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

Parte I

Introdução Geral e Revisão de Literatura

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.

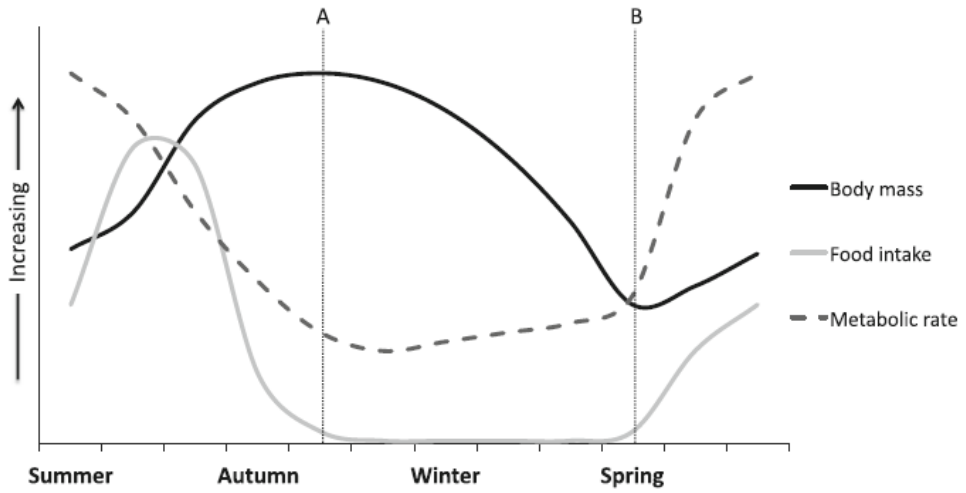

Figura 1.1 – Esquema geral simplificado do ciclo anual da massa corpórea, ingestão de alimento e metabolismo em um roedor hibernante de laboratório. A, início da hibernação; B, final da hibernação. Fonte: Florant e Healy (2011).

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).

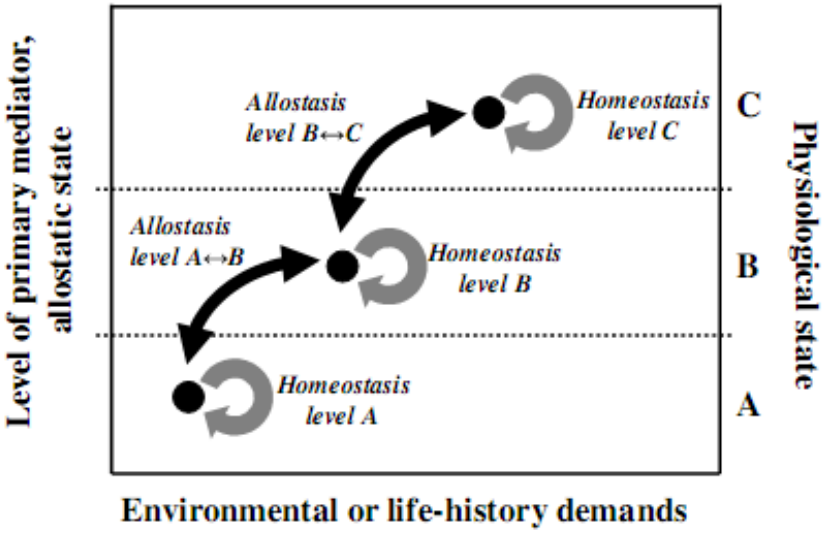

Figura 1.2 – Estados fisiológicos e níveis de mediadores primários (catecolaminas, citocinas e GCs) frente a diferentes demandas da história de vida. Fonte: Landys, Ramenofsky e Wingfield (2006).

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^{-}•), 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^{-}•, dependendo do tecido e concentração de substratos, e a maior parte do ROS intracelular é derivado do O_2^{-}• (TAHARA; NAVARETE; KOWALTOWSKI, 2009). O O_2^{-}• 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^{-}• 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^{-}• 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).

Parte 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*

Changes in the pattern of daily activities related to the energy demands of growth and storage in the first annual cycle of the hibernating lizard *Tupinambis merianae*

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 17 ºC) durante o inverno. O objetivo deste estudo foi investigar 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.

Palavras Chave: Hibernação, dormência sazonal, lagarto teiú, *Tupinambis merianae*, corticosterona, antecipação, sazonalidade, lipídios.

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. This 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 27g 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.

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

2.1. Introdução

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 (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 ajustes que 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 acumulados. 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. 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).

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. Nos animais que armazenam lipídios em órgãos adiposos, 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 deste compromisso é a correlação negativa entre a taxa de crescimento e a quantidade de reservas energéticas na cobra *Vipera berus* (FORSMAN; LINDELL, 1991). 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 uma 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 de eventos que dão suporte ao armazenamento de lipídios em mamíferos adultos foi proposto por Dark (2005), segundo o qual 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 da ingestão alimentar, antes que a massa corpórea atingisse o máximo no fim do outono. Uma sequência temporal de ajustes semelhante ocorre na pré-hibernação de ‘dormice' juvenis em cativeiro (GIROUD et al., 2014), já em esquilos terrícolas de vida livre a redução da taxa metabólica no final do outono ocorre depois que a massa corpórea máxima é atingida (SHERIFF et al., 2013). Tais evidências indicam que a relação temporal entre os ajustes fisiológicos e comportamentais que antecedem a hibernação é variável, inclusive entre espécies de mamíferos. 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.

Embora sejam mais prontamente lembrados como hormônios que promovem mobilização de energia em situações de emergência, evidências indicam que hormônios glicocorticóides (GCs) desempenham uma função importante na regulação do balanço energético nos vertebrados. Em hibernantes, os GCs atuariam como mediadores dos ajustes fisiológicos nas fases do ciclo anual caracterizadas por uma demanda energética elevada, como a pré-hibernação (LANDYS; RAMENOFSKY; WINGFIELD, 2006; MCEWEN; WINGFIELD, 2003). Por exemplo, há evidências sugerindo que níveis basais aumentados de GCs atuariam sinergicamente com a insulina, promovendo a deposição de lipídios durante os meses que antecedem a hibernação (DALLMAN et al., 1993; DARK, 2005). O padrão sazonal dos níveis de GCs em hibernantes foi investigado em algumas espécies de mamíferos, em estudos realizados com animais adultos, nos quais a relação entre os níveis de GCs e a deposição de lipídios se confunde com as alterações de GCs associadas com a fase reprodutiva (ARMITAGE, 1991; BOSWELL; WOODS; KENAGY, 1994; NUNES et al., 2006). Em contraste, estudos sobre a variação sazonal dos níveis de GCs em animais

sexualmente imaturos, em fases precoces de desenvolvimento, são praticamente inexistentes e potencialmente contribuiriam para o entendimento da função destes hormônios no contexto da dormência sazonal na ausência da função reprodutiva.

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 dormência, 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). Em contraste com a hibernação em pequenos mamíferos, que ocorre em baixas temperaturas ambientais (por exemplo, 2-3 ºC) e é interrompida por múltiplos episódios de despertar, a hibernação nos teiús ocorre em temperaturas amenas (~17 ºC) e aparentemente é um estado contínuo, que se estende ao longo de vários meses nos quais os animais permanecem inativos no interior da toca. Nos indivíduos adultos, o período de dormência se estende por 4 a 5 meses (ABE, 1995) enquanto que nos jovens a duração é de cerca de 3 meses apenas, possivelmente devido à sua menor capacidade de estocar substratos energéticos. No primeiro e segundo anos de vida os teiús crescem a taxas elevadas e a maturidade reprodutiva é alcançada por volta do terceiro ciclo anual, quando então a taxa de crescimento diminui e praticamente cessa no quarto ano (TOLEDO et al., 2008). Portanto, as alterações sazonais da adiposidade em animais jovens, nos primeiros anos de vida, são estreitamente relacionadas com as demandas de energia para o crescimento e desenvolvimento e para a dormência de inverno. 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.

O presente estudo teve como objetivo investigar as alterações no padrão de atividades diárias que compatibilizam as demandas de crescimento e de armazenamento de lipídios em teiús recém-eclodidos. Tendo em vista este objetivo, as taxas de crescimento e de

ganho de massa e comportamentos associados com a aquisição (ingestão de alimento) e gasto de energia (atividade diária e locomotora) foram analisados ao longo do primeiro ciclo anual. Com base no modelo proposto por Dark (2005), testou-se 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 observada nesta fase (SOUZA et al., 2004). Assim, na segunda metade do outono, haveria um redirecionamento da alocação de energia do crescimento e da atividade diária para o armazenamento de lipídios, permitindo que os neonatos 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 taxas elevadas de deposição de lipídios e com a atividade metabólica aumentada, face às múltiplas demandas do desenvolvimento, crescimento e preparação para os meses de dormência.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Animais experimentais e manutenção

Lagartos teiú jovens (*Tupinambis merianae* Duméril e Bribon), recém-eclodidos, foram obtidos de uma população estabelecida em Rio Claro, S.P., e transportados para o Instituto de Biociências da USP, em São Paulo. No período de Março a Novembro os teiús foram mantidos em uma sala com acesso à iluminação natural no interior de caixas plásticas de 120 litros, cada caixa contendo 6 a 9 animais devidamente identificados para a análise do comportamento individualizado. Lâmpadas incandescentes foram instaladas na parte superior das caixas e foram programadas para um regime de 9 h de claro e 15 h de escuro, além do regime natural de luz solar proveniente do ambiente externo. Os lagartos puderam alternar livremente entre períodos de aquecimento, ao subirem em pedras colocadas abaixo da lâmpada, e de resfriamento, ao se esconderem em um abrigo de madeira ou entre as folhas de jornal que cobriam o fundo da caixa (Fig. 2.1). Os animais foram alimentados a cada dois dias com carne moída, coração de galinha, ovo e frutas, enriquecidos com minerais, e água *ad libitum*.

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

No início do inverno, uma vez constatado que os teiús se tornaram totalmente inativos dentro do abrigo, as lâmpadas foram desligadas e a oferta de alimento foi interrompida até o início da primavera, quando os animais expeliram uma massa seca de ácido úrico e voltaram a se movimentar do lado de fora do abrigo. Estes sinais foram considerados o início do despertar e neste momento o regime de luz das lâmpadas incandescentes foi restabelecido, observando-se um rápido retorno da atividade termorregulatória nos animais. Durante 48 h após o despertar os animais tiveram livre acesso apenas à água, introduzindo-se a alimentação nos dias subsequentes.

A Figura 2.2 apresenta as temperaturas máxima e mínima no interior das caixas de manutenção, ao longo do ano. As temperaturas foram medidas com um termômetro de mercúrio colocado na área de resfriamento, junto ao abrigo, e outro colocado na área de aquecimento, próximo às pedras. A umidade relativa do ar foi medida com um higrômetro colocado na região do abrigo. As temperaturas mínimas registradas nas duas áreas se sobrepõem e em geral refletem a temperatura noturna, enquanto que as temperaturas máximas diferem em cerca de 8 graus nos meses em que a lâmpada permaneceu acesa. Durante os meses de junho, julho e agosto, que coincidem com a dormência de inverno dos teiús, foram registradas as menores temperaturas médias e a maior umidade relativa do ar (UR) em comparação com os meses de outono e primavera. De acordo com o boletim do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo (IAG – USP, 2013), nos meses de inverno do ano de 2013 a umidade relativa do ar foi maior em comparação com as médias históricas, o que resultou na elevada umidade relativa do ar medida nas caixas de manutenção dos teiús nesta fase do ano.

2.2.2. Análise morfométrica

O comprimento rostro-cloacal e a massa corpórea dos teiús foram medidos quinzenalmente durante as fases em que os animais encontravam-se ativos. A partir do mês de junho as medições foram interrompidas, para evitar o estresse da manipulação e sua interferência na entrada em dormência, e uma única pesagem dos animais foi feita após cerca de 60 dias de dormência.

2.2.3. Análise do comportamento e da ingestão alimentar

O comportamento dos teiús nas caixas de manutenção foi registrado por meio de filmagens realizadas semanalmente. Os animais foram identificados individualmente por meio de cores e números. Uma gaiola com uma câmera presa ao teto e conectada a um computador portátil foi posicionada sobre cada uma das caixas, em dias alternados. O programa Yawcam (Magnus Lundvall, versão 0.4.0) foi configurado para registrar uma imagem por segundo no período de 7h00 às 18h00, durante os meses em que os animais encontravam-se ativos, e as filmagens foram suspensas após a constatação de que todos os animais haviam ingressado no estado de dormência. Durante o inverno os teiús foram inspecionados a cada 2 dias, até que os primeiros sinais de despertar foram observados, quando então as filmagens foram retomadas.

Posteriormente, as imagens foram convertidas em vídeos e o comportamento dos animais foi analisado visualmente para quantificação das seguintes variáveis:

- **Atividade diária:** intervalo de tempo entre a primeira e a última vez que o animal foi visto fora do abrigo, movendo-se no interior da caixa, durante um dia.
- **Assoalhamento:** média da somatória dos intervalos de tempo de permanência do animal sobre a pedra, aquecendo-se embaixo da lâmpada ligada, durante um dia.
- **Atividade locomotora:** média do número de vezes que o animal subiu na pedra durante o seu deslocamento na caixa de manutenção, durante um dia.
- **Atividade alimentar:** média do número de vezes que o animal abocanhou uma porção de alimento durante um dia.

Adicionalmente, uma estimativa da quantidade de alimento ingerido em gramas foi obtida através da pesagem do alimento oferecido pela manhã (≈9h00) e das sobras de alimento recolhidas à tarde (≈15h00). A perda evaporativa de água do alimento durante o intervalo entre as pesagens foi estimada a partir da variação de peso do alimento colocado em caixas sem animais, nas mesmas condições de temperatura e umidade relativa do ar que as demais caixas, e o valor médio obtido (≈30%) foi usado para o cálculo da variável abaixo.

- **Ingestão de alimento:** quantidade média de alimento ingerido por dia em gramas calculada para um teiú com massa corpórea fixa de 50 gramas em diferentes etapas do ciclo anual.

2.2.4. Grupos experimentais e coleta de tecidos

Lagartos teiú foram mortos em diferentes etapas do primeiro ciclo anual, as quais foram caracterizadas com base nas mudanças de comportamento e atividade geral dos animais e sua relação com a taxa metabólica de teiús jovens, conforme estudos prévios realizados no laboratório (SOUZA et al., 2004; DA SILVEIRA et al., 2013). Após jejum de 48 h, os animais foram pesados e mortos por decapitação, constituindo os seguintes grupos experimentais (Fig. 2, setas): '**atividade de início de outono'** (média da massa corpórea ± erro padrão = 68 ± 10 g), que inclui animais mortos na segunda quinzena de abril; '**atividade de fim de outono'** (49 ± 1,5 g), que inclui animais mortos na segunda quinzena de maio; '**dormência de inverno ou hibernação'** (37 ± 2,7 g), que inclui animais mortos na segunda quinzena de julho, após cerca de 60 dias de jejum e inatividade; '**despertar'**, que inclui animais mortos na primeira quinzena de setembro, 48-72 h após o despertar e a ingestão de água (38 ± 2,5 g) e '**atividade de primavera'** (55 ± 7,5 g), que inclui animais mortos no final de outubro, 30-40 dias após o despertar e retomada da alimentação. Em todos os grupos os animais foram mortos entre 10 e 13 h, de maneira a evitar interferência de flutuações circadianas de variáveis fisiológicas.

Amostras de sangue foram coletadas diretamente dos vasos do pescoço e rapidamente transferidas para tubos heparinizados, os quais foram mantidos em gelo todo o tempo. O intervalo de tempo entre a remoção do animal das caixas de manutenção e a coleta de sangue foi sempre inferior a 3 min, de modo a evitar o aumento dos níveis de corticosterona induzido pelo estresse da manipulação (ROMERO; REED, 2005). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em baixa velocidade e várias alíquotas do plasma coletado foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C até o momento do uso. Os corpos gordurosos foram expostos por meio de uma incisão na região abdominal e foram rapidamente removidos e pesados.

2.2.5. Dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona (CORT)

Os níveis plasmáticos de CORT foram quantificados pelo método imuno-enzimático utilizando um kit de reagentes (Cayman Chemicals Inc.). A extração dos hormônios esteroides do plasma foi feita com éter, utilizando-se 10 uL de amostra em duplicata e em duas diluições. O coeficiente de variação intra-ensaio foi em média 9% e inter-ensaio14%.

2.2.6. Análise estatística

Os dados referentes às variáveis comportamentais e ao ganho de massa e crescimento foram agrupados por quinzenas e a influência das fases do ciclo anual sobre as variáveis foi avaliada com o teste de ANOVA 'one-way'. Face à indicação de variabilidade significativa entre os grupos experimentais, comparações múltiplas foram feitas entre as médias dos grupos de dados através do teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Os dados de variáveis discretas e aqueles que não passaram pelo teste de normalidade foram analisados por meio do teste de variância não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn para identificar quais grupos diferiam entre si. Os resultados da análise de variância e os valores de P foram reportados no texto e os resultados do teste de comparações múltiplas entre as médias foram considerados significantes quando $P \leq 0{,}05$ e marginalmente significantes quando $0{,}1 \geq P \geq 0{,}05$, de acordo com recomendações da 'American Physiological Society' (CURRAN-EVERETT; BENOS, 2004). Todas as análises foram feitas com base em Zar (1999) utilizando-se o programa Sigma Stat (Systat Scientific Software).

2.3. Resultados

2.3.1. Tamanho, Massa Corpórea e Adiposidade

Ao chegarem ao laboratório no início de março, os teiús tinham em média 27 g de massa corpórea e 9,3 cm de comprimento rostro-cloacal. Dado que os teiús ao eclodirem possuem em média 15 g de massa corpórea (SOUZA et al., 2004), teria havido um aumento de cerca de 2 vezes da massa corpórea antes do início do experimento. No período de março a outubro houve uma variação significativa do comprimento rostro-cloacal dos neonatos (Fig.2.3-A; F=14,982; P<0,001; $d.f.$=189) e comparações múltiplas indicaram que o comprimento em todas as quinzenas é significativamente maior em comparação com a primeira medida, no início de março. No período experimental houve dois episódios de crescimento dos teiús, o primeiro nos meses de março e abril, quando o comprimento aumentou 20%, e o segundo no mês de outubro, quando o comprimento atingiu valores 27% maiores em relação ao início de março, entre os quais houve uma longa pausa em que praticamente não houve alteração da variável. Adicionalmente, as taxas associadas ao crescimento dos animais foram significativamente diferentes no ciclo anual (Fig. 2.3-B; H=63,650; P<0,001; $d.f.$=6). Ao longo dos meses de abril e maio houve um decréscimo gradual das taxas, conforme indicam os valores significativamente menores em comparação aos registrados na segunda quinzena de março e primeira de abril. Após o despertar da dormência houve um pequeno incremento do comprimento rostro-cloacal, de modo que ao final de outubro a variável acumulou um aumento de 27% em relação ao início do período experimental. A taxa de crescimento no início da primavera é significativamente menor do que as taxas observadas no final do verão e início do outono.

A massa corpórea dos teiús variou significativamente ao longo do período experimental (Fig 2.3-A; H=63,170; P<0,001; $d.f.$=10). Nos meses de março e abril houve um aumento significativo da massa, que atingiu valores 40% maiores ao final desse período em comparação com o início de março. No mês de maio a massa corpórea dos teiús estabilizou e nos meses subsequentes houve uma queda gradual dos valores, porém não significativa. As taxas associadas às mudanças da massa corpórea também diferiram significativamente no ciclo anual (Fig 2.3-B; H=78,748; P<0,001; $d.f.$=9), observando-se uma queda gradual da taxa

de ganho de peso ao longo de abril e maio até valores próximos à zero nas segundas quinzenas de maio e julho. Após 60 dias de jejum e hipometabolismo, que correspondem a mais da metade do período total de dormência, a massa corpórea dos teiús diminuiu 17% em comparação com o final do outono em relação à 2ª quinzena de maio, uma variação sem significância estatística, e não houve alteração adicional após o término do período total de dormência, provavelmente porque os animais ingeriram água nas primeiras 48 h após o despertar, antes da pesagem. No final de outubro, a massa corpórea dos teiús aumentou cerca de 80% em relação ao despertar e dobrou em relação ao início de março. Em contraste com a variação do comprimento, a taxa de ganho de massa corpórea em outubro foi maior em comparação com as taxas no fim do outono (segundas quinzenas de maio e julho).

A massa dos corpos gordurosos abdominais dos teiús, expressa como porcentagem da massa corpórea, está apresentada na Figura 2.3-C. O nível máximo de adiposidade desse tecido foi observado no início do outono (segunda quinzena de abril), quando a sua massa constituiu 3,7% da massa corpórea dos neonatos, e houve uma variação significativa ao longo do primeiro ciclo anual (F=6,813; P<0,001; $d.f.$=27). Essa variação está associada a uma redução progressiva da porcentagem para 1,4% durante o despertar da dormência (primeira quinzena de setembro) e 1,1% na atividade de primavera (segunda quinzena de outubro). Esses dados sugerem uma redução da ordem de 70% da gordura abdominal em comparação com a massa do tecido no início do outono. Após a retomada da alimentação na primavera (segunda quinzena de outubro), a reduzida massa relativa dos corpos gordurosos abdominais indica que a recuperação desse estoque provavelmente tem início em etapas mais tardias do ciclo anual.

2.3.2. Comportamento e atividade

O padrão de atividade diária ao longo do primeiro ciclo anual dos teiús variou significativamente no ciclo anual (Fig. 2.4; H=60,90; P<0,001; $d.f.$=8). Na primeira quinzena de abril, cerca de 74% dos teiús foram observados diariamente fora do abrigo, em atividade, a qual teve início por volta de 9h00min e duração total média de 4,7 horas. Nas semanas seguintes, a proporção de animais ativos diminuiu progressivamente até 40% e os teiús saíram do abrigo cada vez mais tarde e retornaram cada vez mais cedo, de modo que a partir da

segunda quinzena de maio a atividade restringiu-se a cerca de 1 h por dia, uma mudança significativa em relação à primeira quinzena de abril. A ausência de registro de alguns teiús fora do abrigo no decorrer desse período, ou mesmo antes, sugere que muito provavelmente alguns animais já haviam ingressado em dormência. A partir da segunda quinzena de junho, nenhum animal foi detectado fora do abrigo e as filmagens foram interrompidas até que os primeiros sinais de despertar foram observados. Durante a primeira quinzena de setembro, uma média de 75% dos animais foi observada fora do abrigo por cerca de 3 horas e meia, por dia. Na segunda quinzena de setembro esse número aumentou para 83% e o tempo de permanência fora do abrigo dobrou, de modo que a atividade diária média foi de 7 horas, significativamente maior do que a atividade diária registrada durante todo o outono, exceto na primeira quinzena de abril. Um padrão de atividade diária similar foi observado nas semanas seguintes, durante a primavera.

Durante o outono, grande parte da atividade diária dos teiús corresponde ao tempo que os animais permaneceram em repouso sobre a pedra, com a lâmpada ligada, e esse tempo foi considerado uma estimativa aproximada do comportamento de assoalhamento observado na natureza. O tempo de assoalhamento variou significativamente no ciclo anual (Fig. 2.5-A; H=47,423; P<0,001; $d.f.$=8), tendo uma duração média de 2 horas por dia na primeira quinzena de abril e depois diminuindo progressivamente até a sua completa suspensão nos meses de dormência. Após o despertar, o aumento da atividade de assoalhamento também foi gradual, totalizando em média 2 horas diárias na primeira quinzena de setembro e 4 horas diárias na segunda quinzena de setembro e primeira de outubro, de modo que o tempo máximo registrado na primavera é cerca de 4 vezes maior em comparação com a segunda quinzena de abril, mês de maio e primeira quinzena de junho. No entanto, uma parte da variação sazonal do tempo diário sobre a pedra possivelmente se deve à redução das horas de atividade diária, dado que o tempo sobre a pedra relativizado por hora de atividade diária varia ao longo do ciclo anual (H=19,361; P=0,013; $d.f.$=8), porém o teste de comparações múltiplas não apontou onde estaria a diferença (Fig 2.5-A).

A atividade locomotora dos teiús exibiu um padrão sazonal similar ao do tempo de assoalhamento e variou significativamente ao longo do ciclo anual (Fig. 2.5-B; H=40,887; P<0,001; $d.f.$=8). A atividade locomotora foi estimada com base na intensidade de deslocamento dos animais sobre a pedra e foi maior na primeira quinzena de abril, quando os animais subiram na pedra em média 23 vezes por dia. Ao longo do outono a atividade

locomotora diminuiu significativamente para 5 e 3 vezes por dia na segunda quinzena de maio e primeira quinzena de junho, respectivamente, e aparentemente cessou durante todo o período de dormência. Uma vez que a medida de atividade locomotora está associada à medida de atividade termorregulatória, descrita acima, é possível constatar que, no outono, a intensidade de deslocamento diminuiu acentuadamente enquanto que o tempo de permanência do animal sobre a pedra por evento de assoalhamento foi similar, oscilando entre 6 e 21 min no mesmo período (Fig. 2.5-D). O tempo de permanência na pedra por evento de assoalhamento variou sazonalmente (H=30,548; P<0,001; $d.f.$=8). Após a retomada da atividade na primavera, a atividade locomotora foi similar à registrada em meados do outono, porém, o tempo de permanência na pedra por evento de assoalhamento é significativamente maior na segunda quinzena de setembro e primeira quinzena de outubro em comparação com a segunda quinzena de abril e primeira quinzena de maio. Este fato está refletido no maior tempo de atividade diária descrito para esta fase. A atividade locomotora calculada por hora de atividade diária variou sazonalmente (Fig. 2.5-C; H=33,472; P<0,001; $d.f.$=8) e foi menor na segunda quinzena de setembro e primeira quinzena de outubro em comparação com os meses de outono.

