

Lucas Francisco Ribeiro do Nascimento

**Reorganização estrutural e metabólica  
do intestino associada ao jejum e  
dormência sazonal em lagartos teiú  
*Tupinambis meriana***

São Paulo

2009

Lucas Francisco Ribeiro do Nascimento

**Reorganização estrutural e metabólica  
do intestino associada ao jejum e  
dormência sazonal em lagartos teiú  
*Tupinambis merianae***

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo, para  
a obtenção de Título de Mestre  
em Ciências, na Área de  
Fisiologia Geral.

Orientadora: Silvia Cristina  
Ribeiro de Souza

São Paulo

2009

## Ficha Catalográfica

---

Nascimento, Lucas Francisco Ribeiro do  
Reorganização estrutural e  
metabólica do intestino associada ao  
jejum e dormência sazonal em lagartos  
teiú *Tupinambis merianae*  
80p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto  
de Biociências da Universidade de São  
Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Plasticidade fenotípica 2. Intestino  
3. Jejum 4. Depressão metabólica 5. Teiú  
(*Tupinambis merianae*)

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

### Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Profa. Dra. Silvia Cristina Ribeiro de Souza  
Orientadora

Aos meus pais e aos meus irmãos, por sonharem comigo  
e me apoiarem em todos os momentos.

*"Eu tenho essa luz e a vontade de mostrar que  
serei sempre melhor do que antes."*

**Eddie Vedder**

## Agradecimentos

Agradeço, sobretudo, a Deus, pela luz e presença constantes.

Também à Profa. Dra. Silvia Cristina Ribeiro de Souza, por ter me orientado com afinco e dedicação ao longo de todo o mestrado. Agradeço por ter me acolhido com carinho em seu laboratório e ter confiado a mim este trabalho. Obrigado pela presença contínua, pelas discussões, pela troca de experiência e conhecimento, pela perseverança e paciência. Obrigado pelos valores transmitidos e pelo exemplo de pesquisadora, além dos preciosos momentos de descontração e preocupação com o meu bem estar. Obrigado pela amizade.

À Profa. Dra. Alisson Colquhoun, por partilhar seu tempo e conhecimento, pelas discussões e sugestões, além de gentilmente ter cedido o seu laboratório para realização de parte dos experimentos. Também aos seus alunos do Laboratório de Metabolismo do Câncer do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Ao Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier, pelas sugestões nas análises histológicas e por ceder seu laboratório para execução dos experimentos de histologia e morfometria. Também aos seus alunos do Laboratório de Neurociências e Comportamento do Instituto de Biociências da USP; em especial, à Dra. Paula Jaqueline Moura, pelas aulas de Estereologia.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-De-Lacerda e seus alunos, por me acolherem em seu Laboratório de Morfometria e Morfologia Cardiovascular do Instituto de Biologia da UERJ e ajudarem nas análises estereológicas.

À Profa. Dra. Maria Inês Borella, do laboratório de Histofisiologia Endócrina de Peixes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, aos seus alunos e, em especial, ao técnico Cruz Alberto Junior, pelas sugestões fundamentais no tratamento do material histológico.

À Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira e aos seus alunos do Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Peixes do Instituto de Biociências da USP, pelo apoio e por cederem espaço e material para que eu iniciasse meus experimentos de histologia.

Ao Prof. Dr. Márcio Reis Custódio por disponibilizar equipamentos para a captura de imagens microscópicas no seu Laboratório de Toxicologia e Farmacologia de Produtos Marinhos e ao Dr. Enrique Rozas pela ajuda neste processo.

Um agradecimento especial à Laura Gabriela Nisembaum, que deu início a este trabalho e tem grande participação nos resultados e análises primárias.

Às amigas do laboratório, Dra. Laura Haddad, pela experiência compartilhada e Lilian Silveira, pela paciência e ajuda na execução de experimentos, discussões, apoio intelectual e pelos momentos de descontração.

Aos técnicos, Márcio, Manuel e Thaís, pela grande e importante função na manutenção dos animais e do biotério e auxílio na execução de experimentos.

Agradeço com carinho especial aos amigos, Cintia Etsuko e Renato Honji, pela presteza e disposição em discutir protocolos, ajudar nas dificuldades com a histologia e auxiliar na edição e diagramação de figuras, além das sugestões na finalização do trabalho.

Também ao Gabriel Antônio e ao Weberth Mota, pela amizade, sugestões e auxílio na edição do trabalho.

A todos os colegas e amigos do departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, pelas conversas e bons momentos compartilhados.

Aos meus pais, José Francisco e Antoinete, pelo amor e pela força nos momentos difíceis. Aos meus irmãos, Leonardo e Michelle, por acreditarem em mim e nos meus objetivos.

À Daniela e aos meus queridos sobrinhos, Rafael e Raíssa, por tornarem especiais e alegres meus momentos em família.

Ao meu avô, José Cristiano, pelas longas conversas e conselhos que guardo comigo.

Aos eternos amigos, Flávia, Anne, Cecília, Elisa, Mário, Aline, Marcelo, Ana Paula, Flaviane, André, Maísa, Mariana, Jaqueline, Lilian e Andréa, pelo incentivo e carinho. E aos novos, Ana Cássia, Renata, Maíra, Olavo, Julliana, Luiz, Marco, Márcia, Danny, Eduardo, Milano, Cléber e Rosa. Cada um participou de maneira especial nesta fase da minha vida.

À Liliam Ide, meu incentivo primeiro à Ciência, e à Mariella Freitas, pelo apoio e compreensão diante das minhas escolhas. Às duas, pela orientação, amizade, carinho e por me acompanharem sempre.

À comissão do Curso de Inverno, Tópicos em Fisiologia Comparativa/2006, que me ofereceu a oportunidade de entrar em contato com o departamento de Fisiologia e com o Laboratório de Metabolismo e Energética do Instituto de Biociências da USP.

Por último, um agradecimento especial aos Profs. Drs. Augusto Abe e Dênis Andrade da UNESP-Rio Claro, que disponibilizaram animais da criação estabelecida há vários anos em seu laboratório para a realização dos experimentos desta dissertação e, sem os quais este trabalho não teria acontecido.

Ao CNPq e à Capes, pelo financiamento deste projeto.



# Índice

Resumo	x
Abstract	xii
I. Introdução	1
II. Objetivos	11
III. Material e Métodos	13
1. Animais Experimentais	14
2. Coleta de Amostras de Tecido	14
3. Histologia e Morfometria	15
4. Medida da Concentração de Água, Proteína Total e Proteínas Solúveis	17
5. Medida da Atividade Máxima de Enzimas	18
6. Análise Estatística	22
IV. Resultados	23
1. Efeitos da Massa Corpórea e da Sazonalidade Sobre a Massa do Intestino Médio	24
2. Histologia e Morfometria	25
3. Teor de Água e Proteínas	27
4. Atividades Enzimáticas	28
V. Tabelas	32
VI. Figuras	39
VII. Discussão	44
1. Relações de Escala	45
2. Reorganização Estrutural	47
3. Mudanças no Teor de Água e Proteínas	55
4. Reorganização Metabólica	61
VIII. Conclusões	69
IX. Referências Bibliográficas	72

## RESUMO

A plasticidade fenotípica do intestino está presente em diferentes grupos de vertebrados e permite ajustes de caráter antecipatório ou de curto prazo na capacidade funcional do intestino frente a flutuações previsíveis e não previsíveis na disponibilidade de alimento no ambiente. No presente trabalho, avaliamos as alterações sazonais na morfologia e na capacidade de oxidação de substratos energéticos no intestino médio de lagartos teiú *Tupinambis merianae*. A resposta ao jejum associado à depressão metabólica na dormência de inverno foi contrastada com as alterações após 20 dias de jejum na fase ativa. Grupos de animais jovens foram mortos em diferentes fases do primeiro ciclo anual e o intestino médio foi removido e pesado. Amostras do terço proximal do órgão foram transferidas para frascos contendo formaldeído tamponado e o restante do tecido foi picotado e amostras aleatórias foram congeladas em N<sub>2</sub> líquido e transferidas para freezer -80 °C. Variáveis morfológicas foram analisadas em cortes histológicos de 5 µm de espessura utilizando-se o método estereológico. O teor de água e o de proteína solúvel e total foi medido nas amostras por meio de ensaios padrão; as atividades máximas de enzimas foram medidas por espectrofotometria em condições saturantes de substrato e cofatores. No outono, a massa relativa do intestino é 1,04% e diminui 23% durante a dormência, junto a uma redução na densidade de volume da mucosa e de superfície do epitélio, da altura máxima dos vilos e do conteúdo protéico total. O epitélio altera sua conformação estrutural, passando de colunar simples para pseudo-estratificado, sugerindo intensa atividade proliferativa. Após o despertar na primavera, há um aumento de mais de duas vezes da massa do intestino, com um aumento da densidade de superfície epitelial e, possivelmente, do comprimento e/ou diâmetro do órgão. Em animais submetidos ao jejum, a massa intestinal relativa diminui 49% em relação a animais alimentados, porém, a atrofia da mucosa é menos intensa e o epitélio é mais preservado, além de um aumento da espessura da túnica muscular. O tecido possui elevado potencial para o uso de diferentes substratos energéticos e o tipo preferencial seria regulado em função do estado nutricional e metabólico do animal. As enzimas glicolíticas HK, PK e LDH não variam ao longo do ciclo anual, assim como a transaminase AspAT. Por outro lado, a GDH, enzima da oxidação de aminoácidos, a HOAD, enzima da β-

oxidação lipídica e a CS, indicadora da capacidade aeróbia mitocondrial estão fortemente inibidas na dormência, acompanhando a depressão metabólica no animal. Em animais submetidos ao jejum na primavera, todas as enzimas tiveram suas atividades reduzidas e, em consonância com os dados da morfologia do tecido, os ajustes na capacidade funcional do órgão aparentemente se dão de maneira diferente em relação ao jejum associado à dormência sazonal, em função do caráter previsível e da existência de uma fase antecipatória neste fenômeno.

## ABSTRACT

The gut phenotypic plasticity is widely documented in the vertebrates and would allow to either short term or anticipatory adjustments in the organ functional capacity, to cope with unpredictable and periodic changes of food availability in the environment. This study investigates seasonal changes of morphology and in the capacity for substrate oxidation in the midgut of the tegu lizard *Tupinambis merianae*, associated with prolonged fasting and metabolic depression in winter months. In addition, the pattern of change was compared with the adjustments induced by 20 days of fasting in spring active animals. Groups of young lizards were killed in distinct phases during the first annual cycle and the midgut was quickly excised and weighted. Tissue samples were removed from the organ proximal third and preserved in fixative solution for histology. The remaining tissue was cut in small pieces and aliquots were frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at -80°C for the assays. The morphological changes were analyzed in 5µm thick slices using stereological methods. The content of water and of total and soluble proteins were measured using standard assays, and maximum activities of metabolic enzymes were measured by espectrophotometry. The mid-gut mass is 1.04% of body mass in autumn activity and decreases 23% during winter dormancy, combined with a reduction of mucosal volume and surface densities, of villus maximal height and of total protein content. The epithelial cells change conformation from columnar to pseudo-stratified, suggesting intense proliferative activity during dormancy. Later in spring activity, the mid-gut mass increases to 1.64% combined with an increase of epithelial surface density and possibly of midgut lenght and/or diameter. Atrophy during fasting was higher in active lizards, 49% in relation to fed animals, the mucosal density however is more preserved than during dormancy and the muscle layer increases thickness. High levels of enzyme activities suggest a potential to obtain energy from different substrates and the regulatory mechanisms of fuel selection would act as a function of the physiological context. HK, PK and LDH, and AspAT, acting on pathways of glucose and amino-acid oxidation respectively, do not change during the annual cycle, whereas GDH and HOAD (amino-acid and fatty acid oxidation respectively), and CS (indicator of mitochondrial aerobic capacity) are strongly inhibited in dormant and arousing animals. Fasting during spring activity caused all enzymes

to be inhibited and this effect, together with large tissue atrophy, suggest that in the short term fasting the regulatory mechanisms allow to save glucose for glucose-dependent tissues, besides contributing to energy spare at the whole body level.



---

## ***Introdução***

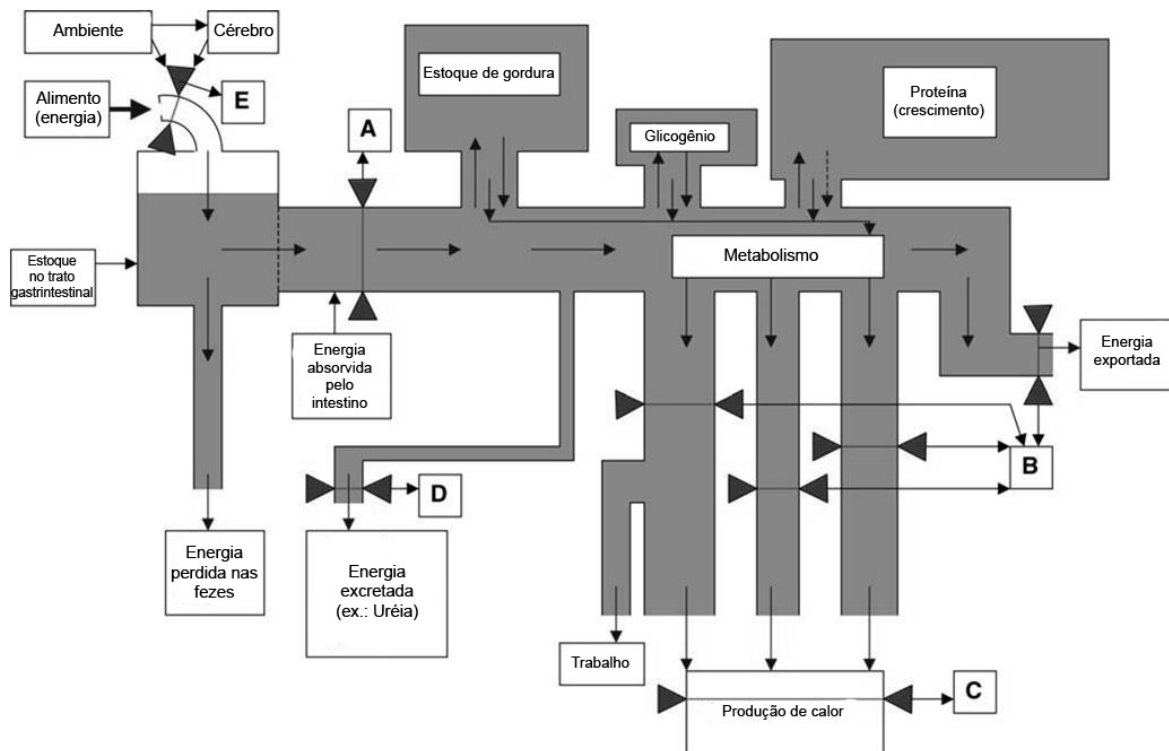
## I. INTRODUÇÃO

O tamanho e a capacidade funcional de vários órgãos se modificam em resposta à demanda fisiológica imposta sobre eles. As primeiras observações dessas mudanças datam de antes do século IX, em meio às discussões sobre o Lamarckismo e os princípios evolucionistas de Darwin, e hoje, a flexibilidade fenotípica é amplamente aceita como um traço adaptativo dos organismos (Wang *et al.*, 2006; Starck, 2005). No entanto, os estudos são ainda incompletos em determinados aspectos, não distinguindo claramente as diferenças entre os ajustes sazonais, antecipatórios, e aqueles de curto prazo, em resposta a alterações não previsíveis.

Variações sazonais de temperatura, umidade e comprimento do dia causam flutuações na oferta de alimento. Essas variações são extremas em regiões polares e menos intensas em regiões tropicais, porém em ambos os casos os padrões de variação são previsíveis e os sinais ambientais juntamente aos ritmos endógenos permitem que os organismos se ajustem às alterações na oferta de alimento. Em contraste, alterações de curto prazo na disponibilidade de alimento são imprevisíveis e provocam nos organismos respostas rápidas e reversíveis, levando a mudanças fenotípicas. As respostas às flutuações ambientais previsíveis e imprevisíveis possivelmente são regidas por diferentes vias de regulação e, sendo assim, organismos que apresentam mudanças sazonais no seu fenótipo podem não apresentar o mesmo ajuste para flutuações de curto prazo e vice-versa. Mas, aparentemente, os dois tipos de resposta estão integrados e, em conjunto, permitem que os organismos se ajustem às flutuações ambientais na oferta de alimento (Starck, 2005).

A capacidade de obtenção de energia a partir da ingestão de alimento define o tamanho corpóreo, o sucesso reprodutivo e outros importantes atributos dos indivíduos de uma dada espécie. Várias hipóteses têm sido investigadas a respeito dos fatores que estabelecem o 'teto' ou limite máximo da capacidade de transferência de energia nos animais e a oferta de alimento é um fator crítico, como evidenciam os vários exemplos de animais adaptados ao jejum. Além deste, o fluxo de energia nos animais é limitado por fatores intrínsecos; periféricamente, a limitação seria dada pela capacidade de tecidos, como o músculo esquelético, de consumir a energia fornecida pelo trato digestório e demais órgãos envolvidos

na provisão de nutrientes, enquanto que centralmente a limitação seria dada pela capacidade do trato alimentar de processar, assimilar e distribuir os nutrientes (Hammond & Diamond, 1997; Speakman & Król, 2005; Figura 1).



**Figura 1** - De acordo com o modelo, a taxa de ingestão alimentar e a transferência de energia nos animais, podem ser limitadas centralmente pela capacidade do trato digestório de processar, assimilar e distribuir os nutrientes (A), ou periféricamente, pela capacidade dos tecidos de consumir a energia fornecida pelo trato digestório (B), pela capacidade de produção de calor (C), e ainda pela capacidade de excreção de produtos finais do metabolismo (D). Adicionalmente, a oferta de alimento no ambiente (E) representa um fator limitante. Modificado de Speakman & Król (2005).

Na natureza, o jejum pode ser observado também quando há competição da alimentação com outras atividades, como reprodução, cuidado com os ovos e com as crias (Castellini & Rea, 1992; Wang *et al.*, 2006). Algumas aves e mamíferos toleram o jejum por um longo tempo, por exemplo, o elefante marinho *Mirounga angustirostris* e o pingüim imperador *Aptenodytes forsteri*, que ficam sem se alimentar por aproximadamente 90 e 120 dias, respectivamente, durante a fase reprodutiva (Castellini & Rea, 1992; Starck, 2005). Alguns ectotermos toleram o jejum por um tempo ainda maior, de cerca de um ano ou mais, por exemplo, cobras píton *Python molurus* (Lignot *et al.*, 2005; Starck, 2005). Nesses animais, a homeostase metabólica e as funções dos órgãos são mantidas durante



o jejum e há um aumento do metabolismo de lipídios e elevação nos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres, além de um relativo aumento na concentração de uréia, ácido úrico e creatina fosfato na circulação, associados com um aumento do catabolismo de proteínas. Quando as reservas de gordura são depletadas, os animais aumentam as taxas de oxidação de proteína corpórea e, se o jejum persiste por um tempo maior, o catabolismo protéico aumenta grandemente e pode causar danos irreversíveis no animal (Castellini & Rea, 1992; Starck, 2005; Wang *et al.*, 2006).

Nos vertebrados, as células epiteliais do intestino realizam várias funções relacionadas com a provisão de nutrientes, além de uma diversidade de outras como a regulação do balanço de água e eletrólitos, e o seu ciclo de vida exhibe uma notável transitoriedade no tempo e no espaço. Em mamíferos, elas originam-se nas criptas e movem-se em direção ao ápice. Durante a migração, elas se tornam funcionais e absorvem nutrientes. Quando alcançam a parte distal dos vilos, elas entram em apoptose e são descartadas no lúmen intestinal, todos esses eventos ocorrendo em cerca de 3-8 dias (Carey & Martin, 1996; Dunel-Erb *et al.*, 2001). Isto resulta em um elevado custo energético de manutenção do tecido, que atinge cerca de 20-30% do metabolismo basal em mamíferos e entre 28-46% do total da síntese de proteína nestes animais (Stevens & Hume, 1995 *apud* Starck, 2005; Tracy & Diamond, 2005). A contribuição relativa do intestino para o gasto de energia total é, portanto, muito maior do que a contribuição de sua massa para a massa corpórea do animal (Hulbert & Else, 2000; Hume *et al.*, 2002). Considerando estes fatos, a compreensão dos mecanismos e substratos que dão suporte a uma atividade oxidativa tão elevada assume uma importância considerável do ponto de vista fisiológico e nutricional. No estado alimentado a mucosa intestinal está em contato com uma complexa mistura de substratos, disponíveis tanto no sangue arterial quanto no lúmen intestinal, e o conhecimento relativo ao tipo de substrato metabólico preferencial utilizado pelo tecido, ou mesmo a sua procedência, é ainda incompleto em mamíferos (Stoll *et al.*, 1999) e praticamente inexistente nos demais vertebrados.

Mudanças no tamanho e na função de órgãos do sistema digestório podem ter sido favorecidas pela seleção natural, reduzindo o custo metabólico de manutenção nas fases em que os órgãos estão em desuso (Secor & Diamond, 1998a; Secor & Diamond, 1998b; Tracy & Diamond, 2005). Com a retomada da

alimentação, o trato digestório tem sua estrutura e capacidade funcional recuperadas, e esta característica confere a esses órgãos, especialmente ao intestino médio, notável plasticidade fenotípica. Embora ainda não se saiba se a flexibilidade do sistema gastrointestinal e seus mecanismos subjacentes evoluíram de uma vez ou se ela evoluiu independentemente nos diferentes clados, aparentemente ela está presente em todas as classes de vertebrados (Bozic *et al.*, 2001; Carey, 1995; Christel *et al.*, 2007; Cramp & Franklin, 2005; Dunel-Erb *et al.*, 2001; McWilliams & Karasov, 2001; Pennisi, 2005; Starck & Beese, 2002).

