantled ground squirrel. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 9, p. 920–933, 2004.

ESWORTHY, R. S.; CHU, F.-F.; DOROSHOW, J. H. Analysis of Glutathione-Related Enzymes. In: **Current Protocols in Toxicology**, 00:7.1:7.1.1–7. p. 1-32, 1999.

FARNER, D. S. Annual rhythms. **Annual Review of Physiology**, v. 47, n. 1, p. 65–82, 1985.

FIELDS, R.; DIXON, H. B. F. Micro method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides, using 2,4-dinitrophenylhydrazine. **Biochemical Journal**, v. 121, n. 4, p. 587–589, 1971.

FLANIGAN, J.; WITHERS, P. C.; GUPPY, M. In vitro metabolic depression of tissues from the aestivating frog *Neobatrachus pelobatoides*. **Journal of Experimental Biology**, v. 161, p. 273–283, 1991.

FLORANT, G. L. et al. Fat-cell mass, serum leptin and adiponectin changes during weight gain and loss in yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 174, n. 8, p. 633–9, 2004.

FLORANT, G. L.; HEALY, J. E. The regulation of food intake in mammalian hibernators: A review. **Journal of Comparative Physiology B**, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22080368>. Acesso em: 17 abr. 2013

FORSMAN, A.; LINDELL, L. E. Trade-Off between growth and energy storage in male *Vipera berus* (L.) under different prey densities. **Functional Ecology**, v. 5, n. 6, p. 717–723, 1991.

GALLI, G. L. J. et al. The role of the sarcoplasmic reticulum in the generation of high heart rates and blood pressures in reptiles. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. Pt 10, p. 1956–63, 2006.

GEHNRICH, S. C.; APRILLE, J. R. Hepatic gluconeogenesis and mitochondrial function during hibernation. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 91, n. 1, p. 11–16, 1988.

GIRAUD-BILLOUD, M. et al. Antioxidant and molecular chaperone defences during estivation and arousal in the South American apple snail *Pomacea canaliculata*. The **Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 614–622, 2013.

GIROUD, S. et al. Late-born intermittently fasted juvenile garden dormice use torpor to grow and fatten prior to hibernation: consequences for ageing processes. **Proceedings of the Royal Society B**, n. 281: 20141131, http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.1131, 2014.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochemical Journal**, v. 55, n. 3, p. 400–408, 1953.

GRABEK, K. R. et al. Multistate proteomics analysis reveals novel strategies used by a hibernator to precondition the heart and conserve ATP for winter heterothermy. **Physiological Genomics**, v. 43, n. 22, p. 1263–1275, 2011.

GREEN, C. Mammalian hibernation: Lessons for organ preservation? **Cryo-Letters**, v. 21, n. 2, p. 91–98, 2000.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207–212, 1980.

GRUNDY, J. E.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 168, n. 2, p. 132–142, 1998.

GUPPY, M.; WITHERS, P. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. **Biological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 1–40, 1999.

HABER, F.; WEISS, J. The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts. **Proceedings of the Royal Society A**, v. 147, n. 861, p. 332–351, 1934.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 398–405, 1981.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HADDAD, L. S. **O papel dos lipídios na reorganização metabolica associada à dormência sazonal no lagarto teiú *Tupinambis merianae***. 2007. 81p. Tese (Doutorado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2007.

HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 6, p. 445–600, 1995.

HELDMAIER, G.; ORTMANN, S.; ELVERT, R. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 141, n. 3, p. 317–329, 2004.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Wiley-Liss, Hoboken, p. 319–368., 2004

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 120, n. 3, p. 437–448, 1998.

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 133, p. 537–556, 2002.

HOCHACHKA, P. W.; GUPPY, M. **Metabolic arrest and the control of biological time**. Havard: University Press, 1987.

HUDSON, J. W. Hibernation: endocrinologic aspects. **Annual Review of Physiology**, v. 41, p. 287–303, 1979.

HUKSHORN, C. J.; SARIS, W. H. M. Leptin and energy expenditure. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 7, n. 6, p. 629–33, 2004.

HUMPHRIES, M. M.; THOMAS, D. W.; KRAMER, D. L. The role of energy availability in mammalian hibernation: a cost-benefit approach. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 76, n. 2, p. 165–179, 2003.

Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo (São Paulo) Boletim Climatológico Anual da Estação Meteorológica do IAG/USP/ Seção Técnica de Serviços Meteorológicos. v 16, 2013.