A Figura 2.6 apresenta a atividade alimentar, dada em número de vezes que os animais abocanharam o alimento por dia, e a ingestão de alimento, dada pela quantidade de alimento efetivamente ingerido por dia por um teiú de 50 g de massa corpórea. Houve um efeito significativo da sazonalidade sobre a atividade alimentar (H=27,830; P<0,001; $d.f.$=7) e ingestão de alimento (H=42,027; P<0,001; $d.f.$=6) ao longo do primeiro ciclo anual dos teiús. A ingestão de alimento na segunda quinzena de março foi de 4,3g para um teiú de 50g de massa corpórea. Na primeira quinzena de abril, a atividade alimentar foi, em média, de 8 vezes por dia (Fig. 2.6-A) e, no total, um teiú de 50 g teria ingerido cerca de 3 g de alimento ou o equivalente a 6% da sua massa em um dia (Fig.2.6-B). Ao longo das semanas seguintes a ingestão de alimento diminuiu progressivamente e foi significativamente menor na primeira e segunda semanas de maio em comparação com o final do verão (segunda quinzena de março). Apesar de um padrão de variação muito semelhante ocorrer nos dados de atividade alimentar, a estatística não detectou diferença significativa desta variável entre as semanas iniciais e finais do outono. A partir da primeira quinzena de junho nenhum teiú foi visto se alimentando e em seguida todos os animais ingressaram em dormência. Após cerca de 90 dias de jejum e hipometabolismo os teiús retomaram a alimentação de forma gradual. Na primeira quinzena

de setembro, cerca de 70% dos animais abocanharam o alimento em média 2,5 vezes por dia. Um aumento pronunciado da atividade alimentar ocorreu na segunda quinzena de setembro, quando os animais abocanharam o alimento em média 13 vezes por dia; essa atividade alimentar é similar ao observado no início do outono e significativamente maior em comparação com a do mês de maio. No mês de outubro, a atividade alimentar foi menor, 4-5 vezes por dia, porém, um teiú de 50 g teria ingerido cerca de 4-6 g de alimento por dia ou 10% da sua massa corpórea, uma quantidade significativamente maior em relação ao mês de maio. Adicionalmente, 90-100% dos teiús foram visto ingerindo alimento após cerca de 40 dias de atividade na primavera.

2.3.3. Níveis plasmáticos de CORT

Os níveis plasmáticos de CORT seguiram um padrão similar ao observado na atividade diária dos teiús (Fig. 2.7; F=4,686; P=0,006; $d.f.$=27). A concentração mais elevada foi observada em animais do grupo de atividade de início outono e uma redução progressiva ocorreu até valores 75 e 86% menores nos grupos de dormência e despertar, respectivamente. Na atividade de primavera, os níveis de CORT foram 32% menores do que na atividade de início de outono (segunda quinzena de abril, diferença não significativa) e similares aos encontrados no grupo de atividade de fim de outono.

2.4. Discussão

O presente estudo teve como objetivo investigar as alterações no padrão de atividades diárias que compatibilizam as demandas de crescimento e de armazenamento de lipídios em lagartos teiú recém-eclodidos. Os animais estudados eclodiram por volta da metade do verão e exibiram intensa atividade diária e termorregulatória no início do outono, cerca de um mês após sua transferência para o laboratório. Nesta etapa do ciclo anual, os teiús permaneceram fora do abrigo durante cerca de cinco horas por dia e, desse total, ao menos duas horas assoalhando sobre as pedras. No entanto, é possível que as variáveis já estivessem em declínio no início do outono em relação ao verão. Tal interpretação se baseia no fato de que a atividade dos teiús na primavera foi ainda maior do que a observada no início do outono e é possível que essa maior intensidade também ocorra no verão, quando há um pico de crescimento dos neonatos. Ao longo do outono houve uma progressiva redução da atividade geral, até que os animais espontaneamente entraram em dormência no início do inverno. Este perfil sazonal do comportamento de teiús jovens, manifestado em condições de laboratório, é muito semelhante ao comportamento de teiús adultos criados em semi-cativeiro, os quais permanecem fora do abrigo por mais tempo por dia nos meses de primavera e de verão (MILSOM et al., 2012). As alterações das variáveis comportamentais observadas em neonatos seriam acompanhadas por marcadas alterações da taxa metabólica de repouso (Souza *et al.*, 2004) e corroboram as evidências de que o padrão sazonal dos teiús é o resultado da expressão de um ritmo endógeno. A redução da atividade diária durante o outono levaria a uma diminuição do tempo de exposição à luz e do fotoperíodo ‘efetivo’ que atua sobre os teiús, conforme proposto por Mayhew (1965). A melatonina, produto de secreção de células foto-sensíveis da pineal de répteis, provavelmente desempenha um importante papel no controle do comportamento termorregulatório dos teiús, assim como descrito em outros répteis (revisão em BERTOLUCCI; FOÀ; TOSINI, 2002). Este hormônio atuaria como um intermediário entre os sinais de luminosidade e as respostas fisiológicas e comportamentais, coordenando a atividade e a termorregulação com as condições ambientais nas escalas de tempo diária e sazonal (SEEBACHER, 2005).

O padrão do comportamento dos teiús sugere que a alimentação tinha início somente após os animais permanecerem algum tempo aquecendo sob a lâmpada. Depois de ingerir a

primeira porção de alimento, os teiús alternavam as atividades de assoalhamento e de alimentação e muitos permaneciam sob a lâmpada até o momento de se recolherem ao abrigo. No conjunto, esses resultados refletem o fato de que a temperatura corpórea influencia de maneira significativa o comportamento alimentar e a digestão em répteis, modulando as taxas de diversos processos fisiológicos associados à aquisição de energia. Em um lagarto lacertídeo, a taxa de digestão aumenta com o aumento da temperatura corpórea e em cobras, uma redução da temperatura corpórea logo após a ingestão do alimento frequentemente causa regurgitação (STEVENSON; PETERSON; TSUJI, 1985; VAN DAMME; BAUWENST; VERHEYEN, 1991). Essa estreita relação é ainda mais crítica em animais jovens, nos quais a demanda de energia para dar suporte ao crescimento e à elevada taxa metabólica massa-específica requerem a ingestão e o processamento de grandes quantidades de nutrientes. Um estudo com iguanas mostrou que animais jovens exibem temperatura corpórea e taxas de ingestão e digestão de alimento mais elevadas em comparação com adultos (WIKELSKI; GALL; TRILLMICH, 1993). Nos teiús eclodidos no verão, a alimentação ainda é intensa no início do outono e diminui progressivamente nas semanas seguintes, acompanhando o padrão sazonal de variação da atividade diária e do assoalhamento. Este acoplamento das variáveis possivelmente otimiza os processos de digestão e absorção de nutrientes no período em que há um declínio da alimentação e demais atividades nos teiús neonatos. Em contraste, a redução da atividade alimentar e da ingestão de alimento ao longo das semanas ocorre mais rapidamente e cessa antes que a atividade diária e o assoalhamento, de maneira que no início de junho os teiús ainda saíram do abrigo e permaneceram algum tempo assoalhando sob a lâmpada, porém não se alimentaram. Adicionalmente, nesta etapa do ciclo anual houve uma acentuada redução da atividade locomotora e do número de episódios de assoalhamento, porém os teiús permaneceram mais tempo em repouso sobre a pedra, o que possivelmente contribui para a redução do gasto energético e preserva as reservas energéticas depositadas para os meses de dormência.

Os aspectos comportamentais relacionados com o gasto e a aquisição de energia, acima discutidos, têm consequências importantes para o desenvolvimento ontogenético e para a sobrevivência dos lagartos teiú no primeiro ciclo anual. Segundo Souza et al. (2004), os teiús nascem com cerca de 15 g de massa corpórea e a taxa de ganho de massa no verão é da ordem de 1,0 g por dia, diminuindo para 0,4 e 0,2 g por dia no início e no final do outono, respectivamente, até alcançar balanço negativo durante o inverno. No presente estudo, os teiús

tinham em média 27 g de massa corpórea e 9,3 cm de comprimento rostro-cloacal no início de março, quando as primeiras medições foram feitas. Nas semanas seguintes houve um acréscimo de cerca de 0,5 g e 0,1 cm por dia e ambas as taxas diminuíram progressivamente durante o outono, de modo consistente com a descrição no artigo citado acima. Enquanto a variação do comprimento rostro-cloacal expressa o crescimento linear dos teiús, a variação da massa corpórea reflete o crescimento e o armazenamento de energia, uma vez que abrange tanto componentes estruturais (ossos, músculos e órgãos internos) quanto lipídio e outros substratos armazenados nos tecidos. Esquilos terrícolas neonatos iniciam a deposição de lipídios com seis semanas de idade; inicialmente o armazenamento ocorre concomitantemente ao crescimento estrutural, mas após cerca de duas semanas a massa de componentes estruturais e o crescimento linear estabilizam e o acréscimo de massa corpórea é resultado apenas da deposição de lipídios (MORTON; MAXWELL; WADE, 1973). No presente estudo, a massa relativa dos corpos gordurosos abdominais foi usada como índice de adiposidade e da quantidade de energia alocada no armazenamento desse substrato ao longo do outono. No início do outono, a massa relativa dos corpos gordurosos foi 3,7% e no fim do outono 2,7% e, embora a diferença não seja estatisticamente significativa, ela contrasta com o padrão anteriormente descrito mostrando um pico da adiposidade no final do outono (Souza *et al*., 2004). Essa discrepância possivelmente resulta da massa corpórea 27% maior no grupo de início de outono (67,0 g) em comparação com o de final de outono (49,5 g), uma vez que a massa relativa dos corpos gordurosos é maior nos teiús maiores e que, portanto, o acúmulo de lipídios é desproporcional ao tamanho corpóreo em teiús neonatos (SOUZA et al., 2004). Além da plasticidade do crescimento em teiús da mesma ninhada, diferenças de tamanho corpóreo entre as ninhadas têm sido observadas ao longo dos anos, sugerindo que a taxa de crescimento de teiús jovens é fortemente influenciada por fatores genéticos (A. S. Abe e S. C. R. de Souza, informação pessoal). Adicionalmente, os teiús no presente estudo interromperam a alimentação e mostraram sinais de dormência mais cedo em relação ao trabalho citado, o que pode ter levado ao consumo de uma parte das reservas durante o outono. Apesar de eventuais diferenças com respeito ao curso temporal dos eventos, a massa relativa dos corpos gordurosos durante o outono indica que o nível de adiposidade era alto nos animais em geral, ressaltando a importância de mecanismos reguladores do metabolismo lipídico na fase de preparação para a dormência sazonal. Por exemplo, observou-se uma acentuada inibição das enzimas carnitina-palmitoil transferase I e II (CPT I e II) e β-hidroxiacil-CoA desidrogenase

(HOAD), limitantes da taxa de oxidação de ácidos graxos, no fígado de animais em pré-dormência, um ajuste que favorece a lipogênese nesta fase (HADDAD, 2007; SOUZA et al., 2004).

A ideia de que as alterações da adiposidade em animais hibernantes são produto de uma mudança programada do nível ideal de adiposidade não é recente. Há mais de 30 anos foi proposto que as variações anuais da massa corpórea em animais hibernantes seriam 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). 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 (revisão em 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). No presente estudo, os níveis plasmáticos de CORT mais elevados foram observados na primeira metade do outono, associados com alimentação intensa e alto grau de adiposidade. Um padrão similar, com aumento da concentração de CORT na pré-hibernação paralelamente ao aumento da massa corpórea, foi observado em esquilos terrícolas e morcegos, associado a uma intensa atividade diária e alimentar (NUNES et al., 2006; REEDER et al., 2004). Em cobras a concentração basal de CORT é maior no verão, quando o índice de condição corporal também é maior, e ambos diminuem no outono antes da

hibernação (MOORE et al., 2000). No conjunto, as evidências fortemente sugerem um papel de GCs na fase de armazenamento de reservas energéticas que antecede a hibernação nos teiús.

O mecanismo através do qual os GCs favorecem o aumento da adiposidade ainda não é conhecido, mas uma alternativa seria através do 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, hormônio sintetizado principalmente nos adipócitos e envolvido na regulação do balanço energético, 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). Foi demonstrado que 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). As evidências da literatura e do presente trabalho, mostrando uma maior concentração de GCs durante o outono, sugerem um papel importante de GCs nos ajustes que promovem a ingestão de alimentos e a deposição de substratos energéticos nos teiús.

Na maioria das espécies de vertebrados estudados 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. Face às mudanças da organização temporal das atividades diárias ao longo do primeiro ciclo anual dos teiús, seria interessante que um trabalho futuro analisasse se estas mudanças são acompanhadas por uma variação do padrão diário de secreção de CORT. O principal sinal ambiental (‘zeitgeber’) que arrasta o ritmo de secreção de GCs é o ciclo claro-escuro, no entanto, existem evidências de uma relação bidirecional na qual o ritmo de secreção de GCs afeta o ritmo de ingestão de alimento e o ritmo de ingestão de alimento também afeta o ritmo de secreção de GCs, somando-se ao efeito do ciclo claro-

escuro e atuando como um *zeitgeber* (DALLMAN et al., 1993; KRIEGER; HAUSER; KREY, 1977). Uma relação bidirecional também parece existir entre GCs e a temperatura corpórea em répteis através da modulação do comportamento termorregulatório. Níveis aumentados de CORT aumentam a procura por fontes de calor (PREEST; CREE, 2008) ou por locais de resfriamento (BELLIURE; CLOBERT, 2004) em diferentes espécies; por outro lado, a concentração plasmática de CORT pode aumentar em répteis expostos a temperaturas elevadas (TELEMECO; ADDIS, 2014; WOODLEY et al., 2003) ou baixas (DUPOUÉ et al., 2013). Vários estudos também têm mostrado uma correlação positiva entre os níveis de GCs e a intensidade da atividade locomotora em diversos vertebrados (revisao 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 dos teiús durante os meses de atividade.

O mesmo argumento sobre um papel da CORT nos eventos do ciclo diário 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. Evidências com esquilos sugerem que as variações sazonais dos níveis de GCs estão associadas a um ritmo circanual, gerado por um temporizador endógeno (NUNES et al., 2006). No presente estudo, os níveis de CORT são elevados no início do outono e diminuem nas semanas subsequentes, juntamente com uma diminuição gradual das taxas de ganho de peso e comprimento corpóreos e da atividade diária dos teiús. Observações sobre o comportamento geral de teiús jovens em laboratório foram comentadas em estudos prévios, porém, o presente estudo é o primeiro a realizar uma análise sistemática de variáveis comportamentais e suas alterações durante o primeiro ciclo anual. Em um trabalho com teiús adultos, Milsom e col. (2012) referem-se ao conjunto dos ajustes comportamentais no final do outono como ‘supressão metabólica comportamental’ e os presentes resultados mostram que estes ajustes se manifestam nos animais recém-eclodidos, em antecipação ao jejum e dormência no primeiro ciclo anual.

A depressão metabólica se instala de forma gradual nos teiús jovens, de modo que no final da atividade de outono já se observa uma diminuição da taxa de consumo de O_2 de 50% a 25ºC em comparação com o início do outono, associada com anorexia e alteração do ritmo

diário (SOUZA et al., 2004). Esta condição intermediária se estende por algumas semanas, até que os animais se tornam totalmente inativos no interior do abrigo. De modo semelhante, pequenos mamíferos apresentam episódios de torpor durante o outono (GIROUD et al., 2014; RUSSELL et al., 2010; SHERIFF et al., 2012), os quais foram interpretados pelos autores como 'ensaios termorregulatórios' realizados em preparação para a drástica redução da temperatura corpórea que acompanha a dormência nestes animais. Esta hipótese foi formulada há várias décadas por Strumwasser (1959) para explicar a ocorrência de episódios de torpor cada vez mais longos e em temperatura corpórea cada vez menor no início do período de hibernação; portanto, a importante contribuição dos estudos mais recentes está em mostrar que estes 'ensaios' ocorrem bem mais cedo no ciclo anual, a partir do outono. Os teiús, à medida que o outono avança, permanecem cada vez menos horas por dia assoalhando e eventualmente intercalam dias de atividade fora do abrigo com dias de inatividade no interior do abrigo, de modo que é impossível apontar com exatidão o momento no qual os animais ingressaram em hibernação no presente estudo. Este lagarto apresenta depressão metabólica em temperaturas amenas e as alterações de comportamento registradas em laboratório à $\approx 26^{o}$C provavelmente ocorrem em ambiente natural, associadas a uma diminuição progressiva da temperatura corpórea e da taxa metabólica média diária. Sheriff et al., (2012) propuseram que os episódios de torpor durante o outono em mamíferos hibernantes formam um contínuo com a hibernação, da mesma forma que a gradual depressão do metabolismo nos teiús. Desde modo, a hibernação tanto em vertebrados ectotermos quanto endotermos não teria uma delimitação precisa no tempo e começaria de forma gradual, bem mais cedo do que geralmente assumido na maioria dos estudos.

As mudanças do padrão diário de atividade dos teiús ocorreram de maneira mais marcante por volta da segunda quinzena de abril e, neste momento, os animais já haviam alcançado a massa corpórea máxima da estação de outono. Portanto, a redução do nível de atividade geral nas últimas semanas do outono supostamente contribuiu para a economia energética e manutenção da massa corpórea nos teiús, apesar da redução da ingestão de alimento, mas não potencializaram o aumento da adiposidade como tem sido proposto na literatura para mamíferos hibernantes (revisão em DARK, 2005; FLORANT; HEALY, 2011). De maneira semelhante, em esquilos do ártico livres na natureza a taxa metabólica declina somente após a massa corpórea ter quase atingido o máximo e os autores sugerem que os esquilos na natureza podem não ser capazes de lidar com os compromissos ('trade-offs')

envolvidos na redução da taxa metabólica cedo na estação ativa (SHERIFF et al., 2013). Por outro lado, em ‘dormice’, os episódios de torpor durante a atividade de outono aparentemente potencializam a deposição de lipídios em indivíduos que nascem tardiamente na estação ativa (GIROUD et al., 2014). Portanto, a relação temporal entre os ajustes fisiológicos e comportamentais que antecedem a hibernação parece variar mesmo entre os mamíferos hibernantes. Nos teiús, a redução do tempo fora do abrigo e a menor atividade locomotora contribuiriam para certo grau de depressão metabólica e economia energética nesta fase de transição para a dormência, que é da ordem de 50% segundo Souza et al. (2004). Por outro lado, os breves períodos de assoalhamento registrados durante essa fase de transição preservariam alguma capacidade de digestão e absorção de nutrientes até a segunda metade do outono, apesar de ingerirem quantidades cada vez menores de alimento por dia. No final do outono, a total supressão da alimentação e das atividades diárias contribuiria para que os teiús atinjam um maior grau de inibição metabólica, da ordem de 80% (SOUZA et al., 2004). Embora a resposta típica dos vertebrados ao jejum seja a inibição do metabolismo e da locomoção (MCCUE, 2010), o elevado grau de depressão do metabolismo nos teiús sugere a existência de um controle sazonal endógeno, acoplado ao caráter previsível da escassez de alimento durante o inverno e selecionado ao longo da história evolutiva da espécie.

Dark (2005) propôs que haveria uma redução da taxa metabólica antes da diminuição da ingestão de alimento durante a fase de pré-hibernação em mamíferos. No presente estudo, os primeiros sinais de diminuição da ingestão de alimento foram registrados no início do outono, com um número crescente de teiús hipofágicos ou anoréxicos ao longo dos meses de abril e maio, juntamente com um decréscimo gradual da atividade diária; portanto, os resultados sugerem que em teiús neonatos esses eventos são concomitantes. O curso temporal destes ajustes nos teiús é semelhante ao descrito em um estudo recente com esquilos terrícolas (idade não reportada), mantidos em condições constantes, nos quais a ingestão de alimento diminuiu 55% em três semanas apesar de manterem um nível de atividade moderado (SCHWARTZ; HAMPTON; ANDREWS, 2015). Nos teiús, a transição para a fase hipofágica no outono foi mais marcante entre a primeira e a segunda quinzena de abril, quando a porcentagem de animais que se alimentaram, dentre os que se encontravam ativos fora do abrigo, diminuiu de 70% para 40%, juntamente com uma redução de 60% e de 75% da atividade alimentar e da ingestão de alimento, respectivamente. Nas semanas finais do outono foi comum observar que alguns lagartos se aproximavam e inspecionavam o alimento

oferecido, mas não ingeriam. Esse estado voluntário de anorexia no fim do outono em animais recém-eclodidos é intrigante, dada a reduzida massa corpórea dos teiús neonatos e o curto período de tempo disponível para crescimento e armazenamento de substratos até o inverno. Fatores endógenos parecem ser de grande influência na definição do momento de interrupção da alimentação; filhotes de marmota mantidos na ausência ou presença de suplementação de alimento interrompem a atividade alimentar duas semanas antes da hibernação, mesmo em face de maiores taxas de ganho de peso no segundo grupo e na presença de alimento fornecido artificialmente (WOODS; ARMITAGE, 2003). Segundo Humphries; Thomas; Kramer, (2003), a interrupção do processo de armazenamento de reservas energéticas enquanto os recursos ainda são abundantes é frequentemente observada em hibernantes, sugerindo que a entrada em hibernação é influenciada por uma combinação dos seguintes fatores: uma limitação física da capacidade de armazenamento (especialmente em hibernantes que armazenam lipídios) e o reduzido benefício que reservas adicionais forneceriam face aos custos do forrageamento (por exemplo, risco de predação). Desta forma, o momento de interromper o processo de deposição de lipídios teria sido definido evolutivamente através das pressões geradas por um ‘trade-off’ entre os custos e os benefícios e o resultado é que a quantidade de lipídios armazenados no outono aparentemente não é a máxima possível, ao contrário do que é frequentemente sugerido na literatura (DARK, 2005; FLORANT; HEALY, 2011). Em animais jovens, a estocagem de uma quantidade mínima de lipídios necessária para a manutenção durante o inverno maximizaria a sobrevivência no primeiro ano, uma vez que permitiria uma maior alocação de energia para o crescimento no curto período de tempo entre o nascimento e a chegada do inverno (MOGENSEN; POST, 2012).

Os mecanismos envolvidos no controle da saciedade e na manutenção do estado de anorexia voluntária ainda não são conhecidos. 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 em animais hipofágicos no final do outono 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 a hipofagia no final do outono nestes animais. Outro hormônio importante no controle da ingestão de alimento, a CORT, exerce

efeito inibitório na ação da leptina e favorece a ação orexigênica do NPY em ratos (ZAKRZEWSKA et al., 1997). Apesar da inexistência de estudos sobre a interação da CORT com a leptina em hibernantes, pode-se especular que a tendência à diminuição dos níveis de CORT nos teiús no final do outono favoreceria o efeito anorexigênico da leptina e teria um efeito inibitório sobre a ação orexigênica do NPY nesta etapa do ciclo anual.

O conjunto dos resultados obtidos com os teiús no fim do outono sugere que os animais mantiveram algum grau de atividade diária e de alimentação após terem alcançado a adiposidade máxima, prolongando por algumas semanas a fase ativa. Recentemente, uma discussão sobre os efeitos negativos e positivos da depressão metabólica tem trazido à luz outros aspectos importantes do fenômeno, além do efeito clássico de economia das reservas energéticas citado extensivamente na literatura. Entre os efeitos benéficos do torpor estaria a redução da mortalidade durante a hibernação em comparação com a fase ativa, possivelmente devido à diminuição da exposição a predadores (LEBL et al., 2011; TURBILL; BIEBER; RUF, 2011). Alguns dos prováveis efeitos fisiológicos negativos do torpor incluem a exposição a espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (BUZADZIC et al., 1990; CAREY; FRANK; SEIFERT, 2000); redução da imunocompetência (PRENDERGAST et al., 2002), prejuízos à memória (MILLESI et al., 2001), desidratação e prejuízos à circulação e balanço iônico (BEN-HAMO et al., 2013; THOMAS; GEISER, 1997). Nesse contexto, um estudo interessante com um pequeno roedor mostrou que animais com reservas lipídicas maiores e, portanto, capazes de sustentar uma fase ativa mais longa, apresentam uma depressão metabólica menos pronunciada e despertam mais frequentemente durante o inverno (BIEBER et al., 2014). Os autores sugeriram que este ajuste seria um produto das pressões exercidas pelos efeitos contrastantes do torpor, na medida em que haveria uma redução dos efeitos negativos do torpor e o tempo de atividade fora da toca seria curto, evitando possíveis encontros com predadores. Pressões seletivas semelhantes podem ter atuado na história de lagartos teiú. Evidências indicam, por exemplo, que em teiús jovens a magnitude da depressão metabólica é menor e a massa relativa de gordura mobilizada é maior nos indivíduos de maior massa corpórea, os quais possuem um maior grau de adiposidade (SOUZA et al., 2004). Adicionalmente, pode-se supor que os teiús com maior massa corpórea estendem a fase de atividade de outono por algumas semanas retardando o início da dormência, porém permanecem fora da toca por períodos de poucas horas minimizando os riscos de predação. Porém, essa hipótese não pode ser analisada no presente trabalho em virtude do reduzido

tamanho da amostra e da pequena amplitude de variação da massa corpórea dos animais. A discussão sobre os fatores que influenciam o curso temporal dos eventos na entrada em dormência é também prejudicada pela dificuldade de definir com exatidão o início da dormência nos teiús e nos hibernantes de modo geral. Curiosamente, o efeito causado por diferenças de massa corpórea ao longo da vida dos teiús segue um padrão oposto ao sugerido acima para teiús jovens. Nos animais adultos a dormência se estende por 4 a 5 meses (ABE, 1995) enquanto que nos jovens a duração é de cerca de 3 meses apenas, possivelmente devido à menor capacidade de estocar substratos energéticos nos jovens. Além da forte pressão que seria exercida pela demanda para crescimento, retardando o início da dormência nos jovens, é provável que os efeitos negativos da depressão metabólica sejam mais intensos nessa fase e que tenham algum papel na definição do tempo ideal de dormência em cada fase do ciclo de vida dos hibernantes. Bieber et al. (2014) propõem que a hibernação deve ser vista como um fenômeno flexível nas estratégias de história de vida e que, portanto, não pode ser inteiramente compreendida somente como uma resposta a necessidades energéticas devido a condições ambientais desfavoráveis. Esta questão da delimitação da hibernação em répteis é discutida na literatura datada de mais de 60 anos, quando foi sugerido que a hesitação em tornar-se ativo, a perda do apetite e a interrupção do crescimento seriam indicadores da hibernação em répteis (CASE, 1976; MAYHEW, 1965).

Durante a dormência dos teiús, o gasto energético é sustentado principalmente pelos lipídios armazenados ao longo da estação ativa (SOUZA et al., 2004). Semelhante ao descrito por estes autores, cerca de dois meses após o início da dormência a massa relativa dos corpos gordurosos dos teiús no presente trabalho diminuiu somente 13% em relação ao final do outono. Os níveis basais 75% menores de CORT na fase de dormência em comparação com o inicio da atividade de outono sugerem a manutenção da atividade endócrina em um patamar reduzido, garantindo a disponibilidade de glicose para órgãos glicose dependentes e de baixas taxas de lipólise nos adipócitos. Em alguns mamíferos hibernantes, o nível plasmático de CORT é proporcional à intensidade de mobilização de lipídios (HUDSON, 1979). Alternativamente, as variações sazonais dos níveis de GCs poderiam resultar da relação de custo-benefício envolvida na expressão dos comportamentos mediados por GCs em diferentes momentos do ciclo anual (ROMERO, 2002). Em algumas espécies de aves limícolas, por exemplo, o gênero com maior investimento parental e que, portanto, teria mais a perder com o abandono do ninho, possui menor nível plasmático de GCs na fase reprodutiva (O'REILLY;

WINGFIELD, 2001). Nos teiús, a redução dos níveis de CORT da fase de dormência poderia ser explicada por esta hipótese, dado que nesta fase os animais permanecem inativos nos refúgios e a probabilidade de exposição a estressores é menor em comparação com as fases ativas. No entanto, após a emergência e ingestão de água os níveis de CORT permaneceram reduzidos em níveis comparáveis aos da dormência; uma vez que o despertar representa uma condição potencial de estresse fisiológico e poderia expor o animal os estressores do ambiente, este dado parece ser contrário à teoria de Romero (2002). Após o despertar, os teiús permaneceram anoréxicos por alguns dias e, dada a relação de GCs com a motivação para o comportamento alimentar (LA FLEUR, 2006), é possível que a recuperação dos níveis de CORT após a dormência aconteça dias mais tarde, em associação com a retomada da alimentação.