Os ajustes na morfologia do intestino foram observados pela primeira vez por Hunter (1839 *apud* Starck, 2005), em pombos mantidos com uma dieta exclusivamente carnívora. Depois disso, diversos outros estudos foram conduzidos com diferentes aves, mostrando a plasticidade do trato digestório frente a alterações na composição da dieta e no jejum associado à migração ou restrição alimentar. Durante a migração, as aves gastam grande quantidade de energia no vôo e elas precisam ser capazes de digerir diferentes alimentos ao longo do percurso. No geral, há uma diminuição no tamanho do intestino durante a migração, reduzindo o gasto energético de manutenção do tecido nesta fase, e há um aumento do órgão após a realimentação (McWilliams & Karasov, 2001; Piersma *et al.*, 1999). Em animais submetidos ao jejum, há uma redução acentuada da massa intestinal, e após a realimentação, há um aumento das taxas de proliferação celular e rápida recuperação do tecido (Karasov *et al.*, 2004). As mudanças nos padrões de composição da dieta também alteram o tamanho e a área de superfície do órgão, e o significado fisiológico destas alterações teria a ver com o tempo de retenção do alimento no tubo, o qual se relaciona diretamente com a eficiência digestiva (Starck & Rahmaan, 2003; Starck, 1996). Esses experimentos sugerem uma combinação dos efeitos do controle endógeno, através de ajustes antecipatórios, com ajustes instantâneos atuando em resposta a mudanças nas condições ambientais.

Em animais que se alimentam esporadicamente, como cobras boas e pítons, os padrões de regulação intestinal se destacam pela rapidez na recuperação da área de superfície de absorção do epitélio. A cobra *P. molurus* chega a consumir presas com massa corpórea superior à sua, e a cada alimentação, é capaz de dobrar a massa intestinal e aumentar de 2 a 3 vezes a superfície absorptiva do intestino, que atrofiou acentuadamente durante o jejum. A

configuração do epitélio se modifica, passando de pseudoestratificado para estratificado, e há incorporação de grande quantidade de gotículas de gordura nos enterócitos (Lignot *et al.*, 2005; Starck & Beese, 2001; Secor & Diamond, 2000). Essas alterações podem ser observadas também em outras cobras (Starck & Beese, 2002) e em anuros (Starck, 2005) e, aparentemente a rápida recuperação da superfície epitelial do intestino se dá principalmente em função de uma hipertrofia dos enterócitos. Observações do gasto energético associado à ação dinâmica específica (ADE) nesses animais permitiram a formulação dessa hipótese, a qual sugere que, o gasto energético envolvido no ajuste da capacidade absorptiva do tecido é menor do que se dependesse de hiperplasia e, embora ainda atrófico, o intestino é capaz de absorver grande quantidade de nutrientes imediatamente após a ingestão de alimento.

A ADE compreende o gasto energético envolvido com a ingestão, digestão e absorção de nutrientes e, em mamíferos, resulta num aumento de 30-40% do consumo de oxigênio basal ou de repouso, enquanto que em alimentadores esporádicos, como as pítons, a ADE pode elevar a taxa metabólica a valores até 40 vezes maiores do que o observado no repouso. Esse grande aumento resulta da regulação de processos que incluem um aumento da atividade de enzimas, de transportadores e de secreções gástricas, além de altas taxas de síntese protéica para rápido crescimento de órgãos que atrofiaram no jejum, como o intestino (Willmer *et al.*, 2000). Nas pítons, estimou-se que apenas 5% desse aumento do metabolismo estaria associado com o aumento da superfície epitelial (Secor, 2003).

Diferentemente, em mamíferos, durante a recuperação do jejum, não há uma amplificação tão rápida da superfície absorptiva do epitélio, e a hiperplasia e a distrofia parecem ser os principais mecanismos de aumento e perda de massa intestinal. Mas, em ambos os grupos de animais, as taxas de proliferação celular aumentam na recuperação do tecido e obedecem a um ritmo circadiano, que se relaciona inversamente com a atividade do intestino, sendo maior quando o órgão está inativo e menor quando o órgão está trabalhando ativamente (Dunel-Erb *et al.*, 2001; Sakata, 1987 *apud* Stark, 2005; Starck & Beese, 2002). Em roedores de laboratório, a privação alimentar resulta em rápida alteração estrutural da mucosa intestinal com concomitantes mudanças na capacidade absorptiva. Após a realimentação, a expressão dos genes *c-fos* e *c-jun* é rapidamente ativada,

evidenciando um aumento das taxas de mitose e proliferação celular que promovem a recuperação do tecido (Hodin *et al.*, 1994).

Em outros animais, o jejum está associado à dormência (estivação e hibernação) e ocorre como parte de um ritmo sazonal endógeno, que assegura a sobrevivência face a condições ambientais desfavoráveis e à escassez de alimento (Arévalo *et al.*, 1990; Bauman, 1990; Boyer & Barnes, 1999). Nesses animais, também é possível observar ajustes na estrutura e função do intestino e o fluxo regular de nutrientes através do trato gastrintestinal é interrompido por longos intervalos de tempo (Hume *et al.*, 2002; Van Breukelen & Carey, 2002; Cramp & Franklin, 2005). Uma das principais características da dormência é a sua antecipação, isto é, a ocorrência de uma série de ajustes metabólicos como preparação para a fase de estresse, levando à formação de grandes reservas de nutrientes, principalmente lipídios, e de estoques de água (revisão em Carey *et al.*, 2003; Heldmaier *et al.*, 2004; Storey, 2002).

Durante a dormência, a perda evaporativa de água é minimizada por uma redução acentuada da ventilação e por barreiras químicas ou físicas no tegumento, como a secreção de muco e a permanência em abrigos, que reduzem o grau de exposição da superfície corpórea ao ambiente. O consumo de substratos é grandemente diminuído, como consequência de uma redução das taxas de processos metabólicos, o que impede que as reservas energéticas armazenadas sejam esgotadas rapidamente. Nos pequenos mamíferos hibernantes, a queda da taxa metabólica é acompanhada de uma queda da temperatura corpórea e, enquanto muitas das funções fisiológicas permanecem virtualmente inativas, outras continuam ativas embora a taxas reduzidas, como os batimentos cardíacos, a ventilação e a filtração renal. Além disso, a depressão metabólica em hibernantes e estivantes acontece em condições normóxicas, envolvendo diminuição das taxas de oxidação de carboidratos, enquanto os lipídios e os corpos cetônicos passam a ser utilizados como principal substrato energético. Glicerol, lactato e possivelmente aminoácidos provenientes da degradação de proteína corpórea são utilizados para síntese de carboidratos na gliconeogênese, suprindo os tecidos glicose-dependentes e promovendo o reabastecimento das reservas de glicogênio, as quais são utilizadas em grande parte na entrada da dormência e posteriormente, no despertar do animal (revisão em Carey *et al.*, 2003; Storey, 2002).

Em mamíferos, a depressão da taxa metabólica basal, que pode ser superior a 90%, resulta da inibição dos processos de proliferação celular, respiração mitocondrial, resposta imune e, principalmente, da inibição dos processos que mais consomem energia nas células e tecidos, como a síntese protéica e a bomba de NaK-ATPase (Carey *et al.*, 2003). Durante a hibernação, o conteúdo protéico da camada mucosa do intestino do esquilo *Spermophilus tridecemlineatus* diminui pela metade, causando um encurtamento da região das vilosidades. Porém, a arquitetura e a capacidade funcional do epitélio absortivo por unidade de massa encontram-se bem preservadas ao final da dormência se comparadas a de animais em plena atividade (Carey & Sills, 1996; Carey, 1995; Van Breukelen & Carey, 2002). Embora ocorra uma diminuição na massa total do intestino, a região luminal apresenta nutrientes e secreções digestivas relacionadas com o crescimento do epitélio, ou fator trófico para a mucosa intestinal, sugerindo que a habilidade de gerar novas células epiteliais e de transportar nutrientes é mantida. Estas características podem estar relacionadas com a ocorrência de vários episódios de despertar durante o período total de dormência, típica de pequenos hibernantes, quando a elevação da temperatura corpórea, por curtos períodos de aproximadamente 24h, permitiria o reabastecimento de estoques celulares e a síntese de proteínas (Carey *et al.*, 2003; Hume *et al.*, 2002). Apesar da atrofia do tecido, a preservação de sua capacidade funcional teria grande relevância na fase crítica que inicia na primavera, após o despertar, quando os estoques de energia do animal encontram-se reduzidos e a oferta de alimento no ambiente ainda é escassa (Carey, 1990).

Durante a estivação, anuros reduzem acentuadamente as taxas de consumo de O<sub>2</sub>, resultando numa depressão metabólica semelhante àquela observada em mamíferos hibernantes. Eles são capazes de permanecer neste estado por um longo tempo, como o sapo *Cycolorana alboguttata*, que ao final de 9 meses de estivação tem o comprimento e diâmetro do intestino diminuídos, com uma acentuada atrofia da camada mucosa e da túnica muscular (Cramp & Franklin, 2005; Cramp *et al.*, 2005). Contudo, não há um comprometimento da capacidade absortiva do intestino, que aparentemente é compensada por um ajuste na motilidade do órgão que leva a um tempo maior de permanência dos nutrientes no lúmen (Cramp & Franklin, 2003).

---

Em contraste com mamíferos hibernantes, a dormência em certas espécies de lagartos é um processo contínuo ao longo de vários meses, não incluindo episódios de despertar. O teiú *Tupinambis merianae*, animal amplamente distribuído na América do Sul e de grande ocorrência no sudeste do Brasil, ingressa num estado de dormência durante os meses de inverno, que se caracteriza como uma estação fria e seca em que insetos e outros alimentos são escassos. A redução das populações de insetos durante o inverno é crítica para a sobrevivência das ninhadas de lagartos ao longo do primeiro ciclo anual, quando eles são basicamente insetívoros (Lopes & Abe, 1999). A escassez dessa fonte de alimento por um período prolongado do ano possivelmente favoreceu a ocorrência de dormência sazonal na história evolutiva da espécie.

O teiú apresenta atividade reprodutiva concentrada na primavera e as atividades de forrageamento e de alimentação tornam-se gradualmente reduzidas durante o verão, até que o animal torna-se totalmente inativo, permanecendo 4 a 6 meses em abrigos subterrâneos no outono e inverno (Abe, 1995). Trabalhos realizados em nosso laboratório com animais jovens, recém-eclodidos, mostraram uma acentuada queda (~80%) da taxa metabólica de repouso na fase dormente durante o primeiro ciclo anual, sugerindo que a depressão metabólica sazonal nestes animais representa um fenômeno de origem endógena e de magnitude similar ao observado em hibernantes típicos (Souza *et al.*, 2004). Aparentemente, a dormência nos teiús é um processo contínuo, sem os episódios de despertar. Adicionalmente, a ampla depressão do metabolismo aeróbico nos teiús é alcançada sem o efeito predominante da redução do gasto de energia associado à endotermia, como o observado em hibernantes. No interior de São Paulo, a temperatura mínima de inverno registrada na toca dos teiús é de 15 °C e a temperatura corpórea dos teiús mantém-se relativamente alta, em torno de 17 °C, durante o estado dormente (Abe, 1995), em contraste com pequenos mamíferos hibernantes, nos quais a inibição dos mecanismos termorregulatórios resulta em uma acentuada queda da temperatura corpórea na entrada em torpor, até valores próximos à temperatura do ambiente (~4 °C). A análise do conteúdo de adenilatos e outros metabólitos nos tecidos do teiú, em conjunto com estes dados, sugere que a inibição metabólica e a economia energética seriam dadas principalmente por uma regulação coordenada das taxas de processos que produzem e consomem energia no animal (Carvalho, 1999; Souza *et al.*, 2004).

Dadas as características da dormência sazonal nos teiús, investigou-se o padrão sazonal de reorganização estrutural e metabólica do tecido intestinal em animais jovens, ao longo do primeiro ciclo anual e em animais ativos submetidos ao jejum. Os estudos prévios com hibernantes e estivantes não analisaram alterações da capacidade funcional do intestino em animais ativos submetidos ao jejum, de tal forma que, o presente estudo permite melhor avaliar a influência de uma fase antecipatória nos ajustes sazonais ao jejum.



---

***Objetivos***



## II. OBJETIVOS

Como objetivo geral, este estudo analisa o papel de ajustes sazonais da capacidade funcional do intestino médio na manutenção da homeostase energética em lagartos teiú jovens. Adicionalmente, os efeitos do jejum em animais ativos na primavera foram analisados, de modo a contrastar o impacto de curtos períodos de escassez de alimento na fase ativa com o padrão de regulação associado à adaptação ao jejum sazonal e à dormência.

Dado que a dormência nos teiús aparentemente não inclui episódios de despertar, pretendeu-se testar a hipótese de que o jejum e a depressão metabólica por um tempo prolongado levam à atrofia e desorganização do epitélio de absorção intestinal acentuadas e à redução da capacidade de oxidação de substratos, contribuindo para a economia energética do animal durante o estado dormente. Em consequência, uma grande mobilização de reservas endógenas seria necessária para recomposição do 'pool' de proteínas do tecido e para a retomada das funções de transporte e absorção após o despertar. Alternativamente, dado que a temperatura corpórea dos teiús na dormência mantém-se relativamente elevada e, ao mesmo tempo, a taxa metabólica encontra-se bastante reduzida, os processos de degradação e síntese de proteínas permaneceriam ativos, embora a taxas reduzidas, de modo que os efeitos do jejum prolongado na dormência seriam menos severos e a integridade funcional do tecido por unidade de massa seria preservada, possibilitando a rápida recuperação das funções de transporte e nutrição após o despertar. Uma terceira hipótese formulada é a de que respostas de curto prazo à escassez de alimento na fase ativa envolveriam ajustes similares, porém de magnitude distinta, em relação aos ajustes de caráter previsível associados ao jejum na dormência.



---

***Material e Métodos***

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

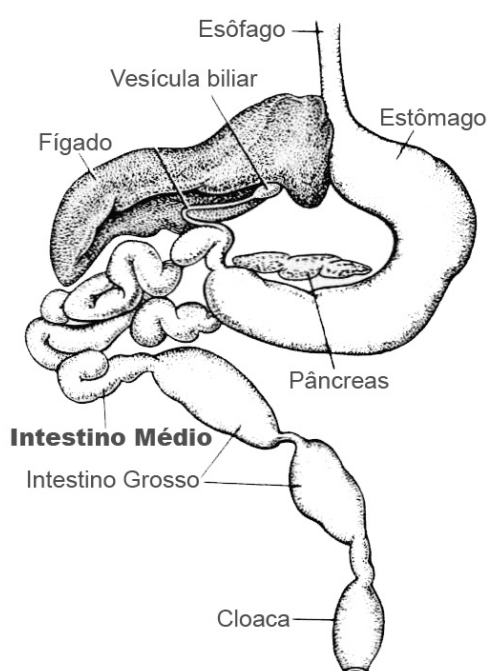
#### **1. Animais Experimentais**

Exemplares jovens (recém-eclodidos) do lagarto *Tupinambis merianae* (Reptilia, Sauria, Teiidae) foram obtidos de uma criação estabelecida na UNESP de Rio Claro, Estado de São Paulo. Os animais foram mantidos em laboratório, em grupos de quatro a cinco indivíduos separados aleatoriamente em caixas plásticas de 120 litros cada, e expostos a condições de termo e fotoperíodo determinadas tanto por lâmpadas incandescentes de 100W quanto pela luz solar proveniente do ambiente externo. As lâmpadas permaneceram ligadas por um intervalo de 9h durante os meses de outono, primavera e verão e foram desligadas durante a fase dormente em fins de outono e durante o inverno. Dentro de cada caixa plástica havia um abrigo construído de madeira, proporcionando uma região de 'sombra' e resfriamento, de tal forma que os lagartos puderam alternar entre momentos de aquecimento, próximos à lâmpada, e de resfriamento, no interior do abrigo. A alimentação foi composta de carne moída crua e coração de frango, enriquecidos com cálcio, frutas e ovos, oferecida diariamente nas fases ativas, além de água que esteve disponível o tempo todo.

#### **2. Coleta de Amostras de Tecidos**

Após um jejum de 72 h, os animais foram pesados e mortos por decapitação nas diferentes fases do ciclo anual, constituindo os seguintes grupos experimentais: atividade de outono ou pré-dormência (animais ativos e alimentados), dormência de inverno (cerca de 60 dias de jejum e inatividade), despertar (animais re-hidratados e em jejum, 48-72h), e atividade de primavera (animais ativos e alimentados, 30-40 dias após o despertar). Adicionalmente, animais ativos na primavera foram submetidos ao jejum por 20 dias, para a comparação de seus efeitos com os do jejum na fase de dormência. As fases foram definidas com base nas variações de atividade geral e na taxa de consumo de O<sub>2</sub> dos animais, de acordo com Souza *et al.* (2004).

O trato digestório foi dissecado e a porção correspondente ao intestino médio, região entre o piloro e a válvula ileocecal (Romer & Parsons, 1986; Figura 2), foi retirada e aberta através de uma incisão longitudinal, procedendo-se à limpeza do lúmen do tubo com solução salina (NaCl 0,9%) para remoção de muco e resíduos de alimento. Em seguida, o tecido foi pesado e dividido em alíquotas que foram transferidas para fixador ou congeladas em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas a -80 °C, para uso posterior.



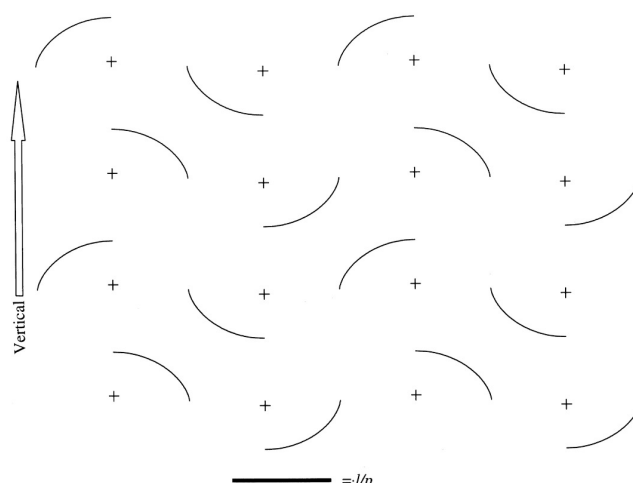
**Figura 2:** Esquema do trato digestório de lagartos, com destaque para a porção referente ao intestino médio. Adaptado de Romer & Parsons (1986).

### **3. Histologia e Morfometria**

Fragmentos do terço proximal do intestino médio, de cerca de 0,5cm<sup>2</sup> cada, foram fixados em solução de formaldeído 4% em tampão fosfato (pH 7,4). Posteriormente, os fragmentos de tecido foram desidratados por imersão em etanol em concentrações crescentes de 50 a 100%, diafanizados em xilol puro e incluídos com Paraplast Plus (Sigma Aldrich) em estufa à 60 °C. Na preparação dos blocos para corte em micrótomo, a orientação dos fragmentos foi aleatorizada

em relação ao plano de referência (superfície da bancada), produzindo-se cortes verticais seriados de 5µm de espessura, transversais às paredes muscular e mucosa do intestino médio. Este procedimento permitiu a obtenção de cortes isotrópicos em relação ao plano de referência, requisito para uma estimativa sem viés das medidas estereológicas (Mandarin-De-Lacerda, 2003; Mayhew, 1991). Por fim, os cortes foram montados em lâminas previamente banhadas com solução de gelatina (Synth) e sulfato de cromo-potássio, para auxiliar a aderência e preservação do tecido, corados com Hematoxilina e Eosina e recobertos com lamínula e Entellan (Merck).

Cinco animais por grupo foram selecionados aleatoriamente e três cortes por animal foram analisados em um microscópio ótico Nikon Eclipse E1000 com imagens capturadas por uma câmera Low Light Integrating i308 acoplada a um computador. Medidas lineares de espessura da túnica muscular e altura máxima dos vilos foram feitas aleatoriamente com o auxílio do software Stereo Investigator 2000 MicroBrightField, Inc., a primeira por meio de 3 medidas da extensão compreendida entre a camada serosa e o início da mucosa, e a segunda por meio de 5 medidas da extensão entre a muscular da mucosa e a ponta dos maiores vilos. A densidade de superfície ( $S_V$ ) do epitélio de absorção e a densidade de volume ( $V_V$ ) da mucosa foram estimadas com base no princípio estereológico clássico de Delesse (1847 *apud* Mandarin-De-Lacerda, 2003), utilizando-se o sistema teste proposto por Gundersen *et al.* (1988; Figura 3) posicionado em 3 campos determinados aleatoriamente sobre a imagem projetada na tela do computador, sempre obedecendo à orientação vertical dos cortes. A estimativa de  $S_V$  do epitélio foi feita através da contagem do número de vezes que os arcos ciclóides interceptavam os limites externo e interno do epitélio, calculada através da média entre as duas medidas e aplicada a fórmula  $S_V := 2 \cdot I / L_T$ , onde  $I$  = média do número de intersecções do arco com a superfície epitelial,  $L_T$  = comprimento total das linhas teste. A estimativa da  $V_V$  da mucosa foi feita através da contagem do número de pontos teste que caíam dentro das estruturas analisadas (lâmina própria e epitélio absorptivo) e calculada através da fórmula  $V_V := P_P / P_T$ , onde  $P_P$  = número de pontos teste dentro das estruturas e  $P_T$  = número total de pontos teste do sistema.



**Figura 3:** Sistema teste de arcos ciclóides. Os sinais “+” são pontos teste ( $n=16$ ) e o comprimento do arco ciclóide é definido através da linha  $l/p$ . O sistema é alinhado com os cortes através da seta (lado

Os cortes foram digitalizados no microscópio invertido Eclipse TE 300; câmera Nikon D40. Para inserção das barras de escala, identificação de áreas anatômicas e transformação das imagens para tonalidade de preto e branco foi utilizado o programa Adobe Photoshop CS3 Extended (versão 10.0).

#### 4. Medida da Concentração de Água, Proteína Total e Proteínas solúveis

Para estimativa do teor de água, amostras do tecido foram descongeladas, retirando-se o excesso de água com o auxílio de um papel de filtro, pesadas e colocadas para secar em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  até seu peso tornar-se constante (cerca de 48h). As amostras foram transferidas para um dessecador contendo sílica gel até o seu resfriamento e então novamente pesadas, calculando-se o conteúdo de água a partir da diferença entre o peso inicial (úmido) e final (seco) das amostras. O teor de água foi expresso como  $\text{g.g}^{-1}$  tecido.