ISAKSSON, C.; SHELDON, B. C.; ULLER, T. The challenges of integrating oxidative stress into life-history biology. **BioScience**, v. 61, n. 3, p. 194–202, 2011.

JANG, Y. C. et al. Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice. **Journal of Gerontology: Biological Sciences**, v. 64, n. 11, p. 1114–1125, 2009.

JANI, A. et al. Kidney proteome changes provide evidence for a dynamic metabolism and regional redistribution of plasma proteins during torpor-arousal cycles of hibernation. **Physiological Genomics**, v. 44, n. 14, p. 717-727, 2012.

JOHNSON, R. M.; JOHNSON, T. M.; LONDRAVILLE, R. L. Evidence for leptin expression in fishes. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 286, n. 7, p. 718–724, 2000.

KABINE, M. et al. Changes of peroxisomal fatty acid metabolism during cold acclimatization in hibernating jerboa (*Jaculus orientalis*). **Biochimie**, v. 85, n. 7, p. 707–714, 2003.

KELLY, F. J. Gluthathione: In defence of the lung. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9-10, p. 963–966, 1999.

KENAGY, G. J.; PLACE, N. J. Seasonal changes in plasma glucocorticosteroids of free-living female yellow-pine chipmunks: effects of reproduction and capture and handling. **General and Comparative Endocrinology**, v. 117, n. 2, p. 189–199, 2000.

KIM, G. W. et al. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. **Stroke**, v. 33, n. 3, p. 809–815, 2002.

KORNBERG, A.; HORECKER, B. L.; SMYRNIOTIS, P. Z. Glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconic dehydrogenase. **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 323–327, 1955.

KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 333–343, 2009.

KRIEGER, D. T.; HAUSER, H.; KREY, L. C. Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. **Science**, v. 197, p. 398–399, 1977.

KRONFELD-SCHOR, N. et al. Dissociation of leptin secretion and adiposity during prehibernatory fattening in little brown bats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, p. R1277–R1281, 2000.

KUDEJ, R. K.; VATNER, S. F. Nitric oxide-dependent vasodilation maintains blood flow in true hibernating myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, p. 931–935, 2003.

KURTZ, C. C. et al. Hibernation confers resistance to intestinal ischemia-reperfusion injury. American journal of physiology. **Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 291, n. 5, p. G895–901, 2006.

LA FLEUR, S. E. et al. Interaction between corticosterone and insulin in obesity: Regulation of lard intake and fat stores. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2174–2185, 2004.

LA FLEUR, S. E. The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. **Physiology & Behavior**, v. 89, n. 1, p. 110–114, 2006.

LANDYS, M. M.; RAMENOFSKY, M.; WINGFIELD, J. C. Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 132–149, 2006.

LAWRENCE, R. A.; BURK, R. F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 71, n. 4, p. 952–958, 23 ago. 1976.

LEBL, K. et al. Survival rates in a small hibernator, the edible dormouse: A comparison across Europe. **Ecography**, v. 34, n. 4, p. 683–692, 2011.

LEBOVITZ, R. M. et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9782–9787, 1996.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464–478, 1990.

LI, C.; JACKSON, R. M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury**. American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 282, p. C227–241, 2002.

LI, Y. et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nature Genetics**, v. 11, n. 4, p. 376–381, 1995.

LINDELL, S. L. et al. Natural resistance to liver cold ischemia-reperfusion injury associated with the hibernation phenotype. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, n. 3, p. G473–480, 2005.

LITTLE, C. et al. Properties and Regulation of Glutathione Peroxidase. **The Jounal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 14, p. 3632–3636, 1970.

LIU, J.; WANG, X.; MORI, A. Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: Effect of treatment with reduced glutathione. **International Journal of Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 511–517, 1994.

LÓPEZ-TORRES, M. et al. A comparative study of free radicals. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 105, n. 3/4, p. 757–763, 1993.

LOWRY, O.H., RESENBROUGHT, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-257, 1951.

MA, Y. L. et al. Absence of cellular stress in brain after hypoxia induced by arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 5, p. R1297–306, 2005.

MAKIMURA, H. et al. Adrenalectomy reverses obese phenotype and restores hypothalamic melanocortin tone in leptin-deficient ob/ob mice. **Diabetes**, v. 49, p. 1917–1923, 2000.

MATTSON, M. P. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. **Experimental Gerontology**, v. 44, n. 10, p. 625–633, 2009.

MAYHEW, W. W. Hibernation in the horned lizard, *Phrynosoma m'calli*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 16, n. 1, p. 103–119, 1965.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 1969.

MCCUE, M. D. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 156, p. 1–18, 2010.

MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 1, p. 2–15, 2003.

MCINTOSH, L. J.; SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. **Experimental Neurology**, v. 141, p. 201–206, 1996.

METCALFE, N. B.; ALONSO-ALVAREZ, C. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. **Functional Ecology**, v. 24, n. 5, p. 984–996, 2010.

METÓN, I.; FERNÁNDEZ, F.; BAANANTE, I. V. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis – gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 225, p. 99–107, 2003.

MILLESI, E. et al. Hibernation effects on memory in European ground squirrels (*Spermophilus citellus*). **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, n. 3, p. 264–271, 2001.

MILSOM, W. K. et al. Seasonal changes in daily metabolic patterns of tegu lizards (*Tupinambis merianae*) placed in the cold (17 degrees C) and dark. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 81, n. 2, p. 165–175, 2008.

MILSOM, W. K. et al. Seasonal changes in thermoregulatory strategies of tegu lizards. In: **Living in a Seasonal World**. Springer, Berlin Heidelberg, p. 317–324, 2012.

MILSOM, W. K.; BETH ZIMMER, M.; HARRIS, M. B. Vagal control of cardiorespiratory function in hibernation. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 6, p. 791–796, 2001.

MIYATA, T.; KUROKAWA, K.; VAN YPERSELE DE STRIHOU, C. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. **Kidney International**, v. 76, p. 120–125, 2000.

MOGENSEN, S.; POST, J. R. Energy allocation strategy modifies growth-survival trade-offs in juvenile fish across ecological and environmental gradients. **Oecologia**, v. 168, p. 923–933, 2012.

MONAGHAN, P.; COSTANTINI, D. Free Radicals - An Evolutionary Perspective. In: **Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants,** Springer, Berlin Heidelberg, p. 39–64, 2014.

MOORE, I. T. et al. Relationships between annual cycles of testosterone, corticosterone, and body condition in male red-spotted garter snakes, *Thamnophis*

sirtalis concinnus. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, n. 3, p. 307–312, 2000.

MORALES, A. E. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver. **Comparative biochemistry and physiology**. **Toxicology & Pharmacology**, v. 139, n. 1-3, p. 153–61, 2004.

MORALES, A. E. et al. Starvation, energetics, and antioxidant defenses. In: **Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems**. John Wiley & Sons, . p. 281–294, doi:10.1002/9781444345988.ch20.

MORIN, P.; STOREY, K. B. Antioxidant defense in hibernation: cloning and expression of peroxiredoxins from hibernating ground squirrels, Spermophilus tridecemlineatus. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 461, n. 1, p. 59–65, 2007.

MORTON, M. L.; MAXWELL, C. S.; WADE, C. E. Body size, body composition, and behavior of juvenile belding ground squirrels. **The Great Basin Naturalist**, v. 34, n. 2, p. 121–134, 1973.

MROSOVSKY, N.; POWLEY, T. L. Set points for body weight and fat. **Behavioral Biology**, v. 20, n. 2, p. 205–223, 1977.

MURAKAMI, K. et al. Overexpression of CuZn-Superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. **Stroke**, v. 28, n. 9, p. 1797–1804, 1997.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **The Biochemical Journal**, v. 417, p. 1–13, 2009.

NASCIMENTO, L. F. R. et al. (submetido, manuscrito 25574) Morphological and metabolic adjustments in the small intestine to energy demands of growth, storage, and fasting in the first annual cycle of a hibernating lizard (*Tupinambis merianae*). **Comparative Biochemistry and Physiology**.

NASCIMENTO, L. F. R. **Reorganização estrutural e metabólica do intestino associada ao jejum e dormência sazonal em lagartos teiú *Tupinambis merianae***. 2007. 80p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2009.

NI, Z.; STOREY, K. B. Heme oxygenase expression and Nrf2 signaling during hibernation in ground squirrels. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, n. 3, p. 379–87, 2010.

NUNES, S. et al. Plasma glucocorticoid concentrations and body mass in ground squirrels: seasonal variation and circannual organization. **General and Comparative Endocrinology**, v. 146, p. 136–143, 2006.

O'REILLY, K. M.; WINGFIELD, J. C. Ecological factors underlying the adrenocortical response to capture stress in arctic-breeding shorebirds. **General and Comparative Endocrinology**, v. 124, p. 1–11, 2001.

ORR, A. L. et al. Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in arctic ground squirrel. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 153, p. 213–221, 2009.

PAGE, M. M. et al. Intracellular antioxidant enzymes are not globally upregulated during hibernation in the major oxidative tissues of the 13-lined ground squirrel *Spermophilus tridecemlineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 152, p. 115–122, 2009.

PAGE, M. M. et al. Upregulation of intracellular antioxidant enzymes in brain and heart during estivation in the African lungfish *Protopterus dolloi*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 180, p. 361–369, 2010.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase**. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158–169, 1967.

PAMPLONA, R.; COSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, p. R843–863, 2011.

PAOLUCCI, M.; ROCCO, M.; VARRICCHIO, E. Leptin presence in plasma, liver and fat bodies in the lizard *Podarcis sicula*: fluctuations throughout the reproductive cycle. **Life Sciences**, v. 69, n. 20, p. 2399–408, 2001.

PECKETT, A. J.; WRIGHT, D. C.; RIDDELL, M. C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 60, n. 11, p. 1500–1510, 2011.

PENGELLEY, E. T.; FISHER, K. C. The effect of temperature and photoperiod on the yearly hibernating behavior of captive golden-mantled ground squirrels (*Citellus lateralis tescorum*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 41, n. 6, p. 1103–1120, 1963.

PILASTRO, A.; GOMIERO, T.; MARIN, G. Factors affecting body mass of young fat dormice (*Glis glis*) at weaning and by hibernation. **Journal of Zoology**, v. 234, p. 13–23, 1994.

PLACE, N. J.; KENAGY, G. J. Seasonal changes in plasma testosterone and glucocorticosteroids in free-living male yellow-pine chipmunks and the response to capture and handling**. Journal of Comparative Physiology B**, v. 170, n. 3, p. 245–251, 2000.

POLI, G.; PAROLA, M. Oxidative damage and fibrogenesis. F**ree Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 287-305, 1996.

PREEST, M. R.; CREE, A. Corticosterone treatment has subtle effects on thermoregulatory behavior and raises metabolic rate in the New Zealand common gecko, *Hoplodactylus maculatus*. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 81, n. 5, p. 641–650, 2008.

PRENDERGAST, B. J. et al. Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of immune responses in ground squirrels. **American Journal of**

Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 282, p. R1054–1062, 2002.

PROSTKO, C. R.; FRITZ, R. S.; KLETZIEN, R. F. Nutritional regulation of hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase. Transient activation of transcription. **The Biochemical Journal**, v. 258, n. 1, p. 295–299, 1989.

RAMOS-VASCONCELOS, G. R.; HERMES-LIMA, M. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 4, p. 675–685, 2003.

REEDER, D. M. et al. Changes in baseline and stress-induced glucocorticoid levels during the active period in free-ranging male and female little brown myotis, *Myotis lucifugus* (Chiroptera: Vespertilionidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 136, n. 2, p. 260–269, 2004.

REILLY, B. D. et al. Decreased hydrogen peroxide production and mitochondrial respiration in skeletal muscle but not cardiac muscle of the green-striped burrowing frog, a natural model of muscle disuse. **The Journal of Experimental Biology**, v. 217, p. 1087–1093, 2013.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 357–363, 1994.

ROBINSON, M. K. et al. Starvation enhances hepatic free radical release following endotoxemia. **The Journal of Surgical Research**, v. 69, n. 2, p. 325–330, 1997.

ROLFE, D. F.; BROWN, G. C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 731–758, 1997.

ROMERO, L. M. Seasonal changes in plasma glococorticoid concentrations in free-living vertebrates. **General and Comparative Endocrinology**, v. 128, p. 1–24, 2002.

ROMERO, L. M.; DICKENS, M. J.; CYR, N. E. The reactive scope model — A new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 3, p. 375–389, 2009.

ROMERO, L. M.; REED, J. M. Collecting baseline corticosterone samples in the field: Is under 3 min good enough? **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 140, p. 73–79, 2005.

ROUBLE, A. N.; TESSIER, S. N.; STOREY, K. B. Characterization of adipocyte stress response pathways during hibernation in thirteen-lined ground squirrels. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 393, n. 1-2, p. 271–282, 2014.

RUSSELL, R. L. et al. Extensive use of torpor in 13-lined ground squirrels in the fall prior to cold exposure. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 180, n. 8, p. 1165–1172, 2010.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Preparative Actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 2000.

SARSOUR, E. H. et al. Manganese superoxide dismutase regulates a metabolic switch during the mammalian cell cycle. **Cancer Research**, v. 72, n. 15, p. 3807–3816, 2012.

SATO, H. et al. Glucocorticoid Generates ROS to Induce Oxidative Injury in the Hippocampus, Leading to Impairment of Cognitive Function of Rats**. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 224–232, 2010.

SCHRADIN, C. et al. Leptin levels in free ranging striped mice (*Rhabdomys pumilio*) increase when food decreases: The ecological leptin hypothesis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 206, p. 139–145, 2014.

SCHWARTZ, C.; HAMPTON, M.; ANDREWS, M. T. Hypothalamic gene expression underlying pre-hibernation satiety. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 14, n. 3, p. 310–318, 2015.

SCHWARTZ, T. S.; BRONIKOWSKI, A. M. Dissecting molecular stress networks: identifying nodes of divergence between life-history phenotypes. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 739–756, 2013.

SECOR, S. M. Evolutionary and cellular mechanisms regulating intestinal performance of amphibians and reptiles. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 2, p. 282–94, 2005.

SEEBACHER, F. A review of thermoregulation and physiological performance in reptiles: what is the role of phenotypic flexibility? **Journal of Comparative Physiology B,** v. 175, n. 7, p. 453–461, 2005.

SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Molecular Cell**, v. 48, p. 158–167, 26 out. 2012.

SHERIFF, M. J. et al. Metabolic rate and prehibernation fattening in free-living arctic ground squirrels. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 86, n. 5, p. 515–527, 2013.

SHERIFF, M. J. et al. Thermoregulatory changes anticipate hibernation onset by 45 days: Data from free-living arctic ground squirrels. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 182, p. 841–847, 2012.

SHERWOOD, L.; KLANDORF, H.; YANCEY, P. H. Endocrine Systems. In: **Animal Physiology: from genes to organisms**. Thomson Brooks/Cole, p. 250–313, 2005.

SIES, H. Biochemistry of Oxidative Stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 12, p. 1058–1071, 1986.

SINGH, S. P. et al. Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* triggered by the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal (4-HNE). **Aging**, v. 1, n. 1, p. 68–80, 2009.

SINGH, S. P. et al. Role of the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the development and maintenance of obesity in mice. **Biochemistry**, v. 47, p. 3900–3911, 2008.

SORENSEN, M. et al. Effects of fasting on oxidative stress in rat liver mitochondria. **Free Radical Research**, v. 40, n. 4, p. 339–347, 2006.

SOUZA, S. C. R. et al. Seasonal metabolic depression, substrate utilisation and changes in scaling patterns during the first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis merianae*). **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 2, p. 307–318, 2004.

SPANOVICH, S.; NIEWIAROWSKI, P. H.; LONDRAVILLE, R. L. Seasonal effects on circulating leptin in the lizard *Sceloporus undulatus* from two populations. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 143, n. 4, p. 507–513, 2006.

STAMATI, K.; MUDERA, V.; CHEEMA, U. Evolution of oxygen utilization in multicellular organisms and implications for cell signalling in tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2011.

STEVENSON, R. D.; PETERSON, C. R.; TSUJI, J. S. The thermal dependence of locomotion, tongue flicking, digestion, and oxygen consumption in the wandering garter snake. **Physiological Reviews**, v. 58, n. 1, p. 46–57, 1985.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 12, p. 1715–1733, 1996.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Aestivation: signaling and hypometabolism. The **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. Pt 9, p. 1425–33, 2012.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 79, n. 1, p. 207–233, 2004.

STRUMWASSER, F. Factors in the pattern, timing and predictability of hibernation in the squirrel, *Citellus beecheyi*. **The American Journal of Physiology**, v. 196, n. 1, p. 8–14, 1959.

TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D. T.; KOWALTOWSKI, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 9, p. 1283–1297, 2009.

TALAEI, F. et al. Reversible remodeling of lung tissue during hibernation in the Syrian hamster. **The Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. Pt 8, p. 1276–1282, 2011.

TELEMECO, R. S.; ADDIS, E. A. Temperature has species-specific effects on corticosterone in alligator lizards. **General and Comparative Endocrinology**, v. 206, p. 184–192, 2014.

THOMAS, D. W.; GEISER, F. Periodic arousals in hibernating mammals: is evaporative water loss involved? **Functional Ecology**, v. 11, n. 5, p. 585–591, 1997.

TØIEN Ø et al. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n. 2, p. R572–83, 2001.

TOLEDO, L. F. et al. Effects of season, temperature, and body mass on the standard metabolic rate of tegu lizards (*Tupinambis merianae*). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 81, n. 2, p. 158–164, 2008.

TURBILL, C.; BIEBER, C.; RUF, T. Hibernation is associated with increased survival and the evolution of slow life histories among mammals. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 278, p. 3355–3363, 2011.

VAN BREUKELEN, F.; CAREY, H. V. Ubiquitin conjugate dynamics in the gut and liver of hibernating ground squirrels. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 172, n. 3, p. 269–273, 2002.

VAN BREUKELEN, F.; KRUMSCHNABEL, G.; PODRABSKY, J. E. Vertebrate cell death in energy-limited conditions and how to avoid it: what we might learn from mammalian hibernators and other stress-tolerant vertebrates. **Apoptosis**, v. 15, n. 3, p. 386–399, 2010.

VAN BREUKELEN, F.; MARTIN, S. L. Reversible depression of transcription during hibernation. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 172, n. 5, p. 355–361, 2002.

VAN BREUKELEN, F.; MARTIN, S. L. The hibernation continuum: physiological and molecular aspects of metabolic plasticity in mammals. **Physiology**, v. 30, n. 4, p. 273–281, 2015.

VAN DAMME, R.; BAUWENST, D.; VERHEYEN, R. F. The thermal dependence of feeding behaviour, food consumption and gut-passage time in the lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. **Functional Ecology**, v. 5, n. 4, p. 507–517, 1991.

VELICKOVSKA, V. et al. Proteolysis is depressed during torpor in hibernators at the level of the 20S core protease**. Journal of Comparative Physiology B**, v. 175, n. 5, p. 329–335, 2005.

VOITURON, Y. et al. Oxidative DNA damage and antioxidant defenses in the European common lizard (*Lacerta vivipara*) in supercooled and frozen states. **Cryobiology**, v. 52, p. 74–82, 2006.

WANG, P. et al. Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 8, p. 4556–4560, 1998.

WELKER, A. F. **Efeito da flutuação da disponibilidade de oxigênio e da privação alimentar sobre o metabolismo de radicais livres**. 2009. 287p. Tese (Doutorado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2009.

WELKER, A. F. et al. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 165, n. 4, p. 384 – 404, 2013.

WIKELSKI, M.; GALL, B.; TRILLMICH, F. Ontogenetic changes in food intake and digestion rate of the herbivorous marine iguana (*Amblyrhynchus cristatus*, Bell). **Oecologia**, v. 94, p. 373–379, 1993.

WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle *Trachemys scripta elegans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 170, n. 1-2, p. 177–185, 1997.

WONISCH, W. et al. Ultrastructural analysis of HNE-treated *Saccharomyces cerevisiae* cells reveals fragmentation of the vacuole and an accumulation of lipids in the cytosol. **Cell Biochemistry and Function**, v. 19, n. 1, p. 59–64, 2001.

WOODLEY, S. K. et al. Effect of tidal cycle and food intake on the baseline plasma corticosterone rhythm in intertidally foraging marine iguanas. **General and Comparative Endocrinology**, v. 132, p. 216–222, 2003.

WOODS, B. C.; ARMITAGE, K. B. Effect of food supplementation on juvenile growth and survival in *Marmota Flaviventris*. **Journal of Mammalogy**, v. 84, n. 3, p. 903–914, 2003.

WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 489–492, 2004.

YAN, L. et al. Myocardial ischemic protection in natural mammalian hibernation. **Basic Research in Cardiology**, v. 110, n. 9, p. 1–10, 2015.

YOU, J.-M. et al. Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, n. 6, p. 440–447, 2009.

ZAKRZEWSKA, K. E. et al. Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin toward an understanding of leptin resistance. **Diabetes**, v. 46, p. 717–719, 1997.

ZANCANARO, C. et al. The kidney during hibernation and arousal from hibernation . A natural model of organ preservation during cold ischaemia and reperfusion. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 14, p. 1982–1990, 1999.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4° ed. New Jersey: Prentice-Hall. 663p. 1999.

ZEMLYAK, I. et al. Effects of overexpression of antioxidants on the release of cytochrome c and apoptosis-inducing factor in the model of ischemia. **Neuroscience Letters**, v. 453, n. 3, p. 182–185, 2009.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425–32, 1994.