Uma característica marcante da emergência da dormência nos teiús é a ingestão de grande quantidade de água. Enquanto no outono e na primavera a frequência de visitas ao bebedouro era de 1-3 vezes por dia, durante o despertar observou-se 14-16 visitas ao bebedouro, sendo que algumas vezes os animais permaneceram vários segundos com o focinho na água. Após diversas visitas ao bebedouro, foi possível observar o exato momento em que dois animais expeliram um pellet de ácido úrico, outra característica marcante do despertar. Grande parte da perda de massa corpórea durante a dormência é recuperada após a ingestão de água nos primeiros dois dias após o despertar, sugerindo que parte da variação de massa corpórea ocorre devido à perda evaporativa de água além da mobilização de reservas energéticas (SOUZA et al., 2004). A massa relativa dos corpos gordurosos abdominais dos teiús no despertar é cerca da metade daquela medida no fim do outono. Esses dados contrastam com dados prévios com teiús jovens, os quais sugerem que os lipídios dos corpos gordurosos são virtualmente inexistentes durante o despertar nos indivíduos de menor massa corpórea e, portanto, que haveria uma limitação da capacidade dos animais menores de sustentar as elevadas taxas do metabolismo no retorno à atividade (SOUZA et al., 2004). Essa discrepância provavelmente deve-se ao fato de que a menor massa corpórea dos teiús no trabalho supracitado (94,1 ± 9,1 no despertar) era superior e mais heterogênea do que a massa corpórea dos animais do presente estudo (38,5 ± 20,5). A despeito dessa diferença, dado que a intensidade da inibição da taxa metabólica durante a dormência é maior nos animais de menor massa corpórea (SOUZA et al., 2004), a considerável quantidade remanescente de lipídios nos corpos gordurosos dos teiús no presente estudo sugere que a depressão metabólica durante a

dormência foi de grandes proporções nestes animais. Alternativamente, a grande quantidade de lipídios armazenados no outono nestes animais também pode ter contribuído para a maior quantidade remanescente ao final da dormência.

A atividade diária nas semanas seguintes ao despertar aumentou de maneira gradual nos teiús. O tempo de assoalhamento, por exemplo, variou de 20 min a 3 horas entre teiús na mesma caixa de manutenção e três animais sequer foram detectados fora do abrigo na primeira filmagem após o despertar. A maior parte dos animais (70%) retomou a alimentação rapidamente, porém a atividade alimentar nas primeiras semanas foi pequena e a massa e comprimento corpóreos permanecem quase inalterados. Provavelmente, a alimentação após o jejum na dormência é retomada de forma gradual devido à necessidade de recuperação da capacidade funcional de órgãos que atrofiaram durante a dormência. Nos teiús, há uma redução significativa da massa relativa do intestino médio durante a dormência (NASCIMENTO, 2009) tal como observado em outros animais que apresentam dormência sazonal (SECOR, 2005). Cerca de um mês após o despertar, no final de setembro, a atividade diária, o assoalhamento e a atividade alimentar se intensificaram e as altas taxas de ganho de massa e comprimento corpóreos foram retomadas. Na primavera, o aumento de massa corpórea não foi acompanhado por um aumento de mesma proporção do comprimento rostro-cloacal. Portanto, o aumento da massa corpórea dos teiús jovens no final do mês de outubro provavelmente consiste de crescimento estrutural através do ganho de densidade óssea, massa muscular e, principalmente, do aumento da massa de órgãos viscerais. Nos animais que compuseram o grupo de atividade de primavera as massas de diversos órgãos aumentaram significativamente em comparação com o grupo de atividade de fim de outono: fígado (25%), coração (38%), intestino (2 vezes) e rins (2 vezes) (dados não apresentados). Por outro lado, a massa relativa dos corpos gordurosos abdominais praticamente não se altera em comparação com o despertar, sugerindo que nesta fase a energia obtida é preferencialmente alocada para o crescimento dos teiús e que a recuperação das reservas lipídicas ocorreria mais tarde no ciclo anual. No grupo de atividade de primavera os níveis de CORT foram similares ao do grupo de atividade de final de outono e cerca de 32% menores do que no grupo de atividade de início de outono. Considerando que em ambos os grupos os animais encontravam-se metabolicamente ativos, essa diferença enfatiza a importância de níveis aumentados de CORT no outono, promovendo ajustes que favorecem a formação de estoques lipídicos.

Em resumo, os resultados do presente estudo oferecem informações sobre os ajustes que compatibilizam das demandas do crescimento e do armazenamento de lipídios nos primeiros meses de vida de teiús neonatos. No início do outono, a alimentação ainda é intensa, juntamente com níveis plasmáticos de CORT e de adiposidade elevados. Nas semanas seguintes a alimentação e os níveis de CORT diminuem, juntamente com uma gradual diminuição das taxas de ganho de peso e comprimento corpóreos e da atividade diária dos teiús, até que os animais espontaneamente se tornam afágicos e, após algumas semanas, tornam-se totalmente inativos no início do inverno. Estas evidências fortemente sugerem um papel de GCs nos ajustes que promovem a ingestão de alimentos e a deposição de substratos energéticos nos teiús na primeira metade do outono além de uma possível função mais abrangente deste hormônio na coordenação dos ajustes comportamentais e fisiológicos no primeiro ciclo anual. A redução do nível de atividade geral nas semanas finais do outono contribuiria para a economia energética e manutenção da massa corpórea nos teiús, mas não há evidências de que esta mudança exerceria um efeito que potencializa o aumento da adiposidade, como tem sido proposto na literatura para mamíferos hibernantes (revisão em DARK, 2005; FLORANT; HEALY, 2011). As alterações espontâneas das variáveis comportamentais estariam associadas a marcadas alterações da taxa metabólica de repouso (SOUZA et al., 2004) e corroboram as evidências de que o padrão sazonal de atividades dos teiús é o resultado da expressão de um ritmo endógeno. Além disso, o estado voluntário de anorexia no fim do outono em teiús recém-eclodidos é intrigante, dada a sua reduzida massa corpórea e o curto período de tempo disponível para crescimento e armazenamento de substratos até o inverno, e reforça a atuação de um temporizador endógeno. Finalmente, os resultados do presente estudo sugerem que a hibernação não teria uma delimitação precisa no tempo e deve ser considerada como um fenômeno flexível nas estratégias de história de vida.

2.5. Figuras

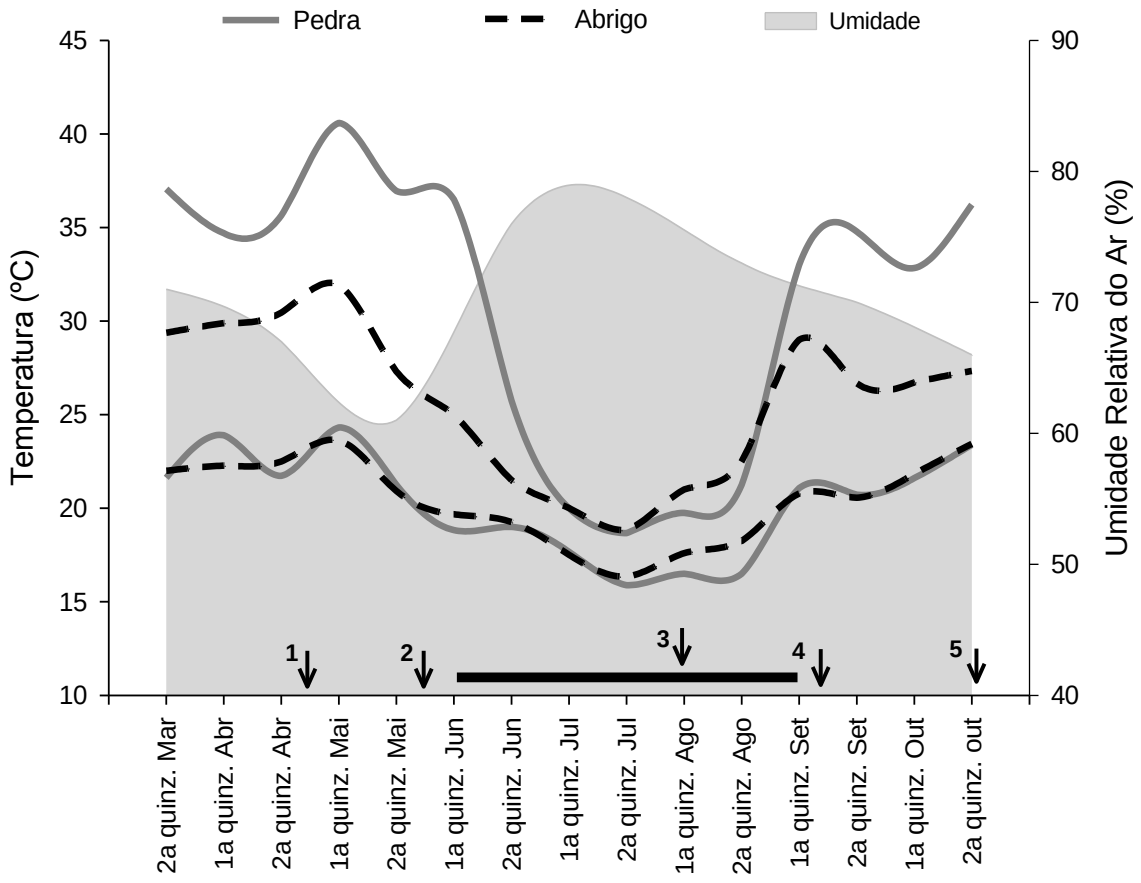

Figura 2.2. – Temperaturas máxima e mínima nas regiões próximas à pedra (região de aquecimento, linhas contínuas) e próximas ao abrigo (região de resfriamento, linhas pontilhadas) e umidade relativa do ar (área sombreada) nas caixas onde os teiús juvenis foram mantidos no ano de 2013. Os dados de temperatura são as médias quinzenais e os de umidade a média mensal de medições diárias. A barra preta indica o período aproximado da hibernação e as setas numeradas indicam as datas aproximadas de sacrifício dos grupos de atividade de início de outono (1), atividade de final de outono (2), dormência de inverno (3), despertar (4) e atividade de primavera (5).

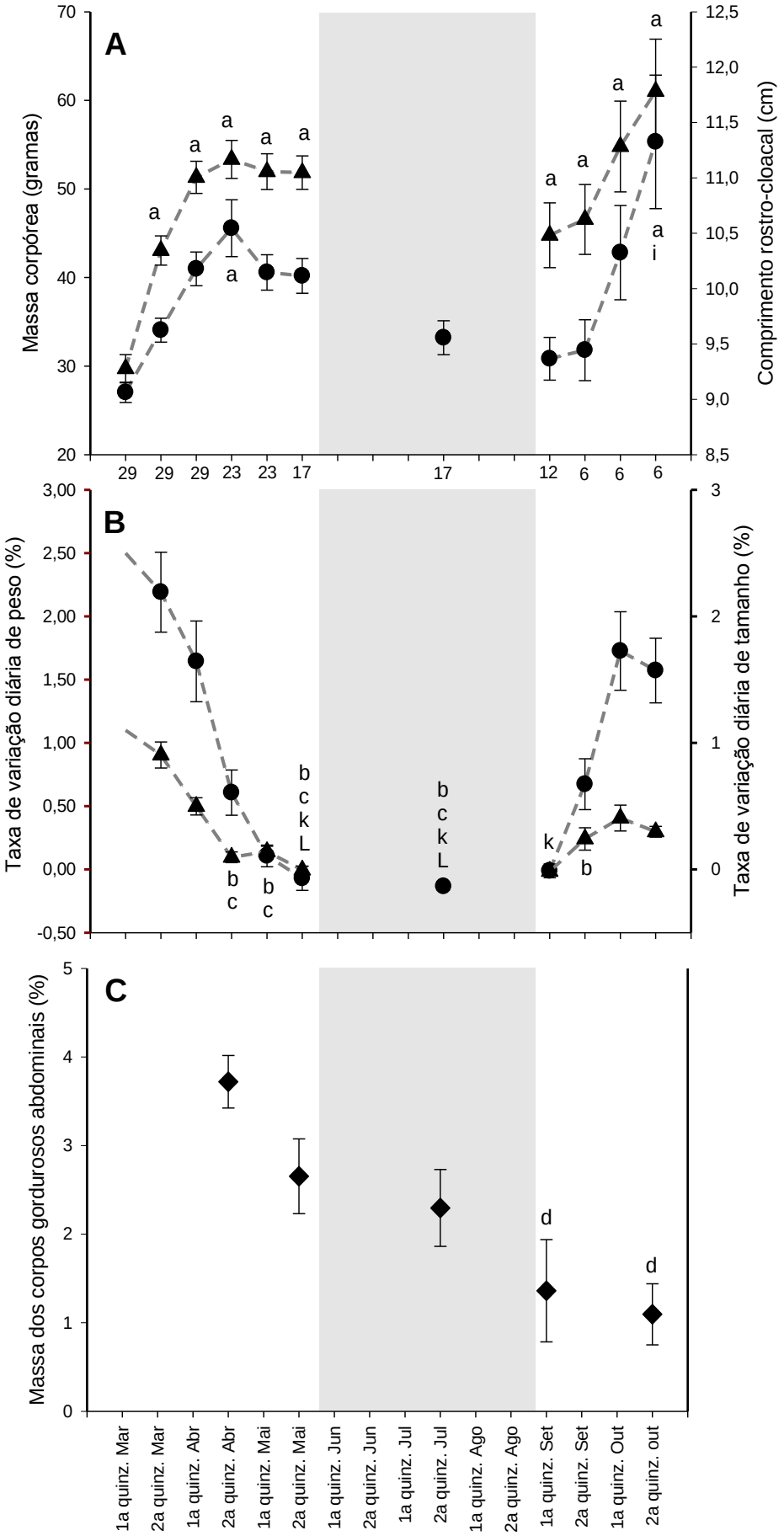
A
Massa corpórea (gramas)
Comprimento rostro-cloacal (cm)
70
60
50
40
30
20
12,5
12,0
11,5
11,0
10,5
10,0
9,5
9,0
8,5
29 29 29 23 23 17 17 12 6 6 6
B
Taxa de variação diária de peso (%)
Taxa de variação diária de tamanho (%)
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
-0,50
3
2
1
0
C
Massa dos corpos gordurosos abdominais (%)
5
4
3
2
1
0
1a quinz. Mar
2a quinz. Mar
1a quinz. Abr
2a quinz. Abr
1a quinz. Mai
2a quinz. Mai
1a quinz. Jun
2a quinz. Jun
1a quinz. Jul
2a quinz. Jul
1a quinz. Ago
2a quinz. Ago
1a quinz. Set
2a quinz. Set
1a quinz. Out
2a quinz. out

Figura 2.3 – Massa corpórea (círculos) e comprimento rostro-cloacal (triângulos) (A); taxas de variação diárias de massa corpórea (círculos) e comprimento rostro-cloacal (triângulos) (B); massa relativa dos corpos gordurosos abdominais (losangos) (C) de teiús jovens durante o primeiro ciclo anual de atividades. '**a**' indica diferenças significativas em relação à 1ª quinzena de março, '**b**' em relação à 2ª quinzena de março, '**c**' em relação à 1ª quinzena de abril, '**d**' em relação à 2ª quinzena de abril, '**i**' em relação à 1ª quinzena de setembro, '**k**' em relação à 1ª quinzena de outubro, '**L**' em relação à 2ª quinzena de outubro. Os valores são as médias ± erro padrão da média. Os números na base do eixo X do gráfico A são o número de animais por grupos de todas as variáveis exceto da massa relativa dos corpos gordurosos abdominais, cujos valores são médias de 4-6 animais por grupo. A área sombreada representa o período de hibernação.

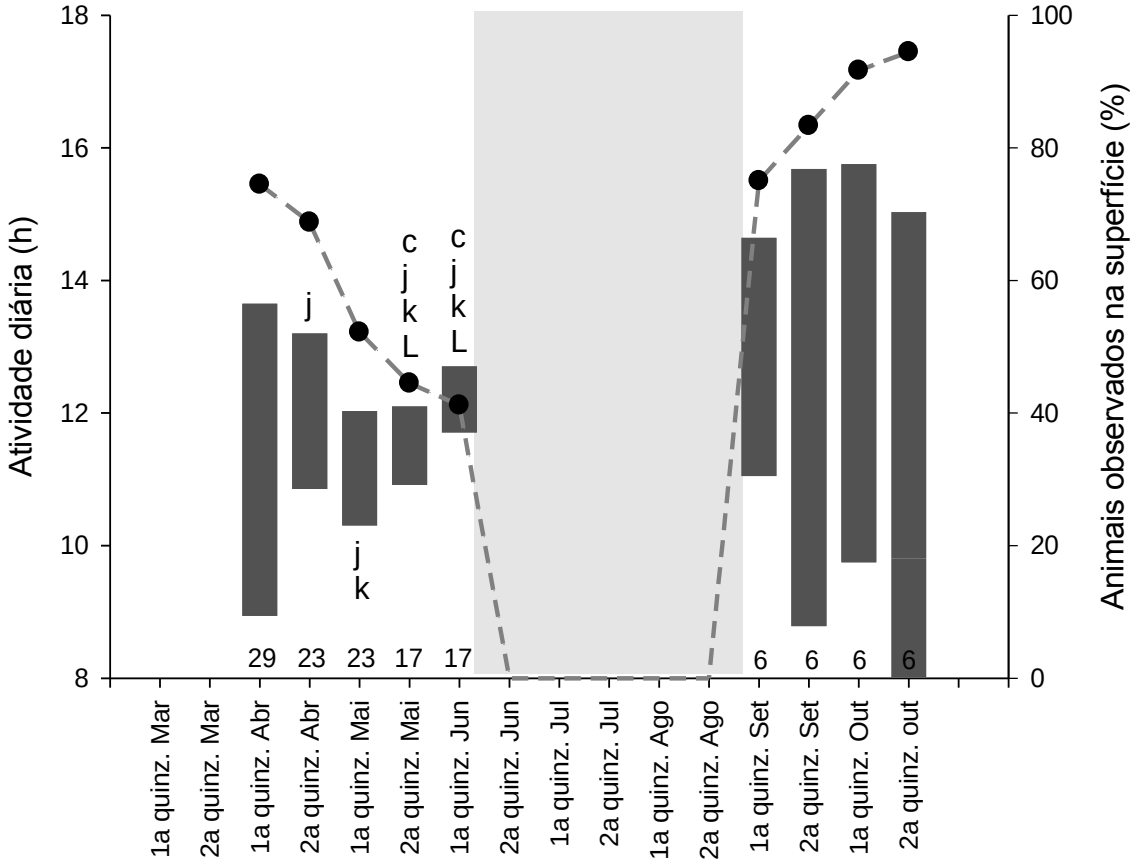

Figura 2.4 – Atividade diária em horas (barras - eixo esquerdo) e porcentagem de teiús observados na superfície da caixa (pontos com linhas - eixo direito) durante o período experimental. Barras: a extremidade inferior representa o horário médio em que os teiús eram vistos na superfície da caixa pela primeira vez e a extremidade superior representa o último o horário que os teiús foram vistos. A extensão das barras representa a média do total de horas de atividade diária em cada quinzena. Pontos: os pontos representam a média de animais observados na superfície da caixa como uma porcentagem do total de animais existentes em cada fase (números abaixo das barras). '**c**' indica diferenças significativas em relação à 1ª quinzena de abril, '**j**' em relação à 2ª quinzena de setembro, '**k**' em relação à 1ª quinzena de outubro, '**L**' em relação à 2ª quinzena de outubro. Os valores são as médias de todos os teiús e dois dias de filmagem de cada caixa, com exceção de 1ª quinzena de maio e 1ª quinzena de setembro, quanto foi realizada apenas uma filmagem de cada caixa. A área sombreada representa o período de hibernação.

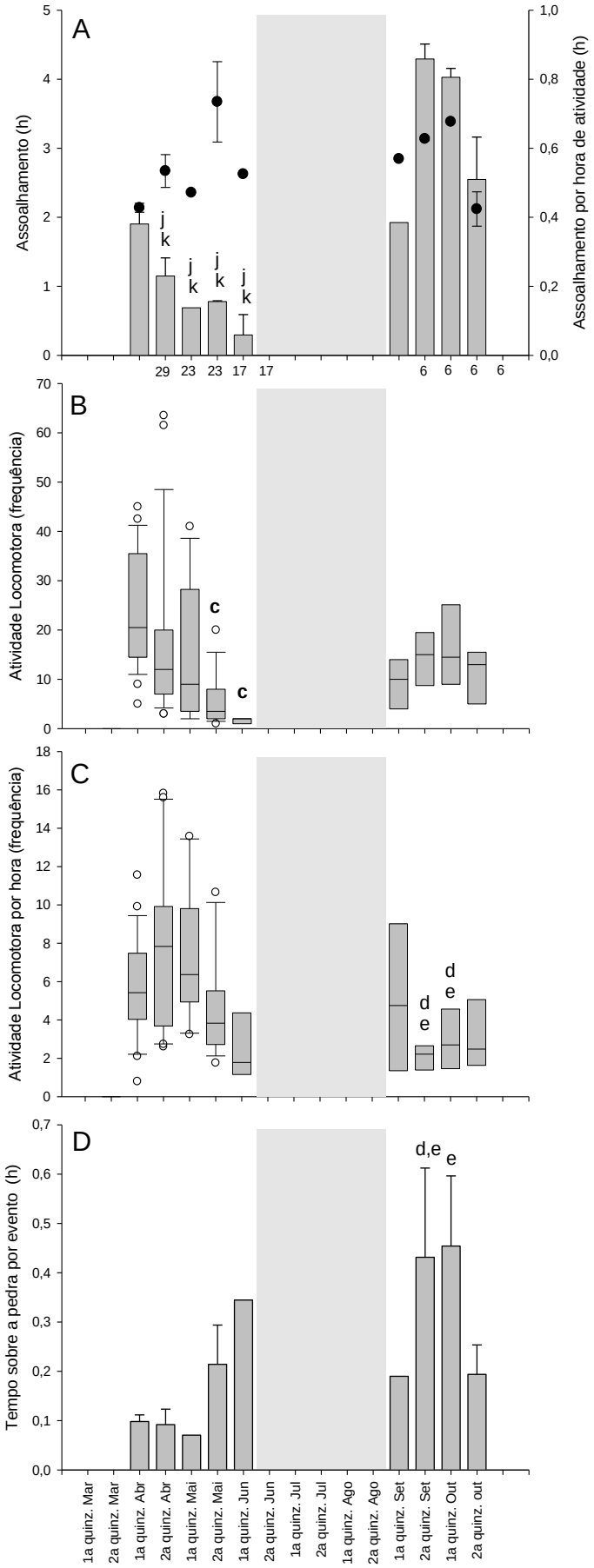
A
Assoalhamento (h)
Assoalhamento por hora de atividade (h)
j
k
29
23
17
6
B
Atividade Locomotora (frequência)
c
C
Atividade Locomotora por hora (frequência)
d
e
D
Tempo sobre a pedra por evento (h)
d,e
1a quinz. Mar
2a quinz. Mar
1a quinz. Abr
2a quinz. Abr
1a quinz. Mai
2a quinz. Mai
1a quinz. Jun
2a quinz. Jun
1a quinz. Jul
2a quinz. Jul
1a quinz. Ago
2a quinz. Ago
1a quinz. Set
2a quinz. Set
1a quinz. Out
2a quinz. out

Figura 2.5 – Assoalhamento (**A**, barras, eixo esquerdo), assoalhamento por hora de atividade diária (pontos, eixo direto), atividade locomotora **(B),** atividade locomotora por hora de atividade diária (**C**) e tempo sobre a pedra por evento de subida na pedra (**D**). '**c**' indica diferenças significativas em relação à 1ª quinzena de abril, '**d**' em relação à 2ª quinzena de abril, '**e**' em relação à 1ª quinzena de maio, '**j**' em relação à 2ª quinzena de setembro, '**k**' em relação à 1ª quinzena de outubro. Os números na base do eixo X do gráfico A são o número de animais analisados por grupo. Os valores em A e D são as médias ± erro padrão da média de todos os teiús em dois dias de filmagem de cada caixa, com exceção de 1ª quinzena de maio e 1ª quinzena de setembro, quanto foi realizada apenas uma filmagem de cada caixa. A área sombreada representa o período aproximado de hibernação.