Para medida do teor de proteína total, utilizou-se um protocolo adaptado de Milligan & Girard (1993). Amostras congeladas foram trituradas em cadinho contendo  $\text{N}_2$  líquido até a completa pulverização e então homogeneizadas em 5 volumes de ácido perclórico (PCA) 6% com um homogeneizador do tipo ‘ultra-turrax’ (Polytron). Após 15 min, quando a hidrólise completa das proteínas teria

ocorrido, o homogeneizado foi centrifugado por 5 min a 10.000g e a fração sobrenadante foi descartada. O precipitado obtido foi ressuspensão em 4 volumes de PCA 6% e novamente centrifugado por 5 min a 10.000g, repetindo-se este procedimento 3 vezes. Ao final, o precipitado foi ressuspensão em 14 volumes de KOH 2,5% e a solução mantida sob agitação constante por 48h, para completa solubilização das proteínas extraídas das amostras. A concentração de proteínas solúveis foi medida nos extratos centrifugados utilizados nos ensaios enzimáticos (ver abaixo).

Por fim, a concentração de proteína total e solúveis foi determinada com base no método de Lowry *et al.* (1951), modificado para o uso de placas de microtitulação (0,3 µL) em espectrofotômetro (Spectra Max 250; Molecular Devices) a 660 nm, utilizando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). As determinações foram feitas em duplicatas e a concentração de proteína total expressa em mg.g<sup>-1</sup> tecido úmido e mg.g<sup>-1</sup> tecido seco e a de proteínas solúveis em mg.g<sup>-1</sup> tecido úmido.

## **5. Medida da Atividade Máxima de Enzimas**

### **- Homogeneização das amostras**

Amostras do tecido foram descongeladas e conservadas em gelo ao longo de todas as etapas descritas a seguir. A homogeneização foi feita em baixa velocidade, usando-se um homogeneizador 'ultra-turrax' (Polytron), em 9 volumes de tampão gelado constituído de Imidazol 50 mM (pH 7,4 a 25 °C), EDTA 2 mM, Triton X-100 0,1% , NaF 20 mM, PMSF a 1 mM, para realizar medidas da citrato sintase (CS). A adição de EDTA e NaF ao meio de homogeneização evita alterações nas atividades enzimáticas *in vitro* , resultantes da ação de proteína quinase ou proteína fosfatase. Para as medidas das demais enzimas, acrescentou-se ditioneitol (DTT) 5 mM ao meio de homogeneização. Os homogeneizados foram submetidos a ultra-som três vezes por 10 s, com intervalos de resfriamento de 30 s, em um sonicador IKA Labor Technik-U-200S. O emprego de Triton X-100 e a sonicação previnem a perda de atividade enzimática, resultante da ligação da proteína com o material particulado (Parra &

Pete, 1995). Por fim, o homogeneizado foi centrifugado a 18.745g por 15 min, a 4 °C, em centrífuga Hettich Universal 30 RF e o sobrenadante utilizado nos ensaios para medida de atividade enzimática.

### - Ensaio enzimáticos

Foram medidas as atividades máximas ( $V_{m\acute{a}x}$ ) de enzimas do metabolismo de glicose, ácidos graxos, aminoácidos, de enzimas gliconeogênicas e da CS, enzima marcadora das taxas de oxidação mitocondrial (Figura 4).

Substratos e cofatores foram dissolvidos em tampão de ensaio e a solução ajustada para o pH experimental. As atividades enzimáticas foram medidas em volume final de 1,0 mL, a 25°C, usando-se um espectrofotômetro Beckman DU-70. As reações foram iniciadas pela aplicação de substrato, seguindo-se por 3 min a oxidação do NADH ou a redução do NADP<sup>+</sup> a 340 nm, (coeficiente de extinção milimolar = 6,22), exceto a citrato sintase (CS), cuja reação foi monitorada seguindo-se a produção de ânion reduzido de DTNB a 412 nm (coeficiente de extinção milimolar = 13,6). As medidas de  $V_{m\acute{a}x}$  foram baseadas no método descrito por Suarez *et al.*, (1986), a não ser quando especificado. Controles de atividade não específica foram corridos em todos os ensaios durante 3 min, antes da adição de substrato, e o valor do branco descontado para a obtenção dos valores finais de atividade enzimática. Os meios de reação empregados nos ensaios foram os seguintes:

#### 1) Enzimas do metabolismo de glicose:

- **Hexoquinase** (HK; ATP: D-hexose-6-fosfotransferase; EC 2.7.1.1): glicose a 30 mM (omitida nos controles), ATP a 1 mM, MgCl<sub>2</sub> a 5 mM, KCl a 100 mM, DTT a 5 mM, NADP<sup>+</sup> a 0,5 mM, e glicose-6-fosfato desidrogenase a 1 U/mL, em tampão Imidazol-HCl a 50 mM (pH 7,0).

- **Piruvato quinase** (PK; EC 2.7.1.40): fosfoenol-piruvato 5 mM (ausente nos controles), ADP 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 100 mM, NADH 0,15 mM, frutose 1,6-bisfosfato 0,02 mM e 4,2 U/mL de lactato desidrogenase em tampão Imidazol-HCl a 50 mM (pH 7,0).



- **Desidrogenase Láctica** (LDH; [S]-lactato: NAD<sup>+</sup> oxireductase; EC 1.1.1.27): piruvato 1 mM (omitido nos controles), DTT 5 mM, NADH 0,15 mM em tampão Imidazol-HCl a 50 mM (pH 7,0).

## **2) Enzimas gliconeogênicas:**

- **Frutose 1,6-bisfosfatase** (FBPase; EC 3.1.3.11) frutose 1,6-bisfosfato 0,1 mM (omitido nos controles), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 0,5 mM, NADP 0,2 mM, 1,2 U/ml de fofoglicose isomerase e 1 U/mL de glicose 6-fosfato desidrogenase em tampão Imidazol-HCl a 50 mM (pH 7,0).

- **Fosfoenolpiruvato carboxiquinase** (PEPCK; EC 4.1.1.32) dGDP a 0,2 mM (omitido nos controles), MnSO<sub>4</sub> a 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> a 20 mM, fosfoenolpiruvato a 0,5 mM, NADH a 0,15 mM e malato desidrogenase a 1 U/mL em tampão Imidazol-HCl a 50 mM (pH 7,0).

## **3) Enzima indicativa da capacidade aeróbia total e enzima do metabolismo de ácidos graxos:**

- **β-hidroxiacil-CoA desidrogenase** (HOAD; EC 1.1.1.35): acetocaetil CoA 0,1 mM (omitido nos controles), NADH 0,15 mM em tampão Imidazol-HCl a 50 mM (pH 7,0).

- **Citrato sintase** (CS; citrato oxaloacetato liase [CoA-acetilante], EC 4.1.3.7): oxaloacetato 0,5 mM (omitido nos controles), acetil-CoA 0,15 mM, ácido ditiobisnitrobenzólico (DNTB) 0,1 mM em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0).

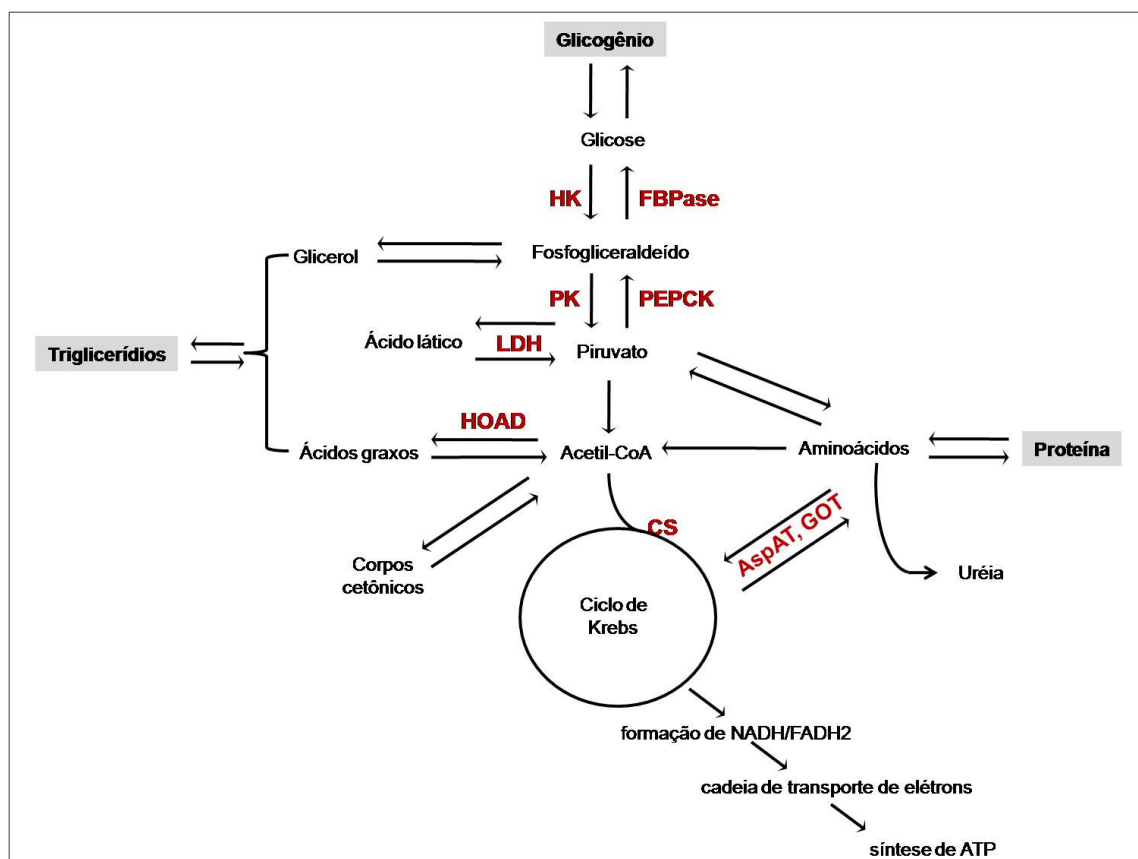
## **4) Enzimas do metabolismo de aminoácidos:**

- **Glutamato desidrogenase** (GDH; L-glutamato: NAD(P)<sup>+</sup> oxidoreductase [desaminase]; EC 1.4.1.3): α-cetoglutarato a 10 mM (omitido nos controles), ADP a 1 mM, DTT a 5 mM, NADH a 0,15 mM, acetato de amônia a 100 mM, em tampão Imidazol-HCl a 50 mM (pH 7,0).

- **Aspartato aminotransferase** (AspAT; L- asparato: 2-oxoglutarato aminotransferase; EC 2.6.1.1): α-cetoglutarato a 10 mM e L- asparato a 40 mM (omitido nos controles), NADH a 0,15 mM, DTT a 5 mM, piridoxal fosfato a 0,025 mM, malato desidrogenase a 2,2 U/mL, em tampão Imidazol-HCl a 50 mM (pH 7,0).

As atividades enzimáticas foram medidas em concentrações ótimas e não inibitórias de substrato e ativadores, que propiciam os valores mais altos ( $V_{m\acute{a}x}$ ), à 25 °C. A determinação dos valores de  $V_{m\acute{a}x}$  *in vitro*, sob condições ótimas, em oposição à medida em condições fisiológicas (em que se simula, *in vitro*, condições intracelulares) é consistente com os objetivos deste trabalho, uma vez que  $V_{m\acute{a}x}$  é um indicador de capacidade funcional (Garland & Carter, 1994; Suarez *et al.*, 1986).

Os resultados foram expressos em  $U \cdot g^{-1}$  de tecido úmido, onde U representa uma unidade de atividade enzimática e é definida como a quantidade de enzima que converte 1  $\mu\text{mol}$  de substrato a produto por minuto, a 25° C.



**Figura 4** – Esquema simplificado das vias metabólicas de produção de energia na forma de ATP. Em vermelho estão indicadas as enzimas que tiveram suas  $V_{m\acute{a}x}$  medidas no tecido intestinal de teiús jovens no primeiro ciclo anual de atividades. Alguns passos de reações e seus intermediários foram omitidos e os substratos e respectivos produtos das atividades dessas enzimas não estão representados.

## 6. Análise Estatística

Dado o efeito de escala sobre a forma e função de órgãos e tecidos nos animais em geral (Schmidt Nielsen, 2002) e, em particular, nos ajustes metabólicos que acompanham a dormência sazonal em teiús jovens (Souza *et al.*, 2004), os efeitos da massa corpórea sobre a massa total e outros atributos do tecido intestinal foram analisados nas diferentes fases do ciclo anual e em animais submetidos ao jejum na primavera com o método de regressão linear aplicado ao logaritmo dos dados. A significância da contribuição da massa corpórea na previsão da variável dependente, indicada pelo coeficiente de determinação  $R^2$ , foi avaliada com base nos valores de  $F$  obtidos no teste de variância (ANOVA).

A influência das diferentes fases do ciclo anual sobre variáveis morfológicas e bioquímicas do intestino médio foram analisadas 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 ao jejum por 20 dias no grupo de atividade de primavera foram feitas separadamente, por meio do teste 't' de Student.

A existência de correlação entre variáveis morfológicas ou entre as atividades máximas de enzimas foi verificadas pelo teste de correlação linear e expressa pela coeficiente de correlação  $R$ .

Todas as análises foram feitas com base em Zar (1999). As diferenças dos testes estatísticos foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$  e marginalmente significativas quando  $0,1 \geq P \geq 0,05$ .



---

***Resultados***

## IV. RESULTADOS

### 1. Efeitos da Massa Corpórea e da Sazonalidade Sobre a Massa do Intestino Médio

Na atividade de outono, a massa do intestino médio representa cerca de 1% da massa corpórea nos teiús jovens (Tabela 1; página 33) e, na média, ela sofre uma redução de 12% após 60 dias de dormência e até o despertar essa redução é de 23%. Na primavera, 30 a 40 dias após o despertar e o retorno à atividade e alimentação, há um aumento de mais de duas vezes da massa do órgão, e o jejum de 20 dias nesta fase resulta numa redução de 49% da massa do intestino em relação aos animais alimentados.

Conforme mostram a Tabela 1 e a Figura 5 (página 40), a massa do intestino cresce proporcionalmente menos que a massa corpórea em teiús recém-eclodidos na fase que antecede a dormência ( $b=0,92$ ). Essa relação se mantém ( $b=0,89$ ), sem diferença estatística entre os coeficientes angulares ' $b$ ' das retas de regressão após os 2/3 de dormência, mas, no despertar, a relação se altera ( $b=0,98$ ), sugerindo que animais menores apresentam uma redução mais acentuada da massa intestinal que animais maiores ao final da dormência. A ausência de correlação significativa entre a massa intestinal e a massa corpórea na primavera ( $b=0,14$ ) revela uma acentuada diferença no padrão de recuperação da massa do órgão. Animais menores, que perderam proporcionalmente mais massa intestinal na dormência, exibem maior recuperação de massa do intestino, a qual se torna similar à de animais que diferem cerca de 200 g na massa corpórea.

Nos teiús submetidos ao jejum na fase ativa, a relação entre as variáveis se altera em comparação com os animais alimentados e sugere que o jejum nesta fase também resulta em uma maior redução da massa intestinal em animais menores. Adicionalmente, a relação da massa intestinal com a massa corpórea difere da observada na dormência, o coeficiente linear ' $a$ ' é maior e o angular ' $b$ ' é menor.

## 2. Histologia e Morfometria

A mucosa da parte proximal do intestino médio dos teiús é semelhante à do duodeno de mamíferos (Gans, 1977; Junqueira & Carneiro, 2004). As vilosidades possuem forma de folhas e são revestidas por um epitélio composto, principalmente, por células absortivas, células de Paneth e células calciformes distribuídas entre as células absortivas, ambas apoiadas numa membrana basal. As criptas não são desenvolvidas e a lâmina própria forma um tecido conectivo complexo composto por tecido conjuntivo frouxo com vasos sangüíneos e linfáticos, fibras nervosas (não evidenciadas com esta coloração) e fibras musculares lisas; além de células do sistema imune, principalmente linfócitos e macrófagos. A muscular da mucosa compõe uma camada fina de tecido que separa a lâmina própria da submucosa e esta última é composta por tecido conjuntivo denso, repleta de arteríolas de grande calibre. Nos cortes do intestino do teiú a submucosa estava “descolada” da lâmina própria em diversos pontos e por isso decidimos não incluir esta parte do tecido na medida de espessura da mucosa, fazendo a opção pela medida de altura máxima dos vilos. Nesses animais, a túnica muscular é bem desenvolvida e composta por duas camadas, uma circular e outra longitudinal (Figura 6).

Na atividade de outono, o epitélio da parede intestinal é predominantemente colunar simples e ao longo do ciclo anual ele muda sua estrutura conformacional (Figura 7). Na dormência, há uma grande quantidade de células que se posicionam próximo à lâmina basal, e o epitélio passa a ser pseudo-estratificado, mantendo-se assim até o despertar. Na atividade de primavera, há uma diminuição do número de células dispostas na região da lâmina basal e o epitélio é caracteristicamente transitório, com pontos onde ele é colunar simples e outros onde é pseudo-estratificado. Esse epitélio transitório também pode ser visto no intestino de animais ativos submetidos ao jejum.

Embora a massa do intestino não seja diferente entre animais ativos no outono e na primavera, na atividade de outono a altura dos vilos é 19% maior (Tabela 2). Na dormência, a diminuição da massa intestinal é acompanhada por uma redução de aproximadamente 2 vezes na altura dos vilos e este padrão se mantém até o despertar. Na atividade de primavera, a altura dos vilos aumenta

59% em relação ao despertar e animais submetidos ao jejum nesta fase têm uma altura máxima dos vilos 21% menor que animais alimentados.

A densidade de superfície ( $S_V$ ) do epitélio na atividade de outono é 18% menor que na atividade de primavera e na dormência e no despertar, ela diminui aproximadamente 20% em relação à atividade de outono. Na atividade de primavera a  $S_V$  do epitélio aumenta 54% em relação ao despertar e em animais submetidos ao jejum nesta fase há uma redução de 22% desta variável em relação a animais alimentados (Tabela 2).

Aparentemente a  $S_V$  do epitélio não correlaciona com a densidade de volume da mucosa ( $V_V$  epitélio +  $V_V$  lâmina própria). A  $V_V$  da mucosa é similar entre os grupos de atividade de outono e atividade de primavera, mas é 19% menor na dormência e aproximadamente 31% menor no despertar, em relação à atividade de outono. Na atividade de primavera, há um aumento de 48% em relação ao despertar, evidenciando a recuperação do tecido após a retomada da alimentação. Adicionalmente, animais submetidos ao jejum na primavera, apresentam uma redução de 11% da  $V_V$  da mucosa, em relação a animais alimentados nesta fase. A densidade de volume ( $V_V$ ) do epitélio e a densidade de volume ( $V_V$ ) da lâmina própria, analisadas separadamente, também não exibem diferença entre animais ativos no outono e na primavera. Na dormência, a  $V_V$  do epitélio diminui 29% em relação à atividade de outono, mantém-se assim até o despertar e volta a se recuperar na atividade de primavera, exibindo um aumento de 45% em relação ao despertar. Em animais submetidos ao jejum na primavera há uma tendência à redução da  $V_V$  do epitélio em relação a animais alimentados. Por outro lado, a  $V_V$  da lâmina própria reduz apenas 8% após 2/3 de dormência, mas essa tendência se acentua e resulta numa diminuição de 33% no despertar. Na atividade de primavera, a  $V_V$  da lâmina própria aumenta 53% em relação ao despertar e animais submetidos ao jejum nesta fase não apresentam diferenças na  $V_V$  da lâmina própria em relação a animais alimentados (Tabela 2).

Em conseqüência dessas alterações, a razão  $V_V$  epitélio/ $V_V$  lâmina própria reduz 17% na dormência em relação à atividade de outono, mas mantém-se praticamente constante nas demais fases, inclusive em animais submetidos ao jejum na atividade de primavera. Não há correlação significativa entre essas duas variáveis ao longo do ciclo anual, com exceção para os animais na atividade de primavera, nos quais a tendência à correlação sugere que os ajustes na  $V_V$  do

epitélio e na  $V_V$  da lâmina própria se dão de forma coordenada durante a recuperação do tecido.

Comparações múltiplas entre as médias dos grupos mostram que, a espessura da túnica muscular do tecido intestinal dos teiús não varia ao longo do ciclo anual, mas em animais submetidos ao jejum na atividade de primavera, ela é 51% maior em relação aos animais alimentados (Tabela 2).

Para algumas variáveis que acompanham os ajustes no tecido intestinal ao longo do ciclo anual, o efeito de escala em função da massa corpórea é menos evidente. A altura máxima dos vilos, por exemplo, não correlaciona significativamente com a massa corpórea e exibe apenas uma tendência à correlação em animais dormentes. A  $V_V$  da mucosa não se altera em função do tamanho dos animais.

Na atividade de outono não observamos variação da  $S_V$  do epitélio em função da massa corpórea, mas durante a dormência existe uma tendência à variação, e animais maiores apresentam proporcionalmente menos  $S_V$  do epitélio que animais menores. No despertar, essa relação deixa de existir, mas durante a recuperação do tecido, na primavera, a relação observada na dormência volta a se esboçar. No entanto, somente quando submetidos ao jejum é que essa relação se estabelece com maior robustez e se mostra estatisticamente significativa (Tabela 3).

### **3. Teor de Água e Proteínas**

A análise do conteúdo de água do tecido intestinal dos lagartos indicou variações significativas, embora de pequena magnitude, entre as fases do ciclo sazonal (Tabela 4). Comparações entre as médias dos grupos de dados indicam um aumento de 3-4% do teor de água na fase de despertar em relação às fases de atividade de outono e de primavera. Não há diferença estatística no conteúdo de água do tecido intestinal entre teiús submetidos ao jejum e teiús alimentados na primavera.

A concentração de proteína total do tecido, expressa em  $\text{mg.g}^{-1}$  tecido úmido e em  $\text{mg.g}^{-1}$  tecido seco é apresentada na Tabela 4. Na atividade de outono, a concentração de proteína total é muito similar à atividade de primavera, porém, na dormência há uma diminuição de 23% e, no despertar, a ausência de



variação significativa sugere um aumento do teor de proteínas a despeito do aumento do conteúdo de água do tecido que se observa nesta fase. Não se observa diferença estatística na concentração de proteína por grama de tecido entre animais submetidos ao jejum e animais alimentados na primavera, provavelmente associada ao aumento da espessura da túnica muscular.