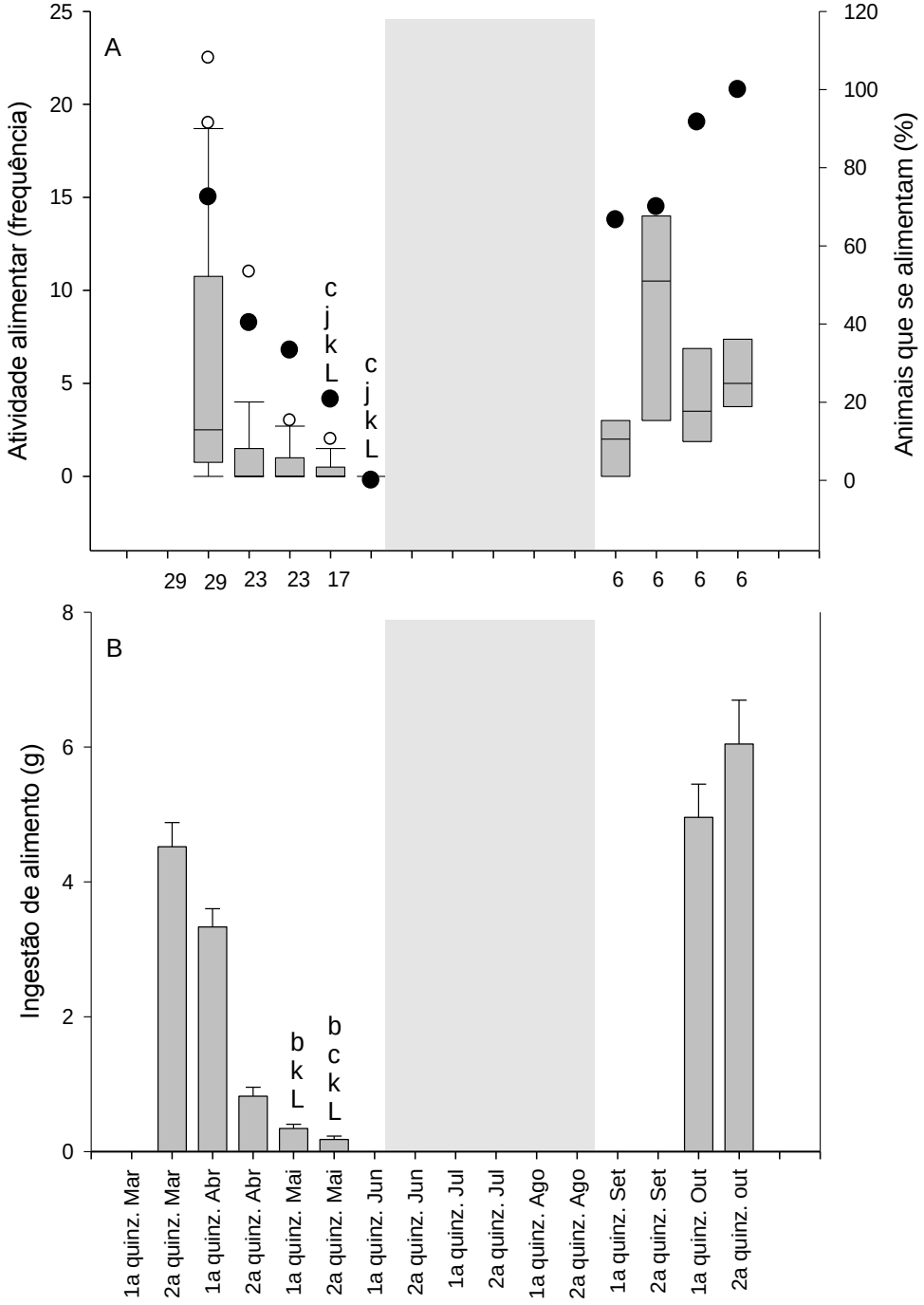

Figura 2.6 – Atividade alimentar (A, barras, eixo esquerdo), proporção de animais que comem (A, pontos, eixo direito) e ingestão de alimento (B). '**b**' indica diferenças significativas em relação à 2ª quinzena de março, '**c**' em relação à 1ª quinzena de abril, '**j**' em relação à 2ª quinzena de setembro, '**k**' em relação à 1ª quinzena de outubro, '**L**' em relação à 2ª quinzena de outubro. Os números na base do eixo X do gráfico A são o número de animais analisados por grupo. Os valores em B são as médias ± erro padrão da média de todos os teiús em dois dias de filmagem de cada caixa, com exceção de 1ª quinzena de maio e 1ª quinzena de setembro, quanto foi realizada apenas uma filmagem de cada caixa. A área sombreada representa o período aproximado de hibernação.

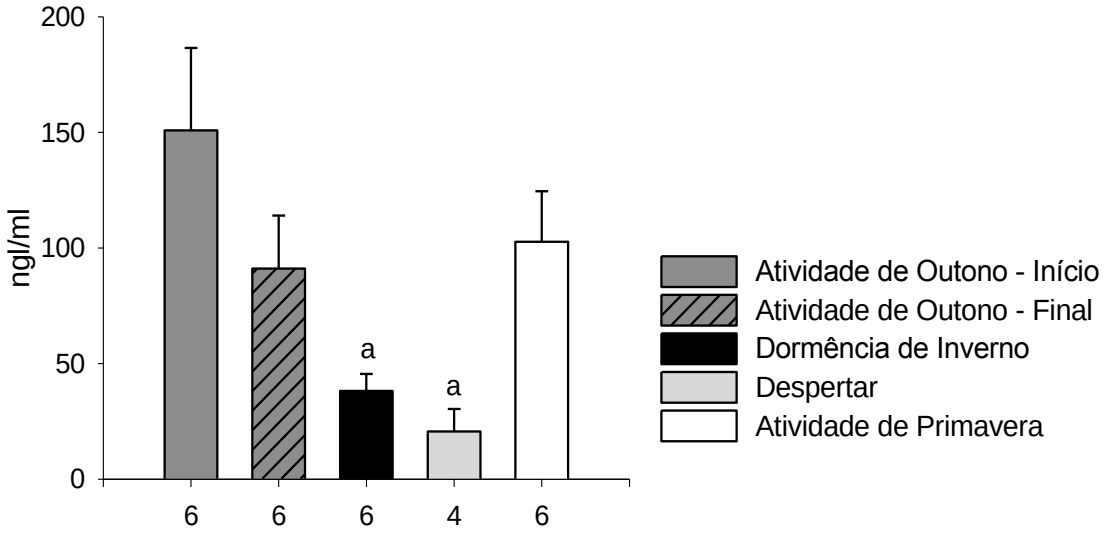

Figura 2.7 – Níveis plasmáticos de corticosterona (CORT) durante o primeiro ciclo anual de atividades de teiús. 'a' indica diferenças significativas em relação ao grupo de atividade de outono – início. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. Números abaixo das colunas representam o número de animais por grupo.

Parte III

Proteção antioxidante e estresse oxidativo em função do jejum e depressão metabólica no primeiro ciclo anual de lagartos teiú

Antioxidant protection and oxidative stress related to fasting and metabolic depression in the first annual cycle of tegu lizards

Resumo

A hibernação em lagartos teiú juvenis caracteriza-se pelo jejum e depressão metabólica contínuos a temperaturas amenas (≈80% a 17°C). No despertar, o aumento do metabolismo e a reperfusão de órgãos favoreceriam a ocorrência de estresse oxidativo, sugerindo um importante papel de ajustes no sistema de proteção antioxidante em antecipação ao despertar. Esta hipótese foi investigada por meio da análise de marcadores de estresse oxidativo e antioxidantes em órgãos de teiús neonatos, em diferentes fases do ano e no jejum na primavera. 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: hibernação, sazonalidade, lagarto teiú, *Tupinambis merianae*, estresse oxidativo, antioxidantes, antecipação

Abstract

Hibernation in juvenile tegu lizards is characterized by a continuous state of fasting and metabolic depression at mild temperatures (≈80% a 17°C). The reactivation of metabolism and of blood perfusion during arousal could favor the occurrence of oxidative stress in the tissues, and suggest an important role of adjustments in antioxidant system preparatory to the moment of arousal. This hypothesis was investigated 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, tegu lizard, *Tupinambis merianae*, oxidative stress, antioxidants, anticipation

3.1. Introdução

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 (GUPPY; WITHERS, 1999; HELDMAIER; ORTMANN; ELVERT, 2004). A sobrevivência durante os meses de dormência depende de ajustes metabólicos antecipatórios, que favorecem o armazenamento de substratos energéticos, e ajustes que promovem uma redução coordenada e gradual das taxas de produção e consumo de energia no animal. Em mamíferos e em outros vertebrados a ventilação no estado dormente é interrompida por fases de apneia que podem durar até 20 min, juntamente com uma redução do fluxo sanguíneo nos rins, trato gastrointestinal e córtex cerebral, que 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 podem favorecer um aumento das taxas de produção de espécies reativas de oxigênio (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, nos quais a hipóxia seguida de reoxigenação pode resultar em danos celulares irreversíveis (LI; JACKSON, 2002).

ROS são geradas 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). De modo geral, o sistema de proteção antioxidante consiste de enzimas, dentre elas estão a superóxido dismutase, catalase e glutationa redutase, e antioxidantes não enzimáticos, como a glutationa. 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. Segundo o autor, 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, de modo que animais que convivem rotineiramente com situações de ampla variação da disponibilidade e/ou do consumo de oxigênio em geral possuem defesas antioxidantes constitutivamente mais altas em relação a animais que raramente vivenciam estas situações. Este é o caso da tartaruga *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). Dentre os animais que apresentam dormência sazonal, o segundo padrão é mais frequente que o primeiro, tendo sido observado no tecido cerebral e cardíaco de um peixe pulmonado em estivação (PAGE et al., 2010) e no tecido adiposo marrom de esquilos e no coração e músculo esquelético de morcegos em torpor durante a hibernação (BUZADZIC et al., 1990; EDDY; MCNALLY; STOREY, 2005). Porém, em contraste com estes exemplos, observou-se uma inibição da atividade de enzimas antioxidantes em diversos órgãos de sapos em estivação (GRUNDY; STOREY, 1998) e no fígado de esquilos em torpor durante a hibernação (BUZADZIC et al., 1990). Portanto, os resultados disponíveis até o presente sugerem que o padrão é altamente espécie- e tecido-específico e ainda não possibilitam um entendimento mais amplo dos fatores que determinam a ‘escolha’ do ajuste do sistema de proteção antioxidante na dormência sazonal.

Grande parte da economia energética durante o estado hipometabólico resulta da 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. O investimento em um aumento da capacidade antioxidante durante a dormência poderia ser vantajoso, na medida em que contribui para a preservação das macromoléculas de danos causados por ROS, aumentado assim a sua meia-vida (GIRAUD-BILLOUD et al., 2013). Por outro lado, um fator determinante na seleção de um dado padrão de ajuste seria a temperatura corpórea do animal durante o estado hipometabólico. Em mamíferos, a inibição da produção mitocondrial de ROS durante o torpor parece ser em grande parte uma consequência da queda da temperatura corpórea, que pode atingir valores por volta de 4°C (BROWN et al., 2012). As taxas de síntese proteica também diminuem nesses animais a partir de temperaturas corpóreas por

volta de 18°C (VAN BREUKELEN; MARTIN, 2002) e este efeito é potencialmente conflitante com o aumento da capacidade antioxidante durante o torpor em antecipação ao despertar, descrito acima. Em contraste com a maioria dos mamíferos hibernantes, alguns vertebrados apresentam dormência sazonal durante o inverno a uma temperatura corpórea moderadamente elevada; nesses animais, portanto, a contribuição do efeito termodinâmico para a inibição da produção de ROS seria menor, enquanto que as temperaturas seriam permissivas para a síntese de proteínas essenciais para a manutenção da viabilidade do organismo durante o hipometabolismo e despertar.

Lagartos teiú *Tupinambis merianae,* comuns no sudeste brasileiro, exibem um estado de dormência durante o outono e inverno a uma temperatura corpórea moderadamente elevada (15-20 ^{o}C), quando atingem um grau de depressão metabólica de proporções similares ao descrito para mamíferos hibernantes (MILSOM et al., 2008; SOUZA et al., 2004). Este período de supressão metabólica no ciclo anual dos teiús foi considerado equivalente ao ‘sono de inverno’, isto é, hibernação (MILSOM et al., 2012). O ciclo anual dos teiús inclui uma fase de preparação para a dormência, caracterizada por uma redução gradual da atividade diária 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 (SOUZA et al., 2004). Em contraste com a hibernação em pequenos mamíferos, que é interrompida por múltiplos episódios de despertar, a dormência nos teiús é um estado contínuo que se estende ao longo de vários meses, nos quais os animais permanecem no interior da toca a temperaturas de ~17ºC. Embora ainda não se conheça a causa evolutiva dos padrões distintos de dormência, várias hipóteses têm sido propostas para explicar o seu significado funcional. Por exemplo, a hibernação confere resistência à isquemia seguida de reperfusão no intestino de mamíferos hibernantes; essa resistência 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 moderadamente elevada no teiú levantam 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, o presente estudo investigou a ocorrência de estresse oxidativo e de ajustes no sistema de proteção antioxidante no ciclo sazonal de lagartos teiú.

O estudo teve como hipótese o aumento da capacidade do sistema de proteção antioxidante durante a dormência em teiús jovens, em antecipação ao despertar, assegurando a integridade celular e prevenindo o excessivo aumento do nível de estresse oxidativo durante a reativação do metabolismo ao final da dormência. 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. Essa análise é essencial para a interpretação dos possíveis padrões de regulação e sua relação com a sazonalidade e tem sido negligenciada na maioria dos estudos na área. O estudo foi realizado com lagartos recém-eclodidos, durante diferentes fases do primeiro ciclo anual, quando os níveis de estresse oxidativo seriam elevados em decorrência da atividade metabólica aumentada face às múltiplas demandas do desenvolvimento, crescimento e preparação para os meses de dormência (METCALFE; ALONSO-ALVAREZ, 2010). Estudos que investiguem um possível papel de ajustes do sistema antioxidante em animais juvenis são raros (BAKER; COSTANZO; LEE, 2007), no entanto, a observação de altas taxas de mortalidade no decorrer do primeiro episódio de dormência sazonal sugere que esta fase do ciclo de vida impõe condições limitantes para a sobrevivência dos teiús (Abe, comunicação pessoal). Face aos objetivos, analisou-se as atividades de enzimas antioxidantes que atuam direta e indiretamente na neutralização de ROS e os níveis de marcadores de danos oxidativos nos tecidos de teiús neonatos, de modo a traçar possíveis relações entre o padrão das alterações observadas e a função dos tecidos, sem o efeito abrangente de redução da temperatura corpórea. Adicionalmente, as mesmas variáveis foram analisadas em animais submetidos a jejum na fase de atividade de primavera, de maneira a contrastar os efeitos do jejum aos efeitos da sazonalidade sobre o sistema antioxidante.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Animais experimentais e manutenção

Lagartos teiú recém-eclodidos (*Tupinambis merianae* Duméril & Bribon) foram obtidos de uma população estabelecida em Rio Claro, Sudeste, Brasil. Após a eclosão no verão, os animais foram mantidos no laboratório em caixas de 120 litros equipadas com lâmpadas incandescentes programadas para um regime de 9 horas de claro e 15 horas de escuro, além do regime natural proveniente do ambiente externo. Os lagartos puderam alternar livremente entre períodos de aquecimento, ao subirem em pedras colocadas abaixo da lâmpada, e resfriamento, se escondendo em um abrigo de madeira ou entre as folhas de jornal que cobriam o fundo da caixa. Os animais foram alimentados a cada dois dias com carne moída, ovo e frutas, enriquecidos com minerais e água *ad libitum*.

Uma mudança na atividade diária dos teiús foi vista no início do outono, quando houve uma diminuição progressiva do tempo gasto com termorregulação e alimentação, até que no fim da estação os lagartos se tornaram totalmente inativos dentro do abrigo. As lâmpadas permaneceram desligadas e a oferta de alimento foi interrompida durante o inverno até o início da primavera, quando os animais expeliram uma massa seca de ácido úrico e voltaram a se movimentar do lado de fora do abrigo. Estes sinais foram considerados o início do despertar e neste momento o regime de luz das lâmpadas incandescentes foi restabelecido, observando-se um rápido retorno da atividade termorregulatória. Durante 48 h após o despertar os animais tiveram livre acesso apenas à água, introduzindo-se a alimentação nos dias subsequentes. Ao longo de 1-2 semanas após o despertar, houve um aumento na quantidade de alimento ingerido e na atividade diária dos animais, que voltaram a exibir altas taxas de crescimento e de aumento da massa corpórea. As temperaturas mínima e máxima diárias foram medidas com um termômetro de mercúrio colocado na área do refúgio. As médias para cada fase do ano foram: outono, 18–26 °C; inverno, 15–20 °C; início da primavera, 20–26 °C; final da primavera, 23–30 °C.

3.2.2. Grupos experimentais e coleta de amostras

Lagartos teiú foram pesados e mortos por decapitação em diferentes fases do ciclo anual, constituindo os seguintes grupos experimentais: '**atividade de outono'** (média da massa corpórea ± erro padrão = 192 ± 30 g); '**dormência de inverno'** (184 ± 23 g), que inclui animais mortos após cerca de 60 dias de jejum e inatividade; '**despertar'**, dividido em dois subgrupos denominados '**não-alimentado**', que inclui animais mortos 48-72 h após o despertar e a ingestão de água (164 ± 17 g) e '**alimentado**' que inclui animais mortos 6-8 dias após o despertar e a primeira refeição (177 ± 33 g); e '**atividade de primavera'**, que inclui animais mortos 30-40 dias após o despertar e retomada da alimentação, dividido em dois subgrupos denominados '**alimentado**' (195 ± 23 g) e '**jejum**' (305 ± 59 g), este último compreendendo animais submetidos a jejum por 20 dias, com água *ad libitum*. Este último subgrupo foi usado para contrastar os efeitos do 'jejum sazonal' com os efeitos do jejum em animais ativos, decorrente da imprevisibilidade da alimentação nos meses de atividade. Os dados de massa corpórea de cada grupo apresentados acima se referem aos animais utilizados para a obtenção das amostras de fígado e rim. As massas corpóreas dos teiús utilizados para a obtenção das amostras de coração e pulmão foram as seguintes: 'atividade de outono', 68 ± 10 g; 'dormência de inverno', 37 ± 2,7 g; 'despertar', 38 ± 2,5 g e 'atividade de primavera', 55 ± 7,5 g. Em função do número reduzido de animais disponíveis no ano em que estas amostras foram coletadas, não foi possível avaliar os efeitos da primeira alimentação após o despertar e do jejum na primavera no coração e no pulmão. Os grupos experimentais foram definidos com base na observação direta do comportamento e atividade geral dos animais, levando-se em consideração as medidas da taxa de consumo de O_2 de teiús juvenis, nas mesmas condições e respectivas fases, em anos anteriores (SOUZA et al., 2004).

Os animais foram mortos entre 10 e 13h, de maneira a minimizar a interferência de flutuações circadianas das variáveis fisiológicas. Após 72 h de jejum, cada animal foi pesado, decapitado e os órgãos rapidamente removidos e transferidos para uma placa de Petri com salina gelada para dissecção. O fígado, o rim, o coração e o pulmão foram pesados, picotados, as alíquotas foram rapidamente congeladas em nitrogênio e armazenadas em freezer -80 °C até o momento de uso.

Todas as variáveis descritas a seguir foram analisadas em amostras do tecido hepático, mas em função da escassez de material biológico, algumas variáveis não foram analisadas nos demais tecidos. A atividade das enzimas GPX e Se-GPX não foi medida no rim, coração e pulmão. A atividade da G6PDH não foi medida no coração e no pulmão e a concentração de TBARS não foi medida no coração.

3.2.3. Preparação dos extratos para as medidas de atividade enzimática

Para a medida de atividade das enzimas do sistema de proteção antioxidante, amostras de tecido congelado foram rapidamente pesadas e homogeneizadas em 1:20 (w:v) de tampão gelado constituído de fosfato de potássio 50mM, (pH 7,2), contendo EDTA 0,5 mM, na presença de fenil metil sulfonil fluoride (PMSF) 10µM. Para a medida de atividade da citrato sintase (CS) o tampão foi constituído de Imidazol 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, Triton X-100 0,1% , NaF 20 mM, PMSF 1 mM. Os extratos dos tecidos foram preparados usando homogeneizador do tipo ultraturrax (Janke & Kunkel, IKA, Labortechnick, Staufen, Germany). Os extratos obtidos para a medida de CS foram submetidos a ultra-som três vezes por 10 s, com intervalos de resfriamento de 30 s, utilizando-se um sonicador (Janke & Kunkel, IKA, Labortechnik, Staufen, Germany). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 ***g*** e 4 ºC por 15 min. Os sobrenadantes (extratos contendo as enzimas) foram coletados, mantidos em gelo e usados imediatamente para os ensaios de atividade enzimática em espectrofotômetro Beckman DU-70 a 25 ± 1 ºC.

3.2.4. Ensaios enzimáticos

A atividade total da superóxido dismutase (SOD total) consiste da soma das atividades das isoformas CuZn-SOD, localizada no espaço entre membranas mitocondrial interna e externa e no citosol, e Mn-SOD, localizada na matriz mitocondrial (KOWALTOWSKI et al., 2009; SENA; CHANDEL, 2012). A SOD total foi medida de acordo com o método descrito em McCord e Fridovich, (1969). As concentrações do meio de reação utilizado nos ensaios foram: tampão fosfato 50 mM (pH 7,2), EDTA 0,5 mM, citocromo c 0,01 mM predominantemente oxidado, hipoxantina 0,05 mM, xantina oxidase

em quantidade suficiente para produzir uma taxa de redução do citocromo c de 0,025 abs por min a 550 nm. A reação foi ativada com a adição de xantina oxidase ao meio de ensaio. A SOD promove a dismutação do radical superóxido (O_2^{-}•) em O_2 e H_2O_2, impedindo a redução do citocromo c. Uma unidade (U) de SOD corresponde à quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução do citocromo c (IC_{50}). Várias cubetas de 1 mL foram lidas por amostra, usando concentrações crescentes de extrato da enzima, e uma curva de inibição foi gerada (taxa de oxidação *versus* quantidade de extrato). A atividade da Mn-SOD foi determinada como descrito acima, porém, após incubação com KCN (1 mM). Nessa concentração, o cianeto inibe a isoforma CuZn-SOD, mas não afeta a Mn-SOD.

A atividade da catalase (CAT) foi medida de acordo com o método descrito por Aebi (1984), que envolve o monitoramento da degradação do H_2O_2 a 240 nm em cubetas de quartzo (ε_{240}= 0,04 $mM^{-1}.cm^{-1}$). O meio de reação continha tampão fosfato 50 mM (pH 7,2), EDTA 0,5 mM e H_2O_2 10 mM; o branco da reação foi medido após a adição apenas da amostra e, em seguida, a reação foi ativada com a adição de H_2O_2. Uma unidade de catalase é definida como a quantidade de enzima que degrada 1 µmol de H_2O_2 por minuto.

A atividade da glutationa redutase (GR) foi medida de acordo com o método descrito em Carlberg & Mannervik (1975), que envolve o monitoramento da oxidação do NADPH através da variação da absorbância em 340 nm (ε_{340} = 6,22 $mM^{-1}. cm^{-1}$). O meio de reação continha tampão fosfato 50 mM pH (7,2), EDTA 0,5 mM, GSSG 1mM e NADPH 0,1 mM. Dois brancos da reação foram utilizados nos ensaios, um, com amostra e sem NADPH, e outro com amostra e sem GSSG, e a reação foi ativada com a adição de NADPH. Uma unidade de GR equivale à quantidade de enzima que oxida 1 µmol de NADPH por minuto.

A atividade da glutationa-S-transferase (GST) foi medida de acordo com o método descrito em Habig e Jakoby (1981) e Habig, Pabst e Jakoby (1974), que se baseia na formação do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno, estimada através da variação de absorbância a 340 nm (ε_{340} = 9,6 $mM^{-1}. cm^{-1}$). As concentrações do meio de reação foram: tampão fosfato 50 mM (pH 7,2), EDTA 0,5 mM, GSH 1 mM e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1 mM em etanol. Dois brancos de reação foram utilizados nos ensaios, um, com amostra e sem CDNB, e outro sem amostra e com CDNB, para monitorar a taxa de reação não enzimática. A reação foi ativada com CDNB em etanol e a concentração final do etanol

foi controlada de modo a não ultrapassar 4%. Uma unidade de GST equivale à quantidade de enzima que forma 1µmol do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno por minuto.

A atividade da glutationa peroxidase dependente de selênio (Se-GPX) foi medida de acordo com o método descrito por Paglia e Valentine (1967), que se baseia no monitoramento da oxidação de NADPH através da variação da absorbância a 340 nm (ε_{340} = 6,22 mM^{-1}. cm^{-1}). O meio de reação era constituído de tampão fosfato 50 mM (pH 7,2), EDTA 0,5 mM, NaN_3 4mM, GSH 5 mM, GR 0,1 U/ml; NADPH 0,2 mM e H_2O_2 0,073 mM . Os reagentes, exceto H_2O_2, foram incubados no meio de reação por pelo menos 3 min, à temperatura ambiente, até que a oxidação do NADPH estivesse estável. Após este período, a reação era ativada com a adição de H_2O_2. Dois brancos da reação foram utilizados nos ensaios, um, com amostra e sem o H_2O_2, e outro sem a amostra e com H_2O_2. Uma unidade de Se-GPX equivale à quantidade de enzima que promove a oxidação de 1 µmol de NADPH por minuto. A atividade glutationa peroxidase total (GPX total) foi medida da mesma forma descrita para a Se-GPX, utilizando-se cumeno hidroperóxido 0,2 mM no lugar de H_2O_2 (BURK et al., 1978; LAWRENCE; BURK, 1976; LITTLE et al., 1970).

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi medida pelo método descrito por Glock; McLean, (1953) e Kornberg, Horecker e Smyrniotis (1955), que se baseia na redução do NADP, estimada através da variação da absorbância em 340 nm (ε_{340} = 6,22 mM^{-1}. cm^{-1}). O meio de reação consistiu de tampão fosfato 50 mM (pH 7,2), EDTA 0,5 mM; $MgCl_2$ 5 mM; NADP 0,2 mM e G6P 1 mM. O branco da reação continha a amostra sem o substrato e a reação foi ativada com a adição de G6P. Uma unidade de G6PDH equivale à quantidade de enzima que forma 1 µmol de NADPH por minuto.

A atividade da CS foi medida através do monitoramento da produção do ânion reduzido do ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) a 412 nm (ε_{412} = 13,6 mM^{-1}. cm^{-1}), de acordo com o método descrito em Bergmeyer (1984). O meio de reação consistiu de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), acetil-CoA 0,15 mM, DTNB 0,1 mM e oxaloacetato 0,5 mM. O branco da reação continha amostra sem o substrato e a reação foi ativada com a adição de oxalacetato. Uma unidade de CS equivale à quantidade de enzima que converte 1 µmol de acetil-CoA por minuto.

Uma alíquota do sobrenadante usado na medida da atividade da CS foi armazenada para a dosagem do teor de proteínas solúveis nas amostras. A concentração de proteínas solúveis foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

3.2.5. Determinação do índice de peroxidação lipídica - TBARS

A medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi usada como um indicador de peroxidação lipídica. A concentração de TBARS foi medida nas amostras de fígado, rim e pulmão, pelo método descrito por Buege e Aust (1978). As amostras de tecido congeladas foram pesadas e homogeneizadas com ácido tricloroacético 10% (TCA) a uma diluição de 1:20 (w:v), utilizando um homogeneizador do tipo ultraturrax. Alíquotas do homogeneizado foram transferidas para tubos destinados à reação com ácido tiobarbitúrico (TBA) e tubos destinados ao controle da reação. As concentrações finais do meio de reação foram TCA 10%, TBA 0,25% e HCl 0,17 N. Nos tubos destinados ao controle, o TBA foi omitido. As amostras foram incubadas no meio de reação durante 15 min, a 90 °C, e então centrifugadas por 6 min a 10.000 *g*. Uma alíquota do sobrenadante, contendo os TBARS, foi transferida para uma microplaca e a absorbância foi lida em 532 e 600 nm. O cálculo da concentração de TBARS foi feito subtraindo-se as absorbâncias a 600 nm da absorbância a 532 nm, para evitar a influência de absorção de fundo, e o valor encontrado ($\varepsilon = 156\ mM^{-1}.cm^{-1}$) foi corrigido em função das diluições da amostra.