A concentração de proteínas solúveis nas amostras, medida no sobrenadante após centrifugação do homogeneizado, também está apresentada na Tabela 4; e esta fração contém a maioria das enzimas relacionadas à produção de ATP no tecido, enquanto a fração precipitada contém grande quantidade de proteínas do citoesqueleto. Na atividade de outono a concentração de proteínas solúveis não difere da atividade de primavera, mas na dormência há uma redução de 20% e até o despertar essa redução chega a 35% em relação à atividade de outono. Animais submetidos ao jejum na primavera também apresentam uma redução das proteínas solúveis no intestino médio, de aproximadamente 29% em relação aos animais alimentados na mesma fase.

#### 4. Atividades Enzimáticas

A medida da  $V_{m\acute{a}x}$  de enzimas que dão suporte à atividade do tecido permite avaliar o tipo preferencial e as taxas de fluxo de substratos energéticos no intestino ao longo do ciclo anual, além de indiretamente permitir avaliar a contribuição relativa do tecido para a economia energética total do animal no jejum durante a dormência e no jejum durante a atividade.

A atividade máxima das enzimas glicolíticas HK, PK e LDH no intestino médio dos teiús não variou significativamente ao longo do ciclo anual (Tabela 5; Figura 8). No entanto, em animais submetidos ao jejum na primavera há uma redução de atividade de 35%, 36% e 26% respectivamente, em relação aos animais alimentados na mesma fase. A enzima gliconeogênica FBPase apresentou atividade baixa e errática, provavelmente em decorrência de sua baixa concentração no tecido intestinal, e por essa razão os dados não foram reportados. A PEPCK, outra enzima que participa da síntese *de novo* de glicose, não varia sua atividade máxima entre os animais ativos no outono e na primavera. Na dormência, ela apresenta uma tendência à diminuição, com redução de 33% e se mantém assim no despertar. Na atividade de primavera, há um aumento de

82% na  $V_{m\acute{a}x}$  em relação ao despertar e em animais submetidos ao jejum nesta fase houve uma diminuição marginalmente significativa com uma atividade máxima 28% menor em relação aos animais alimentados.

Na atividade de outono a  $V_{m\acute{a}x}$  da HOAD é similar aos valores de atividade de primavera. Na dormência e no despertar a sua atividade máxima é menos que a metade das taxas na atividade de outono (Tabela 5; Figura 8). Na atividade de primavera, a  $V_{m\acute{a}x}$  desta enzima volta a aumentar e animais submetidos ao jejum apresentam uma redução de 46% em relação a animais alimentados. Um padrão semelhante se observa para a CS, cuja  $V_{m\acute{a}x}$  entre os grupos de animais ativos no outono e na primavera não varia, mas na dormência a atividade máxima é 2,5 vezes menor que na atividade de outono. No despertar, essa depressão é um pouco menor, mas ainda alcança 50% do observado na atividade de outono. Animais submetidos ao jejum na atividade de primavera, exibem uma  $V_{m\acute{a}x}$  para a CS 49% menor que animais alimentados.

Em relação ao metabolismo de aminoácidos, a  $V_{m\acute{a}x}$  da GDH no intestino médio também não varia entre os animais na atividade de outono e primavera, mas há uma tendência  inibição da atividade desta enzima na dormência, que se acentua no despertar, quando a  $V_{m\acute{a}x}$   40% que na pr-dormência (Tabela 5; Figura 8). Adicionalmente, animais submetidos ao jejum na atividade de primavera exibem uma diminuição marginalmente significativa de 33% das taxas de atividade da GDH em comparação com animais alimentados. Embora se observe uma tendência similar, as pequenas variações na atividade da AspAT não chegam a ser significativas estatisticamente entre as diferentes fases sazonais e nem entre os dois grupos na primavera. Essas enzimas estão envolvidas com a provisão de esqueletos de carbono para formação de ATP no ciclo de Krebs, com a ciclagem de amônia no interior das células e participam de vias anapleróticas de regeneração de intermediários do ciclo de Krebs.

Mudanças no teor de água do tecido poderiam influenciar o resultado da  $V_{m\acute{a}x}$  das enzimas, seja superestimando a atividade na dormência, seja subestimando a atividade no despertar. Por isso, analisamos a atividade das enzimas por miligrama de proteínas solúveis. Quando expressas por miligrama de proteína solúvel, a atividade máxima das enzimas glicolíticas mostra ausência de variações sazonais, com exceção da LDH em animais submetidos ao jejum na primavera, que apresenta um valor 30% maior do que em animais alimentados,

um efeito contrário àquele observado nos valores expressos em  $\text{U.g}^{-1}$  tecido. A atividade máxima da HOAD, também expressa por miligrama de proteína, mostra uma tendência à redução na dormência e no despertar é 19% menor que na atividade de outono e 12% menor que na atividade de primavera. Animais submetidos ao jejum na primavera apresentam uma HOAD 35% maior que animais alimentados e, novamente se observa uma inversão do padrão de atividade da enzima expressa em  $\text{U.g}^{-1}$  de tecido. Da mesma forma, a atividade da CS expressa em  $\text{U.mg}^{-1}$  de proteína exibe uma tendência à inibição de suas taxas na dormência e no despertar, ambas marginalmente significativas. E não há diferença entre a  $V_{\text{máx}}$  de animais submetidos ao jejum e alimentados na primavera. Não houve alteração ao longo do ciclo anual na atividade máxima das enzimas GDH e AspAT expressas em  $\text{U.mg}^{-1}$  de proteína, nem em animais submetidos ao jejum.

Apesar de verificarmos uma variação na concentração de água somente no despertar, ao expressar a atividade das enzimas por miligrama de proteína solúvel as diferenças mais sutis “desaparecem” enquanto as mais evidentes se confirmam, como a redução na HOAD e na CS. Em parte, isso pode ser explicado pela introdução de erros na medida da concentração de proteína, como diluição, pipetagem, etc, e por esta razão optamos por discutir os dados expressos somente por miligrama de tecido.

As razões entre as  $V_{\text{máx}}$  das enzimas foram calculadas com os dados em  $\text{U.g}^{-1}$  tecido (Tabela 6), permitindo avaliar o sentido preferencial do fluxo de substratos na vias metabólicas do tecido intestinal dos teiús e as eventuais mudanças que ocorrem em função da fase do ciclo anual ou condição nutricional (Stuart e Ballantyne, 1997). Adicionalmente, a existência de correlações significativas entre as  $V_{\text{máx}}$  das enzimas foi verificada.

As razões PK:LDH, PK:CS e LDH:CS não diferem muito entre animais ativos no outono e na primavera, mas elas aumentam na dormência e, no despertar, voltam a cair e apresentam valores próximos aos da atividade. Não há correlação significativa entre as atividades dessas enzimas, com exceção para a  $V_{\text{máx}}$  da PK e da LDH se correlacionam significativamente em animais submetidos ao jejum na primavera.

Diferentemente, a razão HOAD:CS não segue o mesmo padrão e é maior em animais na atividade de outono que na atividade de primavera. Na dormência,

essa razão praticamente não se altera, mas no despertar ela diminui e alcança seu menor valor na atividade de primavera, sem variação substancial entre animais submetidos ao jejum e alimentados. A variação na atividade dessas duas enzimas ao longo do ciclo anual é coordenada, de tal forma que, na dormência, no despertar e na atividade de primavera a correlação entre suas  $V_{m\acute{a}x}$  é estatisticamente significativa. Em animais submetidos ao jejum na primavera não há correlação entre a atividade máxima da HOAD e da CS.

As razões GDH:CS e AspAT:CS não variam entre os grupos de animais ativos no outono e na primavera e estão aumentadas na dormência. No despertar, tendem a diminuir até voltar aos valores de referência na atividade. Em animais submetidos ao jejum na primavera, a razão GDH:CS praticamente não se altera, mas a razão AspAT:CS aumenta substancialmente.



---

***Tabelas***

**Tabela 1** – Massa do intestino médio e sua relação alométrica com a massa corpórea em lagartos teiú jovens durante o primeiro ciclo anual de atividades.

Fase do ciclo anual	Massa Intestinal		Massa Corpórea (g)	<i>a</i>	<i>b</i>	R <sup>2</sup>	p
	(g)	(%)					
Atividade de outono	2,04 ± 0,26 <sup>c,d</sup>	1,04 ± 0,05 <sup>c</sup>	197,42 ± 26,06 (10)	-1,797 ± 0,312	0,917 ± 0,137	0,848	0,0002
Dormência de inverno	1,63 ± 0,22 <sup>d</sup>	0,88 ± 0,04 <sup>d</sup>	190,61 ± 26,90 (14)	-1,822 ± 0,260	0,891 ± 0,116 <sup>c</sup>	0,831	<0,0001
Despertar	1,29 ± 0,10 <sup>a,d</sup>	0,77 ± 0,03 <sup>a,d</sup>	168,08 ± 15,40 (17)	-2,077 ± 0,232	0,980 ± 0,106 <sup>b</sup>	0,841	<0,0001
Atividade de primavera alimentado	2,65 ± 0,21 <sup>a,b,c</sup>	1,65 ± 0,21 <sup>b,d</sup>	188,69 ± 22,54 (14)	0,095 ± 0,321	0,141 ± 0,143	0,0757	0,3410
jejum	2,19 ± 0,30	0,85 ± 0,08 <sup>*</sup>	287,70 ± 57,37 (8)	-1,113 ± 0,176	0,596 ± 0,073	0,917	0,0002

Os valores são a média ± erro padrão da média (EPM), com o número de animais entre parênteses. Regressões lineares foram realizadas com os valores transformados em log e descritos pela equação  $\log_{10} Mi = \log a + b \log_{10} Mc$ , onde *a* é o intercepto ± EPM, *b* é o coeficiente angular ± EPM, *Mi* é a massa intestinal e *Mc* a massa corpórea. <sup>a</sup> indica diferenças significativas em relação à atividade de outono, <sup>b</sup> em relação à dormência de inverno, <sup>c</sup> em relação ao despertar e <sup>d</sup> em relação à atividade de primavera. Dado que a correlação entre *Mi* e *Mc* não é significativa na atividade de primavera, os valores de *b* para esta fase não foram usados nas comparações estatísticas. A massa relativa do intestino, corrigida pela massa corpórea, está representada em %.

**Tabela 2** – Alterações na morfologia do intestino médio de lagartos teiú jovens durante o primeiro ciclo anual de atividades.

Fase do ciclo anual	Em (mm)	Av (mm)	V <sub>V</sub> LP (%)	V <sub>V</sub> Ep (%)	S <sub>V</sub> Ep (mm)
Atividade de outono	0,485 ± 0,034	1,091 ± 0,083 <sup>b,c,d</sup>	34,72 ± 0,90 <sup>c</sup>	38,75 ± 2,40 <sup>b,c</sup>	15,53 ± 0,68 <sup>b,c,d</sup>
Dormência de inverno	0,390 ± 0,046	0,579 ± 0,029 <sup>a,d</sup>	29,72 ± 1,80	26,25 ± 2,70 <sup>a,d</sup>	12,56 ± 1,70 <sup>a,d</sup>
Despertar	0,435 ± 0,044	0,576 ± 0,054 <sup>a,d</sup>	23,26 ± 1,21 <sup>a,d</sup>	27,66 ± 1,60 <sup>a,d</sup>	12,32 ± 0,63 <sup>a,d</sup>
Atividade de primavera					
alimentado	0,412 ± 0,031	0,918 ± 0,040 <sup>a,b,c</sup>	35,56 ± 4,20 <sup>c</sup>	40,00 ± 2,33 <sup>b,c</sup>	18,97 ± 0,67 <sup>a,b,c</sup>
jejum	0,622 ± 0,040*	0,721 ± 0,042*	32,75 ± 1,20	34,14 ± 1,68	14,80 ± 1,22*

Os valores são a média ± erro padrão da média de 5-6 animais e referem-se às seguintes variáveis: espessura da túnica muscular (Em), altura máxima dos vilos (Av), densidade de volume da lâmina própria (V<sub>V</sub>LP), densidade de volume epitelial (V<sub>V</sub>Ep) e densidade de superfície epitelial (S<sub>V</sub>Ep). <sup>a</sup> indica diferenças significativas em relação à atividade de outono, <sup>b</sup> em relação à dormência de inverno, <sup>c</sup> em relação ao despertar e <sup>d</sup> em relação à atividade de primavera. \* indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera.

**Tabela 3** – Relação alométrica entre a densidade de superfície ( $S_V$ ) epitelial do intestino médio e a massa corpórea de teiús jovens durante o primeiro ciclo anual de atividades.

<b>Fase do ciclo anual</b>	<b><i>a</i></b>	<b><i>b</i></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
Atividade de outono	0,717 ± 0,285	0,201 ± 0,121	0,478	0,196
Dormência de inverno	2,096 ± 0,367	-0,429 ± 0,157	0,713	0,072
Despertar	1,108 ± 0,593	-0,009 ± 0,269	0,000	0,974
Atividade de primavera				
alimentado	1,666 ± 0,135	-0,164 ± 0,056	0,735	0,063
jejum	1,756 ± 0,204	-0,244 ± 0,083	0,681	0,043

Os valores são a média ± erro padrão da média (EPM) de 5-6 animais. Regressões lineares foram realizadas com os valores transformados em log e descritos pela equação  $\log_{10} \bar{M}_i = \log a + b \log_{10} M_c$ , onde  $a$  é o intercepto ± EPM,  $b$  é o coeficiente angular ± EPM,  $\bar{M}_i$  é a massa intestinal e  $M_c$  a massa corpórea.



**Tabela 4** – Alterações na concentração de água e de proteínas do intestino médio de lagartos teiú jovens durante o primeiro ciclo anual de atividades.

Fase do ciclo anual	Água (%)	Proteína total (mg.g <sup>-1</sup> )		Proteínas solúveis (mg.g <sup>-1</sup> )
		Tecido úmido	Tecido seco	
Atividade de outono	81,81 ± 0,68 <sup>c</sup>	45,92 ± 1,45 <sup>b</sup>	259,56 ± 12,89 <sup>b</sup>	40,06 ± 2,44 <sup>b,c</sup>
Dormência de inverno	83,07 ± 0,58	35,37 ± 1,06 <sup>a,d</sup>	210,33 ± 8,02 <sup>a</sup>	31,87 ± 1,60 <sup>a,d</sup>
Despertar	84,55 ± 0,50 <sup>a,d</sup>	40,21 ± 2,32	237,60 ± 16,21	26,15 ± 1,57 <sup>a,d</sup>
Atividade de primavera	80,97 ± 0,62 <sup>c</sup>	45,21 ± 2,15 <sup>b</sup>	237,17 ± 7,55	43,33 ± 2,80 <sup>b,c</sup>
jejum	82,88 ± 0,52	44,22 ± 1,72	259,86 ± 10,26	30,72 ± 1,95 <sup>*</sup>

Os valores são a média ± erro padrão da média de 8-10 animais para a medida da concentração de água e proteína total e de 16-17 animais para as medidas da concentração de proteína solúvel. <sup>a</sup> indica diferenças significativas em relação à atividade de outono, <sup>b</sup> em relação à dormência de inverno, <sup>c</sup> em relação ao despertar e <sup>d</sup> em relação à atividade de primavera. \* indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera.

**Tabela 5** – Atividade máxima (U.g-1 tecido úmido; 25 °C) de enzimas do metabolismo de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos no intestino médio de teiús jovens, durante o primeiro ciclo anual.

Fase do ciclo anual	HK	PK	LDH	CS	HOAD	GDH	AspAT	PEPCK
Atividade de outono	2,08 ± 0,23	69,30 ± 8,52	127,00 ± 6,62	5,68 ± 0,52 <sup>b,c</sup>	23,40 ± 1,76 <sup>b,c</sup>	14,32 ± 1,23 <sup>c</sup>	33,81 ± 3,30	0,74 ± 0,08
Dormência de inverno	1,76 ± 0,22	72,90 ± 5,57	110,00 ± 7,22	2,24 ± 0,41 <sup>a,d</sup>	10,80 ± 1,63 <sup>a,d</sup>	10,40 ± 0,70	31,29 ± 1,77	0,50 ± 0,11 <sup>d</sup>
Despertar	1,64 ± 0,32	57,60 ± 4,02	103,00 ± 9,02	2,83 ± 0,51 <sup>a,d</sup>	10,10 ± 1,64 <sup>a,d</sup>	8,64 ± 0,98 <sup>a,d</sup>	27,52 ± 2,71	0,49 ± 0,10 <sup>d</sup>
Atividade de primavera								
alimentado	2,31 ± 0,24	66,30 ± 5,62	116,60 ± 7,58	6,25 ± 1,01 <sup>b,c</sup>	18,50 ± 2,25 <sup>b,c</sup>	14,14 ± 2,10 <sup>c</sup>	35,71 ± 3,94	0,89 ± 0,08 <sup>b,c</sup>
jejum	1,50 ± 0,23*	42,10 ± 6,7*	86,20 ± 6,18*	3,20 ± 0,24*	10,00 ± 0,82*	9,49 ± 0,89	28,22 ± 3,27	0,64 ± 0,09

Os valores são a média ± erro padrão da média de 7-10 animais. <sup>a</sup> indica diferenças significativas em relação à atividade de outono, <sup>b</sup> em relação à dormência de inverno, <sup>c</sup> em relação ao despertar e <sup>d</sup> em relação à atividade de primavera. \* indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera.

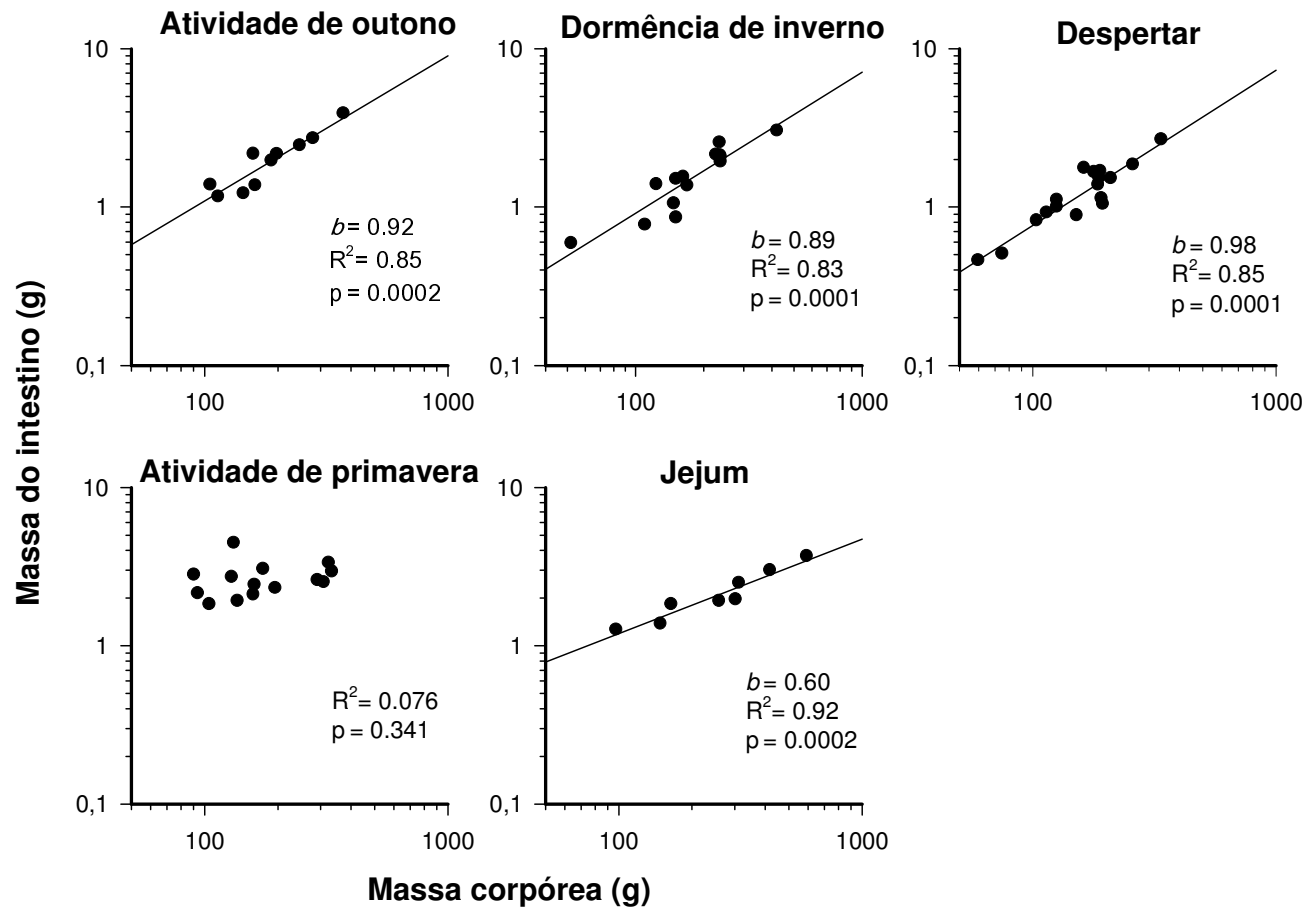
**Tabela 6** – Razão entre as atividades máximas de enzimas do intestino médio de lagartos teiú jovens durante o primeiro ciclo anual de atividades.