3.2.6. Determinação da concentração de glutationa

O protocolo usado foi baseado em Akerboom e Sies (1981) e Griffith (1980). Amostras de tecido congeladas foram homogeneizadas em TCA 10% a uma diluição de 1:14 (w:v) usando um homogeneizador do tipo ultraturrax. As amostras foram centrifugadas por 6 min, a 10.000 ***g*** e 4 °C. O *pellet* foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 ºC para a análise do teor de proteínas carboniladas. Alíquotas do sobrenadante foram divididas em tubos destinados à medida da concentração de equivalentes de glutationa (eq-GSH = GSH + 2GSSG) e glutationa oxidada (GSSG). Ambas as alíquotas foram incubadas por 60 min em meio de reação contendo TCA 2,38%,

Kpi 0,357 M e etanol 4,76%, nos tubos destinados à medida de Eq-GSH, e contendo TCA 2,38%, Kpi 0,357 M e 2-vinilpirdina 0,025 M em etanol 4,76% nos tubos destinados à medida de GSSG.

Duas curvas padrão, uma para Eq-GSH e outra para GSSG, foram feitas diariamente antes do ensaio das amostras e o mesmo protocolo foi empregado para a medida da concentração de Eq-GSH e GSSG nas amostras. A concentração de Eq-GSH e de GSSG foi determinada com base na quantidade de TNB formada na reação, a qual é estimada através da variação de absorbância em 412 nm (ε_{412} = 13,6 mM^{-1}. cm^{-1}). O meio de reação para medida de Eq-GSH foi constituído de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM, TCA 0,238%, GSH 0 a 1,5 µM, NADPH 0,1 mM, DTNB 2 mM e GR 0,05 U/mL. O meio de reação para a medida de GSSG foi constituído de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM, TCA 0,238%, GSH 0 a 0,2 µM, NADPH 0,1 mM, DTNB 2 mM e GR 0,3 U/mL. O cálculo das concentrações foi feito através da interpolação dos dados nas curvas padrão e correção das diluições da amostra.

3.2.7. Determinação da concentração de proteínas carboniladas (PC)

O teor de proteínas carboniladas (PC), um indicador do nível de danos oxidativos a proteínas, foi determinado usando os *pellets* armazenados durante o ensaio para medida do teor de glutationa. O método usado baseou-se em protocolos estabelecidos na literatura da área (DALLE-DONNE et al., 2003; FIELDS; DIXON, 1971; LEVINE et al., 1990; REZNICK; PACKER, 1994; WELKER, 2009). Os *pellets* armazenados foram descongelados em temperatura ambiente; nos tubos destinados ao teste adicionou-se 0,5 mL de DNPH 10 mM em HCl 2M e nos tubos destinados ao controle adicionou-se 0,5 mL de HCl 2 M. O *pellet* foi dissolvido por agitação e a solução foi incubada em temperatura ambiente, ausência de luz e agitação constante por uma hora. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de TCA 20% gelado, que causou a precipitação das proteínas e a remoção do excesso de corantes e lipídios. Os tubos foram agitados por 40 s e mantidos em gelo por 10 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 6 min a 10000 ***g***, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* solubilizado em 1mL de etanol:acetato de etila (1:1) por meio de agitação e a solução foi centrifugada novamente por 6 minutos a 10000 ***g***. Esta etapa foi repetida mais 2 vezes. Após a última lavagem adicionou-se aos tubos contendo o *pellet* 1

mL de cloreto de guanidina 6 M em tampão fosfato 20 mM pH 2,3, os tubos foram agitados e a solução foi incubada em banho-maria a 37 ºC por 15 min. Após esta etapa, a solução foi centrifugada por 6 minutos a 10000 *g* para precipitar os resíduos.

Para calibrar o espectrofotômetro, alíquotas da solução de cloreto de guanidina 6 M em tampão fosfato 20 mM pH 2,3 foram centrifugadas e somente o sobrenadante foi usado, a fim de evitar partículas que absorvem luz. O teor de proteínas carboniladas foi aferido medindo-se a absorbância das amostras (testes e controles) entre os comprimentos de onda 340 e 410 nm e registrando-se o maior valor de absorbância no intervalo. Para os cálculos de PC utilizou-se o coeficiente de absorção a 370 nm $\varepsilon = 22.000\ M^{-1}.cm^{-1}$. O teor de proteínas totais foi medido através da leitura a 280 nm das amostras destinadas ao controle e para os cálculos utilizou-se o coeficiente de absorção da albumina de soro bovino $\varepsilon = 6{,}6\ mM^{-1}.cm^{-1}$. No cálculo final, a concentração de PC foi dividida pela concentração de proteínas totais.

3.2.8. Análise estatística

A influência das fases do ciclo anual sobre as variáveis foi avaliada por meio de ANOVA *one-way* e, face às indicações de variabilidade significativa, comparações múltiplas foram feitas entre as médias dos grupos de dados através do teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Os dados que não passaram pelo teste de normalidade foram analisados por meio do teste de variância não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para determinação de quais grupos diferiam entre si. Todas as comparações entre animais alimentados e submetidos a jejum por 20 dias na atividade de primavera foram feitas separadamente, por meio do teste ‘t’ de Student. Quando os dados não seguiam as exigências de homogeneidade de variâncias ou normalidade, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados da análise de variância e do teste ‘t’, ou dos testes não paramétricos equivalentes, foram reportados no texto juntamente com os valores de P. Os resultados dos testes de comparações múltiplas entre as médias foram considerados significativos quando $P \leq 0{,}05$ e marginalmente significativos quando $0{,}1 \geq P \geq 0{,}05$, de acordo com recomendações da Sociedade Americana de Fisiologia, (APS; CURRAN-EVERETT; BENOS, 2004). Todas as análises foram feitas com base em Zar (1999) utilizando-se o programa Sigma Stat (Systat Scientific Software).

3.3. Resultados

O teor de proteínas solúveis do fígado não variou em função da fase do ciclo anual (*F*=0,424; *P*=0,789; *d.f.*=27) ou em função do jejum na atividade de primavera (*t*=0,06; *P*=0,954; *d.f.*=9) (Tabela 3.1). Também não houve variação sazonal do teor de proteínas solúveis no pulmão (*F*=1,267*; P*=0,312; *d.f.*=27). Nas amostras de rim a estatística indicou uma variação sazonal marginalmente significativa (*F*=2,582*; P*=0,064; *d.f.*=27), provavelmente devido aos valores mais baixos nos grupos de dormência (18%) e de despertar seguido de ingestão de água (35%) em relação à atividade de outono. No coração o teor de proteínas solúveis foi 16% menor no grupo de dormência em relação ao de atividade de primavera (*F*=4,928*; P*=0,005; *d.f.*=27). A atividade das enzimas expressa por mg de massa de tecido e por mg de proteína revelou um padrão sazonal similar. Em alguns casos, porém, a magnitude das alterações é menor e sem significância estatística com os dados expressos por mg de proteína, possivelmente devido ao erro introduzido pela dosagem de proteínas e ao efeito inespecífico decorrente da redução da concentração de proteínas solúveis totais nas amostras.

A Vmáx da CS, um indicador de capacidade oxidativa aeróbia do tecido, não variou em função da fase do ciclo anual nas amostras de fígado e pulmão analisadas (*F*=1,313*; P*=0,295*; d.f*=27) (Fig. 3.1). No pulmão, entretanto, nota-se uma tendência a valores 26% mais baixos no grupo de dormência em comparação com os grupos de atividade, a qual não alcançou significância estatística provavelmente devido ao número reduzido de amostras neste grupo experimental. No grupo de animais ativos na primavera, a Vmáx da CS é 27% maior no rim do que no fígado e no pulmão representa cerca de 15% dos valores observados no fígado. A Vmáx da CS no rim apresentou uma variação sazonal significativa (*F*=5,263; *P*=0,004; *d.f.*=26). Neste órgão, as taxas foram cerca de 30% menores no grupo de dormência em relação ao grupo de despertar seguido de alimentação e em relação ao grupo de atividade de primavera (Fig. 3.1). Devido à escassez de material biológico, a atividade da CS no músculo cardíaco não foi medida; contudo, dados prévios obtidos nas mesmas condições de ensaio foram apresentados na figura 3.1-B, com a finalidade de facilitar as comparações e a análise dos padrões de variação (DA SILVEIRA et al., 2013). No músculo cardíaco, a atividade de CS é cerca de 3 vezes maior do que no tecido hepático e não houve variação sazonal significativa. Em contraste com o efeito

sazonal, a Vmáx desta enzima no tecido cardíaco foi 22% menor em animais submetidos a jejum do que em animais alimentados durante a atividade de primavera (*t*=3,404; *P*=0,007; *d.f.*=10), enquanto que no rim e no fígado o jejum não causou variação significativa da CS.

No grupo de atividade de primavera, a atividade da G6PDH foi 22% maior no fígado do que no rim (Fig. 3.2). Nas demais fases, porém, os valores foram cerca de 70% menores no fígado do que no rim. No fígado, houve uma variação marginalmente significativa da enzima ao longo do ciclo anual (*F*=2,682; *P*=0,058; *d.f.*=26), provavelmente relacionada com as taxas 2,6 vezes menores na atividade de outono em relação à atividade de primavera, (Fig. 3.2) ao passo que no rim a enzima se manteve constante ao longo do ciclo anual (*F*=1,123*; P*=0,369*; d.f.*=28). Em contraste, o jejum na atividade de primavera não causou variação significativa da enzima nas amostras de fígado analisadas, enquanto no rim, as taxas foram 38% menores em relação aos animais alimentados na mesma fase (*t*=4,116; *P*=0,002; *d.f.*=10).

A atividade da GR em animais do grupo de atividade de primavera foi 4 vezes maior no rim do que no fígado, cujos valores são semelhantes aos observados no músculo cardíaco e no pulmão. De um modo geral, esta enzima exibiu um padrão de variação semelhante nos quatro tecidos analisados, com uma tendência consistente à redução das taxas na dormência e despertar (Fig. 3.3). No fígado, a variação sazonal da GR foi significativa (*F*=3,859, *P*=0,015; *d.f.*=27) e está associada aos valores progressivamente menores registrados na dormência de inverno (20%), no despertar após ingestão de água (30%) e após ingestão de alimento (46%), quando então a atividade da enzima foi significativamente diferente em relação à atividade de outono (Fig. 3.3-A). No rim, os valores exibiram uma acentuada variação sazonal (*F*=12,855; *P*<0.001; *d.f.*=28); este efeito deve-se às taxas significativamente menores (33 a 49%) em todos os grupos em relação ao grupo de atividade de primavera (Fig. 3.3-A). No músculo cardíaco, a estatística não indicou um efeito sazonal significativo, muito embora os valores 37% menores no grupo de dormência sugiram uma tendência à menor atividade enzimática nesta fase em comparação com a atividade de outono. No pulmão houve um efeito sazonal significativo sobre a GR (*F*=7,318; *P*=0,003; *d.f.*=17), associado aos valores significativamente menores no grupo de dormência em relação ao grupo de atividade de outono (43%) e em relação ao grupo de atividade de primavera (33%). Em contraste com o efeito sazonal, não houve variação significativa da GR no rim de animais submetidos a jejum na primavera, porém

no fígado a atividade da enzima foi 26% menor do que no grupo de animais alimentados (t=-2,538; P=0,029; $d.f$=10).

A atividade da GST em animais ativos na primavera foi 50% maior no rim do que no fígado e, neste órgão, as taxas foram 5 e 11 vezes maiores do que no coração e no pulmão, respectivamente (Fig. 3.3). No fígado, a atividade da GST variou significativamente em função da fase do ciclo anual (F=5,146; P=0,004; $d.f.$=26), devido aos valores em média 30% menores no grupo de dormência de inverno, de despertar seguido de ingestão de água e de despertar seguido de ingestão de alimento, em relação ao grupo de atividade de outono. É interessante notar que na atividade de outono as taxas da GST no fígado foram ligeiramente maiores (24%) em comparação com a atividade de primavera. No rim, a GST exibiu uma variação sazonal significativa (F=5,281; P=0,003; $d.f.$=28), associada às taxas significativamente menores após o despertar seguido de ingestão de água (30%) e de alimento (48%) em relação à atividade de primavera. Em contraste com o efeito sazonal, não houve alteração de atividade da GST no fígado e no rim de animais submetidos a jejum na atividade de primavera.

A atividade da CAT no fígado de animais ativos na primavera foi 50% maior do que no rim e 13 e 4 vezes maior do que no tecido cardíaco e no pulmão, respectivamente (Fig. 3.3). No fígado, as taxas da enzima mostraram uma variação marginalmente significativa ao longo do ciclo anual (H=7,980; P=0,092; $d.f.$=4), provavelmente relacionada aos valores 40% menores nos grupos de dormência e despertar em relação à atividade de outono e de primavera. No rim, a CAT exibiu uma variação sazonal significativa (F=3,736; P=0,017; $d.f.$=28), associada a uma forte tendência a menores taxas no grupo de dormência (41%), de despertar seguido de ingestão de água (45%) e de alimento (50%), em relação à atividade de outono, muito embora esta diferença seja significativa apenas nos grupos de despertar. É interessante observar que a atividade da CAT no rim foi 30% maior na atividade de outono do que na atividade de primavera. O jejum na primavera não causou alteração da enzima no fígado, porém no rim a atividade da CAT foi 33% menor em relação aos valores de animais alimentados na mesma fase (t=2,452; P=0,034; $d.f.$=10). No coração, a atividade da CAT apresentou um efeito sazonal significativo (F=3,392; P=0,038; $d.f.$=23), associado aos valores progressivamente menores na dormência (21%) e no despertar após ingestão de água (29%), em relação ao grupo de atividade de outono, quando então a diferença entre as médias alcançou

significância estatística. Padrão similar foi observado no pulmão, com taxas da CAT 39% e 36% menores nos grupos de dormência e despertar seguido de ingestão de água, respectivamente, em relação ao grupo de atividade de primavera (*H*=12,982; *P*=0,005; *d.f.*=3).

A atividade da SOD em animais ativos na primavera foi semelhante no rim e no fígado e os valores obtidos com este último órgão foram 55% e 8 vezes menores que os observados no coração e no pulmão (Fig. 3.4). No rim, coração e pulmão, o padrão de variação da SOD foi semelhante ao padrão das demais enzimas analisadas, com as menores taxas na dormência e no despertar ou na atividade de primavera. No rim, a variação sazonal foi significativa (*F*=4,914; *P*=0,005; *d.f.*=27) e a comparação entre as médias indicou que os valores foram significativamente menores nos grupos de despertar seguido de ingestão de água (13%) e de alimento (15%) em comparação com o grupo de atividade de outono. No coração e no pulmão, o efeito sazonal também foi significativo (*F*=3,805; *P*=0,028; *d.f.*=21; e *F*=3,903; *P*=0,026; *d.f.*=21) e a comparação entre as médias indicou que os valores foram significativamente menores no grupo de dormência de inverno em relação aos grupos de atividade de primavera (16%) e de outono (14%). No fígado a estatística detectou uma variação sazonal da SOD (*F*=3,956; *P*=0,014; *d.f.*=27), porém o padrão de variação foi claramente distinto daquele observado nos demais tecidos e enzimas uma vez que as taxas foram 20% maiores na dormência e despertar seguido da ingestão de água em relação à atividade de outono, muito embora a estatística considere significativa apenas a diferença de cerca de 34% entre os grupos de dormência e despertar seguido da ingestão de água em relação ao grupo de despertar seguido de ingestão de alimento. Não houve variação da atividade total da SOD no rim e no fígado de animais submetidos a jejum na primavera em relação aos animais alimentados.

Os padrões de variação da Mn-SOD foram muito semelhantes aos padrões da SOD total nos respectivos tecidos, no entanto, a variação sazonal foi significativa apenas no fígado (*F*=3,428; *P*=0,024; *d.f.*=27) e no pulmão (*F*=4,658; *P*=0,014; *d.f.*=27; Fig. 3.4). No fígado, o teste de comparações múltiplas não detectou quais grupos diferem entre si e no pulmão o as taxas foram menores na dormência em comparação com o outono. A atividade da Mn-SOD não variou no fígado e rim de animais submetidos a jejum na primavera em relação aos animais alimentados.

A enzima GPX foi analisada somente no tecido hepático e os resultados sugerem um efeito sazonal marginalmente significativo para a atividade total da enzima (*F*=2,392; *P*=0,079; *d.f.*=28) e significativo para a atividade dependente de selênio (*F*=2,814; *P*=0,049; *d.f.*= 27), cujo padrão foi semelhante em ambas as medidas (Fig. 3.5). Na GPX total, este efeito estaria associado a uma tendência a taxas mais elevadas no outono, dormência e despertar (44-30%) em relação à atividade de primavera. Essa tendência foi mais acentuada na Se-GPX, cujas taxas foram 43% maiores na atividade de outono e 62% maiores na dormência de inverno, em relação à atividade de primavera. Nos animais submetidos a jejum na primavera não houve alteração detectável da GPX total, enquanto que a Se-GPX sofreu um aumento de 44%, marginalmente significativo em relação aos animais alimentados na mesma fase (*t*= -2,111; *P*=0,061; *d.f.*=10).

A estatística não indicou um efeito sazonal significativo na concentração de Eq-GSH, GSH, GSSG ou GSH:GSSG no fígado (Fig. 3.6), no rim (Fig. 3.7) e no coração (Fig. 3.8). No fígado, porém, detectou-se uma variação marginalmente significativa da concentração de Eq-GSH (*F*=2,136; *P*=0,112; *d.f.*=25), possivelmente associada aos valores 26% mais altos no outono e 16% mais baixos na dormência de inverno em relação à atividade de primavera, os quais, por sua vez, teriam relação com alterações dos níveis de GSH. O único órgão que apresentou alterações sazonais significativas de GSH foi o pulmão (Fig. 3.9, *F*=49,537; *P*=<0,001; *d.f.*=21), no qual a concentração de Eq-GSH nos grupos de dormência de inverno e de atividade de primavera foi diferente de todas as demais fases e entre si. No grupo de dormência de inverno, a concentração de Eq-GSH foi significativamente menor em comparação com a atividade de outono (38%) e de primavera (55%), respectivamente, e mostra sinais de recuperação após o despertar e a ingestão de água. Este resultado reflete, principalmente, o forte efeito sazonal nos níveis da GSH (*F*=31,398; *P*<0,001; *d.f.*=21), o qual está associado a concentrações significativamente menores na dormência em relação à atividade de outono (40%) e à atividade de primavera (56%). Quanto aos níveis de GSSG, houve uma variação marginalmente significativa durante o ciclo anual (*F*=2,47; *P*=0,095; *d.f.*=21), provavelmente relacionada com os 48% menores no grupo de dormência de inverno comparado com o grupo de atividade de primavera. A razão GSSG:GSH não apresentou variação sazonal no pulmão. No grupo de animais submetidos a jejum na primavera não houve mudança detectável da concentração dessas variáveis no fígado; no rim, a concentração de Eq-GSH foi 27% menor em relação a animais alimentados (*t*=2,911; *P*=0,017; *d.f.*=9), refletindo a queda na concentração de

GSH (*t*=3,085; *P*=0,013; *d.f.*=9), o que resultou em um aumento de 66% da razão GSSG:GSH (*t*=-2,671; *P*=0,026; *d.f.*=9).

A concentração de TBARS no fígado variou significativamente em função do ciclo anual (*F*=4,495; *P*=0,007; *d.f.*=28) em decorrência dos valores 30-35% mais altos na atividade de outono, cuja média é significativamente diferente da média de todas as demais fases exceto o despertar seguido de ingestão de água (Fig. 3.10). Um efeito sazonal significativo também foi observado no pulmão (*H*=12,480; *P*=0,006; *d.f.*=3), associado a uma concentração 26% menor na dormência de inverno em relação à atividade de primavera. No rim não houve variação sazonal significativa dos níveis de TBARS. O jejum na atividade de primavera causou um aumento de 26% na concentração de TBARS no fígado em relação aos animais alimentados (*t*=-2,243; *P*=0,049; *d.f.*=10) e não causou efeito significativo no rim.

A concentração de PC no fígado e no coração dos teiús se manteve constante ao longo do ciclo anual (Fig. 3.11). No pulmão, embora o teste de Kruskal-Wallis tenha indicado um efeito sazonal significativo (*H*=7,940; *P*=0,007; *d.f.*=3), o teste de comparações múltiplas não detectou entre quais grupos estaria esta diferença. Neste órgão observou-se uma forte tendência ao aumento de PC no grupo de atividade de outono, quando a média foi 80% maior em comparação com o grupo de atividade de primavera. No rim, o conteúdo de PC também variou em função da fase do ciclo anual (*H*=5,628; *P*=0,003; *d.f.*=26), associado ao teor significativamente maior no grupo de dormência de inverno comparado com os grupos de despertar seguido de ingestão de água (57%), despertar seguido de ingestão de alimento (87%) e atividade de primavera (100%). De modo semelhante, no rim de animais submetidos a jejum na primavera houve um aumento de 73% dos níveis de PC em relação a animais alimentados (*U*=32,000; *P*=0,026; *d.f.*=10).

3.4. Discussão

No presente estudo investigou-se a hipótese de um aumento da capacidade antioxidante durante o ciclo anual em lagartos teiú, que ocorreria na fase de dormência de inverno como preparação para o momento de despertar. Os resultados mostraram que, ao contrário, há um efeito predominante de queda da atividade de várias enzimas antioxidantes no fígado, rim, coração e pulmão durante o estado hipometabólico, acompanhando a depressão das taxas de consumo de O_2 medidas no animal como um todo. No entanto, destaca-se no conjunto dos dados o aumento seletivo de atividade das enzimas SOD total e Se-GPX no fígado de animais dormentes. O padrão distinto de alteração destas enzimas poderia estar relacionado com o seu papel na defesa contra os efeitos pró-oxidantes do jejum que acompanha a fase de dormência, aumentando a resistência do órgão ao estresse. Reforçando essa interpretação, o jejum na atividade de primavera, dissociado da dormência, também causou um aumento significativo da atividade da Se-GPX. Em contraste, o jejum na primavera não alterou a atividade da SOD total e, portanto, as altas taxas desta enzima no fígado de animais dormentes seriam evidência de um ajuste regulatório da proteção antioxidante em preparação para a reativação do metabolismo durante o despertar, possivelmente envolvendo um aumento da expressão gênica e/ou da meia-vida da proteína. Não há evidências de estresse oxidativo no fígado, coração e pulmão durante a dormência e o despertar, sugerindo que os efeitos seletivos de inibição e de hiperativação de enzimas mantêm a proteção antioxidante destes tecidos em níveis adequados, face às amplas flutuações de intensidade metabólica. No rim, o aumento do teor de proteínas carboniladas (PC) durante a dormência de inverno e o jejum na primavera seria evidência de estresse oxidativo associado ao jejum. Porém, a natureza do efeito sazonal neste tecido parece não ser o jejum per se, uma vez que a concentração de PC normalizou 72 horas após o despertar seguido da ingestão apenas de água. Adicionalmente, os resultados mostraram que os níveis de TBARS e a atividade de GST estão elevados no fígado de animais em atividade de outono, quando a lipólise encontra-se inibida no tecido e a lipogênese hiperativada. Estes efeitos, observados durante a fase que antecede a dormência, sugerem uma correlação entre o aumento dos níveis de adiposidade e o aumento da produção de ROS no contexto da sazonalidade, um tema de grande interesse científico e ainda inexplorado.

Storey (1996) propôs que animais sujeitos a amplas variações da produção de ROS podem apresentar um dentre três diferentes padrões de resposta das defesas antioxidantes. O primeiro seria a manutenção de níveis de antioxidantes constitutivamente altos, de modo que o organismo estaria apto a se defender a qualquer momento. O segundo seria o aumento dos níveis de antioxidantes durante o estado hipometabólico, de modo que o potencial de defesa seria ajustado em antecipação ao aumento da produção de ROS no despertar. O terceiro seria uma maior resistência ao acúmulo de moléculas danificadas durante a dormência e o despertar, por meio de uma ênfase nos mecanismos de reparação e eliminação das moléculas. Nos teiús, a atividade da maioria das enzimas antioxidantes do fígado situa-se acima da média dos valores reportados para vertebrados não-mamíferos e é muito similar à do rato e do esquilo, apesar de taxas de consumo de O_2 muito menores em ectotermos (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002; HERMES-LIMA, 2004; VOITURON et al., 2006). Por exemplo, a atividade da SOD ($U.mg^{-1}$ de proteína) no teiú é 57, na cobra *Thamnophis sirtalis parietalis,* 8,3, na tartaruga *Trachemys scripta,* 48, no lagarto *Lacerta vivípara*, 27, no rato, 50-90 e no esquilo, 47. A atividade da CAT ($U.mg^{-1}$ de proteína) no teiú é 216, na cobra *T. sirtalis,* 72, na tartaruga *T. scripta,* 230, no rato, 300-440 e no esquilo, 533. É importante destacar a semelhança entre os valores do teiú e da tartaruga *T. scripta,* que, além hibernar em condições anóxicas, realiza mergulhos prolongados na fase ativa, quando ajustes circulatórios podem causar hipóxia severa em alguns órgãos (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002). A anóxia resulta em redução da atividade de enzimas antioxidantes em diversos órgãos da tartaruga, sem sinais de danos a macromoléculas após a reoxigenação, o que tem sido atribuído ao elevado potencial antioxidante constitutivo nestes animais (WILLMORE; STOREY, 1997). Em contraste, a capacidade antioxidante do fígado da cobra *T. sirtalis* é muito semelhante à observada em outros ectotermos durante o ciclo anual, aumentando durante a anóxia. Nos teiús, o ajuste sazonal da atividade de várias enzimas antioxidantes indica um padrão de inibição durante o estado hipometabólico e sugere, portanto, que a atividade remanescente das enzimas seria suficiente para prevenir danos oxidativos aos tecidos. Essa interpretação é reforçada pelo fato de que, na maioria dos casos, a inibição é sustentada durante o despertar e após a retomada da alimentação, quando as taxas de consumo de oxigênio do animal gradualmente se elevam. As pressões seletivas envolvidas no desenvolvimento de uma capacidade antioxidante elevada nos teiús não são claras, mas podem estar relacionadas ao

elevado nível de atividade do animal e às variações circadianas de metabolismo e temperatura corpórea.

Contudo, este não foi o único padrão de ajuste observado. A atividade aumentada da SOD total no fígado de animais dormentes, mas não nos demais órgãos do mesmo animal, indica que os ajustes no sistema de proteção antioxidante são enzima- e tecido-específicos. Além disso, a recuperação da atividade de várias enzimas após o despertar seguido da ingestão apenas de água, como a SOD no coração e a SOD, a Mn-SOD e a GR no pulmão, constitui forte evidência de um aumento de expressão destas enzimas no final do período de dormência ou durante a reativação do metabolismo no despertar. Este ajuste deve ser essencial, uma vez que requer consumo de energia durante uma etapa do ciclo anual em que as reservas energéticas encontram-se diminuídas nos teiús neonatos. As atividades de síntese proteica e transcrição gênica utilizam, respectivamente, 25%-30% e 1%-10% do ATP produzido nos tecidos de mamíferos no estado basal (ROLFE; BROWN, 1997) e são importantes alvos de depressão metabólica na dormência sazonal (GUPPY; WITHERS, 1999). Deste modo, espera-se que somente proteínas de extrema relevância para a manutenção da viabilidade celular estejam com sua síntese aumentada durante o estado hipometabólico. De acordo com o conhecimento disponível, as enzimas do sistema de proteção antioxidante não são reguladas por mecanismos pós-tradução e o aumento de atividade necessariamente reflete um aumento da taxa de síntese e/ou redução da taxa de degradação (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002). Nos teiús, taxas elevadas da SOD total no fígado foram observadas 60 dias após a entrada em dormência e 48 h após o despertar, sugerindo que o potencial para a eliminação de radicais superóxido é ajustado em antecipação ao despertar. A atividade da Se-GPX também está aumentada no fígado de animais dormentes, porém o mesmo efeito foi induzido pelo jejum dissociado da dormência em animais ativos na primavera, sugerindo que o estímulo preponderante para o ajuste desta enzima seria a interrupção da alimentação. Outro resultado que se destaca é a tendência a taxas aumentadas da GST e da GPX no fígado de animais em atividade de outono em comparação com a dormência e a atividade de primavera. Portanto, os padrões de regulação da GST e GPX seriam distintos dos demais e sugerem que a capacidade de certas enzimas na fase de preparação para a dormência excede a observada em animais ativos na primavera. Além disso, a atividade da Se-GPX está aumentada também na atividade de outono, resultado que pode estar relacionado com o aumento da concentração

de TBARS nesta mesma fase, já que as GPX degradam hidroperóxidos orgânicos (HERMES-LIMA, 2004).

O aumento da atividade total da SOD no fígado de animais dormentes, descrito acima, também poderia contribuir para um aumento da resistência do órgão ao estresse oxidativo durante o estado hipometabólico. Há evidências de que um aumento da expressão da CuZn-SOD e Mn-SOD no cérebro e coração de roedores aumenta a resistência ao estresse oxidativo e de que a deficiência de Mn-SOD aumenta a vulnerabilidade desses órgãos à morte celular após eventos de isquemia e reperfusão (ASIMAKIS; LICK; PATTERSON, 2002; CHEN et al., 1998; JANG et al., 2009; KIM et al., 2002; MURAKAMI et al., 1997). Em cultura de células, níveis aumentados de SOD, GPX e CAT previnem a translocação do fator indutor de apoptose (AIF) da mitocôndria para o núcleo e limitam a ocorrência de morte celular (ZEMLYAK et al., 2009). No fígado dos teiús, a atividade da Mn-SOD acompanha a variação da SOD total, embora as diferenças entre os grupos não tenham sido significativas de acordo com a Anova. Em músculo e fígado da cobra *T. sirtalis* há aumento da atividade SOD total durante a anóxia, antes da reoxigenação, e este parece constituir um importante mecanismo adaptativo em animais que convivem com flutuações na oferta de oxigênio (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002). Em contraste com o que ocorre no fígado, no rim e no pulmão dos teiús observou-se inibição da atividade da SOD total, para a qual a atividade Mn-SOD parece contribuir. No coração, enquanto a SOD total é menor na dormência, a atividade da Mn-SOD parece ser preservada ao longo do ciclo anual. É provável que os diferentes padrões de variação estejam relacionados com graus distintos de depressão metabólica nestes órgãos (CAREY; ANDREWS; MARTIN, 2003; FLANIGAN; WITHERS; GUPPY, 1991).

Durante a dormência, enquanto algumas funções são interrompidas, como a filtração glomerular e a alimentação, outras continuam a taxas reduzidas, como a função cardiorrespiratória e o controle metabólico exercido pelo fígado. O fígado desempenha uma função central em vários processos vitais, importantes para a sobrevivência de animais que exibem uma acentuada sazonalidade no ciclo anual. No teiú e nos hibernantes em geral, a fase que antecede a dormência caracteriza-se por um acúmulo de lipídios no tecido adiposo. Nesta fase, ajustes metabólicos no fígado favorecem a esterificação de ácidos graxos e formação de triglicerídeos, ao mesmo tempo em que a oxidação de ácidos

graxos é inibida (DARK, 2005; SOUZA et al., 2004). Durante a dormência, os lipídios armazenados constituem a principal fonte de energia dos tecidos e o fígado é responsável pela síntese de enzimas lipolíticas e proteínas envolvidas no transporte de ácidos graxos. O fígado também é o local de síntese de diversas enzimas envolvidas na gliconeogênese e formação de corpos cetônicos, que constituem fontes suplementares de energia para órgãos vitais como cérebro e coração durante a dormência e o despertar (EPPERSON; DAHL; MARTIN, 2004; GEHNRICH; APRILLE, 1988). Nos teiús, a frequência cardíaca é mantida em torno de 12 bpm durante a dormência sazonal, independente de variações da temperatura corpórea, enquanto que em animais ativos a frequência cardíaca correlaciona positivamente com a temperatura e pode alcançar 100 bpm (ABE, 1983; GALLI et al., 2006). Nos teiús jovens, em paralelo com a inibição metabólica e da frequência cardíaca ao longo do outono e dormência, ocorre hipertrofia cardíaca e manutenção da capacidade de oxidação de substratos pelo miocárdio, evidenciando a importância da manutenção da capacidade funcional do tecido durante o hipometabolismo (DA SILVEIRA et al., 2013). Outro órgão cuja função é sustentada num patamar reduzido ao longo da dormência é o pulmão; a ventilação ocorre em episódios intercalados, com fases de apneia que podem durar mais de 20 min, e calcula-se que ventilação seja responsável por cerca de 50% do gasto energético durante a dormência (ANDRADE D V; ABE, 1999). Em contraste, a função renal é suprimida durante a dormência e não há eliminação de excretas ao longo de todo o período. Em mamíferos hibernantes, isso ocorre em grande parte como consequência da hipotermia (ZANCANARO et al., 1999), enquanto nos teiús a temperatura não seria o fator crítico. A menor atividade CS no rim e a tendência similar observada no pulmão dos teiús durante a dormência sugerem uma depressão do metabolismo aeróbio de grandes proporções nestes órgãos. Dentre os demais órgãos do teiú já investigados, observou-se uma redução das taxas da CS também no intestino médio, órgão que sofre um grau acentuado de atrofia durante a dormência, enquanto que no fígado, cérebro, coração e músculo esquelético a atividade da CS não se altera no ciclo anual (DA SILVEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2015). No presente estudo, a ausência de mudanças na CS do fígado em função do ciclo sazonal confirma dados prévios com o tecido e o contraste entre este resultado e a redução das taxas no rim e no pulmão sugere diferenças na taxa de produção de ROS entre os tecidos, as quais estariam associadas a diferenças no padrão de regulação de enzimas antioxidantes, como a SOD.

A recuperação da atividade da SOD no coração e no pulmão dos teiús durante a reativação do metabolismo no despertar, antes da retomada da alimentação, é um dado intrigante. O aumento de atividade da SOD teria ocorrido numa etapa do experimento em que as taxas de consumo de O_2 ainda exibem um grau de inibição por volta de 50% em relação à atividade de primavera (SOUZA et al., 2004), ou, alternativamente, no terço final da dormência, conferindo a estes órgãos uma maior resistência ao aumento da produção de ROS no despertar. No despertar, o coração desempenha um papel importante na distribuição de sangue e geração de pressão para a perfusão de órgãos hipoperfundidos. Em mamíferos hibernantes, a frequência cardíaca alcança valores superiores aos típicos da fase ativa (MILSOM; BETH ZIMMER; HARRIS, 2001) e o retorno ao padrão de ventilação contínuo, sem fases de apneia, resulta em reativação das taxas de produção e consumo de energia no pulmão, como sugere a recuperação das taxas da CS. Neste momento, o risco de estresse oxidativo seria máximo, devido à atividade ainda inibida de algumas enzimas, à concentração reduzida de antioxidantes provenientes da dieta e ao aumento do metabolismo e da produção de ROS quando os animais ainda estão em jejum. Apesar disso, nenhuma evidência de aumento do dano oxidativo foi observada na dormência ou no despertar em ambos os órgãos, sugerindo que as inibições pontuais do sistema de proteção antioxidante estariam ajustadas ao nível de produção de ROS. Chama a atenção a constância da maioria das variáveis analisadas no músculo cardíaco: 5 de 7 variáveis analisadas se mantiveram inalteradas ao longo do ciclo anual e apenas a atividade da SOD-total, já mencionada, e da CAT, foram significativamente menores nos grupos de despertar. Outros estudos com animais que apresentam dormência sazonal relataram um aumento da proteção antioxidante no músculo cardíaco; por exemplo, o aumento da atividade de peroxirredoxinas (MORIN; STOREY, 2007) e da concentração de chaperonas e proteínas de choque térmico em esquilos em torpor na hibernação (GRABEK et al., 2011), o aumento da expressão de uma tiorredoxina peroxidase em morcegos em torpor (EDDY; MCNALLY; STOREY, 2005), o aumento da atividade da GR e GPX em um peixe pulmonado na estivação (PAGE et al., 2010). No entanto, resultados discrepantes têm sido reportados na literatura; por exemplo, a ausência de mudança na atividade da maioria das enzimas antioxidantes no coração de esquilos em torpor (PAGE et al., 2009) e um efeito preponderante de inibição das taxas das enzimas no coração de sapos (GRUNDY; STOREY, 1998). Uma parte das diferenças pode estar relacionada a diferenças de metodologia empregada nos estudos, porém, estes dados fortemente sugerem que os

ajustes do sistema de proteção antioxidante são espécie- e tecido-específicos e os dados do presente estudo, com teiús neonatos, reforçam esta teoria. Miller (2009) sugeriu que a resistência ao estresse oxidativo seria um dos componentes de um sistema complexo de resistência ao estresse (‘multiplex stress resistance’), o qual atuaria por meio de diversas adaptações moleculares, além da regulação de certas enzimas antioxidantes, e que os ajustes envolvidos diferem entre as espécies, tecidos e estados fisiológicos.

Além de sua função antioxidante, a Mn-SOD é uma enzima essencial na biologia de células e tecidos estando envolvida, por exemplo, na regulação da proliferação celular e do fluxo de H_2O_2 nas células (BUETTNER et al., 2006; SARSOUR et al., 2012). A atividade da Mn-SOD em mamíferos é cerca de 1 a 10% da atividade da SOD total (HERMES-LIMA, 2004). Nos teiús, a atividade Mn-SOD representa 28%, 45%, 50% e 33% da atividade total da SOD no fígado, rim, coração e pulmão respectivamente, no grupo de atividade de primavera. É possível que as condições do meio de reação não tenham possibilitado a completa inibição da CuZn-SOD, superestimando a medida de Mn-SOD; alternativamente, a atividade da Mn-SOD no teiú pode representar uma fração maior da atividade total da SOD. A atividade da CS é comumente usada como indicador de densidade mitocondrial; a razão entre a atividade Mn-SOD e a atividade CS no grupo de atividade de primavera é maior no rim (média= 208), seguido pelo fígado (125) e pelo pulmão (115), sugerindo que há uma maior concentração da enzima nas mitocôndrias do rim. A ausência de dados de Vmáx da CS e da Mn-SOD obtidos com o coração dos mesmos animais inviabiliza um cálculo mais preciso da razão entre estas enzimas na atividade de primavera; uma estimativa grosseira sugere que a razão é consideravelmente menor no tecido cardíaco (33) relativamente aos demais tecidos, devido à atividade elevada da CS e não acompanhada por uma taxa proporcionalmente elevada da Mn-SOD. No rim e no pulmão, a razão é constante ao longo do ciclo anual, sugerindo que a concentração da Mn-SOD por unidade de mitocôndria é mantida constante. Em contraste, no fígado a razão Mn-SOD:CS se altera significativamente durante o ciclo anual (F=3,314; P=0,032; $d.f.$=23), observando-se um aumento progressivo ao longo da dormência e despertar seguido da ingestão de água, quando a razão é 57% maior e significativamente diferente da razão na atividade de primavera. Desta forma, a capacidade de remoção de radicais superóxido aparentemente é mantida no rim e no pulmão dos teiús, ou até mesmo aumentada, como parece ocorrer no fígado, por meio de ajustes distintos porém

compatíveis com a regulação do metabolismo oxidativo aeróbio e o potencial de formação de radicais nestes tecidos.

Cerca de 1-4% de todo o oxigênio consumido pelos vertebrados é convertido em radicais superóxido (O_2^-•) e a maior parte do ROS intracelular é derivado do O_2^-•. Através da ação das SODs, o O_2^-• é convertido a H_2O_2, o qual é pouco reativo, mas a sua estabilidade e capacidade de se difundir rapidamente dentro da célula o torna potencialmente danoso (HERMES-LIMA, 2004). Existem diversas enzimas que degradam o H_2O_2, incluindo peroxirredoxinas, Se-GPX e CAT (SENA; CHANDEL, 2012). A função destas enzimas depende da afinidade pelo H_2O_2 e da concentração relativa do H_2O_2 e das enzimas. A CAT atua na degradação de H_2O_2 quando os níveis deste radical estão elevados (baixa afinidade), como ocorre nos peroxissomos, e a Se-GPX atua em níveis baixos de H_2O_2 (alta afinidade). A abundância relativa de Se-GPX e CAT geralmente reflete as concentrações do H_2O_2 no tecido e o aumento da atividade de uma tem sido observado em situações nas quais a atividade da outra está inibida (GRUNDY; STOREY, 1998). Dada a acentuada depressão do consumo de oxigênio dos teiús na dormência, cerca de 80% dos valores de repouso na atividade, a produção de ROS e as concentrações de H_2O_2 também estariam diminuídas. No fígado dos teiús, a atividade da CAT na dormência é substancialmente menor do que na atividade, porém a da Se-GPX está aumentada; no despertar, as taxas de ambas as enzimas são menores do que na atividade de primavera. As altas taxas da Se-GPX apenas na dormência sugerem a manutenção de um elevado potencial de remoção de H_2O_2 quando a taxa de formação e a concentração deste radical são reduzidas no tecido hepático. Dado que não há evidência de danos a macromoléculas hepáticas durante a dormência ou no despertar, a concentração de H_2O_2 aparentemente foi mantida em níveis seguros nestas fases devido ao elevado potencial catalítico da CAT no fígado dos teiús, comparativamente a outros vertebrados, e ao ajuste da Se-GPX durante a dormência.

Em esquilos, a taxa de formação de radicais no fígado encontra-se inibida no torpor por um mecanismo dependente da redução da temperatura corpórea, que atinge cerca de 4 ^{o}C (BROWN et al., 2012). Os teiús permanecem em estado de dormência a uma temperatura relativamente elevada (~17 ^{o}C) e a regulação da produção de ROS provavelmente depende em maior grau de mecanismos intrínsecos de depressão metabólica, os quais ainda não foram elucidados. Durante o despertar, o aumento da

peroxidação lipídica no hepatopâncreas de caracóis que estivam (RAMOS-VASCONCELOS; HERMES-LIMA, 2003) e o aumento da concentração de urato no plasma de esquilos hibernantes (TØIEN Ø et al., 2001) seriam evidências de uma produção aumentada de ROS durante a reativação do metabolismo. No presente estudo, a manutenção dos níveis de TBARS e de PC e da razão GSSG:GSH em vários órgãos dos teiús durante o despertar constituem uma evidência contrária à reportada na literatura, de que a reativação do metabolismo não resulta em estresse oxidativo. Uma característica do despertar nos teiús, que é provavelmente importante para evitar o estresse oxidativo, é o seu caráter gradual (SOUZA et al., 2004). Aproximadamente 48 h após os sinais de despertar e a ingestão de água, a depressão do consumo de O_2 em teiús juvenis ainda representa cerca de 50% em relação às taxas de repouso na fase de atividade e 30% após a ingestão de alimento, cerca de uma semana após o despertar (SOUZA et al., 2004). Esse padrão contrasta com a rápida e energeticamente cara reativação do metabolismo observada em mamíferos hibernantes e em caracóis (PRENDERGAST et al., 2002; RAMOS-VASCONCELOS; HERMES-LIMA, 2003). Curiosamente, um mecanismo de redução do custo energético do despertar foi recentemente proposto para morcegos hibernantes, o qual envolveria o reaquecimento passivo do animal por meio da radiação solar ou da flutuação da temperatura ambiente (CURRIE; NOY; GEISER, 2015).

A interrupção da alimentação aparentemente desempenha um papel importante nos ajustes da CAT e da GR no fígado e rim dos teiús, cujas atividades em geral estão diminuídas na dormência e no despertar e também durante o jejum na atividade de primavera. O mesmo padrão de variação da CAT foi observado no intestino médio dos teiús, sugerindo um efeito preponderante do jejum (WELKER, 2009). Em roedores de laboratório, o jejum causa redução das defesas antioxidantes e aumento da produção de ROS (DOMENICALI et al., 2001; ROBINSON et al., 1997); sem dúvida, o jejum é um importante componente dos ajustes metabólicos na dormência sazonal. Há evidências na literatura de inibição da CAT no fígado de mamíferos em hibernação, porém o efeito do jejum dissociado da dormência não foi analisado nestes estudos (BUZADZIC et al., 1990; KABINE et al., 2003). A CAT é encontrada principalmente nos peroxissomos, que são organelas envolvidas nos processos de oxidação de ácidos graxos e degradação de diversas moléculas tóxicas presentes no sangue. Nos teiús, a inibição da CAT no fígado e no rim provavelmente reflete a redução da demanda sobre a atividade de degradação e eliminação de substâncias tóxicas advindas da dieta nas fases em que o animal não se alimenta. Além

disso, dado que a taxa de produção de H_2O_2 provavelmente encontra-se reduzida na condição hipometabólica, enzimas com afinidade elevada pelo H_2O_2 como peroxirredoxinas e Se-GPX seriam mais importantes. A mesma relação entre o efeito sazonal e o efeito do jejum na primavera foi observada com a GR medida no fígado do teiú, sugerindo um efeito inibitório causado pelo jejum. Uma menor atividade da GR também foi observada no fígado de sapos em estivação (GRUNDY; STOREY, 1998) e no intestino de esquilos em hibernação (CAREY; RHOADS; AW, 2003), acompanhada de um aumento dos níveis de GSSG e da razão GSSG:GSH.

A glutationa é um dos antioxidantes não enzimáticos mais abundantes nas células e encontra-se amplamente distribuída em espécies de plantas e animais (HERMES-LIMA, 2004). Nas células, a maior parte (85-90%) da glutationa está presente no citosol, com o restante em mitocôndrias, matriz nuclear e peroxissomos, principalmente na sua forma reduzida (GSH). Um aumento da susceptibilidade ao estresse oxidativo geralmente se manifesta como um aumento da razão entre a forma oxidada e a reduzida (GSSG:GSH) (HERMES-LIMA, 2004). A glutationa é adquirida através da dieta e sintetizada endogenamente, principalmente no fígado, onde ocorre em maior concentração em diversas espécies (LÓPEZ-TORRES et al., 1993), enquanto o rim é um dos órgãos que mais utiliza a glutationa produzida no fígado (WU et al., 2004). No grupo de teiús ativos durante a primavera, os maiores valores de Eq-GSH foram encontrados no rim (2665 nmol/g), seguido pelo coração (2401 nmol/g), fígado (1780 nmol/g) e pulmão (1498 nmol/g); sequência semelhante ocorreu com os valores de GSH; por outro lado, a maior razão GSSG:GSH foi observada no pulmão (0,17), seguido pelo coração (0,12), fígado (0,08) e rim (0,08). Uma tendência a maiores valores de GSSG:GSH no pulmão também foi observada entre os órgãos de diversas espécies de vertebrados endotermos e ectotermos (LÓPEZ-TORRES et al., 1993) e estes autores sugerem que esta tendência seria resultado da constante exposição do pulmão a uma maior pressão de oxigênio em comparação com outros órgãos.

Apesar das amplas variações de taxa metabólica nos teiús durante o ciclo anual, o sistema antioxidante do fígado, rim e coração aparentemente ajusta-se de modo que as concentrações e o equilíbrio redox da glutationa se mantêm inalterados. Esse resultado contrasta com observações feitas em sapos durante a estivação (GRUNDY; STOREY, 1998), nos quais houve um aumento da razão GSSG:GSH nestes órgãos. Nos teiús, a

tendência a uma maior concentração de Eq-GSH no fígado de animais em atividade de outono provavelmente reflete a demanda elevada por este antioxidante no órgão, devido às altas taxas de ingestão de alimento e de lipogênese e, possivelmente, uma maior necessidade de exportação para outros órgãos.

No pulmão, o perfil sazonal da glutationa mostrou alterações marcantes, com uma redução de Eq-GSH e GSH na dormência de inverno de 40% e 55% em comparação com a atividade de outono e de primavera, respectivamente. Este resultado é consistente com a inibição da atividade da GR durante a dormência de inverno neste mesmo órgão. No entanto, a razão GSSG:GSH se manteve constante no pulmão dos teiús ao longo do ciclo anual, devido à tendência de variação proporcional dos níveis de GSSG. Aparentemente, há apenas um estudo do sistema de proteção antioxidante no pulmão no contexto da dormência sazonal, o qual foi conduzido com sapos estivantes; similar aos resultados com os teiús, observou-se uma redução da concentração de Eq-GSH e GSH na estivação, porém acompanhada de um aumento da razão GSSG:GSH, sugerindo um aumento da susceptibilidade do órgão ao estresse oxidativo durante a estivação (GRUNDY; STOREY, 1998). Em contraste, a manutenção da razão GSSG:GSH no pulmão dos teiús sugere que a produção de ROS estaria diminuída durante a dormência de inverno e que a atividade da GR, mesmo inibida no pulmão durante esta fase, manteria a taxa de regeneração da glutationa em níveis compatíveis com a preservação da integridade das macromoléculas. É interessante destacar que tanto a concentração de Eq-GSH e GSH quanto a atividade da GR e da SOD tendem a se recuperar no grupo de despertar seguido da ingestão de água, antes da ingestão de alimento. Este padrão contrasta, por exemplo, com a atividade da GR e da SOD no rim e da CAT no pulmão, que permanecem em um patamar baixo e semelhante ao da dormência após o despertar e se recuperam apenas durante a atividade de primavera.

A superfície interna dos alvéolos pulmonares de vertebrados é coberta por líquido surfactante composto por diversas proteínas e lipídios e rico em diversos antioxidantes, como GSH (KELLY, 1999). Em mamíferos, a concentração de glutationa no fluido surfactante é de 200-300 μmol/L e no plasma menos que 5 μmol/L. Uma alteração da concentração de GSH no líquido surfactante é observada em associação com diversas doenças em humanos, como na fibrose cística. Os antioxidantes presentes no surfactante são a primeira linha de defesa do organismo contra os oxidantes e toxinas presentes no ar e

uma redução da concentração de GSH neste líquido deixaria o órgão mais suscetível a ROS de origem exógena e endógena. No presente estudo com os teiús, a quantificação de glutationa foi realizada em um fragmento de tecido pulmonar e os dados provavelmente representam uma média da concentração no tecido e no líquido surfactante. Existem poucos estudos sobre os ajustes morfológicos e metabólicos do pulmão em hibernantes; um deles relata alterações no tecido pulmonar como a ocorrência de fibrose caracterizada pelo aumento da deposição de colágeno e actina e da expressão de proteínas associadas com o remodelamento do tecido, as quais são completamente revertidas após o despertar (TALAEI et al., 2011). Na literatura clínica, o estresse oxidativo tem sido considerado um mecanismo molecular importante na gênese da fibrose pulmonar, evidente em diversas doenças como fibrose pulmonar idiopática (CHERESH et al., 2013; POLI; PAROLA, 1996). Dadas estas relações e a redução significativa da concentração de GSH, CAT e SOD no pulmão dos teiús, seria interessante analisar possíveis alterações do tecido pulmonar e da composição do líquido surfactante ao longo do ciclo anual. Curiosamente, o peso dos pulmões relativizado pela massa corpórea dos teiús na dormência de inverno (0,92%) é significativamente maior que no outono (0,51%) e no despertar (0,62%). Além disso, a concentração de proteínas solúveis no pulmão não se altera sazonalmente, sugerindo que esta variação da massa do órgão possivelmente não está relacionada com o estado de hidratação.

Durante a primavera, a GR é cerca de 4 vezes mais ativa no rim do que nos demais órgãos do teiú analisados e esta alta capacidade redutora está associada com uma elevada concentração de Eq-GSH no tecido. A atividade da GR manteve-se elevada no tecido renal de animais submetidos ao jejum na primavera; no entanto, mudanças indicativas de risco de estresse oxidativo foram observadas no perfil de glutationa, como a redução dos níveis de GSH e aumento da razão GSSG:GSH. Adicionalmente, o aumento da concentração de PC desencadeado pelo jejum seria um reflexo dessa maior susceptibilidade do tecido a danos oxidativos durante a primavera. Nas demais fases, a atividade da GR é baixa e os níveis de GSH não se alteram, sugerindo que a menor capacidade redutora do tecido é compatível com a taxa de oxidação de GSH e com a manutenção da razão GSSH:GSH. No conjunto, os dados fortemente sugerem que o retorno à atividade e a retomada do crescimento após o despertar impõem uma alta demanda sobre a função renal e sobre o potencial da GR no primeiro ciclo anual dos teiús. Em contraste, não houve mudança na concentração de Eq-GSH ou no estado redox da

glutationa no fígado de animais ativos submetidos ao jejum, sugerindo que as taxas de oxidação da GSH se mantiveram baixas durante a interrupção da alimentação e, portanto, compatíveis com a inibição da atividade da GR neste tecido. Apesar de diferenças entre o fígado e o rim com respeito ao padrão sazonal da GR, a atividade da G6PDH não se alterou sazonalmente em ambos tecidos e possivelmente assegura níveis adequados de NADPH para a redução da GSSG. Há sólidas 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 coenzima para a GR e essencial para a atividade da CAT (HERMES-LIMA, 2004). Por outro lado, a atividade da G6PDH é significativamente menor no rim dos teiús após o jejum na primavera e possivelmente contribuiu para o aumento da concentração de PC, discutido acima. Inibição da G6PDH também foi observada em mamíferos submetidos à restrição alimentar (AMIR-AHMADY; SALATI, 2001; PROSTKO; FRITZ; KLETZIEN, 1989) e em peixes submetidos ao jejum (METÓN; FERNÁNDEZ; BAANANTE, 2003; MORALES et al., 2004). O contraste entre este efeito e a manutenção das taxas da G6PDH no fígado e no rim durante o jejum no estado hipometabólico evidencia a defesa do equilíbrio redox da glutationa durante a dormência sazonal, contribuindo para a manutenção da integridade de macromoléculas dos tecidos.

As alterações de resíduos de aminoácidos de proteínas causadas por ROS podem ser reversíveis e inofensivas, muitas vezes associadas com modulação da função da proteína, ou irreversíveis como a carbonilação, que resulta em inativação da proteína e efeitos prejudiciais à célula. Grupos carbonil são introduzidos em proteínas por meio da interação direta da proteína com ROS ou por meio da interação da proteína com moléculas, tais como carboidratos e lipídios previamente danificados por ROS. Uma vez danificadas, as proteínas na sua maioria são marcadas para degradação, frequentemente por meio de ubiquitinação dependente de ATP (DALLE-DONNE et al., 2006; HERMES-LIMA, 2004). A concentração de PC é amplamente usada como um marcador de estresse oxidativo que reflete o dano celular causado por diversas formas de ROS (DALLE-DONNE et al., 2003, 2006; HERMES-LIMA, 2004). Em humanos, o acúmulo de PC tem sido observado em diversas condições clínicas como Alzheimer, diabetes e doença renal crônica e também associada com o processo de envelhecimento (BERLETT, 1997; DALLE-DONNE et al., 2006; MIYATA; KUROKAWA; VAN YPERSELE DE STRIHOU, 2000). No presente estudo com os teiús, o aumento do teor de PC no rim durante a dormência pode refletir o

acúmulo de proteínas danificadas devido à inibição do processo de proteólise. Durante o torpor de esquilos hibernantes ocorre um acúmulo de proteínas ubiquitinadas no fígado e no rim devido à acentuada inibição da proteólise pelo efeito da redução da temperatura corpórea durante a hibernação, enquanto que o processo de ubiquitinação é menos afetado pela redução da temperatura (VAN BREUKELEN; CAREY, 2002; VELICKOVSKA et al., 2005). Estas evidências, associadas à evidência de ocorrência de estresse oxidativo na entrada em torpor nos esquilos (CAREY; FRANK; SEIFERT, 2000), sugerem que o acúmulo de conjugados de ubiquitina no torpor pode estar associado à geração de danos oxidativos na entrada em hibernação e subsequente ubiquitinação das proteínas danificadas durante o torpor. Nos esquilos, a proteólise é retomada durante o retorno à eutermia nos episódios de despertar, favorecendo a renovação da composição do tecido. Nos teiús, nos quais a hibernação é aparentemente contínua e ocorre em temperaturas amenas, a proteólise no tecido renal estaria inibida por mecanismos ativos, independente do efeito da temperatura. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que haveria um acúmulo de proteínas danificadas e supostamente ubiquitinadas no tecido renal durante todo o período de dormência, seguido da reativação do processo de proteólise no início do despertar nos animais ainda em jejum, quando se observou uma redução da concentração de PC para níveis similares aos de teiús ativos no outono. Esses dados, portanto, constituem evidência de que o mecanismo que origina o aumento de PC no jejum associado à dormência sazonal seria distinto daquele envolvido no aumento de PC durante o jejum na atividade de primavera. Esta diferença é corroborada pela inibição da atividade das enzimas CS na dormência e G6PDH no jejum na primavera e pelo aumento da razão GSSG:GSH no rim de animais submetidos a jejum na primavera, enquanto que após o despertar e a ingestão apenas de água observou-se uma tendência à redução da razão GSSH:GSH paralelamente à redução dos níveis de PC e, portanto, da susceptibilidade ao estresse oxidativo. Embora os valores de GSSG:GSH dos grupos de dormência de inverno e jejum na primavera sejam semelhantes, o conjunto dos dados evidencia o papel de mecanismos de proteção do tecido renal nos teiús durante a reativação da função renal, antes da retomada da alimentação. Alternativamente, o aumento do teor de PC no rim dos teiús pode estar relacionado com um acúmulo de proteínas plasmáticas no órgão na fase de dormência. A albumina é uma proteína plasmática que é parcialmente filtrada no glomérulo; no rim de esquilos, observou-se um acúmulo desta proteína no espaço urinário do corpúsculo renal durante o torpor e a eliminação destas proteínas acumuladas após o despertar (JANI et al., 2012). De

modo similar, nos teiús é possível que algumas proteínas plasmáticas danificadas possam se acumular no rim e sejam eliminadas após o despertar, resultando na normalização dos níveis de PC no órgão.

A medida do dano oxidativo por meio da análise de TBARS e PC no presente trabalho produziu diferentes padrões de variação sazonal no mesmo órgão. Por exemplo, no rim, o teor de PC encontra-se aumentado no grupo de dormência, porém não há variação sazonal do teor de TBARS; ao contrário, no fígado a concentração de TBARS está aumentada na atividade de outono enquanto que o nível de PC não se altera sazonalmente. Algumas hipóteses que poderiam explicar esta aparente incoerência incluem diferenças inerentes às macromoléculas na susceptibilidade ao estresse oxidativo e na taxa de acúmulo; diferenças nos níveis de defesas antioxidantes disponíveis para reverter o dano a diferentes tipos de macromoléculas; diferenças na estabilidade das moléculas danificadas nas células (BAGNYUKOVA; STOREY; LUSHCHAK, 2003).

As GSTs constituem uma família de enzimas multifuncionais envolvidas na conjugação da GSH com xenobióticos e produtos de peroxidação lipídica. Nos tecidos dos teiús, as taxas da GST durante a atividade de primavera situam-se em patamares distintos, com valores altos no rim e no fígado (72 e 48 U/mg de tecido, respectivamente), baixos no coração e no pulmão (9 e 4 U/mg de tecido, respectivamente) e intermediários no intestino (26 U/mg de tecido, WELKER, 2009). A atividade da GST diminuiu no rim e no fígado durante a hibernação enquanto que no coração e no pulmão ela se manteve estável ao longo do ciclo anual. A abundância e os diferentes padrões de variação sazonal da GST nos órgãos possivelmente estão relacionados com a função da enzima nestes órgãos: no fígado e no rim a concentração elevada da GST estaria relacionada com a função sistêmica no metabolismo de xenobióticos, menos exigido durante o jejum, enquanto no coração e no pulmão a concentração constitutivamente mais baixa e constante da GST estaria mais relacionada com a manutenção do tecido. Quando a alimentação é interrompida, a quantidade de xenobióticos é muito reduzida e uma menor concentração da enzima no fígado e no rim seria vantajosa do ponto de vista energético, compatibilizando a concentração da enzima com a menor demanda pela sua atividade durante o jejum associado à dormência. Muitas moléculas que induzem a expressão de GSTs são substratos para estas enzimas e sugere-se que a expressão de GSTs seja também induzida por ROS (HAYES; PULFORD, 1995), de modo que a inibição do metabolismo e interrupção da

alimentação resultaria na redução de ROS e redução da síntese de GSTs. No entanto, o mesmo efeito de inibição da GST no fígado e no rim não foi observado durante o jejum na atividade de primavera, sugerindo que o mecanismo de regulação da GST na dormência não seria ativado por jejum. No coração e no pulmão, a atividade da GST se mantém estável durante a dormência, sugerindo que a habilidade de enfrentar o estresse oxidativo seria preservada em órgãos cuja função é rapidamente reativada durante o despertar. Adicionalmente, é interessante destacar a atividade aumentada da GST no fígado de animais em atividade de outono, juntamente com o aumento da concentração de TBARS. Estes padrões de variação convergentes podem estar relacionados à regulação da expressão gênica por ROS ou por lipídios peroxidados (HAYES; PULFORD, 1995). O mesmo ajuste da GST não foi observado após jejum na atividade de primavera, quando também houve aumento dos níveis de TBARS no fígado. A decomposição de lipídios peroxidados durante o jejum poderia envolver a Se-GPX, usando a GSH como cofator (HERMES-LIMA, 2004) uma vez que a atividade dessa enzima também está aumentada no fígado desse grupo de animais.

O perfil metabólico dos teiús na atividade de outono é bastante distinto do perfil na atividade de primavera. No outono, os teiús juvenis ainda se alimentam a taxas reduzidas e a redução da atividade de enzimas lipolíticas (CPT e HOAD) no fígado favorece a lipogênese e o acúmulo de lipídios (HADDAD, 2007; SOUZA et al., 2004). Ao final do outono, os jovens teiús possuem cerca de 3% de sua massa corpórea na forma de lipídios em corpos gordurosos abdominais, além de depósitos lipídicos subcutâneos e na cauda, porém o teor de lipídios do fígado não se altera ao longo do ciclo anual. Portanto, o aumento da concentração de TBARS no fígado não seria causado por uma maior concentração de lipídios no órgão, mas sim uma consequência do aumento das taxas de processamento de lipídios da dieta e de lipogênese no órgão, durante esta fase. Além disso, estágios precoces de desenvolvimento estão associados a níveis elevados de estresse oxidativo devido à elevada taxa metabólica necessária para o crescimento e à elevada produção de ROS resultante (METCALFE; ALONSO-ALVAREZ, 2010). No primeiro ciclo anual, os teiús crescem e armazenam lipídios a taxas elevadas após a eclosão dos ovos e este conflito de demandas, associado a um sistema de proteção antioxidante imaturo, pode criar condições que favorecem o estresse oxidativo.

Sabe-se hoje que a produção mitocondrial de ROS é regulada e que estas moléculas são críticas para o funcionamento celular saudável, participando de diversas vias de sinalização celular (BARJA, 2007; SENA; CHANDEL, 2012). O 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) é um aldeído formado quando um ácido graxo poli-insaturado n-6, como o ácido araquidônico e linoleico, é danificado por ROS e a produção excessiva de 4-HNE é suficiente para causar obesidade e síndrome metabólica em roedores (MATTSON, 2009). Os mecanismos celulares de atuação do 4-HNE ainda não foram totalmente elucidados, mas sugerem uma complexa cadeia de eventos na qual uma maior concentração de 4-HNE causa aumento dos níveis de malonil-CoA, através de uma maior expressão e/ou ativação alostérica da acetil-CoA carboxilase. O excesso de malonil-CoA causa inibição da lipólise e favorece a lipogênese, gerando uma alça de retroalimentação positiva que pode resultar em obesidade no animal. Evidências a favor deste modelo foram observadas em diversos organismos, incluindo camundongo (SINGH et al., 2008), levedura (WONISCH et al., 2001) e vermes nematoides (SINGH et al., 2009), sugerindo que o 4-HNE atua em vias conservadas. Uma hipótese para investigação futura seria que o aumento da concentração de TBARS no fígado dos teiús em atividade de outono estaria acompanhado de um aumento da concentração de 4-HNE, levando ao aumento da isoforma da GST, responsável pela degradação desse aldeído. É possível que, nos teiús, a GST hepática atue modulando a concentração de 4-HNE em níveis compatíveis com a função de sinalização celular e insuficientes para gerar os efeitos patológicos observados em roedores de laboratório e humanos. Um aumento de 4-HNE durante os meses de outono poderia estar envolvido no mecanismo de inibição da atividade das enzimas reguladoras das taxas de oxidação de ácidos graxos, carnitina-palmitoil transferase I e II (CPT I e II) e β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOAD), conforme mostraram dados prévios com o fígado de teiús (HADDAD, 2007; SOUZA et al., 2004).

Em síntese, os resultados do presente estudo sugerem que o potencial antioxidante do fígado do teiú é constitutivamente alto em relação a outros vertebrados e que, embora a atividade da maioria das enzimas antioxidantes varie em função do ciclo sazonal, a atividade remanescente é suficiente para manter a integridade das macromoléculas em todas as fases analisadas. Além disso, os dados mostram uma hiperativação seletiva da SOD e Se-GPX na dormência e sugerem a importância deste ajuste na manutenção da homeostase celular durante o estado hipometabólico. Nenhuma evidência de estresse oxidativo ou de aumento de atividade de enzimas antioxidantes foi encontrada 48h após o

despertar, indicando que o aumento da produção de ROS causado pela reativação do metabolismo e retomada da alimentação não excede a capacidade de remoção desses metabólitos dos tecidos nas condições analisadas. Durante a dormência, no entanto, houve um aumento do nível de PC, o qual é revertido após o despertar e o mecanismo envolvido nesse ajuste merece investigação futura. De modo similar, dentre os resultados obtidos com o coração e o pulmão destaca-se o aumento da atividade da SOD no coração e da SOD, Mn-SOD e GR no pulmão no despertar, antes da retomada da alimentação, evidenciando a importância destes ajustes para a preservação da função de órgãos vitais em animais cujas reservas energéticas encontram-se diminuídas. No fígado, o aumento de TBARS e das taxas de enzimas antioxidantes durante o outono sugere uma importante relação entre a regulação do metabolismo lipídico e o estresse oxidativo neste tecido, que constitui outro tópico merecedor de investigação no futuro.

3.5. Figuras e Tabelas

Tabela 3.1 – Concentração de proteínas solúveis ($mg.g^{-1}$) no fígado, rim, coração e pulmão de lagartos teiú jovens durante o primeiro ciclo anual de atividades.

Fase do ciclo anual	Fígado	Rim	Coração	Pulmão
Atividade de Outono	93,57±11,47	163,29±10,64	50,87±3,23	58,77±3,37
Dormência de Inverno	103,94±8,87	127,07±6,32	42,54±1,77[f]	53,19±4,95
Despertar				
Água	102,51±10,14	100,09±8,13	48,72±1,0	55,03±3,98
Alimento	83,76±3,20	137,92±15,57	N.D.	N.D.
Atividade de Primavera				
Alimentado	96,91±7,20	131,52±3,25	54,25±1,84[c]	65,65±4,94
Jejum	96,02±8,50	129,99±4,37	N.D.	N.D.

Os valores são a média ± erro padrão da média de 4-8 animais por grupo. ‘c’ indica diferenças significativas em relação ao grupo de dormência de inverno e ‘f’ em relação ao grupo de atividade de primavera.

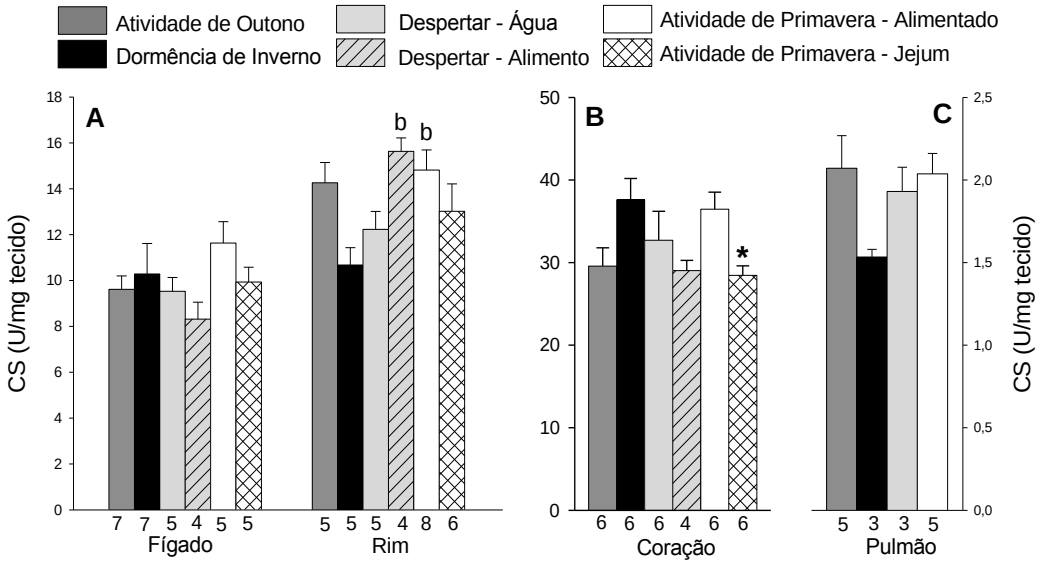

Figura 3.1 – Atividade da enzima citrato sintase (CS) no fígado e rim (A), coração (B) e pulmão (C) de lagartos teiú em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. '**b**' indica diferenças significativas em relação ao grupo de dormência de inverno. '*****' indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. Números abaixo das colunas representam o número de animais por grupo.

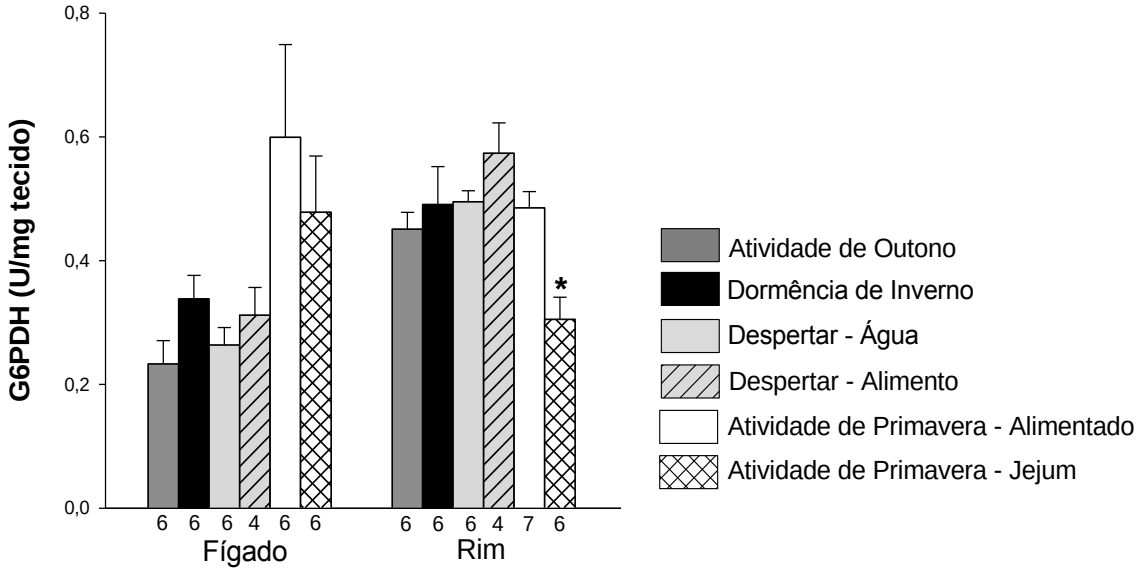

Figura 3.2 – Atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no fígado e rim de lagartos teiú em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. '*****' indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. Números abaixo das colunas representam o número de animais por grupo.

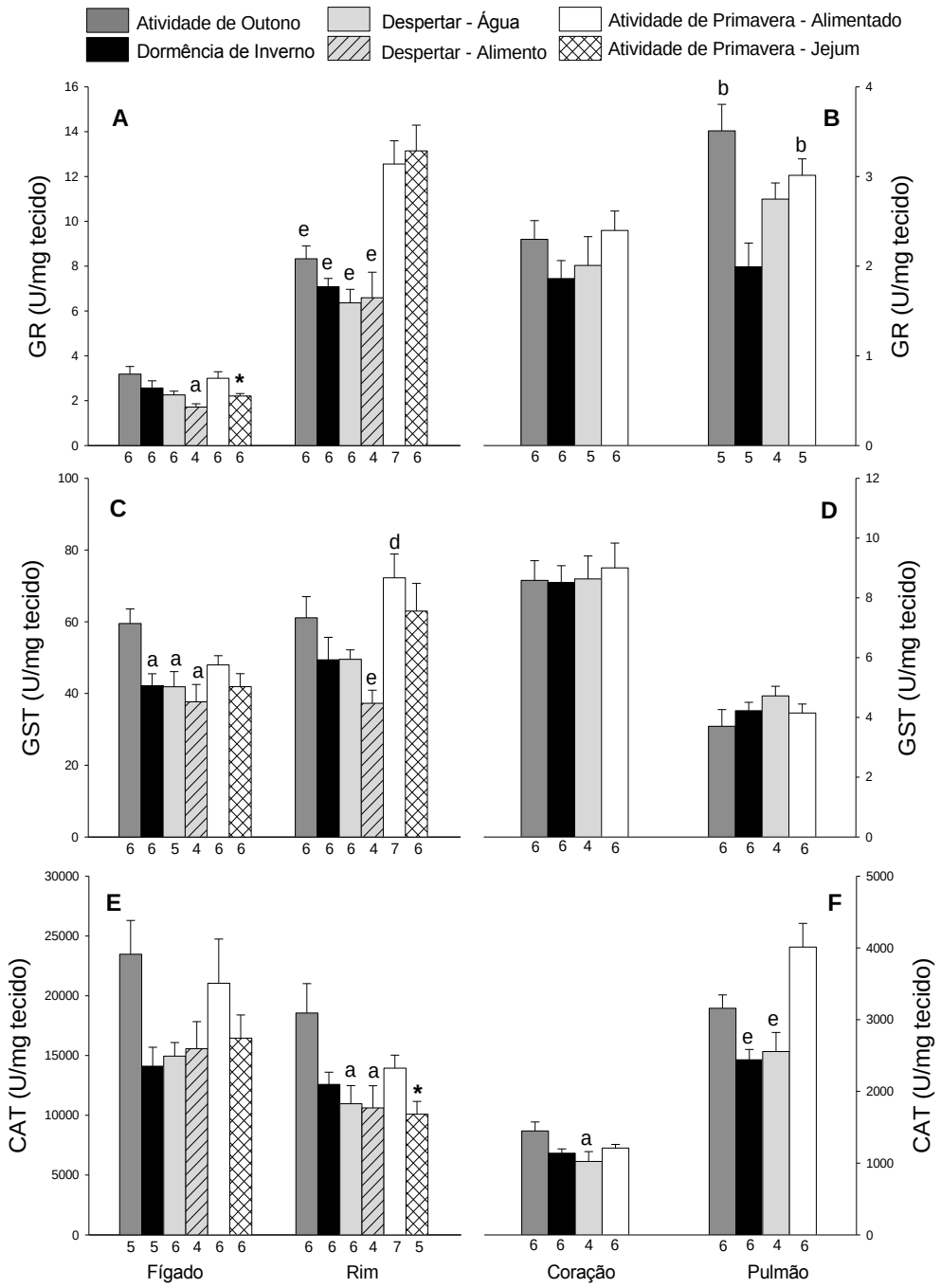

Figura 3.3 – Atividade da glutationa redutase (GR – painéis A e B), glutationa-S-transferase (GST – C e D) e catalase (CAT – E e F) no fígado, rim, coração e pulmão de lagartos teiú em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. '**a**' indica diferenças significativas em relação à atividade de outono, '**b**' em relação à dormência de inverno, '**d**' em relação ao despertar (alimento), '**e**' em relação à atividade de primavera. '*****' indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera. Os números abaixo das colunas são o número de animais por grupo.

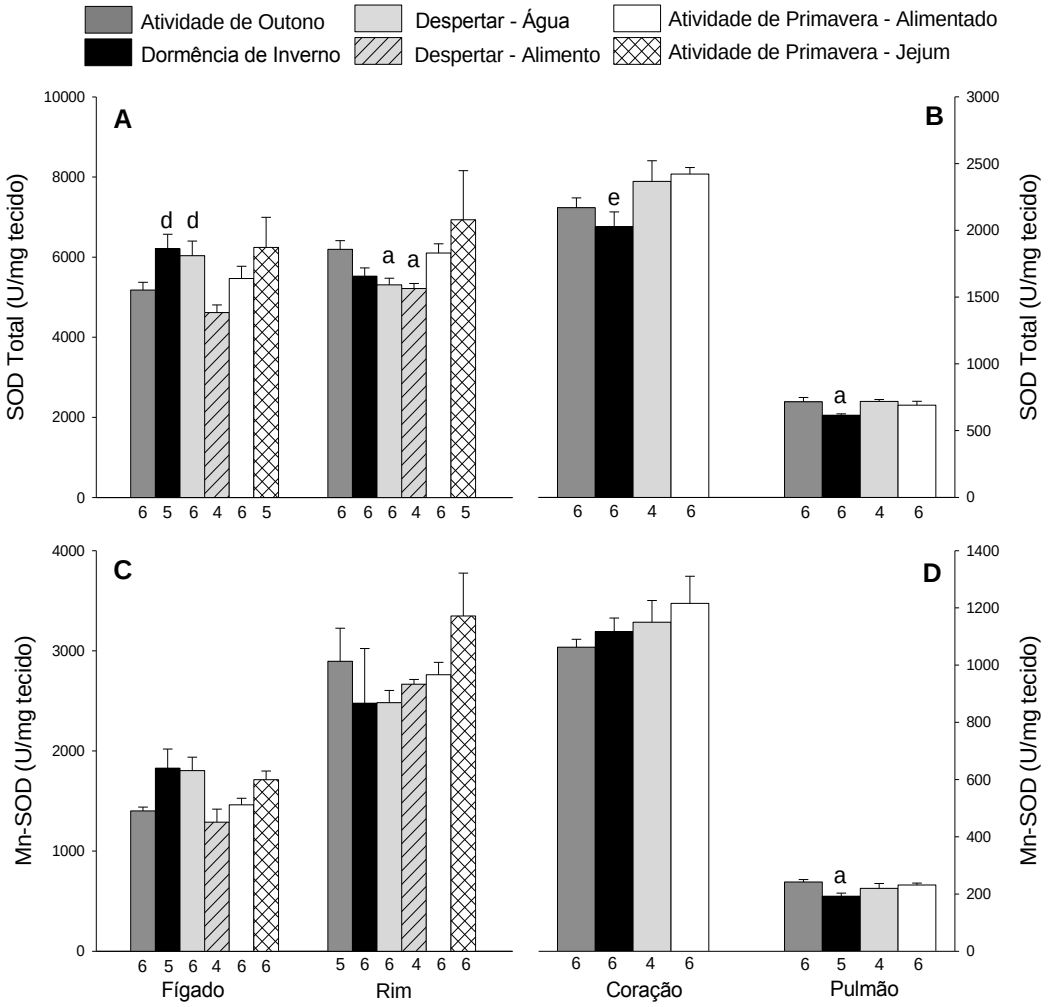

Figura 3.4 – Atividade da superóxido dismutase total (SOD Total, A e B) e da superóxido dismutase dependente de manganês (Mn-SOD, C e D) no fígado, rim, coração e pulmão de lagartos teiú em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. '**a**' indica diferença significativa em relação à atividade de outono, '**d**' em relação ao despertar (alimento), '**e**' em relação à atividade de primavera. Os números abaixo das colunas são o número de teiús por grupo.

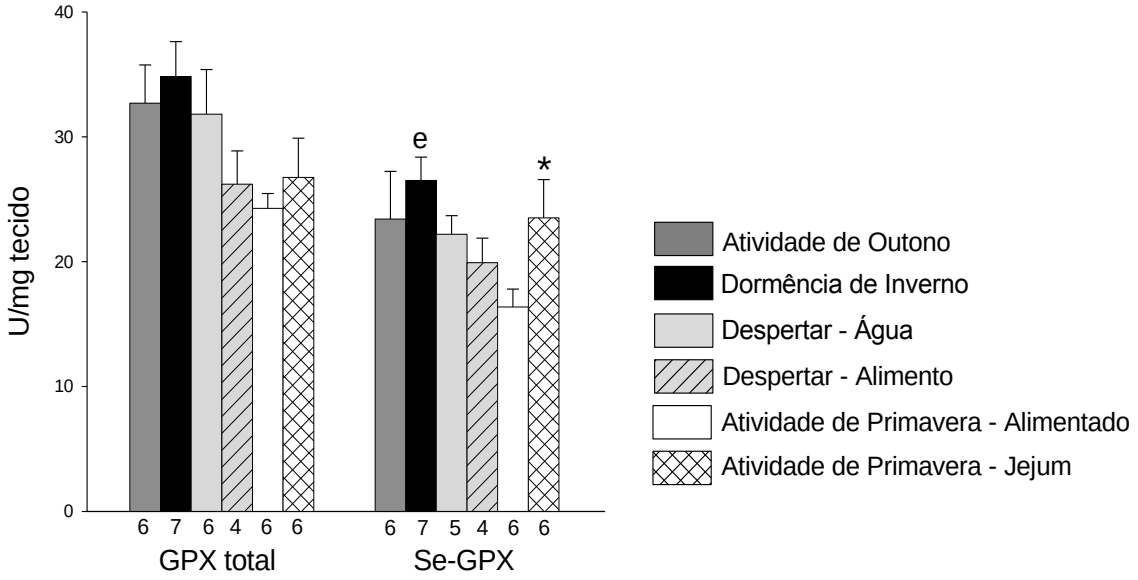

Figura 3.5 - Atividade da glutationa peroxidase total (GPX total) e glutationa peroxidase dependente de selênio (Se-GPX) no fígado de lagartos teiú em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. '**e**' indica diferença significativa em relação à atividade de primavera. '*****' indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera. Os números abaixo das colunas são o número de animais por grupo.

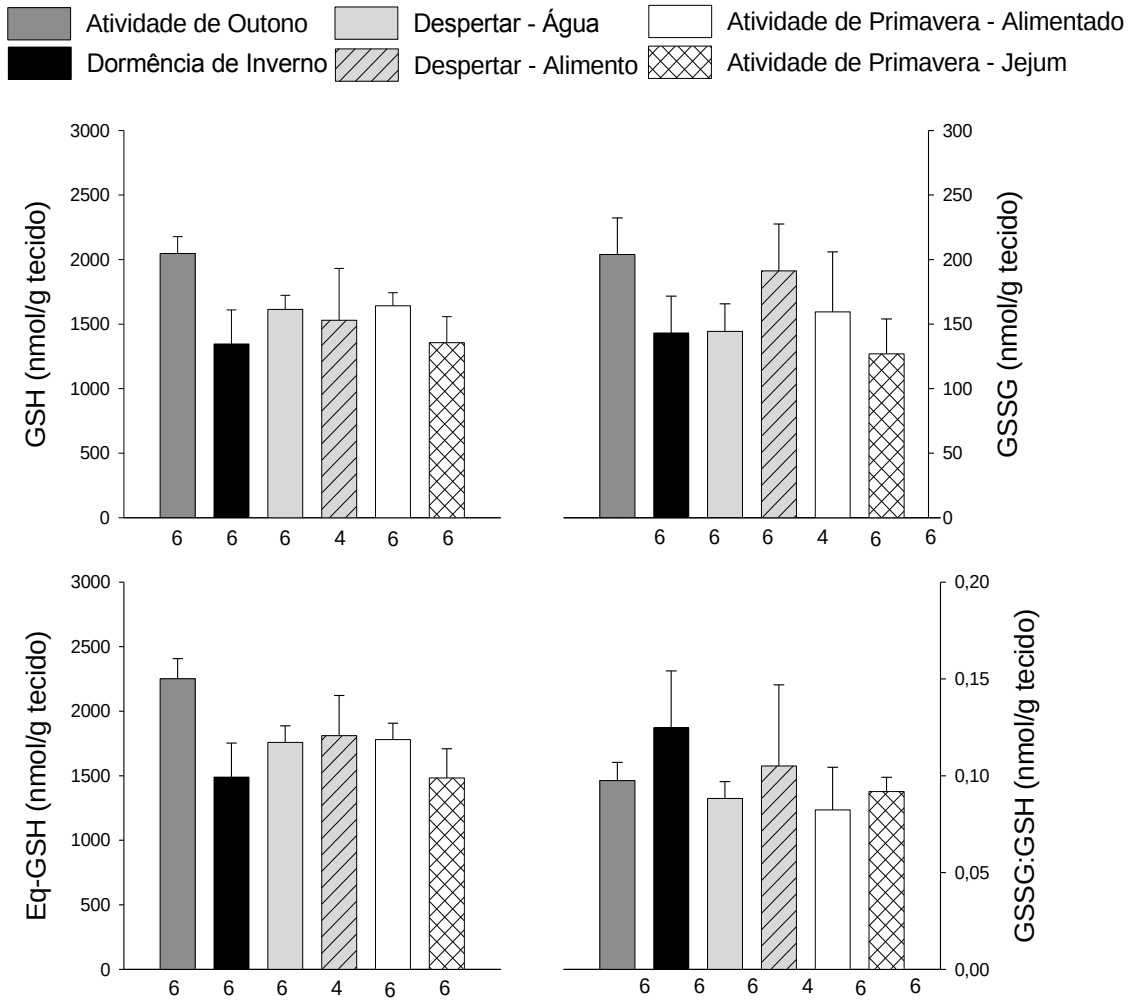

Figura 3.6 – Concentração de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), equivalentes de glutationa (Eq-GSH) e razão GSSG:GSH no **fígado** de teiús em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. Números abaixo das colunas representam o número de animais por grupo.

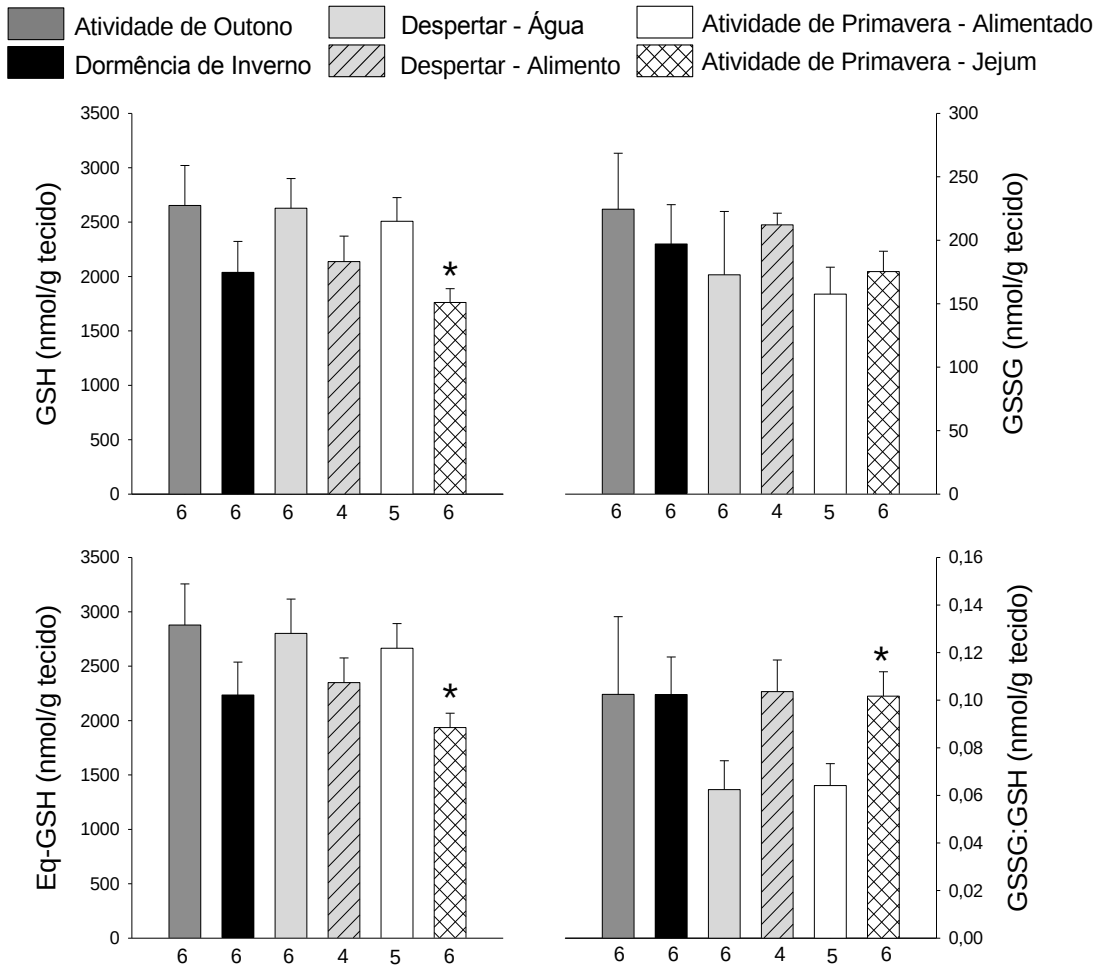

Figura 3.7 – Concentração de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), equivalentes de glutationa (Eq-GSH) e razão GSSG:GSH no **rim** de teiús em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. '*****' indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. Números abaixo das colunas representam o número de animais por grupo.

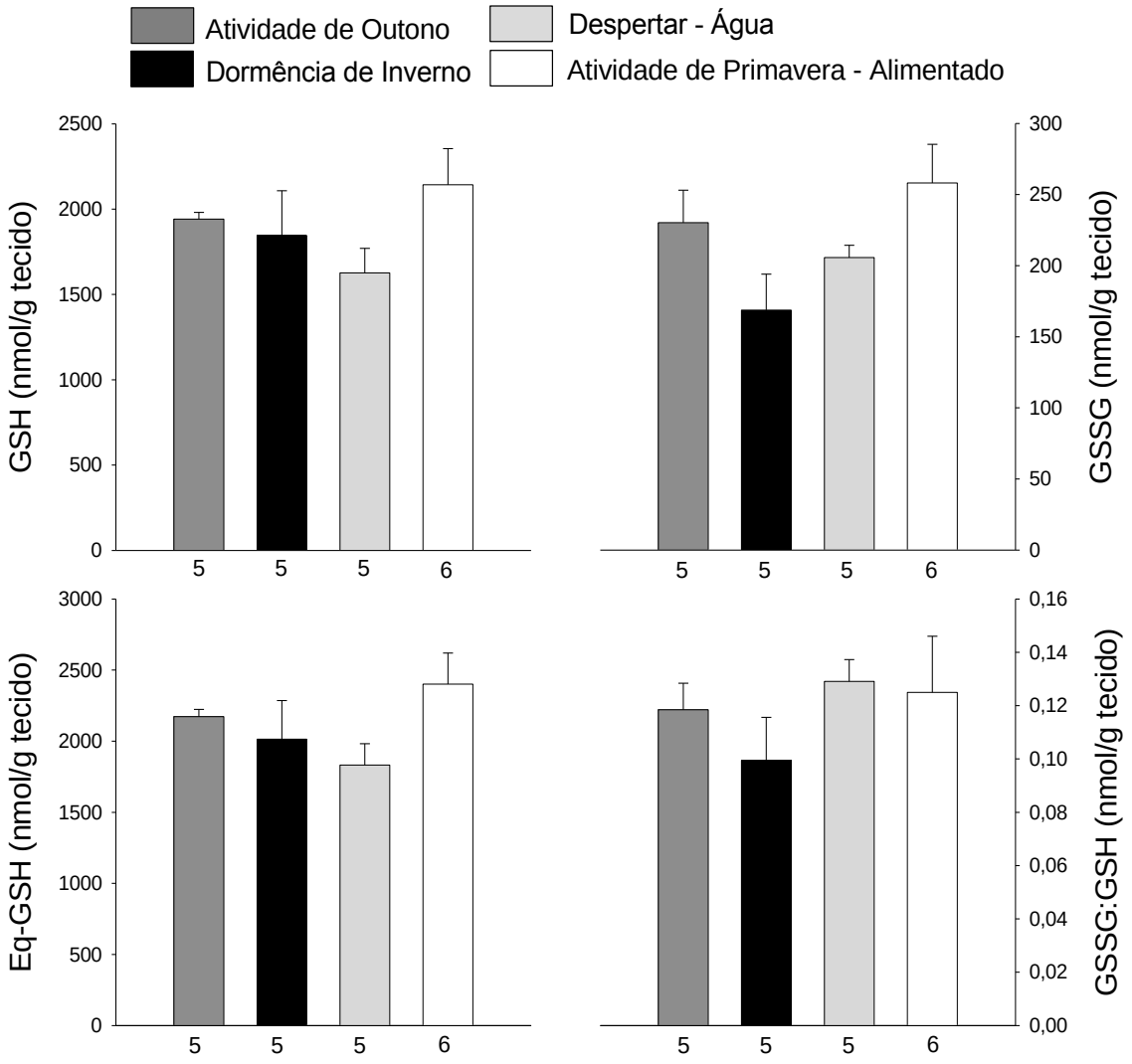

Figura 3.8 – Concentração de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), equivalentes de glutationa (Eq-GSH) e razão GSSG:GSH no **coração** de teiús em diferentes fases do ciclo anual. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. Números abaixo das colunas representam o número de animais por grupo.

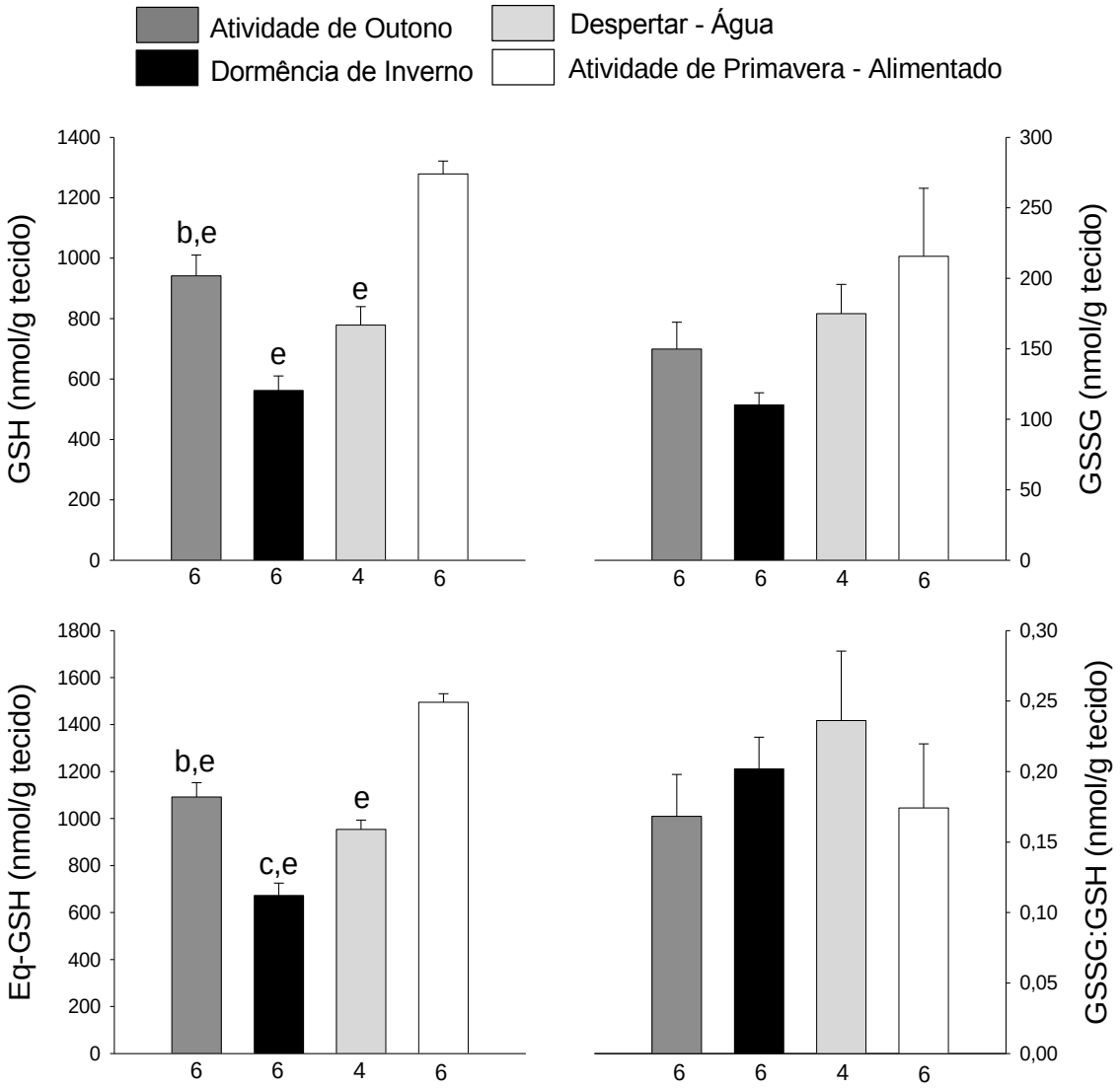

Figura 3.9 – Concentração de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), equivalentes de glutationa (Eq-GSH) e razão GSSG:GSH no **pulmão** de teiús em diferentes fases do ciclo anual. '**a'** indica diferenças significativas em relação à atividade de outono, '**b'** em relação à dormência de inverno, '**c'** em relação ao despertar (água), '**d'** em relação ao despertar (alimento), '**e'** em relação à atividade de primavera. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. Números abaixo das colunas representam o número de animais por grupo.

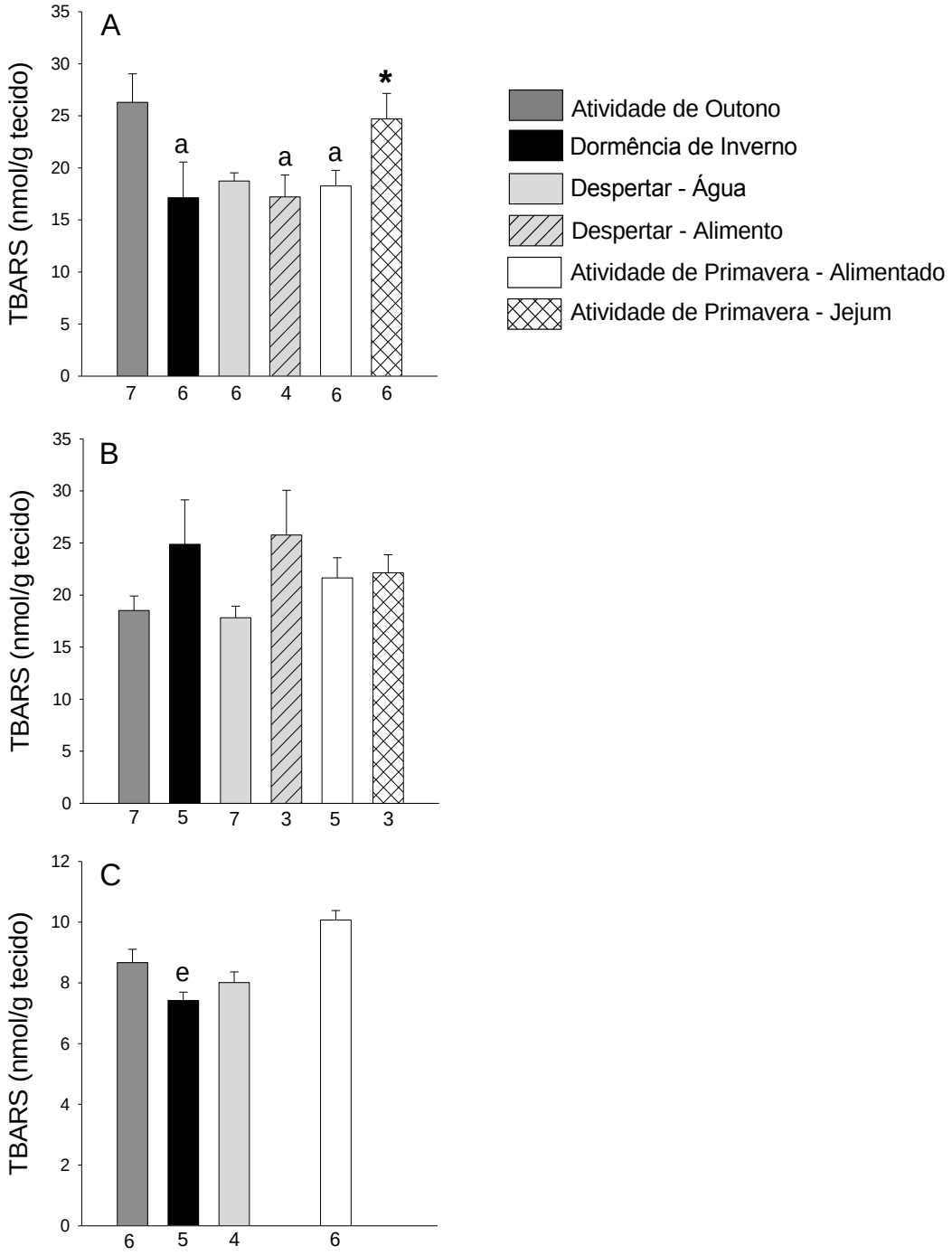

Figura 3.10 – Concentração de TBARS no fígado (A), rim (B) e pulmão (C) de teiús em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. '**a**' indica diferenças significativas em relação à atividade de outono, '**e**' em relação à atividade de primavera. '*****' indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. Números abaixo das colunas representam o número de animais por grupo.

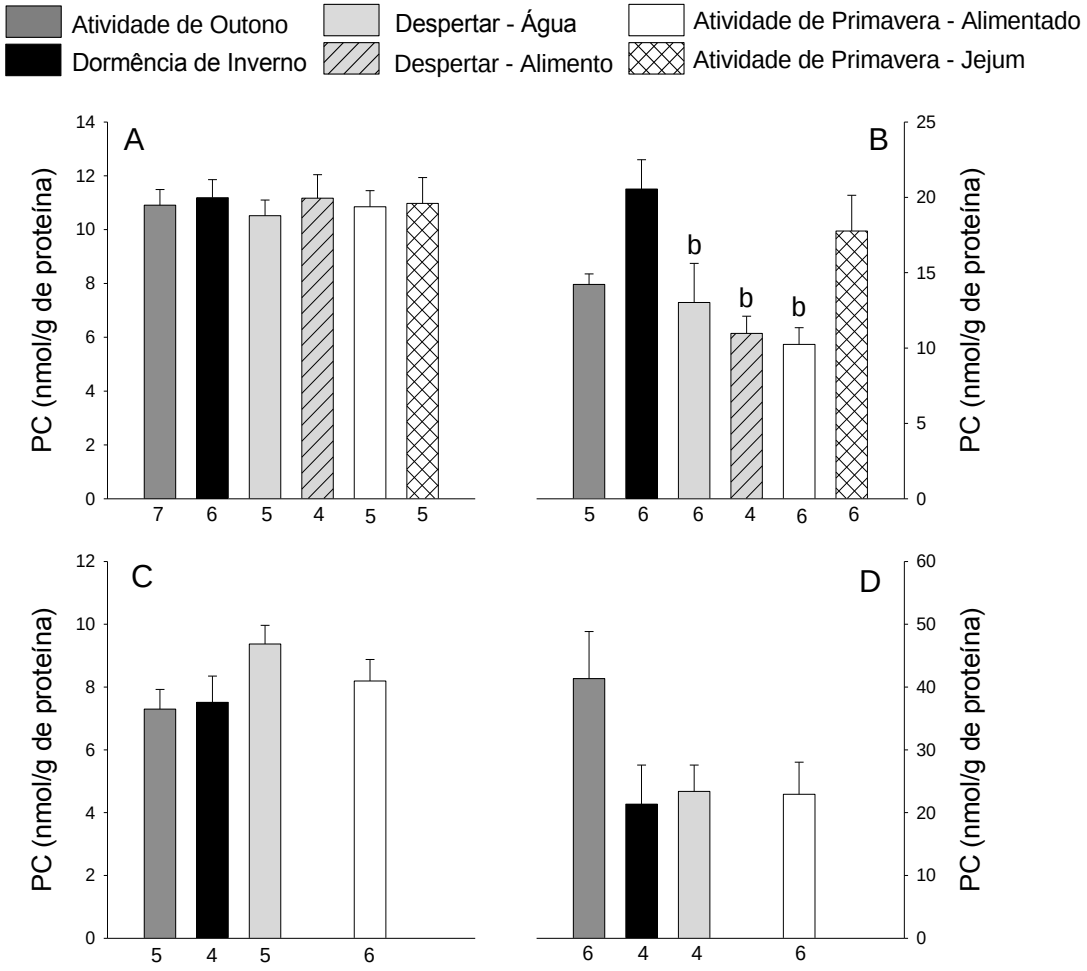

Figura 3.11 - Concentração de proteínas carboniladas (PC) no fígado (A), rim (B), coração (C) e pulmão (D) de teiús em diferentes fases do ciclo anual e submetidos a jejum na primavera. '**b**' indica diferenças significativas em relação à dormência de inverno. Valores apresentados são a média ± erro padrão da média. Números abaixo das colunas representam o número de animais por grupo.

Parte IV

Considerações Finais

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).

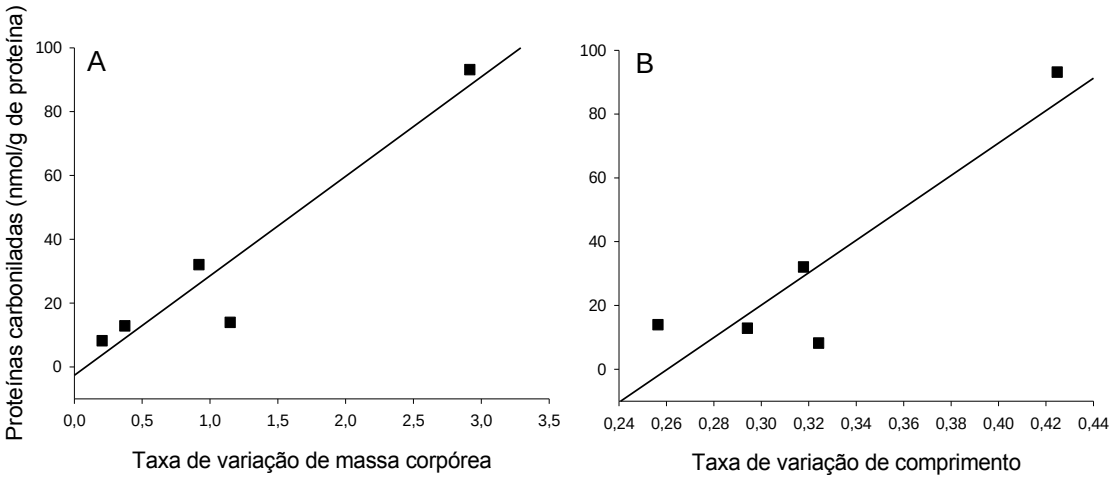

Figura 4.1 – Correlação entre a concentração de proteínas carboniladas no pulmão a taxa de variação de massa corpórea (A) e a taxa de variação de comprimento rostro-cloacal (B) na fase de atividade de início de outono.

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.