<b>Fase do ciclo anual</b>	<b>HK:CS</b>	<b>PK:LDH</b>	<b>PK:CS</b>	<b>LDH:CS</b>	<b>HOAD:CS</b>	<b>GDH:CS</b>	<b>AsAT:CS</b>
Atividade de outono	0,37	0,54	12,20	22,35	4,11	2,52	5,95
Dormência de inverno	0,78	0,65	32,56	49,41	4,81	4,64	13,96
Despertar	0,56	0,55	20,43	36,67	3,57	3,06	9,75
Atividade de primavera							
alimentados	0,37	0,56	10,61	18,68	2,96	2,26	5,72
jejum	0,47	0,49	13,16	26,94	3,12	2,96	8,81

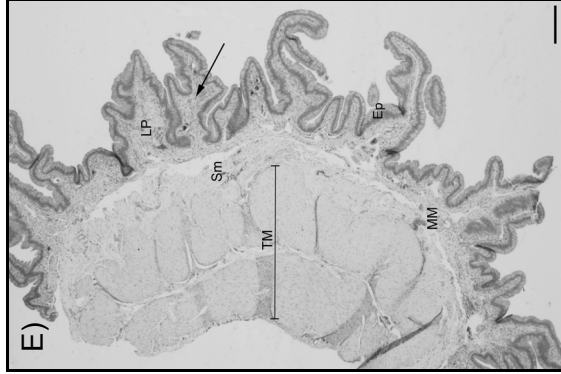
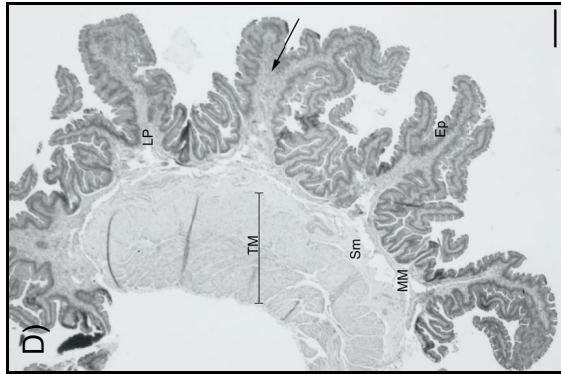
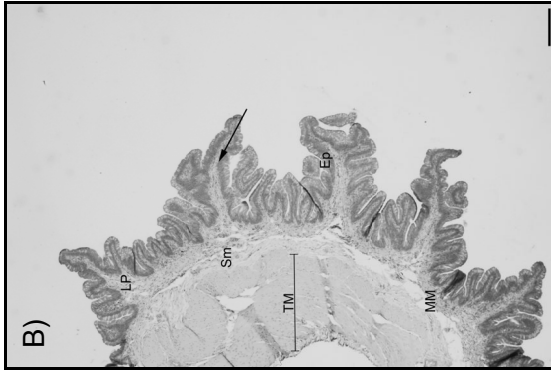
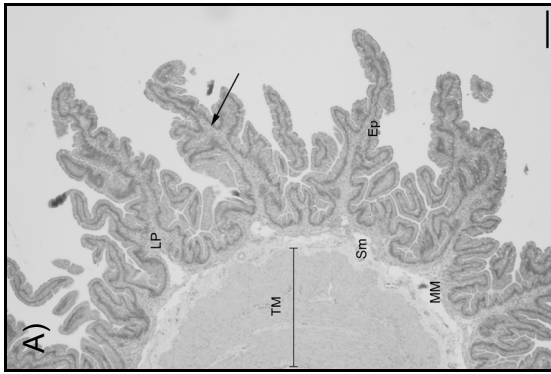


---

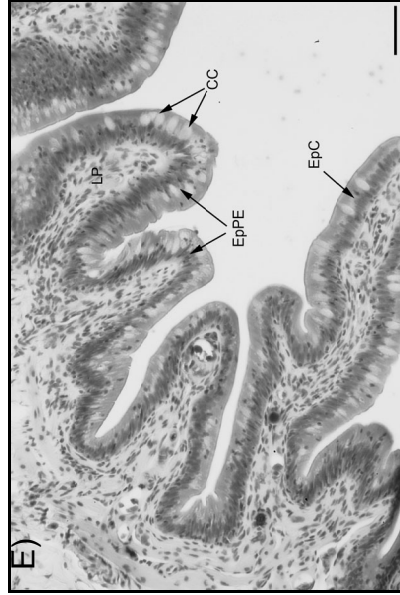
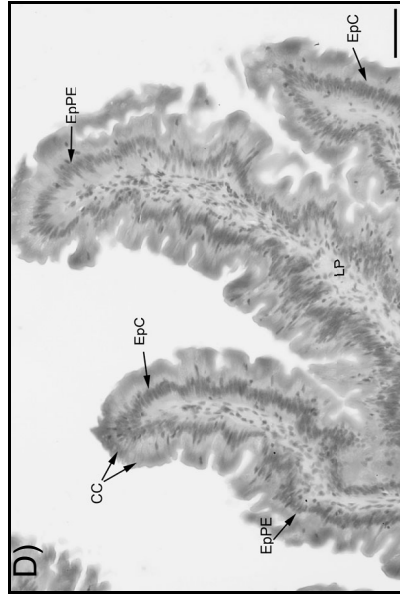
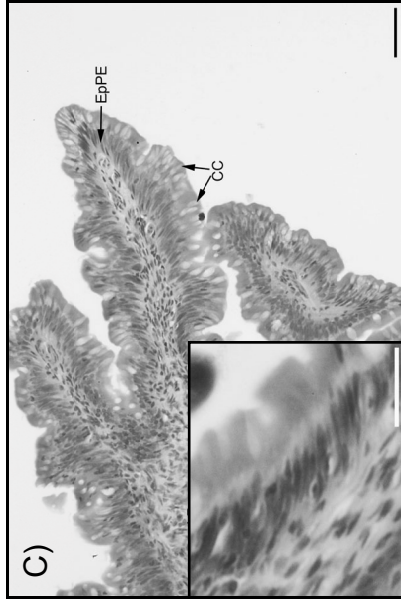
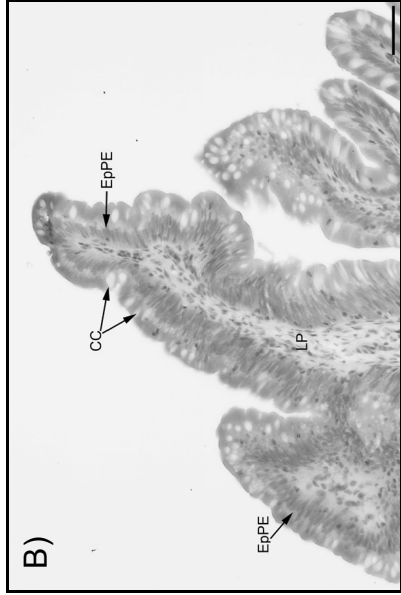
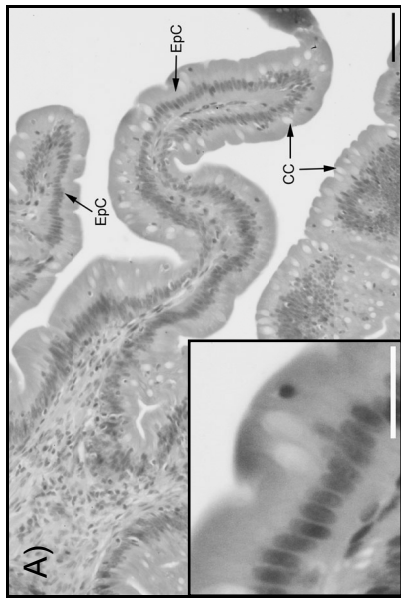
***Figuras***



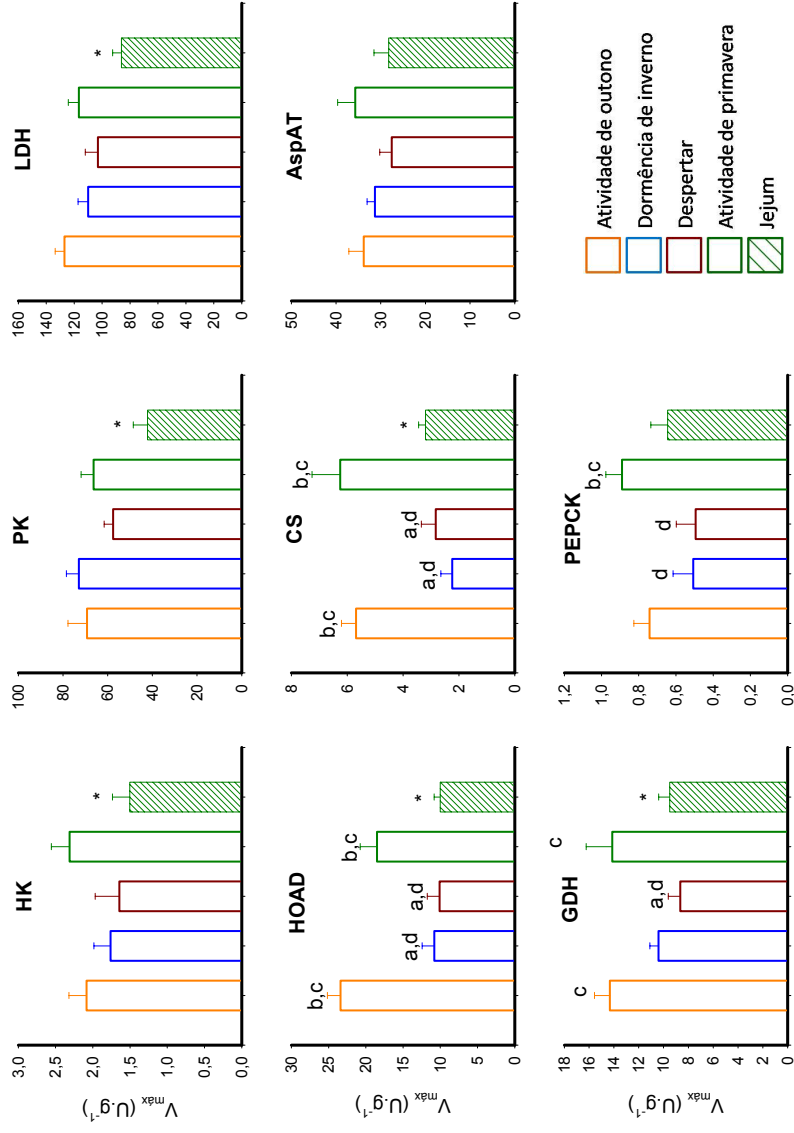
**Figura 5** - Relação alométrica entre a massa do intestino médio e a massa corpórea de lagartos teiú jovens durante o ciclo anual de atividades. As retas de regressão foram calculadas a partir dos dados convertidos para a escala logarítmica e são descritas pela equação:  $Mi = a.Mc^b$ , onde  $a$  = intercepto,  $b$  = coeficiente angular,  $Mi$  = massa do intestino,  $Mc$  = massa corpórea em gramas e  $R^2$  = coeficiente de determinação. A reta foi omitida onde a correlação não é significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 6** - Corte transversal da parede do intestino médio de lagartos teiú jovens no primeiro ciclo anual. A) atividade de outono; B) dormência de inverno; C) despertar; D) animais ativos na primavera; e E) animais ativos na primavera submetidos ao jejum por 20 dias. TM = túnica muscular; Sm = submucosa; LP = mucosa; Sm = submucosa; LP = lâmina própria; Ep = epitélio. As setas apontam para vilos, mostrados em maior aumento na próxima figura. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra de escala = 200 µm.



**Figura 7** - Corte transversal da parede do intestino médio de lagartos teiú jovens no primeiro ciclo anual, destacando diferenças na estrutura do epitélio. A) atividade de outono; B) dormência de inverno; C) despertar; D) animais ativos na primavera; e E) animais ativos na primavera submetidos ao jejum por 20 dias. LP= lâmina própria; EpC= epitélio colunar simples; EpPE= epitélio pseudoestratificado; CC= células caliciformes. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barras de escala= 50 µm para o menor aumento e 25 µm para o maior aumento.



**Figura 8** – Atividades enzimáticas máximas ( $V_{máx}$ ) no tecido intestinal de lagartos teiú jovens durante o primeiro ciclo anual de atividades. As barras representam as médias de  $n = 7-9$  animais e as linhas verticais o erro padrão da média. <sup>a</sup> indica diferenças significativas em relação à atividade de outono, <sup>b</sup> em relação à dormência de inverno, <sup>c</sup> em relação ao despertar e <sup>d</sup> em relação à atividade de primavera. \* indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera.





---

***Discussão***

## VII. DISCUSSÃO

### 1. Relações de Escala

Após a eclosão na primeira metade do verão, os teiús crescem a taxas elevadas, aumentando sua massa corpórea em 5-7 vezes até o outono (Souza *et al.*, 2004). A massa do intestino médio aumenta juntamente com a massa corpórea segundo o coeficiente  $b=0,92$ , resultando numa massa intestinal maior em animais menores e que, em média, representa 1,04% da massa total do animal. Como o tamanho dos órgãos é um dos fatores intrínsecos mais evidentes que afetam a relação de escala entre a taxa metabólica e a massa corpórea dos organismos (Hochachka *et al.*, 2003), a diferença no tamanho do intestino pode contribuir em algum grau para a diferença inter-individual na taxa metabólica dos teiús jovens. No outono, o consumo de  $O_2$  no repouso é maior nos teiús de menor massa corpórea ( $b=1,27$ ) (Souza *et al.*, 2004).

Após 2/3 da fase total de dormência, não há mudança na relação entre as massas corpórea e do intestino em relação ao padrão na atividade de outono, porém, a massa do intestino representa uma fração menor, de 0,88%. O despertar marca o término da dormência e os animais ingerem grande quantidade de água embora permaneçam em jejum. A mudança no intercepto 'a' da reta, que é ainda menor que no inverno, evidencia que com o prolongamento da dormência a atrofia intestinal torna-se mais acentuada nos animais em geral, porém, o aumento do expoente 'b' de 0,89 para 0,98 sugere que a atrofia do intestino é mais intensa em animais menores.

De fato, com base nas equações geradas, estima-se que um teiú de 100g perde 30% da massa intestinal em contraste com 25% de perda em um animal de 300g. Assim, o terço final da dormência, juntamente com o despertar, resultam em um comprometimento maior da massa do intestino de animais com menor massa corpórea, provavelmente porque animais menores dispõem de menos recursos energéticos que possam ser mobilizados para suprir a demanda de ATP, especialmente no momento do despertar, quando substratos endógenos estariam depletados e o catabolismo protéico se tornaria mais acentuado.

Na atividade de primavera, a massa do intestino aumenta de 0,77% no despertar para 1,67% da massa corpórea e a ausência de correlação entre essas

duas variáveis, com o expoente  $b= 0,14$  tendendo a zero, reflete um aumento desproporcional da massa do intestino médio após a retomada da alimentação, de modo que teiús com massa corpórea de 100g apresentam um aumento da massa intestinal de 214% em contraste com 26% observado em animais com massa 3 vezes maior. Notoriamente, a relação desproporcional entre massa corpórea e intestinal observada na atividade de outono se acentua, e animais menores exibem grande aumento da massa intestinal com a retomada do crescimento na primavera. Nesta fase, um animal de 100g tem mais de 2 vezes a massa intestinal de um animal de mesma massa corpórea na atividade de outono enquanto que um animal de 300g praticamente recupera o valor de massa intestinal calculado para um animal de mesmo peso na atividade de outono.

Nos animais ativos submetidos ao jejum por 20 dias, a massa intestinal diminui acentuadamente de 1,67% para 0,85% da massa corpórea e essa atrofia é muito maior nos animais menores, como indicam o menor intercepto e o maior expoente da reta de regressão em relação aos animais alimentados. Com base na equação da reta, um teiú de 100g submetido ao jejum teria uma perda de 50% da massa intestinal enquanto que um animal de 300g teria uma perda de apenas 17%. Assim, o impacto do jejum sobre a massa intestinal de animais ativos na primavera é maior do que o observado na dormência.

O fato de animais menores exibirem uma alteração mais acentuada da massa intestinal do que animais maiores, com maior grau de atrofia no fim da dormência e despertar, maior recuperação após a retomada da alimentação e maior atrofia no jejum durante a atividade, provavelmente está associado ao menor volume corpóreo e menor capacidade de armazenar substratos. Isso realça a importância da fase de antecipação e formação de reservas de substratos energéticos, principalmente lipídios, para a sobrevivência durante o primeiro episódio de dormência. Souza *et al.* (2004) observaram que a massa relativa dos corpos gordurosos no outono é menor nos teiús de menor tamanho e que a depressão das taxas de consumo de  $O_2$  na dormência é maior nesses animais, sugerindo que os mecanismos de inibição metabólica favorecem maior economia energética nos teiús menores.

Por outro lado, em animais submetidos ao jejum na primavera, a ausência de antecipação somada à depleção das reservas de lipídios dos corpos gordurosos abdominais e crescimento corpóreo a taxas elevadas, explicam uma

---

atrofia maior do que na dormência. Com isso, a contribuição relativa do intestino para a economia energética no jejum é maior do que na dormência e, possivelmente, proteínas do tecido são catabolizadas e consumidas pelo próprio tecido como fonte de energia ou usadas para a gliconeogênese, a qual supostamente tem suas taxas mais altas no jejum.

## **2. Reorganização Estrutural**

Além da atrofia do órgão, outras alterações morfológicas no intestino, provavelmente contribuem para minimizar o custo de manutenção do tecido remanescente em animais dormentes ou submetidos ao jejum. Por exemplo, a densidade de superfície ( $S_V$ ) do epitélio intestinal é uma das variáveis histológicas mais importantes no que diz respeito à função do intestino, pois trata da porção do tecido onde se dá a absorção de fluidos e nutrientes. Pappenheimer (1998) mostrou em estudo com diversos mamíferos eutérios não-ruminantes que a área de superfície epitelial (densidade de superfície dos vilos x volume da mucosa) no intestino médio aumenta numa proporção de aproximadamente 0,6 com a massa corpórea. Em teiús jovens, não foi observada correlação entre a  $S_V$  do epitélio e a massa corpórea na atividade de outono, provavelmente em função da pequena amplitude de variação da massa corpórea e do pequeno número de animais analisados. Porém, uma característica peculiar ao intestino nesta fase diz respeito à altura dos vilos, que chega a ser maior que o observado em animais ativos na primavera. Este talvez seja um ajuste importante que aumenta a capacidade absorptiva do órgão na fase de acúmulo de estoques energéticos que vão suprir o metabolismo dos lagartos na dormência.

Em estudos com animais que exibem alterações sazonais da massa corpórea, Król & Speakman (2007) sugerem que o aumento da capacidade absorptiva do intestino seria um dos ajustes mais importantes na fase em que há formação de estoques de gordura. Os autores não observaram alterações na expressão de alguns genes responsáveis pela síntese de neuropeptídeos envolvidos com o controle da ingestão de alimento e do gasto energético no hipotálamo, apenas um aumento na síntese da proteína SOCS3, que participa de mecanismos intracelulares inibitórios de sinais anorexigênicos. Em animais com variação sazonal da massa corpórea, a síntese aumentada dessa proteína parece

ser o principal responsável pela resistência a hormônios adipostáticos, como a leptina e a insulina (Shuhler & Ebling, 2006) e, associado a isso, o aumento da capacidade absorptiva do intestino, parece contribuir para o aumento da massa corpórea (Carey, 1990; Król & Speakman, 2007).

Além disso, a produção de leptina no trato digestório e presença de receptores principalmente no intestino médio sugerem que neste tecido a leptina desempenha um papel importante no controle periférico da ingestão de alimento, modulando a transcrição de genes envolvidos com o transporte de lipídio e de açúcar (Morton *et al.*, 1998; Doi *et al.*, 2001). Evidências de que a leptina poderia ativar a proteína MAPK, responsável pela regulação de várias atividades celulares como a expressão gênica, diferenciação, apoptose e mitose (Morton *et al.*, 1998; Barrenetxe *et al.*, 2002), sugerem que este hormônio possa estar envolvido nas alterações da mucosa intestinal.

Após cerca de apenas 2 meses de dormência a perda de 12% da massa intestinal está associada a uma atrofia da camada mucosa, com redução da sua densidade de volume ( $V_V$ ) em função, principalmente, da redução pela metade da altura dos vilos e diminuição da  $V_V$  do epitélio. Nesta fase, a diminuição de 17% na razão  $V_V$  epitélio/ $V_V$  lâmina própria expressa uma atrofia mais acentuada do epitélio do que da lâmina própria. Acompanhando esses ajustes, a densidade de superfície ( $S_V$ ) do epitélio também diminui e mostra uma forte tendência a variar negativamente em função da massa corpórea, sugerindo que animais menores possuem mais  $S_V$  do epitélio do que animais maiores. Da mesma forma, a diminuição da altura dos vilos aparentemente foi mais pronunciada nos animais de maior massa ( $0,1 > P > 0,05$ ) e, no conjunto, esses dados sugerem que durante a dormência o tecido encontra-se mais bem preservado nos teiús de menor tamanho corpóreo.

Nos três meses iniciais de estivação, o sapo australiano *Cyclorana alboguttata* apresentou uma redução de 68% da massa intestinal com uma diminuição no comprimento e no diâmetro do tubo e, num padrão similar ao observado nos teiús, reduziu pela metade a altura dos vilos (Cramp *et al.*, 2005). Embora o grau de depressão metabólica alcançado por esses animais não seja conhecido, o tempo de jejum que eles atravessam durante a estivação é mais longo do que o observado no presente trabalho com teiús jovens, por volta de 9 meses, e isso acontece a uma temperatura corpórea substancialmente maior,

algo em torno de 25 °C (Cramp *et al.*, 2005), o que explicaria a grande atrofia do órgão, incluindo a túnica muscular. No entanto, este percentual pode estar superestimado porque os resultados não foram analisados em função da massa corpórea dos animais, mas sim do comprimento narina-cloaca, o qual não variou estatisticamente. Variações de massa usualmente refletem variações no conteúdo de energéticas, as quais devem exercer grande influência sobre a quantidade de proteína mobilizada do intestino no jejum e esta possibilidade não deve ser negligenciada.

No esquilo *Spermophilus tridecemlineatus*, a atrofia do intestino durante a hibernação também está relacionada principalmente com uma diminuição na altura dos vilos com conseqüente redução pela metade do peso e do conteúdo de proteínas por centímetro da camada mucosa, além de uma redução na área de superfície do epitélio (Carey, 1990). No entanto, a autora sugere que, nesses animais a arquitetura do epitélio intestinal é bem preservada e a habilidade de gerar novas células absortivas é mantida na dormência de inverno. Nesta fase, a taxa de atividade mitótica do tecido é reduzida, a migração dos enterócitos no eixo cripta-vilo é lenta e as células permanecem na fase G<sub>2</sub> do ciclo celular até o despertar (Carey, 1995). Especula-se que a capacidade de preservação da morfologia do epitélio em mamíferos hibernantes esteja relacionada com os diversos episódios de despertar, quando o aumento da taxa metabólica e aumento da temperatura corpórea possibilitariam a síntese de proteínas, com retomada da atividade mitótica e reposição dos enterócitos (Carey, 1995; Van Breukelen & Martin, 2002). Como as taxas de proliferação celular durante os episódios de despertar se comparam às taxas na atividade de primavera, é provável que a ingestão de alimento *per se* não seja necessária para promover um aumento da atividade mitótica, pelo menos no intestino delgado (Hume *et al.*, 2002). Além disso, a medida das taxas de transporte de glicose e fluxo de Na<sup>+</sup> *in vitro* mostrou que a capacidade absortiva do intestino desses animais é maior durante a hibernação, possivelmente porque a redução das taxas de proliferação e migração celular resulta na presença predominante de enterócitos mais maduros, capazes de transportar nutrientes e íons com maior eficiência. Se os animais que ficaram meses sem se alimentar não exibissem esta resposta compensatória, a capacidade do intestino atrófico de absorver nutrientes eficientemente na primavera seria deficiente e isso poderia comprometer a

---

sobrevivência de espécies que hibernam em regiões onde há pouco alimento disponível no início da primavera (Carey, 1990).

Em lagartos teiú, diferentemente de mamíferos hibernantes, a dormência acontece a uma temperatura corpórea relativamente alta e, embora a síntese de proteínas esteja reduzida, como sugerem os resultados discutidos mais adiante, as taxas de proliferação celular parecem aumentadas e no final da dormência seriam ainda maiores, como evidenciam os aglomerados de enterócitos na extremidade da lâmina própria e base do epitélio. Provavelmente, o intestino inicia sua recuperação ainda na dormência, antecipando a plena recuperação da capacidade funcional do tecido logo após o despertar. Num padrão similar, na cobra *Thamnophis sirtalis parietalis* que se alimenta freqüentemente mas tolera longos intervalos de tempo em jejum quando há escassez de alimento no ambiente, as taxas de proliferação celular aumentaram durante o jejum e atrofia do intestino, indicando que as células desgastadas durante a digestão da última presa ingerida estariam sendo repostas, antes da retomada da alimentação (Starck & Beese, 2002).

É interessante destacar que adicionais 30 dias de dormência resultaram em uma perda média de mais 11% da massa do intestino, totalizando uma atrofia de 23%, porém, o grau de redução na altura dos vilos, na  $V_V$  do epitélio e na  $S_V$  do epitélio não se alterou. Por outro lado, a  $V_V$  da mucosa diminuiu significativamente em conseqüência da redução adicional da  $V_V$  da lâmina própria, que nesta fase é 33% menor que na atividade de outono. A lâmina própria preenche o centro das vilosidades e o maior grau de atrofia apenas no final da dormência provavelmente decorre do fato de ser uma estrutura mais interna em relação ao epitélio, sendo menos afetada pela redução da irrigação do tecido e ausência de nutrientes no lúmen intestinal durante a dormência. Ao final da dormência, a estimativa de redução da mucosa chega a ser superior à diminuição de 23% da massa do intestino, sugerindo que nesta porção do intestino, a atrofia do órgão seja dada por uma redução da mucosa e não do comprimento e/ou do diâmetro do tubo, já que a túnica muscular, outro importante constituinte do tecido, não se altera.

De maneira similar ao observado nos teiús e em mamíferos hibernantes, Dunel-Erb *et al.* (2001) mostraram que ratos Wistar submetidos ao jejum apresentaram um grau de redução da altura dos vilos e da  $V_V$  da mucosa

semelhante. Nesses animais, surpreendentemente, a  $S_V$  do epitélio aumentou significativamente na fase mais avançada do jejum e os autores sugerem que este aumento possa representar uma resposta compensatória que maximiza a função absorptiva do tecido durante a fase de baixa ingestão alimentar. Uma resposta de amplificação da capacidade absorptiva do intestino também é observada em *C. alboguttata* que, no despertar da estivação, apesar da redução em massa e comprimento do tecido, tem um crescimento de mais de 90% na altura dos vilos (Cramp & Franklin, 2005). Um ajuste semelhante foi observado em teiús jovens apenas na atividade de outono, fase que antecede a dormência.

Assim como os teiús, diversos animais que exibem dormência sazonal ou que têm o jejum com parte do seu repertório natural de atividades também não alteraram a espessura da túnica muscular ao longo do ciclo anual ou quando privados de se alimentar (Secor, 2005; Hume *et al.*, 2002; Karasov *et al.*, 2003; Starck & Beese, 2002). Faz exceção *C. alboguttata* que, em função do longo tempo de jejum na estivação e possivelmente da elevada temperatura corpórea nesta fase, mostrou uma redução significativa da espessura da túnica muscular após os três meses iniciais de dormência (Cramp *et al.*, 2005). No hamster hibernante *Mesocricetus auratus*, um aumento significativo no número de neurônios mioentéricos supostamente contribuiu para manter a integridade da túnica muscular do intestino na ausência de nutrientes Toole *et al.* (1999).

Na primavera, o grande aumento da massa intestinal não é acompanhado de variação proporcional da  $V_V$  da mucosa, que é similar à da atividade de outono, e não há diferença na  $V_V$  do epitélio e na  $V_V$  da lâmina própria entre as duas fases. A forte tendência de correlação negativa entre essas duas medidas reflete uma recuperação desproporcional das estruturas que compõem a camada mucosa do intestino e, quanto maior a  $V_V$  do epitélio, menor a  $V_V$  da lâmina própria. Embora os vilos já tenham exibido uma marcada recuperação, eles ainda são menores em relação à atividade de outono e, apesar disso, a  $S_V$  do epitélio é maior, sugerindo uma superfície mais “pregueada”. Somado a essas características, o aumento de mais de 2 vezes da massa do intestino e a ausência de variação na espessura da túnica muscular, sugerem que a recuperação do órgão envolve variação no diâmetro ou aumento no comprimento do tubo. O crescimento do intestino e uma  $S_V$  do epitélio maior são extremamente importantes para aumentar a capacidade absorptiva do órgão nesta fase, quando



os animais voltam a crescer a taxas elevadas, aumentando sua massa corpórea em mais de 10 vezes até o início do verão (Souza *et al.*, 2004).

Nos teiús, assim como em outros animais, apesar de o estímulo alimentar não ser necessário para aumentar as taxas de proliferação celular (Starck & Beese, 2002; Hume *et al.*, 2002), ele parece desempenhar um papel fundamental no crescimento e recuperação do tecido intestinal. A massa do intestino de *C. alboguttata* aumentou 450%, com um crescimento no comprimento e diâmetro do tubo e um crescimento adicional de 40% na altura dos vilos em 36h após a ingestão de alimento que seguiu a fase de estivação (Cramp & Franklin, 2005). O estímulo alimentar também parece ser essencial na recuperação do tecido da ave migratória *Calidris canutus islandica* que, após a perda de massa intestinal na fase que antecede o vôo migratório, recupera o tecido exibindo um aumento da massa do intestino em 10 dias de permanência numa estação de reabastecimento, durante a migração (Piersma *et al.*, 1999). Na marmota *Marmota marmota*, cerca de três meses após o despertar da hibernação, a massa do intestino aumenta 259% e a camada mucosa praticamente dobra sua espessura (Hume *et al.*, 2002). Esse aumento no intestino delgado é semelhante ao aumento da massa da mucosa por centímetro de intestino no esquilo hibernante *S. tridecemlineatus*, num mesmo intervalo de tempo em atividade. (Carey *et al.*, 1990). Um padrão similar de recuperação do tecido intestinal foi observado em cobras píton *Python molurus*, somente a escala de tempo difere; nesses animais a massa do intestino dobrou após a alimentação em seguida do jejum prolongado (Secor & Diamond, 1998a). Em 48-72h após a ingestão de alimento, a espessura da camada mucosa do intestino aumentou o máximo, alcançando valores próximos a 300% do observado no jejum, com um aumento de 129% no comprimento dos vilos e de 6 vezes no comprimento dos microvilos, além de uma circunferência do tubo aumentada sem alteração na espessura da túnica muscular (Secor & Diamond, 1998a; Starck & Beese, 2001).

Adicionalmente, diversos estudos com cobras mostram que a alimentação após um prolongado tempo de jejum induz um aumento no tamanho dos enterócitos, com a incorporação de gotículas de gordura e um aumento de fluido no interior das células (Secor & Diamond; 1998a; Starck & Beese, 2001; Starck & Beese, 2002; Lignot *et al.*, 2005). Num padrão similar ao observado nos teiús entre as fases de atividade de outono e despertar, a conformação estrutural do

---

epitélio muda e passa de pseudoestratificado para colunar simples. Esses dados sugerem que, nesses animais, a hipertrofia seria o mecanismo que mais contribui para o aumento da massa da mucosa intestinal. De fato, a retomada da alimentação, com conseqüente aumento da perfusão do tecido e aumento do calibre dos vasos linfáticos e sanguíneos da lâmina própria fizeram com que Starck & Beese (2001) propusessem um modelo de bomba hidráulica que inflaria os enterócitos, modificando o padrão das células do epitélio e aumentando inclusive o tamanho dos microvilos, cuja expansão é maior, podendo amplificar a capacidade absorptiva do intestino mesmo quando as reservas energéticas endógenas estão exauridas. No entanto, esse mecanismo contraria a idéia prévia de Secor & Diamond (1995), de que as gotículas de gordura presentes nos enterócitos seriam de origem endógena e seriam mobilizadas para o intestino numa fase em que o tecido teria uma alta demanda energética devido a altas taxas de proliferação celular e atividade mitótica, e ambas as hipóteses ainda precisam ser elucidadas. Em aves e mamíferos, ao contrário do que acontece com ectotermos, a hiperplasia parece ser o principal mecanismo envolvido na recuperação do tecido intestinal, apesar de a hipertrofia também poder contribuir com certa parcela para o aumento da mucosa (Carey & Martin, 1996; Durnel-Erb *et al.*, 2001; Starck 1996).

Os animais ativos na primavera foram mortos 30-40 dias após o despertar e neste momento as respostas do tecido intestinal pouco se assemelham em intensidade aos ajustes rápidos na morfologia e na função do intestino observados em animais que se alimentam esporadicamente e enfrentam longos intervalos de tempo em jejum. Mas, o crescimento do intestino aliado a um aumento na  $S_v$  do epitélio sugerem uma resposta compensatória que amplifica a capacidade absorptiva do tecido após sofrer grande atrofia na dormência. No esquilo *S. tridecemlineatus*, a área de superfície da mucosa também é maior durante a primavera, mas, diferentemente dos teiús, ela acompanha um aumento na altura dos vilos e essas variáveis são maiores que no outono podendo contribuir dessa forma para aumentar a capacidade absorptiva do tecido e acelerar o ganho de peso dos animais (Carey, 1990). No entanto, os teiús são jovens e estão em fase de intenso crescimento corpóreo e, portanto, de órgãos, ao contrário dos outros estudos que foram realizados com animais adultos, nos quais a proporção entre massa corpórea e massa intestinal já se encontra definida.

Assim, nos teiús, o aumento da capacidade absorptiva do intestino nesta fase, proporcionaria aumento da captação de nutrientes destinados ao crescimento.

Em animais submetidos ao jejum na atividade, a atrofia da camada mucosa, com redução na sua densidade de volume ( $V_V$ ), é dada por uma diminuição na altura dos vilos e na  $V_V$  do epitélio, mas não na  $V_V$  da lâmina própria. Por outro lado, a espessura da túnica muscular que não variou ao longo do ciclo anual, aumenta 51% em relação aos animais alimentados. No conjunto, os dados sugerem que a diminuição de 49% da massa do intestino se dá com maior intensidade noutra região do órgão, ou ainda, no comprimento e/ou diâmetro do tubo. Essa atrofia é substancialmente maior que aquela observada na dormência, de modo que a contribuição relativa do tecido para economia de energia durante o jejum na atividade é maior. Por outro lado, as alterações na mucosa correspondem, em média, à metade daquelas observadas em 2/3 de dormência e a  $S_V$  do epitélio apresenta o mesmo grau de redução em animais dormentes, sugerindo que, embora atrófico, o intestino mantenha sua capacidade estrutural para digerir e absorver nutrientes tão logo seja recrutado.

As diferenças na reorganização estrutural do intestino entre animais submetidos ao jejum na atividade e animais dormentes se dão muito provavelmente em função do caráter previsível e antecipatório na dormência. Essa antecipação pode ser observada também na ave migratória *Calidris canutus islandica*, capaz de diminuir 36% a massa do intestino na semana que antecede a retomada do vôo na migração (Piersma, *et al.*, 1999).

Secor (2005) sugere que, além do caráter endógeno de antecipação ao jejum, animais que exibem dormência sazonal, como anuros estivantes, respondem diferentemente à privação alimentar na atividade. Segundo ele, para animais que não estiveram e se alimentam freqüentemente, ter um intestino que responde ao jejum com o mesmo grau de atrofia dos animais que estiveram seria energeticamente inviável. Mantendo o intestino num “estado de prontidão”, animais que se alimentam freqüentemente podem digerir rápido e eficientemente.

Embora 30 dia de jejum tenham sido suficientes para reduzir significativamente a espessura da mucosa do intestino do lagarto *Heloderma suspectum*, diferentemente dos teiús, a espessura da túnica muscular não se altera (Cristel *et al.*, 2007). Embora o jejum na primavera tenha induzido um aumento da espessura da túnica muscular do intestino nos teiús, pouco se sabe sobre os

efeitos do 'desuso' prolongado do intestino sobre a morfologia da túnica muscular. Alguns estudos mostram que a ausência de alimento no tubo intestinal muda o padrão de motilidade do trato gastrintestinal, podendo afetar os padrões de digestão e retomada da alimentação (Clench & Mathias, 1995 *apud* Cramp *et al.*, 2005). Mas como essas mudanças na motilidade do órgão estão associadas com as concomitantes mudanças na morfologia da musculatura intestinal ainda não é claro. Alternativamente, um aumento na espessura da túnica muscular do intestino dos teiús pode ser o reflexo de um artefato associado com o retraimento dessa parte do tecido durante a coleta do material, muito embora fosse esperado um mesmo efeito em todas as fases do ciclo anual.

### **3. Mudanças no Teor de Água e Proteínas**

Grande parte da perda de massa corpórea que se observa nos teiús durante a dormência ( $\approx 15\%$ ) aparentemente deve-se à perda evaporativa de água e mais de 65% da redução da massa é recuperada rapidamente após a ingestão de água no despertar (Souza *et al.*, 2004). Alterações da massa e outras variáveis analisadas no intestino dos teiús poderiam ser dadas em função do estado de hidratação do órgão. No entanto, o conteúdo de água do intestino médio dos lagartos não varia substancialmente ao longo do ciclo anual, com exceção de um pequeno aumento de 3-4% no despertar. Souza *et al.* (2004) não observaram alteração no teor de água do músculo esquelético dos teiús no despertar, porém o teor de água no plasma diminui significativamente e, no conjunto, os dados sugerem que a perda evaporativa de água afeta principalmente o compartimento extra-celular, que inclui sangue e interstício. Após 2/3 do tempo total de dormência, a cloaca dos teiús por vezes encontrava-se cheia de água e, no despertar, não havia água neste compartimento (Lucas, F. R. N., observação pessoal). Em répteis, além de o conteúdo da cloaca poder ser direcionado de volta para o intestino e a água ser reabsorvida (Walker & Liem, 1994), a alta vascularização da mucosa cloacal sugere a capacidade de reabsorção de água na própria cloaca (Maloiy, 1979). No sapo *Pseudacris crucifer* a estivação causa uma perda de 50% da massa corpórea, porém, o teor de água dos órgãos notavelmente apresenta apenas pequenas variações e o conteúdo de água do

---

intestino, bem como dos rins e do músculo esquelético não varia (Churchill & Storey, 1994).

A redução da umidade relativa do ar e a não ingestão de alimentos e de água durante a dormência tornam a desidratação um problema potencial para os animais, pois, apesar de adaptados para realizarem economia de água, os répteis inevitavelmente perdem água por evaporação através da respiração, através da pele (passando pelo complexo de queratina e lipídios), ou pela superfície ocular (Mautz, 1982). Porém, diversos mecanismos comportamentais e fisiológicos ajudam a minimizar a perda evaporativa de água na dormência. Nos teiús, um padrão de ventilação episódica, com longos intervalos de tempo em apnéia (Andrade & Abe, 1999), possivelmente associado à vasoconstrição periférica evita a perda de calor corpóreo e ajuda a reduzir a perda de água. Além disso, na fase dormente os teiús se recolhem em abrigos subterrâneos (Abe, 1995) protegendo-se da dessecação e do ataque de predadores. Esta resposta comportamental pode ser observada em outros grupos de animais, como cobras, peixes de respiração aérea que habitam águas salobras, sapos e roedores, e alguns deles ainda são capazes de acumular grandes reservas de água que os mantêm hidratados nesta fase. Anuros, por exemplo, armazenam uma enorme quantidade de água na bexiga que é lentamente reabsorvida para reabastecer os estoques de água perdidos durante a estivação (Storey, 2002). Eles podem perder de 25 a 60% da massa corpórea em função da perda de água e há uma correlação positiva entre a tolerância à desidratação e o grau de terrestrialidade das espécies.

Alguns estudos sugerem a manutenção de altos níveis de glicose plasmática como mecanismo de prevenção à desidratação e de retenção de água durante a estivação. Essa resposta hiperglicêmica e o aumento da osmolaridade sanguínea resultante parecem estar relacionados a situações nas quais a umidade relativa no interior do hibernáculo é muito baixa (Churchill & Storey, 1994). No entanto, o que se observa nos teiús é uma queda de 60% nos níveis de glicose circulante durante a dormência (Souza *et al.*, 2004), sugerindo a atuação de outros mecanismos de controle da hidratação das células intestinais que não envolvem a ação do hormônio insulina, o qual reconhecidamente tem a função de aumentar o volume de água nas células (Häussinger, 1996). No homem, por exemplo, a fosforilação da tirosina é um passo essencial no aumento do volume e

hidratação dos enterócitos (Tilly *et al.*, 1993). A elevação da osmolaridade dos fluidos corpóreos, através do acúmulo de osmólitos de baixo peso molecular, pode ser vista em vários peixes, anfíbios e cobras, que acumulam uréia em altas concentrações (Storey, 2002), em especial aqueles que estiveram em condições secas e águas salobras (Churchill & Storey, 1994). Nos teiús, há um aumento de 5% da osmolaridade do plasma na dormência, mas esse aumento parece ser resultado da desidratação do animal, já que a concentração de uréia não varia ao longo do ciclo anual (Souza *et al.*, 2004).

No despertar, o pequeno aumento na concentração de água do intestino dos teiús decorre, muito provavelmente, da ingestão de grande quantidade de água. Uma vez que o grau de hidratação da célula exerce forte influência sobre o metabolismo celular (Lang & Waldegger, 1997), a entrada de água nos enterócitos restabeleceria as condições fisiológicas necessárias à retomada das funções de digestão e absorção do tecido no retorno à atividade. Adicionalmente, o aumento da frequência cardíaca e a reperfusão do intestino no despertar poderiam expor o tecido a um estresse oxidativo, e este é outro elemento capaz de defender uma constância volumétrica que controla a ciclagem de substratos energéticos e permite que as células desempenhem suas funções (Häussinger, 1996).

A ausência de diferença estatística entre os grupos de animais alimentados e não alimentados na atividade de primavera, sugere que 20 dias de privação alimentar não alteram a concentração de água do tecido. Este resultado não surpreende, uma vez que os animais ativos tiveram acesso à água e, ao contrário dos animais na dormência, eles aparentemente ingeriram água durante o jejum.

Além de alterações no estado de hidratação das células exercerem um papel regulador sobre várias funções celulares, há evidências de que essas mudanças constituem um importante fator na ciclagem de proteína, sendo a degradação de proteína ativada em resposta à desidratação e a síntese ativada em resposta ao aumento da concentração de água nas células (Häussinger *et al.*, 1993). Embora não tenha sido observada alteração significativa no teor de água do tecido intestinal dos lagartos durante a dormência, acompanhando a atrofia do tecido nesta fase há uma redução na concentração de proteína total expressa tanto por unidade de massa úmida quanto por unidade de massa seca. Diferentemente, no despertar, quando o tecido está mais atrofico, a concentração

de proteína total é similar aos valores de atividade de outono e atividade de primavera, sugerindo que, por unidade de massa, o tecido já esboça sinais de recuperação antes mesmo da retomada da alimentação. Em *C. alboguttata*, o retorno aos padrões metabólicos de atividade após a estivação estaria associado com um aumento nas taxas de síntese protéica no tecido antes da retomada da alimentação e, conseqüentemente, há um aumento na altura e densidade dos microvilus (Cramp & Franklin, 2005).

Parte do aumento da taxa metabólica que acompanha o despertar dos teiús pode ser dado pelo aumento das taxas de síntese de proteínas de grande peso molecular no tecido intestinal. A ingestão de grande quantidade de água nesta fase restabeleceria as condições osmóticas no interior dos enterócitos, liberando citocinas, fatores de crescimento, ou outras moléculas que promovem a síntese protéica para o crescimento e reconstituição anatômica do órgão como sugerido no despertar de pequenos mamíferos hibernantes (Carey *et al.*, 2001), em preparação para o retorno à atividade. De fato, como mencionado anteriormente, o estímulo alimentar não parece ser necessário para aumentar as taxas de proliferação celular e a análise histológica do intestino dos teiús mostra uma grande concentração de células na extremidade da lâmina própria e base do epitélio na dormência e despertar. Alternativamente, a retomada dos padrões de concentração de proteína total no despertar poderia envolver um ajuste na síntese de proteínas de membrana, que no intestino, além de controlarem o gradiente iônico e a concentração osmótica dos enterócitos, estão envolvidas no processo de absorção de nutrientes durante a digestão. Além disso, um aumento na concentração de enzimas digestivas nos enterócitos poderia contribuir para o aumento na concentração de proteína total nesta fase. Todos esses ajustes seriam importantes para compensar a atrofia do tecido no momento do despertar, de maneira a permitir a absorção de nutrientes com a retomada da alimentação na atividade.

No entanto, a concentração de proteínas solúveis, envolvidas em diversos passos na provisão de ATP para as funções celulares, continua baixa no despertar e exibe um grau de depressão ainda maior que na dormência. Uma hipótese alternativa para o aumento na concentração de proteína total do tecido intestinal dos teiús no despertar seria a absorção de proteínas presentes no lúmen ou mobilizadas de outros tecidos, que serviriam como suprimento

energético para os enterócitos ou para reconstrução do tecido atrofico. Carey (1995) sugere que, durante o jejum na hibernação, as células intestinais que foram descartadas no lúmen podem ter seus constituintes reabsorvidos e utilizados na provisão de energia para o próprio tecido. Nos teiús, o conteúdo de proteína total do músculo da cauda chega a diminuir 50% no despertar, comparado com os valores observados no final do outono, e o precipitado de ácido úrico expelido da cloaca no despertar é outro forte indicativo de mobilização de proteína durante o jejum na dormência, que é possivelmente intensificada no despertar (Souza *et al.*, 2004).

A concentração de proteína total por unidade de massa úmida é muito semelhante nos grupos de animais ativos no outono e na primavera e o mesmo se observa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum. Quando expressa por unidade de massa seca, a variação individual na concentração de proteína total é mais acentuada, embora também não haja diferença entre os grupos. No conjunto, os dados sugerem que, a concentração de proteína total, expressa tanto por massa úmida quanto por massa seca, mostra um mesmo padrão de variação no ciclo anual, com diminuição na dormência em relação à atividade de outono (23 e 19% respectivamente) e exibindo um aumento no despertar em relação à dormência (14 e 13% respectivamente). Assim, ambos os efeitos são contrários à hipótese de uma superestimativa da concentração de proteína total na dormência, devido à perda de água e de uma subestimativa no despertar, devido à ingestão de água e re-hidratação do tecido, confirmando a idéia de que há uma variação significativa no 'pool' de proteína total por unidade de massa durante a dormência sazonal.

Do "pool" de proteína total presente no tecido intestinal dos teiús, a fração solúvel representa um elevado percentual em todas as fases: 87% na atividade de outono, 90% na dormência, 65% no despertar e 96% na atividade de primavera. Ela é composta principalmente por proteínas de baixo peso molecular, como as enzimas do metabolismo intermediário, e sua concentração diminui significativamente na dormência, sendo ainda menor no despertar. Em animais submetidos ao jejum na primavera o percentual de proteínas solúveis, que corresponde a 69% do total de proteínas, também diminui em comparação com animais alimentados na mesma fase, mas essa redução não chega a ser tão pronunciada quanto no despertar.



As mudanças sazonais no teor de proteínas solúveis do tecido intestinal muito provavelmente refletem a regulação da concentração de enzimas envolvidas na produção de energia nos enterócitos. Como a dormência nos teiús é um fenômeno de origem endógena, que envolve a antecipação como forma de preparação para as respostas fisiológicas apresentadas ao longo do ciclo anual, diferentes sinais ambientais podem estar envolvidos na ativação de mecanismos responsáveis por diferenças na expressão de genes que codificam essas enzimas. Por exemplo, no esquilo *S. tridecemlineatus*, a expressão gênica diferenciada das enzimas PDK-4 e PTL no tecido cardíaco inibe a produção da ATP a partir da glicólise e promove o uso de lipídios como principal fonte de energia para o tecido durante a dormência (Andrews, 2004). Por outro lado, a presença de nutrientes no trato digestório e o estado nutricional do animal parecem exercer forte influência sobre a expressão gênica dessas enzimas, como mostram os resultados de concentração de proteínas solúveis no intestino dos teiús submetidos ao jejum na primavera.

Os processos que controlam as taxas de catabolismo dos produtos gênicos nos teiús provavelmente são diferentes daqueles presentes em mamíferos hibernantes, nos quais as baixas temperaturas exercem um efeito predominante sobre o metabolismo dos animais. Estudos com estes animais revelam que a síntese de proteínas é altamente deprimida durante a hibernação (Van Breukelen & Martin, 2002), através da diminuição da expressão gênica e dos processos de transcrição e tradução, que consomem muita energia nas células (Rolfe & Brown, 1997). Somente a transcrição é responsável por 1-10% do consumo total de energia e a depressão deste processo relaciona-se com a baixa temperatura corpórea, característica do estado de torpor em hibernantes. Estes animais retomam a temperatura corpórea (eutérmica) durante os vários episódios de despertar ao longo da hibernação. Nesse processo, a depressão é revertida e a transcrição de produtos de genes envolvidos possivelmente é ativada, permitindo a reposição do pool de proteínas que foi lentamente catabolizado na dormência (Van Breukelen & Martin, 2002).

O exato sinal nas vias de transdução que resulta em taxas de síntese protéica reduzidas no intestino ainda é desconhecido. Na atrofia muscular, várias mudanças operam em diferentes níveis de organização, por exemplo, o transporte “prejudicado” de íons no sarcolema, que resulta em mudanças nas taxas de

---

renovação e degradação de proteína, o aumento do número de lisossomos e vacúolos autofágicos contendo enzimas proteolíticas, o aumento nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que estimulam a resposta autofágica, e o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio que vazam da membrana mitocondrial durante a respiração aeróbica e degradam proteínas e lipídios (Hudson & Franklin, 2002). Este último ajuste tem sido reportado no intestino médio de mamíferos hibernantes, associado ao torpor e episódios de despertar (Fleck & Carey, 2005) e seria um possível candidato na regulação da concentração de proteínas do intestino dos teiús.

#### **4. Reorganização Metabólica**

Em forte consonância com o padrão de ajuste do 'pool' de proteínas solúveis do tecido intestinal, a concentração das enzimas reguladoras do fluxo de substratos energéticos, HOAD, CS e GDH, encontra-se diminuída na dormência e despertar, como sugerem as medidas das atividades máximas destas enzimas. Por outro lado, destaca-se o fato de que a atividade de pelo menos três enzimas glicolíticas e da transaminase AspAT não variou ao longo do ciclo anual.

A manutenção da capacidade para utilização de carboidratos ao longo de todo o ciclo anual, dada pela ausência de variação na atividade máxima das enzimas glicolíticas, sugere que os carboidratos desempenham um papel importante na provisão de energia para o tecido intestinal nos teiús. Além disso, as altas atividades da HK e da PK sugerem que o tecido possui um elevado potencial para o uso aeróbio de glicose. A atividade da PK no intestino se equipara à atividade desta enzima no coração, ao passo que a atividade da LDH é relativamente baixa e se assemelha somente àquela observada no tecido cerebral (Souza *et al.*, dados não publicados). A atividade máxima da HK, considerada um bom indicador da capacidade de oxidação aeróbia de glicose (Crabtree & Newsholme, 1972) é similar à observada no coração e no cérebro, tecidos que tipicamente exibem altas taxas de consumo de glicose na via aeróbia de produção de ATP.

Em mamíferos, evidências sugerem que o principal substrato energético do tecido intestinal é a glutamina. No entanto, Newsholme & Carrié (1994) mostraram que a atividade da HK na mucosa intestinal é até 10 vezes maior que o fluxo de

glicose na via glicolítica, de tal modo que se o fluxo de glicose no intestino fosse dado pela atividade dessa enzima, ele seria maior inclusive que no próprio cérebro. Os autores sugerem a participação de um mecanismo de controle inibitório da atividade dessa enzima no enterócito, possivelmente a atividade da glicose-6-fosfatase, que no estado alimentado tem sua atividade máxima similar à da HK. Mas, o porquê da existência dessa via de restrição da utilização de glicose no intestino ainda é desconhecido, embora esse mecanismo possa favorecer o uso da glicose circulante pelos tecidos dependentes de glicose no jejum a longo prazo, como na dormência. Por outro lado, a relevância de uma capacidade glicolítica tão elevada poderia estar relacionada com a produção de piruvado e sua utilização na transaminação de glutamato, levando à produção de 2-oxoglutarato (Duée *et al.*, 1995). Esta reação é catalizada pela enzima glutamato desidrogenase (GDH), presente em altas concentrações no fígado dos teiús assim como em mamíferos. No presente trabalho, a atividade desta enzima foi detectada no intestino dos teiús, como discutiremos mais adiante. Corroborando essa idéia, Fleming *et al.* (1997) mostraram que a produção de ATP no intestino de ratos foi maior quando ambos os substratos, glicose e glutamina, estavam presentes simultaneamente. Aparentemente, o mesmo padrão se aplica para o teiú, sugerindo que a glicose desempenha um papel semelhante no metabolismo do tecido intestinal desses animais. Assim, o intestino médio dos teiús possui ao menos parte dos atributos envolvidos com a função sugerida para a via glicolítica no mesmo tecido em mamíferos.

A análise de correlação da atividade das enzimas PK e LDH, PK e CS, LDH e CS sugere que as concentrações dessas enzimas não variam de maneira coordenada ao longo do ciclo anual. No entanto, as razões HK:CS, PK:CS e LDH:CS sugerem que durante a dormência e no despertar o fluxo de glicose nas vias de produção de energia estaria facilitado no intestino, tanto em ausência quanto na presença de O<sub>2</sub>. A atividade da via glicolítica pode levar à produção de energia no ciclo de Krebs a partir de piruvato ou, ainda, resultar na oxidação incompleta de piruvato e formação de lactato. O lactato formado no intestino pode ser exportado através da corrente sanguínea para outros tecidos como o cardíaco, e então ser utilizado como substrato energético ou, ainda, ser convertido a piruvato novamente para a síntese de glicose na gliconeogênese, como proposto em mamíferos (Stoll *et al.*, 1999).

A razão PK:LDH é comumente utilizada para indicar se a produção de piruvato é limitante como substrato para o metabolismo mitoncondrial, ou se há competitividade por NADH em razão das taxas de fluxo no sentido da produção de lactato (Hochachka *et al.*, 1992). No intestino dos teiús, esta razão é praticamente constante ao longo do ano ( $\approx 0,5$ ), mostrando que a concentração de LDH encontra-se em excesso em relação à capacidade de formação de piruvato, favorecendo a produção de lactato. O pequeno aumento de 20% na dormência sugere uma maior eficiência energética do tecido, favorecendo o uso aeróbio de glicose. Da mesma forma, no músculo esquelético do teiú, embora os valores absolutos das  $V_{m\acute{a}x}$  dessas enzimas sejam maiores, a razão entre PK:LDH ao longo do ciclo anual é similar àquela do intestino e não se altera significativamente na dormência, sugerindo a manutenção do fluxo de glicose em direção à formação de lactato (Souza *et al.* dados não publicados).

Em mamíferos, a capacidade do intestino de transportar d-glicose é mantida durante a hibernação, enquanto a velocidade de transporte é aumentada, o que confere maior eficiência absorptiva ao tecido, característica importante para a retomada da alimentação no despertar (Carey, 1990; Carey & Sills, 1996). Em muitos répteis, o estágio inicial de dormência é marcado por uma hipoglicemia, porém, há um aumento gradual da glicemia durante a dormência, concomitante à redução do glicogênio hepático (Gregory, 1982). Num padrão distinto, nos lagartos teiú há uma queda da ordem de 60% dos níveis de glicose circulante na fase dormente, retornando aos valores de atividade apenas no momento do despertar, antes da retomada da alimentação (Souza *et al.*, 2004). Os autores sugerem que essa elevação dos níveis glicêmicos no despertar é um forte indicativo de aumento das taxas de gliconeogênese, importante para a manutenção dos níveis plasmáticos de glicose quando as reservas de glicogênio encontram-se depletadas. O fornecimento constante de glicose é necessário para o metabolismo de diversos tecidos, especialmente o cérebro e o restante do sistema nervoso, a medula renal, os testículos, os eritrócitos e os tecidos embrionários, que dependem de glicose para seus requerimentos energéticos (Nelson & Cox, 2002). Assim, os níveis glicêmicos são cuidadosamente mantidos através de uma complexa rede, que envolve fígado, rim, pâncreas, tecido adiposo, músculos e cérebro. Em vários animais estudados, a PEPCK foi encontrada principalmente no fígado e nos rins, porém, o intestino médio tem sido

---

sugerido como um terceiro sítio de produção endógena de glicose (Croset *et al.*, 2001; Mithieux *et al.*, 2006). Os substratos da enzima são lactato, glicerol e aminoácidos e a preferência parece estar associada à distribuição intracelular da enzima, citosólica ou mitocondrial, a qual é variável entre espécies (Croninger *et al.*, 2002).

A FBPase é uma enzima da via gliconeogênica e pode ser um passo limitante na produção endógena de glicose. No presente estudo, a taxa de reação desta enzima não foi detectada, sugerindo baixa concentração da enzima no tecido intestinal do teiú. Outra enzima reguladora das taxas de produção de glicose, a PEPCK, apresentou uma atividade relativamente alta, apenas 34% menor que no fígado durante a atividade de primavera (Haddad, 2007). Na dormência e no despertar, a atividade da PEPCK está diminuída no intestino acompanhando a depressão metabólica do animal. Apesar do jejum e dos baixos níveis de glicose circulante, o tecido intestinal aparentemente não cumpre um papel importante no suprimento de glicose para o animal através da gliconeogênese nessas duas fases, pois além da atividade da PEPCK diminuída, o intestino encontra-se atrófico e a capacidade gliconeogênica total do órgão é ainda menor. Na atividade de primavera, quando o animal já recuperou sua massa intestinal, esta passa a representar 1,67% da massa corpórea, enquanto a massa do fígado representa 1,45% da massa total do animal. Em conjunto, os dados sugerem que nesta fase, os dois órgãos contribuem de maneira similar para a produção de glicose. Essa capacidade de sintetizar glicose a partir de outros precursores possibilita que o intestino converta substratos, como o lactato resultante da oxidação anaeróbia de glicose, em piruvato, para re-síntese de glicose ou transaminação de aminoácidos como a glutamina (Duée *et al.*, 1995).

A aparente preferência do tecido intestinal de mamíferos por glutamina (Newsholme & Carrié, 1994; Duée *et al.*, 1995) e o elevado catabolismo protéico no tecido muscular esquelético na dormência e despertar (Souza *et al.*, 2004) sugere que o metabolismo de aminoácidos poderia desempenhar um papel importante nos ajustes sazonais ao jejum. No intestino do teiú, a atividade da glutamato desidrogenase (GDH) diminui substancialmente no despertar quando os níveis de glicose sanguínea estão retomando seus valores normais (Souza *et al.*, 2004), diferentemente do que se observa no homem, onde a restrição calórica

no jejum e os baixos níveis de glicose plasmática induzem um aumento na concentração dessa enzima (Nelson & Cox, 2000).

No intestino dos lagartos, as taxas de atividade da GDH são baixas comparativamente às taxas da AspAT, a qual mantém seus níveis elevados e constantes ao longo de todo o ciclo anual. Como consequência, a razão AspAT:GDH é alta em todas fases do ciclo, sugerindo que neste tecido o glutamato é preferencialmente metabolizado por uma aminotransferase em comparação à reação de desidrogenação da GDH, em especial no despertar, quando a razão é ainda maior. O produto final da ação dessas enzimas, o  $\alpha$ -cetoglutarato, pode ser usado para regeneração do ciclo de Krebs ou ainda ser convertido a piruvato e posteriormente a acetil-CoA, que é decarboxilado nas reações do ciclo de Krebs para geração de ATP (Newsholme & Carrié, 1994). Adicionalmente, a alta atividade da AspAT também pode envolver a transaminação de aspartato a oxalacetato e vice-versa e dessa forma também contribuir para a regeneração de intermediários do ciclo de Krebs, cuja concentração é mantida quase sem variação nas células (Nelson & Cox, 2000). Em animais ativos no outono e na primavera, a atividade da AspAT e da GDH no intestino é cerca de 80% menor e mais de 2 vezes maior, respectivamente, em relação ao coração, um tecido de alto desempenho aeróbio que consome diferentes substratos energéticos. Porém, as razões AspAT:CS e GDH:CS aumentam mais de 2 vezes e 84% na dormência, respectivamente, diminuindo gradativamente no despertar até exibir em animais ativos na primavera, os mesmos valores da atividade de outono. Essas altas razões sugerem que o tecido possui grande potencial para oxidação de aminoácidos ao longo de todo o ciclo anual e, em especial, durante a dormência, além de favorecer a regeneração do ciclo de Krebs.

Paralelamente, a atividade da HOAD, enzima mitocondrial limitante das taxas de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, exibe uma atividade relativamente alta no tecido intestinal maior do que no coração (Souza *et al.*, dados não publicados). No ciclo anual, a atividade da HOAD no intestino acompanha a redução da taxa metabólica do animal e reduz drasticamente durante a dormência, voltando aos valores de pré-dormência somente na atividade de primavera, com a retomada da alimentação. A alta atividade da HOAD revela um alto potencial de oxidação lipídica do tecido, perfeitamente ajustado à atividade da CS. Além disso, a alta

atividade da HOAD também pode estar relacionada à grande quantidade de macrófagos e linfócitos presentes na mucosa intestinal. Essas células e as células endoteliais dos vasos ocupam uma parcela considerável da mucosa do intestino, e utilizam, além de glutamina, grande quantidade de ácidos graxos de cadeia longa como fonte energética (Newsholme & Carrié, 1994).

À semelhança do miocárdio, o tecido intestinal parece ter o potencial de uso de diferentes substratos energéticos, carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, porém, a seleção do substrato a ser usado é um processo dinâmico e varia em função do estado nutricional e metabólico do animal. Buschmann & Schaper (1999) mostraram que o miocárdio de mamíferos, que preferencialmente consome ácidos graxos, sob condição isquêmica aumenta o uso de carboidratos; e essa mudança deve-se ao fato de que, por mol de O<sub>2</sub> obtém-se mais ATP a partir da oxidação de carboidratos. O intestino dos teiús possivelmente responde da mesma forma durante a dormência, já que a frequência cardíaca muito reduzida e a menor densidade de volume (V<sub>v</sub>) do epitélio e da mucosa podem caracterizar uma condição isquêmica.

Da mesma forma, a CS, enzima indicadora da capacidade aeróbica, exibe um padrão similar de inibição da sua atividade durante a dormência, acompanhando a redução do consumo de O<sub>2</sub> do animal nesta fase. Em animais ativos, a V<sub>máx</sub> da CS no intestino é 64% menor que no tecido cardíaco e 75% menor do que no cérebro dos teiús, mas é semelhante à atividade no fígado (Souza *et al.*, 2004). Porém, a redução na atividade da CS é um pouco mais acentuada do que da HOAD e como resultado, a razão HOAD:CS que já se mantém relativamente alta (3-4) durante a atividade, é ainda maior na dormência. Esses dados sugerem que o intestino pode ser um sítio de cetogênese durante a dormência, provendo outros tecidos com uma fonte alternativa de energia, em especial os tecidos glicose-dependentes, dado que nesta fase os níveis plasmáticos de glicose encontram-se reduzidos (Souza *et al.*, 2004). Por outro lado, a forte correlação positiva entre as atividades máximas da HOAD e da CS nas fases de dormência (R=0,84), despertar (R=0,66) e atividade de primavera (R=0,69) sugere a existência de um mecanismo de controle que age regulando as taxas de oxidação de ácidos graxos no intestino durante o prolongado jejum no ciclo anual e durante a retomada da atividade na primavera.

Em animais submetidos ao jejum na primavera, todas as enzimas analisadas no tecido intestinal apresentam um padrão de redução das suas taxas, inclusive as enzimas da via glicolítica, HK, PK e LDH, cuja atividade máxima encontra-se diminuída em comparação aos animais alimentados. Esses dados sugerem que há uma diferença entre o jejum associado à depressão metabólica na dormência de inverno e o jejum em animais ativos. Provavelmente, a ausência de uma fase preparatória, com acúmulo de substratos, e a incapacidade de 'prever' a duração do jejum resultam no contraste observado. Nesta condição nutricional, as razões PK:LDH e PK:CS diminuem, sugerindo que o fluxo na via glicolítica está reduzido e, a análise de correlação da atividade da PK e da LDH ( $R=0,97$ ) revela que a diminuição na concentração destas enzimas parece acontecer de maneira coordenada. A razão LDH:CS na dormência aumenta 121%, devido ao efeito predominante de inibição da CS e, portanto, da atividade oxidativa mitocondrial, enquanto que no jejum durante a atividade essa variação é menor, 44%, dada a inibição do fluxo da via glicolítica concomitante ao da via mitocondrial. Talvez a ausência da fase preparatória e da formação de reservas de carboidrato, especialmente no fígado (Souza *et al.*, 2004), esteja associada a este contraste na regulação da via glicolítica durante o jejum na atividade, favorecendo a captação de glicose disponível pelos tecidos glicose-dependentes.

A PEPCK também apresentou uma tendência à diminuição em animais submetidos ao jejum, numa condição nutricional onde esperaríamos que ela estivesse mais expressa. Assim como no jejum durante a dormência, a contribuição do intestino para a manutenção dos níveis plasmáticos de glicose parece irrelevante e o seu papel na gliconeogênese deve ser desempenhado apenas em condições menos severas de jejum, nas quais os demais ajustes de inibição metabólica não são ativados. Manter um maior potencial gliconeogênico no intestino durante a atividade seria importante para que os animais pudessem responder rapidamente a flutuações de curto prazo não previsíveis na disponibilidade de alimento. Os principais precursores da gliconeogênese no intestino médio de ratos são glutamina e glicerol (Croset *et al.*, 2001) e, diferentemente dos teiús, nesses animais o jejum induz o aumento da gliconeogênese no tecido intestinal, que passa a ser responsável pela produção de um terço da glicose endógena depois de 72 horas de privação alimentar (Mithieux *et al.* 2006). Num intervalo de tempo maior de restrição alimentar,



Habold *et al.* (2005) também mostraram um aumento de 30 vezes na atividade da PEPCK no intestino e o principais precursores gliconeogênicos nesta fase são aminoácidos provenientes do catabolismo de proteínas.

A AspAT não variou durante todo o ciclo anual, mantendo suas taxas de atividade em animais submetidos ao jejum, enquanto que a GDH exibiu uma queda semelhante àquela observada no final da dormência e despertar. Com a redução da  $V_{máx}$  da CS, a razão GDH:CS não variou, mas a manutenção das taxas da AspAT resultou numa razão AspAT:CS 54%, maior em animais submetidos ao jejum, semelhante ao observado na dormência, porém com uma magnitude menor. A atividade da HOAD e da CS também diminuiu substancialmente no intestino e o grau de redução foi semelhante àquele observado na dormência de inverno. Como ambas diminuíram sua concentração, a razão entre essas duas enzimas não variou muito e continuou elevada, sugerindo que nessa condição nutricional o tecido mantém seu potencial para produção de corpos cetônicos. No entanto, diferentemente do que se observa na dormência, no despertar e em animais alimentados na primavera, quando ambas as enzimas apresentam atividades máximas com forte correlação positiva, em animais submetidos ao jejum esta correlação não foi detectada.



---

***Conclusões***

## VIII. Conclusões

1. O efeito alométrico observado, no qual animais menores apresentam uma redução mais acentuada da massa intestinal ao término da dormência e no jejum durante a atividade, sugere que teiús jovens de massa corpórea reduzida são mais vulneráveis aos efeitos de flutuações na disponibilidade de alimento no ambiente.
2. Na atividade de outono, os ajustes na capacidade funcional do órgão aparentemente têm um caráter antecipatório e provavelmente atuam em resposta a flutuações previsíveis na disponibilidade de alimento. A altura máxima dos vilos é maior do que nas demais fases do ciclo anual, amplificando a capacidade absorptiva do tecido na fase de acúmulo de reservas energéticas que irão suprir o animal durante a dormência.
3. Até o final da dormência, a massa do intestino diminui 23% e a atrofia é acompanhada de redução da densidade de volume da mucosa e de superfície do epitélio absorptivo. A alteração da conformação estrutural do epitélio, dada pelo grande aumento na quantidade de células dispostas entre a lâmina própria e o epitélio, sugere aumento das taxas de proliferação celular em antecipação à retomada da alimentação após o despertar.
4. Na primavera, os ajustes na capacidade absorptiva envolvem um aumento da densidade de superfície do epitélio e, muito provavelmente, do comprimento total e diâmetro do órgão. Esses ajustes seriam importantes nesta fase em que os jovens teiús crescem a taxas muito elevadas.
5. O jejum de 20 dias na atividade de primavera causa uma redução da massa do intestino maior do que na dormência, 49% em média, porém o grau de atrofia da mucosa é menor. Além da contribuição relativa do intestino para a economia energética no jejum, o tecido, aparentemente constitui uma importante fonte de aminoácidos para uso como substrato energético.
6. O conteúdo de água do tecido intestinal não varia durante o ciclo anual, exceto no despertar, enquanto que o conteúdo de proteína total e solúvel acompanha as variações de massa do órgão.

7. O intestino médio dos teiús exibe um elevado potencial para utilização de diferentes substratos como fonte de energia e, a seleção do tipo preferencial de substrato a ser utilizado parece ser um processo dinâmico que varia em função do estado nutricional e metabólico do animal.
8. A capacidade para utilização de carboidratos é relativamente alta e constante ao longo do ciclo anual e, além disso, o tecido tem o potencial de contribuir significativamente para a gliconeogênese durante curtos períodos de jejum na fase ativa, quando o sucesso na captura de alimento é incerto.
9. O elevado potencial de oxidação lipídica do tecido é deprimido durante a dormência e se ajusta de maneira coordenada à inibição da enzima mitocondrial CS. Porém, as taxas de oxidação lipídica aparentemente excedem a capacidade de oxidação mitocondrial, sugerindo que o intestino pode ser um sítio de cetogênese na fase em que os níveis plasmáticos de glicose encontram-se reduzidos. Além disso, as altas taxas de atividade das transaminases sugerem que o tecido também possui grande potencial para oxidação de aminoácidos, importante na provisão de energia e na regeneração do ciclo de Krebs.
10. Em animais submetidos ao jejum, a atividade máxima de todas as enzimas analisadas reduz em relação a animais alimentados, sugerindo uma diferença nos ajustes metabólicos do tecido entre animais dormentes e submetidos ao jejum na atividade. Essas diferenças, assim como as morfológicas, muito provavelmente decorrem do caráter previsível do jejum no inverno, com formação de grandes estoques energéticos, e da acentuada depressão metabólica que acompanha este fenômeno na dormência.



---

***Referências Bibliográficas***

---

**IX. Referências Bibliográficas**

- Abe, A.S. 1995. Estivation in South American amphibians and reptiles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 1241-1247.
- Andrade, D. V.; Abe, A. S. 1999. Gas Exchange and ventilation during dormancy in the tegu lizard *Tupinambis merianae*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 3677-3685.
- Andrews, M. T. 2004. Genes controlling the metabolic switch in hibernating mammals. **Biochemical Society Transactions**, v. 32, parte 6, p. 1021-1024.
- Arévalo, F.; Burgos, M.J.; del Hoyo, N., López-Luna, P. 1990. Seasonal Variations in the Lipid Composition of White and Brown Tissues in the Bat *Pipistrellus pipistrellus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 95, parte B, p. 535-539.
- Barrenetxe, J.; Villaro, A.C.; Guembe, L.; Pascual, I.; Muñoz-Navas, M; Barber, A.; Latao, M.P. 2002. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and the cytoplasm of enterocytes. **Gut**, v. 50, p. 797-802.
- Bauman, W.A. 1990. Seasonal Changes in Pancreatic Insulin and Glucagon in the Little Brown Bat (*Myotis lucifugus*). **Pancreas**, v. 5, p. 342- 346.
- Boyer, B.B.; Barnes, B.M. 1999. Molecular and metabolic aspects of mammalian hibernation. **BioScience**, v. 49, p. 713-724.
- Bozic, F.; Srebocan, E.; Kozaric, Z. 2001. Starvation-associated pathobiology in the gut of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 114, p. 134-138.
- Buschmann, I.; Schaper, W. 1999. Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessel growth. **News Physiological Science**, v. 14, p. 121-125.
- Carey, H. V. 1990. Seasonal changes in mucosal structure and function in ground squirrel intestine. **American Journal of Physiology**, v. 259, p. R385-R392.
- Carey, H. V. 1995. Gut feelings about hibernation. **News in Physiological Science**, v. 10, p. 55-61.
- Carey, H. V.; Mangino, M. J.; Southard, J. H. 2001. Changes in gut function during hibernation: implications for bowel transplantation and surgery. **Gut**, v. 49, p. 459-461.
- Carey, H. V.; Martin, S.L. 1996. Preservation of intestinal gene expression during hibernation. **American Journal of Physiology**, v. 271, n. 34, p.805-813.
- Carey, H. V.; Sills, N. S. 1996. Hibernation enhances d-glucose uptake by intestinal brush border membrane vesicles in ground squirrels. **Journal of Comparative Physiology**, v. 166, parte B, p. 254-261.

- Carey, H.V., Andrews, M.T., Martin, S.L. 2003. Mammalian hibernation: Cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. **Physiological Review**, v. 83, p. 1153-1181.
- Carvalho, J.E. 1999. Controle da homeostase metabólica na dormência sazonal em lagartos teiú (*Tupinambis meriana*). **Dissertação de mestrado**, Instituto de Biociências, USP, São Paulo.
- Castellini, M. A.; Rea, L. D. 1992. The biochemistry of natural fasting at its limits. **Experientia**, v. 48, p. 572-582.
- Christel, C. M.; DeNardo, D. F.; Secor, S. M. 2007. Metabolic and digestive response to food ingestion in a binge-feeding lizard, the Gila monster (*Heloderma suspectum*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 3430-3439.
- Churchill, T. A.; Storey, K. B. 1994. Effects of dehydration on organ metabolism in the frog *Pseudacris crucifer*: hyperglycemic responses to dehydration mimic freezing-induced cryoprotectant production. **Journal of Comparative Physiology**, v. 164, parte B, p. 492-498.
- Crabtree, B. Newsholme, E. A. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochemical Journal**, v. 126, p. 49-58.
- Cramp, R. L.; Franklin, C. E. 2003. Is re-feeding efficiency compromised by prolonged starvation during aestivation in the green striped burrowing frog, *Cyclorana alboguttata*? **Journal of Experimental Zoology**, v. 300, parte A, p. 126-132.
- Cramp, R. L.; Franklin, C. E. 2005. Arousal and re-feeding rapidly restores digestive tract morphology following aestivation in green-striped burrowing frogs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 142, parte A, p. 451-460.
- Cramp, R. L.; Franklin, C. E.; Meyer, E. 2005. The impact of prolonged fasting during aestivation on the structure of the small intestine in the green-stripe burrowing frog, *Cyclorana alboguttata*. **Acta Zoologica** (Stockholm), v. 86, p. 13-24.
- Cristel, C. M.; DeNardo, D. F.; Secor, S. M. 2007. Metabolic and digestive response to food ingestion in a binge-feeding lizard, the Gila monster (*Heloderma suspectum*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 3430-3439.
- Croniger, C.M.; Olswang, Y.; Reshef, L.; Kalhan, S.C.; Tilghman, S.M.; Hanson, R.W. 2002. Phosphoenolpyruvate carboxykinase revisited: insights into its metabolic role. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 30, p. 14-20.
- Croset, M.; Rajas, F. Zitoun, C.; Hurot, J. M.; Montano, S.; Mithieux, S. 2001. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. **Diabetes**, v. 50, p. 740- 746.

- Doi, T.; Liu, M.; Seeley, R.J.; Woods, S.C.; Tso, P. 2001. Effect of leptin on intestinal apolipoprotein AIV in response to lipid feeding. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.281, p. 753-759.
- Duée, B. P. H.; Darci-Vrillon, B.; Blachier, F.; Morel, M. T. 1995. Fuel selection in intestinal cells. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 54, p. 83-84.
- Dunel-Erb, S.; Chevalier, C.; Laurent, P.; Bach, A.; Decrock, F.; Le Maho, Y. 2001. Restoration of the jejuna mucosa in rats refed after prolonged fasting. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 129, parte A, p. 933-947.
- Fleck, C. C.; Carey, H. V. 2005. Modulation of apoptotic pathways in intestinal mucosa during hibernation. **American Journal of Physiology**, v. 289, p. R586-595.
- Fleming, S. E.; Zambell, K. L.; Fitch, M. D. 1997. Glucose and glutamine provide similar proportions of energy to mucosal cells of rat small intestine. **American Journal of Physiology (Gastrointestinal and Liver Physiology)**, v. 273, n. 4, p. G968-G978.
- Gans, C. 1977. **Biology of the reptilian: Morphology E**, 1<sup>a</sup> ed., v. 6, Academic Press London and New York.
- Garland, T.J.; Carter, P. 1994. Evolutionary physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 56, p. 579-621.
- Gregory, P. T. 1982. Reptilian hibernation. In: Gans, C.; Pough, F. H. (eds). **Biology of the Reptilia**, 1<sup>a</sup> ed., v. 13, Academic Press: London, p. 53-154.
- Gundersen, H. J.; Bendtsen, T. F.; Korbo, L.; Marcussen, N.; Moller, A.; Nielsen, K.; Nyengaard, J. R.; Pakkenberg, B.; Sorensen, F. B.; Vesterby, A. 1988. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 379-394.
- Habold, C.; Foltzer-Jourdainne, C.; Le Maho, Y.; Lignot, J. H.; Oudart, H. 2005. Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. **Journal of Physiology**, v. 566, n.2, p. 575-586.
- Haddad, L. S. 2007. O papel dos lipídios na reorganização metabólica associada à dormência sazonal no lagarto teiú *Tupinambis Merianae* (Sauria, Teiidae). **Tese de Doutorado**, Instituto de Biociências, USP, São Paulo.
- Hammond, K.A., Diamond, J. 1997. Maximal sustained energy budgets in humans and animals. **Nature**, v. 386, p. 457-462.
- Häussinger, D. 1996. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. **Biochemical Journal**, v. 313, p. 697-710.



- Häussinger, D.; Roth, E.; Lang, F.; Gerok, W. 1993. Cellular hydration state: an important determinant of protein catabolism in health and disease. **The Lancet**, v. 341, p. 1330-1332.
- Heldmaier, G.; Ortmann, S., Elvert, R. 2004. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. **Respiratory Physiology e Neurobiology**, v. 141, p. 317-329.
- Hochachka, P. W.; Darveau, C. A.; Andrews, R. D, Suarez, R. K. 2003. Allometric cascade: a model for resolving body mass effects on metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 134, parte A, p. 675-691.
- Hochachka, P. W.; Somero, G. N. 2002. **Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution**. 1ª ed. New York: Oxford University Press.
- Hochachka, P. W.; Stanley, C.; McKenzie, D. C.; Villena, A.; Monge, C. 1992. Enzyme mechanisms for pyruvate-to-lactate flux attenuation: a study of Sherpas, Quechuas, and Hummingbirds. **International Journal Sports of Medicine**, v. 13, parte 1, p. 119-122.
- Hodin, R. A.; Graham, J. R.; Meng, S.; Upton, M. P. 1994. Temporal pattern of rat small intestinal gene expression with refeeding. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. G83-89.
- Hudson, N. J.; Franklin, C. E. 2002. Maintaining muscle mass during extended disuse: aestivating frogs as a model species. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 2297-2303.
- Hulbert, A.J., Else, P.L. 2000. Mechanisms underlying the cost of living in animals. **Annual Review of Physiology**, v. 62, p. 207-235.
- Hume, I. D.; Beiglböck, C.; Ruf, T.; Frey-Roos, F.; Bruns, U.; Arnold, W. 2002. Seasonal changes in morphology and function of the gastrointestinal tract of free-living alpine marmots (*Marmota marmota*). **Journal of Comparative Physiology**, v. 172, p. 197-207.
- Junqueira, L. C.; Carneiro, J. 2004. **Histologia Básica**, 10ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.
- Karasov, W. H.; Pinshow, B.; Stark, J. M.; Afik, D. 2004. Anatomical and histological changes in the alimentary tract of migrating blackcaps (*Sylvia atricapilla*): a comparison among fed, fasted, food-restricted, and refed birds. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 77, n. 1, p. 149-160.
- Król, E; Speakman, J. R. 2007. Regulation of body mass and adiposity in the field vole, *Microtus agrestis*: a model of leptin resistance. **Journal of Endocrinology**, v.192, p.271-278.

- Lang, F.; Waldegger, S. 1997. Regulating cell volume. **American Scientist**, v. 85, p. 456-463.
- Lignot, J.H.; Helmstetter, C.; Secor, S.M. 2005. Postprandial morphological response of the intestinal epithelium of the Burmese python (*Python molurus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 141, parte A, p. 280-291.
- Lopes, H. R.; Abe, A. S. 1999. Biologia reprodutiva e comportamento do teiú *Tupinambis merianae* em cativeiro (Reptilie, Teiidae). In **Manejo y conservación de Fauna Silvestre em América Latina** (Ed. Fang, T. G.; Montenegro, O. L.; Bodmer, R. E.). La Paz: Instituto de Ecologia, p. 259-274.
- Lowry, O.H., Resenbrought, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, 265-257.
- Maloiy, G. M. O. 1979. **Comparative Physiology of Osmoregulation in Animals**, v. 1, Academic Press: Londres.
- Mandarim-De-Lacerda, C. A. 2003. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 4, p. 469-486.
- Mautz. 1982. Reptilian hibernation. In Gans, C. Pough, F. H. (eds) **Biology of the Reptilia**, 1ª ed., v. 12, London: Academic Press, p. 443-476.
- Mayhew, T. M. 1991. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. **Experimental Physiology**, v. 76, p. 639-665.
- McWilliams, S.R., Karasov, W. 2001. Phenotypic flexibility in digestive system structure and function in migratory birds and its ecological significance. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 128, parte A, p. 579-593.
- Milligan, C. L.; Girard, S. S. 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. **The Journal of Experimental Biology**, v. 180, p. 175-193.
- Mithieux, G.; Gautier-Stein, A.; Rajas, F.; Zitoun, C. 2006. Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 143, parte B, p. 195-200.
- Morton, N. M.; Emilsson, V.; Liu, Y.L.; Cawthorne, M.A. 1998. Leptin Action in Intestinal Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n.40, p. 26194-26201.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2000. **Lehninger Principles of biochemistry**. 3ª ed. New York: Worth Publishers.
- Newsholme, E. A.; Carrié, A. L. 1994. Quantitative aspects of glucose and glutamine metabolism by intestinal cells. **Gut**, supplement 1, p. S13-S17.

- Pappenheimer, J. R. 1998. Scaling of dimensions of small intestines in non-ruminant eutherian mammals and its significance for absorptive mechanisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, parte A, p. 45-58.
- Parra, J.; Pette, D. 1995. Effects of low-frequency stimulation on soluble and structure-bound activities of hexokinase and phosphofructokinase in rat fast-twitch muscle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1251, p. 154-160.
- Pennisi, E. 2005. The dynamic gut. **Science**, v. 307, p. 1896-1899.
- Piersma, T.; Gudmundsson, G. A.; Lilliendahl, K. 1999. Rapid changes in the size of different functional organ and muscle groups during refueling in a long-distance migrating shorebird. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 72, n. 4, p. 405-415.
- Rolfe, D. F. S.; Brown, G.C. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 731-758.
- Romer, A. S.; Parsons, T. S. 1986. **The vertebrate body**. 6<sup>a</sup> ed. Japão: Saunders College Publishing.
- Schmidt-Nielsen, K. 2002. **Fisiologia animal: adaptações e meio ambiente**. 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Santos.
- Schuhler, S.; Ebling, F. J. P. 2006. Role of melanocotin in the long-term regulation of energy balance: Lessons from a seasonal model. **Peptides**, v. 27, p. 301-309.
- Secor, S. M. 2003. Gastric function and its contribution to the postprandial metabolic response of the Burmese python, *Python molurus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 1621-1630.
- Secor, S. M. 2005. Physiological responses to feeding, fasting and estivation for anurans. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 2595-2608.
- Secor, S. M.; Diamond, J. 1995. Adaptative responses to feeding in Burmese pythons: pay before pumping. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1312-1325.
- Secor, S. M.; Diamond, J. 1998a. A vertebrate model of extreme physiological regulation. **Nature**, v. 395, p. 659-662.
- Secor, S. M.; Diamond, J. 2000. Evolution of regulatory responses to feeding in snakes. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, p. 123-141.
- Secor, S.M.; Diamond, J.1998b. Effects of meal size on postprandial response in juvenile Burmese pythons (*Python molurus*). **American Journal of Physiology**, v. 41, p. 902-912.
- Souza, S. C.; Carvalho, J. E.; Abe, A. S.; Bicudo, J. E. P. W.; Bianconcini, M. S. C. 2004. Seasonal metabolic depression, substrate utilization and changes in scaling patterns

- during the first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis meriana*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 307-318.
- Speakman, J.R.; Król, E. 2005. Limits to sustained energy intake IX: a review of hypotheses. **Journal of Comparative Physiology**, v. 175, parte B, p. 375-394.
- Starck, J. M. 1996. Phenotypic plasticity, cellular dynamics, and epithelial turnover of the intestine of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Journal of Zoology** (London), v. 238, p. 53-79.
- Starck, J. M. 2005. Structural flexibility of the digestive system of tetrapods – patterns and process at the cellular and tissue level. In **Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates**. Starck, J. M.; Wang, T. (eds). 1<sup>a</sup> ed, Science Publishers: Enfield, New Hampshire.
- Starck, J. M.; Beese, K. 2001. Structural flexibility of the intestine of Burmese python in response to feeding. **The Journal of Experimental Biology**, v. 204, p. 325-335.
- Starck, J. M.; Rahmaan, G. H. 2003. Phenotypic flexibility of structure and function of the digestive system of Japanese quail. **The Journal of Experimental of Biology**, v. 206, p. 1887-1897.
- Stark, J. M.; Beese, K. 2002. Structural flexibility of the small intestine and liver of garter snakes in response to feeding and fasting. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 1377-1388.
- Stoll, B.; Burrin, D. G.; Henry, J.; Yu, H.; Jahoor, F.; Reeds, P. J. 1999. Substrate oxidation by the portal drained viscera of fed piglets. **American Physiological Society**, E, p. 168-175.
- Storey, S.B. 2002. Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 133, parte A, p. 733-754.
- Stuart, J. A.; Ballantyne, J. S. 1997. Importance of ketone bodies to the intermediary metabolism of the terrestrial snail *Archachatina ventricosa*: evidence from enzyme activities. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 117, parte B 2, p. 197-201.
- Suarez, R. K.; Mallet, M. D.; Daxboeck, C.; Hochachka, P. W. 1986. Enzymes of energy metabolism and gluconeogenesis in the pacific blue marlin, *Makaira nigricans*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 64, n. 3, p. 694-697.
- Tilly, B. C.; Van Den Berghe, N.; Tertoolen, L. G. J.; Edixhoven, M. J.; De Jonge, H. R. 1993. Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 19919-19922.
- Toole, L.; Belai, A.; Shochina, M.; Burnstock, G. 1999. The effects of hibernation on the myenteric plexus of the golden hamster small and large intestine. **Cell Tissue**

**Research**, v. 296, p. 479-487.

Tracy, C.R.; Diamond, J. 2005. Regulation of gut function varies with life-history traits in chuckwalla (*Sauromalus obesus* Iguanidae). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 78, p. 469-481.

Van Breukelen, F.; Carey, H.V. 2002. Ubiquitin conjugate dynamics in the gut and liver of hibernating ground squirrels. **Journal of Comparative Physiology**, v. 172, parte B, p. 269-273.

Van Breukelen, F.; Martin, S. L. 2002. Reversible depression of transcription during hibernation. **Journal of Comparative Physiology**, v. 172, parte B, p. 335-361.

Walker Jr., W. F.; Liem, k. F. 1994. **Functional anatomy of the vertebrates**. 2<sup>a</sup> ed. United States of America: Saunders College Publishing.

Wang, T.; Hung, C. C. Y.; Randall, D. J. 2006. The comparative physiology of food deprivation: from feast to famine. **Annual Review of Physiology**, v. 68, p. 223-251.

Willmer, P.; Stone, G.; Johnston, I. 2000. **Environmental Physiology of Animals**. 1<sup>a</sup> ed. Oxford: Blackwell Science.

Zar, J.H.1999. **Biostatistical analysis**. 4<sup>o</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall.