Lilian Cristina da Silveira

Reorganização estrutural e metabólica do tecido
cardíaco associada à dormência e jejum sazonal
em lagartos teiú *Tupinambis merianae*

São Paulo
2010

Lilian Cristina da Silveira

Reorganização estrutural e metabólica do tecido
cardíaco associada à dormência e jejum sazonal
em lagartos teiú *Tupinambis merianae*

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

Orientadora: Silvia Cristina Ribeiro
de Souza

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Silveira, Lilian Cristina da

Reorganização estrutural e metabólica do tecido cardíaco associada à dormência e jejum sazonal em lagartos teiú *Tupinambis merianae*. 125p.

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

1. Depressão metabólica 2. Metabolismo cardíaco 3. Teiú (*Tupinambis merianae*)
Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Silvia Cristina Ribeiro de Souza

Orientadora

Aos meus pais e avós pelo apoio, sacrifícios, pelas orações e por se alegrarem com as minhas conquistas.

Ensinamento

*Minha mãe achava estudo
a coisa mais fina do mundo.*

Não é.

A coisa mais fina do mundo é o sentimento.

*Aquele dia de noite, o pai fazendo serão,
ela falou comigo:*

"Coitado, até essa hora no serviço pesado".

Arrumou pão e café, deixou tacho no fogo com água quente.

Não me falou em amor.

Essa palavra de luxo.

Adélia Prado

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me capacitado e sustentado.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Silvia Cristina Ribeiro de Souza, por ter me acolhido em seu laboratório e por ter confiado a mim este trabalho. Pela orientação dedicada, conhecimentos compartilhados e pelo exemplo de profissional. Muito obrigada por sempre ter me tratado com tanto cuidado e carinho e pela amizade

À Profa. Dra. Alison Colquhoun, por partilhar tempo e conhecimento e pelas discussões e sugestões em várias etapas deste trabalho.

À Profa. Dra. Liliam Midori Ide, pelo primeiro incentivo à ciência e pelos conhecimentos compartilhados de maneira tão generosa.

Aos meus colegas Lucas Nascimento e Laura Haddad por dividirem suas experiências e conhecimentos e pelos momentos de descontração. Ao querido amigo Lucas por ter me acolhido no laboratório e pela ajuda na revisão do texto.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda e seus alunos por terem aberto as portas de seu Laboratório de Morfometria e Morfologia Cardiovascular do Instituto de Biologia da UERJ e pela ajuda na análise estereológica.

Ao Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier pelas sugestões nas análises histológicas e por ter disponibilizado o Laboratório Neurociências e Comportamento do Instituto de Biociências da USP para a execução dos experimentos e análises da histologia.

Ao André Vieira da UNICAMP pelas aulas de estereologia.

À Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira por ter disponibilizado o Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos do Instituto de Biociências da USP para a realização do perfil de ácidos graxos e aquisição das imagens da histologia. Aos seus alunos, em especial ao Renato Honji por gentilmente compartilhar seus conhecimentos sobre histologia.

Aos técnicos Márcio, Taís e Manoel pela ajuda na manutenção dos animais no biotério e realização dos experimentos.

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

Aos meus pais, Luis Carlos da Silveira e Eliane Barbosa da Silveira, e meus avós, Luis Alves Barbosa e Narciza da Conceição Barbosa, pelo apoio, cuidado e amor

que sempre tiveram por mim. Obrigada pelos exemplos de seres humanos, os melhores exemplos que eu poderia ter.

Aos amigos antigos, em especial à Luciana e Natália pelo apoio, pelo ombro amigo, pela cumplicidade, pelas risadas. Obrigada por sempre me fazerem tão bem! => À Natália pela ajuda na revisão de partes do texto. Aos amigos novos, em especial à Carolina pelos momentos de descontração e pela ajuda na revisão de partes do texto.

Um agradecimento especial à Dona Marianita e ao Sr. Neris por terem me acolhido em sua casa me tratado com respeito e carinho ao longo do primeiro ano do mestrado. Obrigada pela amizade que permaneceu. Serei sempre grata pela confiança que tiveram em mim

À comissão do Curso de Inverno, Tópicos em Fisiologia Comparativa/2007 pela oportunidade de entrar em contato com o Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP.

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

À Capes pela bolsa concedida.

Muito obrigada a todos!

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS.....	16
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
1. Animais experimentais e manutenção.....	19
2. Grupos experimentais e coleta de amostras	20
3. Histologia e estereologia.....	21
4. Medida da concentração de água e de proteína total e solúvel	24
5. Medida da concentração de lipídio total	25
6. Medida da atividade máxima de enzimas	26
6.1. Homogeneização das amostras.....	26
6.2. Ensaaios enzimáticos.....	27
7. Perfil de ácidos graxos	28
7.1. Extração dos lipídios	28
7.2. Separação das classes de lipídios	28
7.3. Metilação e análise da composição dos ácidos graxos.....	29
8. Análise estatística.....	32
IV. RESULTADOS	33
1. Efeitos da massa corpórea e da sazonalidade sobre a massa do ventrículo cardíaco	34
2. Histologia e Estereologia	35
3. Composição macromolecular do tecido: teor de água, proteínas e lipídio total.....	37
4. Atividades enzimáticas	38
5. Composição de ácidos graxos.....	41
5.1. Lipídios neutros	41
5.2. Lipídios Polares	44
5.3. Efeito da massa corpórea sobre a composição de ácidos graxos dos fosfolipídios cardíacos.....	47
V. TABELAS	50
VI. FIGURAS	62

VII. DISCUSSÃO	70
1. Efeitos da massa corpórea e da sazonalidade sobre a massa do ventrículo cardíaco	71
2. Morfologia e reorganização estrutural do miocárdio	77
3. Mudanças sazonais da composição macromolecular do miocárdio.....	83
4. Efeitos do jejum e da dormência sazonal sobre as atividades enzimáticas.....	90
5. Influência da sazonalidade e do jejum na composição de ácidos graxos do miocárdio	97
6. Composição dos lipídios neutros e polares	97
7. Efeito da massa corpórea sobre a composição de ácidos graxos dos lipídios polares do miocárdio.....	106
VIII. CONCLUSÕES	111
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

RESUMO

O coração é um órgão notável por sua flexibilidade estrutural e metabólica em resposta a variações de demanda. Na dormência sazonal, a interrupção da alimentação, associada à inatividade física e à acentuada redução da frequência cardíaca, ocasiona uma inibição da demanda sobre a função do órgão e, provavelmente, uma reorganização estrutural e metabólica do tecido cardíaco. Estes aspectos foram investigados ao longo do ciclo anual de atividades em lagartos teiú *Tupinambis merianae*, com o objetivo de examinar as alterações de capacidade funcional cardíaca dadas por ajustes da massa, estrutura e composição do tecido, por regulação do fluxo de substratos energéticos em vias de produção de energia e por mudanças da composição de ácidos graxos dos fosfolípidios das membranas. Grupos de animais jovens foram mortos em diferentes fases do primeiro ciclo anual e após 20 dias de jejum na fase ativa e o ventrículo cardíaco foi removido e pesado. Um fragmento da parede ventricular foi retirado, transferido para fixador e utilizado posteriormente para a confecção de cortes histológicos de 10 µm de espessura que foram analisados utilizando-se método estereológico. O restante do tecido ventricular foi congelado em N₂ líquido e conservado em freezer -80 °C. Os teores de água, proteína total e solúvel e lipídio total foram medidos por meio de ensaios padrão; as atividades máximas de enzimas foram medidas por espectrofotometria em condições saturantes de substratos e cofatores; e o perfil de ácidos graxos dos lipídios neutros e polares foi determinado por cromatografia gasosa. No início do outono, a massa ventricular relativa é 0,16% e aumenta 31% até o final desta fase, quando o miocárdio esponjoso possui aspecto denso e poucos espaços lacunares que ocupam cerca de 8% da área total do corte. Este arranjo é mantido na dormência, quando a massa ventricular relativa aumenta 29% em relação ao final do outono, e no início do despertar, quando a massa ventricular relativa diminui para valores semelhantes aos do final do outono. Após a retomada da alimentação, a massa ventricular relativa volta a exibir uma porcentagem comparável a da dormência, juntamente com um pequeno aumento da área de lacunas no miocárdio esponjoso. Na primavera, a massa ventricular relativa é de 0,24% e o miocárdio esponjoso possui aspecto extremamente reticulado, com 29% da área total do corte ocupada por espaços lacunares. Animais ativos submetidos a jejum apresentam redução de 19% da massa ventricular relativa em relação a animais alimentados. A densidade numérica de

cardiomiócitos na camada esponjosa é 37% menor na dormência em relação à atividade de primavera, resultando em um volume calculado de um cardiomiócito nesta fase 52% maior em relação à atividade de primavera. A análise do teor de água, proteínas totais e solúveis não indica variação ao longo do ciclo anual, com exceção de uma tendência ao aumento do teor de água na dormência e de uma tendência à redução do teor de proteínas solúveis após o despertar e ingestão de água e no grupo de animais ativos submetidos ao jejum. Na atividade de outono e dormência de inverno a concentração de proteínas miofibrilares é reduzida em relação à atividade de primavera e aumenta no início do despertar após a ingestão de água. A concentração de lipídios totais é menor na dormência e despertar em relação à atividade de outono e no grupo de animais submetidos a jejum em relação a animais alimentados. As enzimas glicolíticas PK e LDH não variam ao longo do ciclo anual, enquanto a CS, indicadora da capacidade aeróbia, exibe forte tendência ao aumento na dormência, e a HOAD, enzima da β -oxidação lipídica, encontra-se inibida na dormência e no despertar em relação ao outono. Em contraste, com exceção da LDH que também não varia, a PK e a CS diminuem, enquanto que a HOAD é mantida constante após jejum na fase ativa. As variações do perfil de ácidos graxos da fração lipídica neutra sugerem que ácidos graxos insaturados são preferencialmente mobilizados das reservas do miocárdio durante a dormência e início do despertar, enquanto que no jejum durante a fase ativa as diferentes classes de ácidos graxos são equitativamente mobilizadas. A composição de ácidos graxos da fração lipídica polar exibe uma notável constância ao longo do ciclo anual, sugerindo que os ajustes à dormência sazonal não afetam de modo abrangente os fosfolipídios do tecido cardíaco e, portanto, não sugerem um papel preponderante de mudanças da composição lipídica das membranas na regulação metabólica sazonal nos teiús. Além disso, o contraste em relação às alterações observadas em mamíferos hibernantes sugere que, nestes, os ajustes seriam mais relacionados com a adaptação às baixas temperaturas corpóreas típicas da hibernação. A análise de regressão indica uma variação do conteúdo dos ácidos graxos C18:1n-9, C22:5n-6 e C22:6n-3 em função da massa corpórea dos jovens teiús e as mudanças do padrão alométrico sugerem uma relação entre o conteúdo destes ácidos graxos e as diferenças de taxa metabólica em animais de diferentes massas corpóreas, observadas em determinadas fases do ciclo anual de atividades e após o jejum durante a fase ativa.

ABSTRACT

The structural and metabolic flexibility of cardiac response to a variable physiological demand is notable. During seasonal dormancy, interruption of feeding together with inactivity and reduced heart beating, cause a large decrease of demand which probably brings about structural and metabolic heart tissue reorganization. These aspects were studied during the annual cycle in young tegu lizards *Tupinambis merianae* to investigate the hypothesis of seasonal changes of the heart capacities given by adjustments of tissue mass, structure and composition, by regulation of flux of substrates in the pathways of energy production, and by changes in the composition of fatty acids of tissue membranes. Groups of animals were killed in selected phases during the first year cycle of young tegus and after a 20 days fasting period during spring activity. Heart ventricle was removed and weighed and a tissue sample was collected and transferred to fixative solution, being used to obtain tissue slices of 10µm width for histological analysis with stereological tools. The remaining tissue was cut and split into aliquots, frozen in liquid N₂ and stored at -80°C. Later, the aliquots were used to assess the content of water, total and soluble proteins, and total lipids, by standard assays, the maximum activity of enzymes by spectrophotometry, and neutral and polar fatty acids profiles by gas chromatography. In early fall, the relative mass ventricle is 0.16%, and 31% increased in late fall, when the spongy myocardium appears dense and with few lacunar spaces which area corresponds to 8% of slice total area. During dormancy, the ventricle mass increases further 29%, decreasing to values of late fall during early arousal. After food intake, mass ventricle is again increased together with a small increase of the lacunar spaces, which appear highly expanded later in spring (29% of the total area), when tissue mass is 0,24% increased in relation to early fall. Unlike dormancy, fasting during spring caused a decrease of 19% of the ventricle mass. The cardiomyocytes density in the spongy layer is 37% decreased during dormancy while estimated cell volume is 52% increased, in relation to spring activity. There was no seasonal changes in the content of water and proteins in the groups analysed, except to a tendency to increase in the water content during dormancy, and to decrease in the soluble proteins in early arousal and in fasted animals. Myofibrillar protein is lower during fall and dormancy in relation to spring, increasing soon in early arousal after water intake. Total lipids decrease in the tissue during dormancy in relation to late fall by similar proportion than after fasting during spring.

The glycolytic enzymes PK e LDH are unchanged during the year cycle, whereas the mitochondrial CS shows a tendency to increase, and HOAD, a β -oxidation enzyme, is decreased during dormancy and early arousal, in relation to fall. Unlike, PK and CS are decreased, while HOAD is unchanged after a period of fasting during spring. Fatty acids (FA) profiles of neutral lipids suggest that unsaturated FA are preferentially mobilized during dormancy and arousal, whereas all FA would be equally used during spring fasting. FA of polar lipids are remarkably constant during the year, suggesting that membrane FA in the heart tissue are not generally affected by season, and thus, results do not support a predominant role played by compositional changes of membranes in metabolic depression in the tegu. In addition, the otherwise distinct findings with hibernating mammals suggest that changes of FA composition in these animals would be an adaptation to the low body temperature of torpor, rather than mechanism of metabolic inhibition. Regression analysis indicate significant relationships of C18:1n-9, C22:5n-6, and C22:6n-3 contents as a function of body mass in young tegus, and changes in the allometric patterns are consistent with a putative relationship between these FA levels and the scaling of mass specific metabolic rates of young tegus during the year cycle.

Introdução

I. INTRODUÇÃO

A capacidade de exibir mudanças reversíveis do comportamento, fisiologia e morfologia confere vantagem seletiva aos organismos frente a variações das condições ambientais. Diversos animais são capazes de prever fases do ciclo anual em que as condições do ambiente tornam-se desfavoráveis para funções vitais, por meio de um sistema temporizador interno e da percepção de sinais ambientais cíclicos, tais como fotoperíodo, temperatura e umidade. Animais que apresentam dormência sazonal, por exemplo, são capazes de se antecipar à fase de escassez de alimentos através de uma série de ajustes comportamentais e metabólicos que possibilitam, dentre outros eventos, o armazenamento de substratos energéticos. Em contraste, alterações súbitas e de curto prazo na disponibilidade de alimento são imprevisíveis e a habilidade de exibir mudanças fenotípicas rápidas e reversíveis implica em um aumento das chances de sobrevivência dos indivíduos (PIERSMA & DRENT, 2003).

A dormência sazonal é caracterizada por uma acentuada depressão do metabolismo, que é acompanhada de uma diminuição ou interrupção de diversos processos fisiológicos. Paralelamente à inibição da taxa dos processos que produzem e consomem energia nas células, há uma inibição da locomoção e uma diminuição das frequências cardíaca e respiratória, da filtração glomerular e da atividade elétrica cerebral. Durante esta fase, o animal permanece em jejum e, assim, obtém significativa economia energética associada com a inibição dos processos de digestão e absorção de nutrientes, além do custo envolvido com a manutenção dos órgãos que participam desses processos. Esses ajustes resultam em extensão do tempo de sobrevivência com base nos estoques de nutrientes acumulados na fase de preparação para a dormência. Deste modo, a redução da velocidade dos processos metabólicos representa uma extensão do tempo biológico e, em alguns casos, a supressão completa e reversível do metabolismo induz um estado ‘ametabólico’, cujo significado seria o ‘escape’ reversível do tempo (CAREY *et al.*, 2003; HOCHACKA & GUPPY, 1987). A terminologia usada na literatura que trata desses fenômenos varia em função do critério adotado pelo autor, o que a torna redundante e confusa; neste trabalho, assumimos que a dormência sazonal apresentada por diversos mamíferos durante os meses de inverno é denominada

hibernação e que a dormência durante os meses de verão, como a exibida por anuros e peixes pulmonados, é denominada estivação (STOREY, 2004).

A hibernação em mamíferos consiste em uma sequência de fases de torpor, com duração entre uma a três semanas, interrompidas por episódios de despertar, com duração de menos de 24 h, quando os animais acordam, elevam a temperatura corpórea e restabelecem todas as funções fisiológicas. Este padrão de hibernação consome substancialmente mais energia quando comparado à dormência sazonal contínua, apresentada por anfíbios e répteis. A importância fisiológica dos episódios de despertar ainda não é conhecida, mas sugere-se que tenham um papel no reconhecimento de patógenos e iniciação de resposta imune, além de reposição de mRNAs e proteínas degradados durante o hipometabolismo (PRENDERGAST *et al.*, 2002; KNIGHT *et al.*, 2000). Nos mamíferos, a entrada em hibernação é caracterizada por uma redução em uníssono das frequências cardíaca e ventilatória e da taxa metabólica que, associadas a ajustes hipotalâmicos, contribuem para uma acentuada redução da temperatura corpórea. Durante as fases de torpor, a temperatura corpórea destes animais é regulada num novo patamar que se situa 2 a 3°C acima da temperatura do abrigo, e pode chegar a valores tão baixos quanto 0°C, de modo que a contribuição do efeito termodinâmico para a redução do metabolismo parece ser predominante (HELDMAIER *et al.*, 2004; STOREY & STOREY, 2004). Em contraste com hibernantes clássicos, outros mamíferos apresentam depressão metabólica de magnitude semelhante a temperaturas corpóreas relativamente altas, como é o caso de lêmures de Madagascar, além de diversos anfíbios e répteis, como os lagartos teiú *Tupinambis merianae* da América do Sul, que apresentam dormência sazonal nos meses de inverno tropical a temperaturas amenas por volta de 17 - 20°C (HELDMAIER *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2004). Nestes animais parece haver uma maior contribuição de mecanismos intrínsecos e menor influência do efeito termodinâmico de redução da temperatura corpórea para a inibição metabólica. Os mecanismos intrínsecos podem consistir em expressão gênica diferencial ou alterações pós-tradução de proteínas enzimas que contribuem para a inibição das taxas de consumo e produção de energia nas células além de ajustes específicos, como a mudança do tipo de substrato energético preferencial (STOREY, 2004). Adicionalmente, tem sido proposto que a composição lipídica das membranas celulares possa constituir alvo de regulação durante a dormência sazonal dada a sua influência na atividade das proteínas nela inseridas (HULBERT & ELSE, 2000).

Uma notável característica da dormência sazonal é a função cardíaca reduzida, contínua e regulada. Durante a dormência, o coração continua a bombear sangue a uma temperatura corpórea usualmente menor e contra uma resistência periférica maior do que durante a fase ativa do animal (CAREY *et al.*, 2003; FAHLMAN *et al.*, 2000). Pequenos mamíferos em torpor reduzem a frequência cardíaca (FC) de 200-300 batimentos por minuto (bpm) para 3-5 bpm e, considerando-se que 85% de todo o oxigênio consumido pelo tecido cardíaco em ratos é destinado à energia para contração (ROLFE & BROWN, 1997) e que o metabolismo cardíaco é responsável por cerca de 10% do metabolismo basal em humanos (SCHMIDT-NIELSEN, 1984), uma redução da FC desta magnitude contribui, significativamente, para a redução do gasto energético do tecido e do animal. Na dormência sazonal em lagartos teiú a FC é mantida em torno de 12 bpm, independente de variações da temperatura corpórea, enquanto que em animais ativos a FC correlaciona positivamente com a temperatura e pode alcançar 100 bpm (ABE, 1983; GALLI *et al.*, 2006). Além da inibição de processos contráteis, outros possíveis alvos da depressão metabólica neste tecido são a síntese de proteínas e de RNA, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase e o vazamento de íons nas membranas, os quais são responsáveis por cerca de 15% do consumo de O_2 no coração de rato na condição basal (ROLFE & BROWN, 1997). Em cardiomiócitos isolados de rato, nos quais a contratilidade foi inibida, esta fração atinge 88% e a inibição de ambos os processos, contráteis e não contráteis, teria o potencial de contribuir para a economia energética e prolongar o tempo de sobrevivência das células quando submetidas a condições hipóxicas (CASEY *et al.*, 2001). Contudo, o grau de inibição desses processos varia em diferentes órgãos e, conseqüentemente, a sua contribuição relativa para a depressão do metabolismo do animal varia durante a dormência, de modo que parece haver uma ‘hierarquia’ entre os processos consumidores de ATP nas células, bem como entre os diferentes órgãos (BUTTGEREIT & BRAND, 1995; STOREY & STOREY, 2007). Dentre esses processos, a síntese de proteínas e RNA é mais sensível a variações no suprimento de energia do que o bombeamento de íons, o que evidencia a importância da manutenção dos gradientes iônicos através das membranas. Por exemplo, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase no tecido cardíaco de esquilos mantém-se inalterada durante a hibernação, embora esteja significativamente reduzida no músculo esquelético, rins e fígado (MACDONALD & STOREY, 1999). De maneira semelhante, o fluxo sanguíneo no miocárdio de marmotas e esquilos é mantido durante a hibernação, em contraste com a redução observada no rim e no córtex cerebral e, no conjunto, estes dados sugerem

uma priorização da manutenção da função cardíaca durante a dormência sazonal (BURLINGTON & MILSOM, 1993; KUDEJ & VATNER, 2003).

Face à atividade cardíaca contínua e sustentada quase que exclusivamente por ATP produzido pelo metabolismo aeróbio, o consumo de O₂ do miocárdio de humanos é maior do que em qualquer outro tecido e, em todo reino animal, somente o músculo do voo de abelhas ultrapassa o consumo de O₂ do coração dos mamíferos (AHO & VORNANEN, 1997; GOFFART *et al.*, 2004; TAEGTMEYER *et al.*, 2005; SUAREZ *et al.*, 1996). Adicionalmente, o potencial do músculo cardíaco para oxidação de ácidos graxos, carboidratos e, em certas circunstâncias, corpos cetônicos e aminoácidos, confere a este tecido enorme flexibilidade metabólica, de maneira que, em uma dada condição fisiológica, o coração utiliza o substrato mais apropriado para a produção de ATP (TAEGTMEYER *et al.*, 2005). Em condições de suprimento adequado de O₂, o tecido cardíaco dos vertebrados oxida preferencialmente ácidos graxos (60-90%) e uma menor quantidade de carboidratos (10-40%), valores que, na maioria das vezes, refletem os níveis de substratos circulantes (DRIEDZIC & GESSER, 1994; STANLEY *et al.*, 2005). Em mamíferos hibernantes essa proporção é similar durante a fase ativa, mas se altera durante a fase de depressão metabólica, quando há uma ênfase ainda maior na oxidação de lipídios como substrato energético, favorecendo a redução do uso de carboidratos, preservados para utilização pelo cérebro (CAREY *et al.*, 2003). De modo similar, no tecido cardíaco de anfíbios estivantes observa-se uma maior ênfase na utilização de lipídios como substrato energético durante o estado hipometabólico (DRIEDZIC & GESSER, 1994).

Ciclos sazonais de deposição e mobilização de lipídios se relacionam com a disponibilidade de alimento em muitos répteis, a maioria dos lipídios sendo armazenados em depósitos subcutâneos ou em corpos gordurosos abdominais (DERICKSON, 1976). Os teiús apresentam alterações marcantes da adiposidade ao longo do ciclo anual, com acúmulo de grande quantidade de lipídios durante a atividade de outono que fornecem a maior parte da energia para a manutenção do animal ao longo da fase hipometabólica (SOUZA *et al.*, 2004). Revisões recentes discutem os múltiplos papéis funcionais dos lipídios e, segundo os autores, embora a maioria dos lipídios seja armazenada no tecido adiposo, todas as células são capazes de estocar quantidades limitadas deste substrato em gotículas intracelulares, importantes no tamponamento de desequilíbrios transitórios entre a utilização e absorção de ácidos graxos (revisão em DUCHARME & BICKEL, 2008; KOODLE *et al.*, 2007). Durante fases de escassez de

nutrientes, os triacilgliceróis armazenados nas gotículas lipídicas são catabolizados a glicerol e ácidos graxos livres que, nos músculos esquelético e cardíaco são utilizados para fornecimento de energia para o próprio tecido na β -oxidação mitocondrial. Além de estoque energético, os lipídios armazenados podem influenciar diversos aspectos do metabolismo celular, como por exemplo, servindo de substrato para síntese de outras moléculas, como fosfolipídios de membrana e eicosanóides, e regulando a expressão gênica através da ligação a receptores nucleares. Adicionalmente, gotículas lipídicas podem seqüestrar proteínas específicas quando os níveis destas proteínas são altos e elas não são necessárias ou desejáveis no compartimento celular.

Além de ajustes metabólicos, durante os meses de dormência ocorre também reorganização estrutural de tecidos e órgãos. A natureza homeostática das funções nos organismos se expressa na habilidade de exibir mudanças em resposta a variações de demanda. O tamanho da maioria dos órgãos, por exemplo, não é fixo e pode mudar em resposta à demanda (HULBERT & ELSE, 2005). Animais que apresentam dormência sazonal, como sapos estivantes e o lagarto teiú, apresentam acentuada atrofia do intestino na fase em que a alimentação é interrompida (NASCIMENTO, 2009; PENNISI, 2005). Essa atrofia contribui significativamente para a economia energética do animal na fase dormente, dado que o custo de manutenção do tecido intestinal é alto e atinge 20-30% do metabolismo basal em mamíferos (TRACY & DIAMOND, 2005). Em anfíbios e répteis a alimentação impõe um aumento de demanda simultaneamente ao trato gastrointestinal e ao sistema cardiorrespiratório, associado com um aumento da taxa de consumo de O_2 para níveis próximos ou superiores aos alcançados durante exercício físico máximo (WANG *et al.*, 2005). Assim, a interrupção da alimentação associada à inatividade física e à acentuada redução da FC, características da depressão metabólica, contribuem para uma redução pronunciada da demanda sobre a função cardíaca. Esta redução de demanda pode resultar em atrofia do coração, como a observada em humanos submetidos a repouso ou microgravidade por 6 semanas (PERHONEN *et al.*, 2001). Em adição ao efeito da inatividade, quando submetidos ao jejum prolongado os animais frequentemente mobilizam aminoácidos de órgãos musculares, substratos utilizados na gliconeogênese e na reposição de intermediários do ciclo do ácido cítrico, e podem sofrer atrofia cardíaca (CASTELINI & REA, 1992). No entanto, no esquilo *Spermophilus lateralis* e no lagarto *Liolaemus nigroviridis* ocorre um aumento da massa ventricular relativa durante a dormência sazonal, isto é, da massa ventricular expressa como uma porcentagem da massa corpórea, em contraste com a

atrofia de músculos esqueléticos e de órgãos relacionados à alimentação (NAYA *et al.*, 2009; WICKLER *et al.*, 1991). Esses dados evidenciam a priorização da manutenção da função cardíaca durante a dormência sazonal, porém, a natureza dessa hipertrofia não é clara. No esquilo *Citellus lateralis*, há um aumento do número de gotículas de lipídios associadas às mitocôndrias, substrato provavelmente mobilizado durante os episódios de despertar (BURLINGTON *et al.*, 1972), sugerindo que a hipertrofia cardíaca pode estar relacionada a um aumento do volume dos cardiomiócitos (hipertrofia), devido ao aumento do conteúdo de substratos como lipídios e glicogênio. Adicionalmente, a hipertrofia pode resultar da deposição de proteínas nos cardiomiócitos ou, ainda, de um aumento do número de cardiomiócitos (hiperplasia), ou mesmo de uma combinação destes processos. Por outro lado, o impacto do jejum associado à dormência sazonal e do jejum por restrição alimentar na fase ativa sobre a massa cardíaca pode ser distinto, uma vez que 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 frente a flutuações de curto prazo e vice-versa (STARCK, 2005).

A capacidade proliferativa do músculo cardíaco de peixes, anfíbios e répteis tem sido reconhecida há vários anos e as evidências indicam que a hipertrofia do coração destes animais em diversas situações frequentemente ocorre através de uma combinação de hipertrofia e hiperplasia dos cardiomiócitos (CERRA *et al.*, 2004; GAROFALO *et al.*, 2006; SUN *et al.* 2009). No entanto, até recentemente acreditava-se que os cardiomiócitos de mamíferos eram células pós-mitóticas, incapazes de proliferação, e que a hipertrofia cardíaca consistia somente em hipertrofia dos cardiomiócitos e hiperplasia dos outros tipos celulares que compõem o miocárdio, tais como fibroblastos. Esta idéia influenciou fortemente a pesquisa básica e clínica em cardiologia nas últimas 3 décadas e grandes avanços foram feitos na identificação dos mecanismos moleculares da hipertrofia e seu controle genético. Mais recentemente, reconheceu-se que hiperplasia de cardiomiócitos ocorre no coração de mamíferos adultos e que células não diferenciadas estão presentes no miocárdio, sugerindo a existência de uma reserva de crescimento ao longo da vida (ANVERSA *et al.*, 2006; SUN *et al.* 2009). Assim, ambos os mecanismos, hipertrofia e hiperplasia de cardiomiócitos, podem contribuir para a hipertrofia cardíaca em vertebrados.

O mecanismo através do qual o aumento da massa cardíaca é alcançado tem importantes desdobramentos para os mecanismos de troca de substâncias entre meios

intra e extracelular. A razão superfície:volume é um determinante das taxas de troca de substâncias, tais como Ca^{2+} , e esta razão aumenta à medida que o diâmetro da célula diminui. O diâmetro dos cardiomiócitos é menor em ectotermos em relação à endotermos (20-25 μm no rato e 5 μm na tartaruga), e o oposto se aplica à razão superfície:volume. O maior diâmetro dos cardiomiócitos de endotermos é compensado, em algum grau, pela presença de túbulos T, ausentes em ectotermos (DRIEDZIC & GESSER, 1994). Além disso, o retículo sarcoplasmático (RS) é menos desenvolvido ou até mesmo ausente nos vertebrados ectotérmicos, causando uma maior dependência do Ca^{2+} extracelular, razão pela qual se observa que o músculo cardíaco de vários ectotermos é insensível à rianodina, uma substância que bloqueia os canais de Ca^{2+} do RS (GALLI *et al.*, 2006). Desse modo, a hipertrofia e consequente aumento da área da secção transversa dos cardiomiócitos de ectotermos aumentariam a distância para difusão do Ca^{2+} , prejudicando a função contrátil. Por esse motivo, sugere-se que nesses animais haja uma maior contribuição da hiperplasia para o crescimento cardíaco, com manutenção do tamanho e formato dos cardiomiócitos (CLARK & RODNICK, 1998; DRIEDZIC & GESSER, 1994).

Além das características celulares, a organização do miocárdio possui características distintas nos diferentes grupos de vertebrados e o arranjo das fibras está intimamente relacionado ao tipo de suprimento sanguíneo. Em todos os grupos de vertebrados, a parede ventricular é constituída por uma delgada camada externa de tecido seroso, o epicárdio, pelo miocárdio e pelo endocárdio, camada que reveste a superfície cardíaca interna e é contínua com o endotélio dos vasos. O miocárdio dos vertebrados apresenta três tipos principais de organização: formado predominantemente por tecido esponjoso (anfíbios e alguns peixes), compacto (mamíferos e aves) e o tipo misto, com uma camada externa compacta e interna esponjosa (alguns peixes e anfíbios e a maioria dos répteis). O miocárdio compacto é perfundido pelo sangue arterial que flui pelos vasos coronarianos e capilares, e o esponjoso, na maioria dos animais, é avascular e perfundido pelo sangue que passa pelos espaços lacunares, que pode ser venoso, misto, ou arterial, dependendo da região do coração e condição fisiológica do animal. (POUPA & LINDSTRÖM 1983). Além das diferenças estruturais, as camadas esponjosa e compacta exibem especializações metabólicas e sugere-se que estas duas camadas funcionam em “cooperação”, de maneira que a camada esponjosa possui uma maior capacidade de tamponamento de variações das concentrações de prótons e de lactato, preservando a camada compacta, a qual é a maior produtora de força e, deste

modo, haveria um aumento da eficiência cardíaca (TOTA, 1983). Alterações da morfologia destas camadas têm sido observadas em função do processo de desenvolvimento ontogenético, mas estudos que analisam a morfologia e o metabolismo do miocárdio misto no contexto da dormência sazonal são raros (BARNI *et al.*, 1994; TOTA, 1983).

As variações da anatomia do coração entre as diferentes classes de vertebrados são bem conhecidas (para revisão ver WILLMER *et al.*, 2005). A organização dos arranjos cardíacos como uma progressão evolutiva do coração de duas câmaras de peixes até o coração com quatro câmaras completamente divididas de mamíferos e a noção de que os corações de anfíbios e répteis seriam passos filogenéticos intermediários e ineficientes em relação à circulação de mamíferos e aves, tornou-se antiquada no último século, após a percepção de que o coração de répteis é altamente eficiente no contexto fisiológico destes animais (HICKS, 2002). Além das variações da anatomia interna, a massa relativa do coração difere entre os grupos de vertebrados e representa uma maior proporção da massa corpórea em aves (1,0%), seguidas pelos mamíferos (0,6%), anfíbios e répteis (0,4 a 0,5%) e, por último, peixes (0,2%) (POUPA & LINDSTRÖM, 1983). O aumento mais pronunciado da massa cardíaca relativa durante a filogenia dos vertebrados ocorreu na transição da ectotermia para a endotermia, quando a atividade metabólica dos tecidos e a demanda imposta sobre o transporte de O₂ e nutrientes aumentou substancialmente (OSTADAL *et al.*, 1999). No entanto, em comparações interespecíficas dentro das classes de vertebrados, a massa cardíaca representa uma proporção similar da massa corpórea em animais de diferentes tamanhos e os ajustes que compatibilizam a função cardíaca com o metabolismo parecem ocorrer principalmente através de variações da FC (LILLYWHITE *et al.*, 1999; SCHIMIDT-NIELSEN, 1984; POUPA & LINDSTRÖM, 1983).

A FC e a taxa metabólica massa específica variam em função da massa corpórea de diversos animais, endotérmicos e ectotérmicos, segundo o coeficiente angular $b = -0,25$. Ambas, por sua vez, exibem forte correlação, razão pela qual a FC é usada para inferir a taxa metabólica de animais no campo (ELSE & HULBERT, 1983; FICK, 1870; MCPHEE *et al.*, 2003; SCHIMIDT-NIELSEN, 1984). Há mais de trinta anos, Gudbjarnason e colaboradores (1978 *apud* HULBERT, 2005) mostraram uma fascinante correlação entre a FC de mamíferos de diferentes massas corpóreas e o conteúdo percentual de C22:6n-3 (ácido docosahexanóico – DHA) nos fosfolípidios do tecido cardíaco. Este foi o primeiro indício de que a composição das membranas poderia

variar em função da intensidade metabólica do animal. Desde então, diversos estudos têm sistematicamente demonstrado que estas observações iniciais representam uma diferença fundamental da composição química de vários órgãos em função da massa corpórea de mamíferos e aves (HULBERT *et al.*, 2002a, b). Além disso, comparações entre mamíferos e répteis de massa e temperatura corpóreas similares confirmam a relação entre a composição lipídica das membranas e a intensidade metabólica dos animais, de modo que tecidos com taxa metabólica elevada, como aqueles de mamíferos e aves de massa corpórea reduzida, possuem membranas que são mais poli-insaturadas e menos monoinsaturadas em relação a tecidos com menor intensidade metabólica, como os de mamíferos e aves maiores e de vertebrados ectotérmicos. Estas e muitas outras observações levaram Hulbert e Else (2000) a propor a teoria das membranas como “marca-passo” do metabolismo, a qual postula que a composição lipídica das membranas determina a intensidade metabólica característica das espécies através de sua influência na atividade das proteínas inseridas na membrana (HULBERT & ELSE, 2005, HULBERT *et al.*, 2002a, b, HULBERT & ELSE, 2000). Além disso, foi proposto por estes autores que a composição lipídica das membranas, especificamente um aumento da proporção de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e uma redução da proporção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), poderia constituir importante alvo de regulação na depressão metabólica sazonal.

As membranas biológicas dos eucariotos são formadas principalmente por fosfolipídios e colesterol, que são lipídios anfipáticos que possuem um grupo polar e uma cauda apolar (NELSON & COX, 2008). Os fosfolipídios são constituídos por uma molécula de glicerol ligada a duas cadeias de ácidos graxos e a um grupamento fosfato ligado a um grupo polar, o qual é determinante da classe de fosfolipídio. Uma ampla revisão sobre a bioquímica de ácidos graxos pode ser encontrada em NELSON & COX (2008), seguindo-se apenas uma síntese de aspectos relevantes para o presente estudo. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbônicas formadas por 4 a 36 carbonos, mas os de ocorrência mais comum possuem número par e entre 12 e 24 carbonos. Na extremidade que se liga ao glicerol, os ácidos graxos possuem um grupo carboxila ($-\text{COOH}$), e na outra extremidade da cadeia hidrocarbônica, encontra-se o grupamento metil (CH_3-). Em alguns ácidos graxos, a cadeia hidrocarbônica possui apenas ligações simples e são chamados ácidos graxos saturados (SFA); em outros, a cadeia hidrocarbônica contém uma ou mais duplas ligações, e estes ácidos graxos são denominados monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA), respectivamente.

Uma nomenclatura simplificada para estes compostos consiste no número de carbonos da cadeia e no número de duplas ligações, separados por ‘dois pontos’, por exemplo, o SFA de 16 carbonos é abreviado C16:0, e o MUFA de 18 carbonos é abreviado C18:1. A posição da primeira insaturação a partir da extremidade metil da cadeia é indicada após a letra ‘n’ (ó na literatura mais antiga). Por exemplo, o PUFA denominado DHA é abreviado como C22:6n-3, o que informa que este ácido graxo possui 22 carbonos, 6 insaturações e que a primeira encontra-se entre os carbonos 3 e 4 contando a partir da extremidade metil da cadeia hidrocarbônica. As propriedades físicas dos ácidos graxos, e dos compostos formados por eles, são em grande parte determinadas pelo comprimento e número de insaturações na cadeia hidrocarbônica. O ponto de fusão, por exemplo, é maior quanto mais longa e saturada for a cadeia do ácido graxo. Nos ácidos graxos saturados, a rotação livre em torno das ligações simples entre os carbonos confere grande flexibilidade à cadeia, que assume a conformação linear mais estável. Essa conformação favorece um elevado grau de interações de van der Waals entre cadeias de SFA adjacentes e, na temperatura ambiente (25°C), uma mistura destes ácidos graxos possui consistência de cera. Nos ácidos graxos insaturados (UFA) a dupla ligação na conformação *cis* insere uma curvatura na cadeia hidrocarbônica que impede a formação de interações eletrostáticas tão fortes quanto às formadas entre os SFA, e estes ácidos graxos não lineares causam um certo grau de desordem ou desorganização da camada lipídica. Uma vez que a interação entre estes ácidos graxos é mais fraca, menos energia térmica é necessária para “desorganizar” uma mistura de UFA e eles possuem menor ponto de fusão que SFA de cadeia do mesmo tamanho. Em uma mistura de ácidos graxos, como uma membrana biológica, quanto maior a proporção de UFA, menor grau de ordem e maior mobilidade das cadeias hidrocarbônicas da bicamada lipídica, ou seja, maior a fluidez do sistema em uma dada temperatura.

A importância das membranas para a função das células é realçada pelo fato de que 20-30% do genoma de vários organismos codifica proteínas de membrana e que processos relacionados à membrana representam mais da metade da taxa metabólica basal em mamíferos (ROLFE & BROWN, 1997; WALLIN & HEIJNE, 1998). Uma membrana biológica típica possui centenas a milhares de espécies lipídicas distintas e não há dúvidas de que a composição lipídica das membranas influencia a atividade das proteínas-enzimas a ela associadas (LEE, 2005). De acordo com Lee (2005), a influência da composição lipídica das membranas sobre a atividade de proteínas e, portanto, sobre o metabolismo, pode ser analisada considerando-se as interações

químicas (ligações de hidrogênio, por exemplo) entre lipídios específicos e a proteína; ou analisando propriedades gerais da membrana, como a fluidez. A enzima mitocondrial citocromo c oxidase (CCO), por exemplo, possui sítios específicos aos quais moléculas de cardiolipina, um fosfolipídio, se associam e a remoção deste fosfolipídio da membrana resulta em perda da estrutura e função da CCO (ROBINSON, 1993). O PUFA DHA penetra no interior da rodopsina, o principal receptor de luz do sistema visual, e desfaz interações entre domínios da proteína, facilitando a transição para a forma ativa (GROSSFIELD *et al.*, 2006). Já a atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase parece ser influenciada principalmente pela fluidez da membrana e possui forte correlação positiva com o conteúdo de DHA, PUFA com maior número de insaturações encontrado nas membranas (TURNER *et al.*, 2003). Desse modo, membranas com um alto teor de PUFA, como aquelas de vertebrados com elevada taxa metabólica massa específica, são mais fluidas e proporcionam um maior grau de liberdade para alterações conformacionais das proteínas nela inseridas, resultando em uma elevada atividade molecular destas proteínas, altas taxas de metabolismo celular e, conseqüentemente, de todo o organismo (HULBERT & ELSE, 2005).

Um dos primeiros indícios de uma relação entre a teoria das membranas como “marca-passo” do metabolismo e a dormência sazonal veio de trabalhos com o caracol terrestre *Cepaea nemoralis*, no qual se observou uma redução do conteúdo percentual de PUFA e aumento de MUFA na membrana mitocondrial do hepatopâncreas durante a estivação (STUART *et al.*, 1998). Além disso, nesta fase, o conteúdo de cardiolipina e a atividade da CCO apresentaram uma redução de magnitude similar, $\approx 80\%$. No entanto, outras evidências de um papel dos ajustes da composição de ácidos graxos na regulação metabólica durante a dormência sazonal não são conhecidas. A dormência em dois sapos do gênero *Cyclorana* e no caracol *Helix aspersa* não envolve alterações da composição de ácidos graxos dos fosfolipídios dos tecidos ou da membrana mitocondrial (BERNER *et al.*, 2009; BISHOP *et al.*, 2002). Do mesmo modo, em um recente estudo Haddad (2007) mostrou que a dormência sazonal nos teiús aparentemente não envolve amplas alterações dos ácidos graxos polares do fígado e músculo esquelético, como proposto por Hulbert & Else (2000). Em contraste, mamíferos hibernantes exibem alterações da composição de ácidos graxos das membranas e do tecido adiposo no sentido oposto, ou seja, um aumento da proporção de PUFA na fase que antecede a dormência, em parte favorecido pela preferência por alimentos ricos nestes ácidos graxos (CHARNOCK *et al.*, 1980; DARK, 2005). Além

disso, há evidências de que a composição lipídica dos tecidos de mamíferos hibernantes seria modulada em resposta a alterações do fotoperíodo (GEISER *et al.*, 2007). O aumento da proporção de PUFA é importante para a manutenção da fluidez das membranas e dos depósitos lipídicos durante a fase hipometabólica, quando a temperatura corpórea encontra-se muito reduzida, e assemelham-se aos ajustes exibidos por vertebrados ectotérmicos durante aclimação a temperaturas reduzidas (HAZEL, 1995). Em mamíferos não hibernantes, a redução da fluidez das membranas com a diminuição da temperatura corpórea prejudica a função de transportadores e receptores associados à membrana, sendo um dos motivos pelos quais a maioria destes animais sofre falência cardíaca em consequência de arritmias e fibrilação ventricular em temperaturas abaixo de 20°C (ANDREWS, 2007). Curiosamente, hibernantes na fase ativa são tão suscetíveis aos efeitos letais da hipotermia quanto não hibernantes, evidenciando a importância dos ajustes que ocorrem na fase que antecede a dormência (STOREY, 2004).

A relação entre a composição da dieta e a função cardíaca, intensamente estudada a partir dos anos recentes, foi primeiramente estabelecida a partir da observação de que a composição das membranas e suas propriedades físicas estão intimamente associadas com a manutenção da função cardíaca nas baixas temperaturas típicas da hibernação (MCLENNAN & ABEYWARDENA, 2005). Adicionalmente, constatou-se uma baixa incidência de doenças cardíacas em esquimós, cuja dieta é rica em lipídios, particularmente PUFA n-3, e a partir destas observações a relação entre esses ácidos graxos, particularmente o PUFA n-3 DHA, e a função cardíaca tem sido intensamente estudada. Um teor elevado de DHA nos fosfolipídios do coração reduz a vulnerabilidade a arritmias, fibrilação ventricular e a incidência de danos pós-isquêmicos além de melhorar a recuperação do miocárdio após a reperfusão (PEPE & MCLENNAN, 2002). Além de ser reconhecidamente importante para a saúde de humanos, o DHA também é um dos ácidos graxos apontados como um importante “marca-passo” do metabolismo dos animais em geral (TURNER *et al.*, 2003).

Recentemente, Ruf e Arnold (2008) propuseram que o principal alvo de regulação dos PUFA no coração de mamíferos hibernantes seria a $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ do retículo sarcoplasmático e que esta enzima não seria regulada pelo total de PUFA, mas sim pela razão entre PUFA n-6 e n-3. Uma razão n-6:n-3 elevada nas membranas do RS permitiria algum grau de compensação dos efeitos inibitórios das baixas temperaturas sobre a atividade da $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{ ATPase}$ e contribuiria para a manutenção

de um balanço iônico adequado à função contrátil. Além disso, MUFA n-9, particularmente C18:1n-9, poderiam mimetizar os efeitos positivos de PUFA n-6 na hibernação (GEISER *et al.*, 1994), o que é particularmente interessante nos teiús dadas as evidências de variação do teor de MUFA em vários tecidos durante a dormência (HADDAD, 2007). Considerando que os teiús apresentam depressão metabólica de magnitude semelhante à apresentada por mamíferos hibernantes, porém sem a redução acentuada da temperatura corpórea, a investigação da ocorrência de ajustes da composição dos fosfolipídios cardíacos nos teiús oferece a possibilidade de analisar os possíveis ajustes relacionados à condição hipometabólica dissociados da resposta compensatória aos efeitos da temperatura.

O lagarto teiú *Tupinambis merianae*, amplamente distribuído nas regiões de cerrado da América do Sul e de grande ocorrência no sudeste do Brasil, pode chegar a 1,6m de comprimento e pesar mais de 5 Kg quando adulto, sendo, portanto, o maior membro da família Teiidae (ANDRADE *et al.*, 2004). O clima do cerrado é caracterizado por invernos frios e secos e verões quentes e chuvosos e estes ciclos de pluviosidade e temperatura determinam o ciclo anual de atividade da maioria das espécies de anfíbios e répteis que habitam a região (ABE, 1995). O teiú apresenta atividade reprodutiva concentrada na primavera e, ao longo do verão e outono, a atividade do animal é gradualmente reduzida até que se torna totalmente inativo, permanecendo de 4 a 6 meses em abrigos subterrâneos no outono e inverno. Os teiús são forrageadores ativos que quando adultos se alimentam de frutas, invertebrados e pequenos vertebrados, mas durante o primeiro ano de vida são basicamente insetívoros. A redução das populações de insetos durante o inverno é crítica para a sobrevivência das ninhadas de lagartos ao longo do primeiro ciclo anual e a escassez desta fonte de alimento por uma fase prolongada do ano possivelmente favoreceu a ocorrência de dormência sazonal na história evolutiva da espécie. Trabalhos realizados em nosso laboratório com animais recém-eclodidos mostraram uma acentuada redução da taxa metabólica de repouso ($\approx 80\%$) na fase dormente durante o primeiro ciclo anual, sugerindo que a depressão metabólica sazonal nestes animais é um fenômeno de origem endógena (SOUZA *et al.*, 2004). Dadas as marcantes mudanças do metabolismo, ajustes sazonais da função cardiorrespiratória também são esperados. Durante toda a dormência a ventilação assume um padrão episódico, com fases de apnéia que podem durar mais de 20 minutos (ANDRADE & ABE, 1999) e a FC é mantida em torno de 12 bpm independente de variações na temperatura corpórea (ABE, 1983). Estudos prévios

realizados em nosso laboratório sugerem que o suprimento energético para o tecido cardíaco é dado principalmente pela mobilização de reservas lipídicas e que, apesar da redução do consumo de O₂, o conteúdo total de ATP e a carga energética do ventrículo cardíaco encontram-se inalterados, indicando que os processos de produção e utilização de ATP são mantidos a taxas reduzidas, porém em equilíbrio, durante a dormência (SOUZA *et al.*, 2004; CARVALHO, 1999). No conjunto, os dados sugerem que a capacidade funcional do tecido é preservada na dormência, possibilitando o rápido aumento do fluxo sanguíneo e a rápida resposta a um estímulo no despertar.

Tendo em vista todos os aspectos aqui expostos, investigou-se o padrão sazonal de reorganização estrutural e metabólica do músculo ventricular de teiús jovens, ao longo do primeiro ciclo anual e em animais ativos submetidos ao jejum, com base nos objetivos apresentados a seguir.

Objetivos

II. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Investigar a ocorrência de alterações estruturais e metabólicas no músculo cardíaco dos teiús ao longo do ciclo anual e analisar a sua relação com os ajustes da função do órgão ao jejum e depressão metabólica sazonal. Adicionalmente, as alterações observadas na fase de dormência serão contrastadas aos efeitos do jejum por restrição alimentar na fase de atividade de primavera.

Objetivos específicos

1. Analisar a relação de escala entre a massa ventricular e a massa corpórea e as possíveis alterações em diferentes fases do ciclo anual, dadas tanto pelo crescimento quanto pela ocorrência de dormência sazonal.
2. Investigar possíveis alterações da morfologia do miocárdio e a ocorrência de hipertrofia e hiperplasia dos cardiomiócitos, durante o ciclo anual, analisando suas inter-relações com ajustes da massa ventricular e da função do órgão.
3. Investigar possíveis alterações da composição macromolecular do tecido cardíaco (teor de água, proteínas e lipídios) durante o ciclo anual, analisando suas inter-relações com ajustes da massa ventricular e da função do órgão.
4. Verificar possíveis alterações da capacidade de fluxo de substratos nas vias metabólicas durante o ciclo anual, dadas por ajustes das taxas de atividade máxima de enzimas envolvidas no catabolismo de carboidratos, lipídios e no metabolismo mitocondrial, analisando o seu papel no controle da homeostase metabólica do tecido durante o jejum e depressão metabólica sazonal.
5. Investigar possíveis alterações da composição de ácidos graxos do músculo cardíaco nas várias fases do ciclo anual, analisando suas inter-relações com a oxidação lipídica e mobilização seletiva (lipídios neutros); e com mecanismos de regulação metabólica durante o jejum e depressão metabólica sazonal (fração polar) com base na teoria das membranas como marca-passo do metabolismo.

Material e Métodos

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais experimentais e manutenção

No presente estudo foram utilizados lagartos teiú *Tupinambis merianae* (Reptilia, Sauria, Teiidae), cedidos por uma criação estabelecida na UNESP de Rio Claro, Estado de São Paulo. Animais recém-eclodidos foram trazidos para o laboratório no IBUSP e mantidos durante um ano em caixas plásticas de 120 L, cada uma contendo grupos de quatro a cinco indivíduos separados de acordo com a massa corpórea, de maneira a minimizar o estresse resultante de comportamentos agonísticos. As condições de termo e foto-período foram determinadas tanto por lâmpadas incandescentes de 100 W, posicionadas no topo das caixas, quanto pela luz solar proveniente do ambiente externo. As lâmpadas permaneceram ligadas por 9 h durante os meses de outono, primavera e verão e foram desligadas no final do outono e durante o inverno, quando os animais encontravam-se dormentes. As caixas plásticas possuíam uma tampa feita de madeira e tela de nylon e o assoalho era forrado com jornal e serragem, os quais foram trocados semanalmente. Algumas pedras foram posicionadas embaixo da lâmpada e havia um abrigo de madeira na extremidade oposta, de tal forma que durante o dia os lagartos puderam alternar entre momentos de aquecimento, próximos à lâmpada, e de resfriamento, no interior do abrigo.

Figura 1 – Lagartos teiú jovens, recém-eclodidos.

A alimentação foi composta de carne bovina moída crua e coração de frango, enriquecidos com cálcio, frutas e ovos, e foi oferecida diariamente quando os animais encontravam-se ativos, além de água que esteve disponível o tempo todo. O estado geral dos animais foi verificado diariamente e as mudanças de massa corpórea foram acompanhadas por meio de pesagens semanais, nas fases de atividade, ou quinzenais, nas fases de dormência.

2. Grupos experimentais e coleta de amostras

Após jejum de 72 h, grupos de animais foram pesados e mortos por decapitação em diferentes fases do ciclo anual, constituindo os seguintes grupos experimentais: **atividade de outono ou pré-dormência** (um grupo na primeira metade e outro na segunda metade do outono, denominados inicial e final, respectivamente), **dormência de inverno** (cerca de 60 dias de jejum e inatividade), **despertar** (um grupo após a ingestão de água e outro após a primeira alimentação, cerca de 48 h e 120 h após o despertar, respectivamente) e **atividade de primavera** (30-40 dias após o despertar e retomada da alimentação). Além desta seqüência de fases e eventos, que caracterizam aproximadamente o ciclo anual de atividades em condições naturais, um grupo de animais ativos na primavera foi privado de alimento por 20 dias, com água *ad libitum*, e comparado ao grupo de animais alimentados na mesma fase, possibilitando contrastar os efeitos do ‘jejum sazonal’ aos efeitos do jejum em animais ativos, decorrente da imprevisibilidade da alimentação nos meses de atividade. Os grupos experimentais foram definidos com base nas variações da atividade geral e da taxa de consumo de O₂ dos animais, de acordo com Souza *et al.* (2004).

Após a morte dos animais, o coração foi removido e o ventrículo cardíaco dissecado e pesado em balança analítica após a remoção do excesso de sangue, mantendo-se o tecido sobre gelo durante todo o procedimento. Um fragmento da parede ventricular foi retirado como indicado pela linha tracejada na Figura 2-A, repetindo-se rigorosamente o mesmo procedimento para todos os animais, e transferido para fixador (ver abaixo). O restante do ventrículo foi picotado e dividido em alíquotas, que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C para uso posterior.

3. Histologia e estereologia

As amostras utilizadas para histologia foram coletadas nas fases e condições descritas acima, com exceção apenas dos grupos de atividade de outono final e de jejum na primavera, e os fragmentos da parede ventricular foram fixados em solução de formaldeído 4% em tampão fosfato (pH= 7,4). Posteriormente, as extremidades do fragmento foram cortadas e descartadas (Figura 2-C), evitando-se a região do ápice do coração na qual ocorre confluência de fibras, e o tecido remanescente foi dividido ao meio duas vezes (Figura 2-D e E) através de cortes de ângulos aleatórios, resultando em quatro fragmentos de orientação desconhecida (Figura 2-E). Este procedimento seguiu o critério para obtenção de cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos, necessários para um estudo estereológico sem viés (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

Figura 2 – Representação esquemática do procedimento realizado para a obtenção do fragmento de ventrículo cardíaco utilizado na obtenção de cortes de orientação aleatória para análise estereológica. Informações adicionais no texto. A imagem é de coração de cascavel *Crotalus durissus*, retirada e modificada de Hagensen *et al.*, 2008.

Os fragmentos de tecido foram, então, desidratados por imersão em etanol em concentrações crescentes de 50 a 100%, diafanizados em xilol puro e incluídos em Paraplast Plus (Sigma Aldrich) a 60°C. Na preparação dos blocos para corte em micrótomo, a orientação dos fragmentos foi novamente aleatorizada, produzindo-se cortes de 10 µm de espessura. Por fim, os cortes foram montados em lâminas previamente revestidas com poli-lisina (poly-Lysine solution- Sigma Diagnostics INS, St. Louis M.O. USA; 1:5), para auxiliar a aderência e preservação do tecido, corados com hematoxilina e eosina e recobertos com lamínula e Entellan (Merck).

As variáveis analisadas por meio de técnicas estereológicas foram densidade de área (A_A) de espaços lacunares e densidade de número de cardiomiócitos (N_v). A estimativa de A_A de espaços lacunares em diferentes fases do ciclo anual foi obtida utilizando-se planimetria por contagem de pontos, na qual cada ponto corresponde ao centro geométrico de um polígono de área conhecida. O cálculo foi feito de acordo com a equação:

$$A_A = \frac{\sum P_p}{\sum P_T}$$

onde P_p são os pontos sobre a estrutura de interesse e P_T total de pontos na área teste (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). As medidas foram feitas com quatro animais por grupo experimental, analisando-se oito cortes por animal.

A N_v de cardiomiócitos foi medida na camada miocárdial esponjosa, com as amostras obtidas apenas nas fases de dormência de inverno e atividade de primavera. As medidas foram feitas por contagem de núcleos nos quais era possível observar pelo menos um nucléolo, pelo método ‘optical disector’. Este método consiste na contagem das estruturas de interesse presentes na espessura do corte, observado em microscópio óptico com eixo Z móvel e adaptado para determinar exatamente a distância entre os planos superior e inferior do corte. O sistema teste utilizado possuía 30 x 30 µm e, conforme apresentado na Figura 3, as estruturas tocadas pela linha vermelha eram excluídas da contagem, enquanto as estruturas no interior do sistema teste ou que tocavam a linha verde eram incluídas na contagem. Embora a espessura da microtomia tenha sido de 10 µm, após o processamento dos cortes a espessura real era, em média, de 7 µm, da qual foram excluídos 2 µm das superfícies superior e inferior (‘guard zones’) para assegurar que o objeto de interesse encontrava-se inteiramente na espessura do corte, de modo que o programa de análise de dados foi configurado para contagem

em uma espessura final de 3 μm . A contagem foi realizada em oito campos por animal e os demais parâmetros foram ajustados para uma contagem final de 200 núcleos por animal, em média. O cálculo de N_v foi realizado de acordo com as equações:

$$V_{(\text{dis})} = e \cdot A_T \quad (\text{cm}^3)$$

onde $V_{(\text{dis})}$ é o volume do ‘disector’, ‘e’ é a espessura de tecido utilizada na contagem (3 μm) e A_T é a área do ‘counting frame’(ou área teste); e

$$N_v = \frac{\sum Q^-}{V_{(\text{dis})}} \quad (1/\text{cm}^3)$$

onde $\sum Q^-$ é a somatória de estruturas observadas na área teste (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995).

Figura 3 – Representação esquemática do sistema teste utilizado na contagem de núcleos para estimativa de N_v de cardiomiócitos. As estruturas tocadas pela linha vermelha eram excluídas da contagem, enquanto as estruturas no interior do sistema teste ou que tocavam a linha verde eram incluídas na contagem.

As análises foram feitas em microscópio ótico ‘Nikon Eclipse E1000’, com imagens capturadas por uma câmera ‘Low Light Integrating i308’ acoplada a um computador. Todas as medidas foram feitas com o auxílio do software ‘Stereo Investigator 2000’ (MicroBrightField Inc.). As imagens dos cortes, apresentadas nas

Figuras 6 e 7, foram digitalizadas no microscópio 'Leica DM 100', com o sistema 'Leica Application Suite Professional', e as barras de escala e os símbolos de identificação de áreas anatômicas foram inseridos com o programa 'Adobe Photoshop CS3 Extended'.

4. Medida da concentração de água e de proteína total e solúvel

O teor de água e de proteína total foi medido em amostras dos grupos experimentais descritos no item 2, com exceção do grupo de despertar seguido de ingestão de alimento. Para a estimativa do teor de água, amostras do tecido ventricular foram descongeladas, o excesso de água foi retirado com o auxílio de um papel de filtro e as amostras pesadas e mantidas em estufa a 60°C até seu peso tornar-se constante (cerca de 48 h). As amostras secas 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 % do peso úmido do tecido. As amostras secas foram, então, utilizadas para a medida da concentração de proteína total usando um protocolo adaptado de Milligan & Girard (1993). As amostras foram homogeneizadas em 5 volumes de ácido perclórico (PCA) 6% com um homogeneizador do tipo 'ultraturrax' modelo T25 (IKA Labortechnik). 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 novamente suspenso em 4 volumes de PCA 6% e novamente centrifugado por 5 min a 10.000 g, repetindo-se este procedimento 3 vezes. Ao final, o precipitado foi ressuspenso em 14 volumes de KOH 2,5% e a solução mantida sob agitação constante por 24 h, para completa solubilização das proteínas extraídas das amostras.

A concentração de proteínas solúveis foi medida, primeiramente, na fração sobrenadante dos extratos centrifugados a 17.000 g, conforme procedimento descrito abaixo no item sobre os ensaios enzimáticos, e esta medida inclui principalmente enzimas do metabolismo energético. Após esta etapa, o precipitado obtido na centrifugação foi ressuspenso em tampão de baixa força iônica (50mM K₃PO₄, pH 7,0) com Triton 0,1% e centrifugado a 3.000 g por 20 min, a 4°C, e o sobrenadante removido para tubo eppendorf, repetindo-se o mesmo procedimento por mais duas vezes e reunindo-se os sobrenadantes até a obtenção de um volume final, o qual foi

utilizado para a medida complementar do conteúdo de proteínas sarcoplasmáticas. O precipitado obtido ao final deste procedimento foi ressuspensão em solução 10 M de uréia com ácido acético glacial e mantido sob agitação ‘overnight’ para completa solubilização, e foi posteriormente usado para a medida do conteúdo de proteínas miofibrilares. Por fim, a concentração de proteína total, sarcoplasmática e miofibrilar nas amostras foi determinada com base no método colorimétrico de Lowry *et al.* (1951), modificado para o uso de placas de microtitulação (300 μ L) 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 triplicata, utilizando três diluições da amostra, e a concentração de proteína total foi expressa em mg.g⁻¹ de tecido úmido e mg.g⁻¹ de tecido seco e a de proteínas solúveis em mg.g⁻¹ de tecido úmido.

5. Medida da concentração de lipídio total

Os lipídios foram extraídos segundo o método de Folch modificado (FOLCH *et al.*, 1957). As amostras foram pesadas e homogeneizadas com solução de clorofórmio:metanol (2:1), utilizando-se um homogeneizador tipo ‘ultraturrax’ modelo T25 (IKA Labortechnik). A homogeneização foi feita a 16.000 rpm, por três vezes consecutivas durante 10 s cada, intercaladas com intervalos de resfriamento de 30 s. O homogeneizado foi transferido para tubos de ensaio, o frasco de homogeneização foi lavado duas vezes com a solução de homogeneização e o volume completado com o até atingir 10 mL. A este volume adicionou-se 2 mL de água destilada e a amostra foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 min. Após centrifugação, a fase inferior, contendo os lipídios, foi removida pela técnica de dupla pipeta e transferida para outro frasco previamente pesado. O procedimento foi repetido 2 vezes, adicionando-se clorofórmio à fase superior para remoção do conteúdo lipídico remanescente, centrifugando-se e transferindo-se a fase inferior para um mesmo frasco. Ao final, o solvente contido no volume final das amostras foi evaporado em estufa a 60°C.

O teor de lipídio total foi determinado por gravimetria e pelo método colorimétrico baseado em Frings *et al.* (1972). Pelo primeiro método, os tubos contendo o extrato lipídico seco foram pesados até que o peso se tornasse constante e o peso inicial do tubo foi subtraído para obtenção do peso do extrato lipídico de cada amostra.

Para a determinação colorimétrica, as amostras foram diluídas em 1 mL de clorofórmio e duplicatas de 60 µL foram colocadas para secar em estufa a 50°C, durante 30 min, juntamente com amostras crescentes de solução padrão preparada com clorofórmio e óleo de fígado de bacalhau (*Cod liver oil fatty acid methyl esters*, SIGMA). O resíduo lipídico seco foi solubilizado em ácido sulfúrico concentrado em banho de água fervente por 10 min. Após resfriamento, adicionou-se o reagente de fosfovanilina (vanilina 0,6%, ácido fosfórico concentrado e água destilada na proporção de 7:12:1) e os tubos foram mantidos em banho a 37°C por 15 min. Após resfriamento, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração de lipídio calculada a partir da curva padrão. A concentração de lipídio total por estes dois métodos foi expressa em mg.g⁻¹.

6. Medida da atividade máxima de enzimas

6.1. Homogeneização das amostras

A atividade máxima ($V_{\text{máx}}$) das enzimas piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOAD) foi medida em amostras dos grupos experimentais descritos acima, com exceção de medidas da PK e LDH no grupo de despertar seguido de ingestão de alimento. As amostras de tecido foram descongeladas e conservadas em gelo ao longo de todas as etapas descritas a seguir. Após pesagem, a amostra foi homogeneizada em 9 volumes (v:v) 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 medidas da CS e HOAD. 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. A homogeneização foi feita em baixa velocidade, no decorrer de três etapas de 30 s de duração intercaladas por um intervalo de 30 s para resfriamento, utilizando-se um homogeneizador do tipo ‘ultraturrax’ modelo T25 (IKA Labortechnik). Em seguida, os homogeneizados foram submetidos a ultra-som três vezes por 10 s, com intervalos de resfriamento de 30 s, utilizando-se um sonicador IKA Labor Technik-U-200S. O emprego de Triton X-100 e de ultra-som 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 17.000g e a 4°C

por 15 min em centrífuga Hettich Universal 30-RF e o sobrenadante obtido foi utilizado imediatamente nos ensaios enzimáticos, armazenando-se uma alíquota em freezer -80°C para a determinação posterior do teor de proteínas solúveis dos extratos.

6.2. Ensaios enzimáticos

Foram medidas as $V_{\text{máx}}$ de enzimas do metabolismo de glicose (PK e LDH) e ácidos graxos (HOAD), e a CS, enzima marcadora das taxas de oxidação mitocondrial. Substratos e co-fatores foram dissolvidos em tampão de ensaio e a solução ajustada para o pH experimental. As $V_{\text{máx}}$ foram medidas em volume final de 1 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 a 340 nm (coeficiente de extinção milimolar = 6,22), na reação da PK, LDH e HOAD, ou a produção de ânion reduzido de DTNB a 412 nm (coeficiente de extinção milimolar = 13,6), na reação da CS. As medidas de $V_{\text{máx}}$ foram baseadas no método descrito por Suarez *et al.*, (1986). 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:

- **Piruvato quinase** (PK; EC 2.7.1.40): fosfoenol-piruvato 5 mM (omitido nos controles), ADP 5 mM, MgCl₂ 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).
- **Lactato desidrogenase** (LDH; [S]-lactato: NAD⁺ oxiredutase; 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).
- **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 ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,1 mM em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0).
- **β -hidroxiacil-CoA desidrogenase** (HOAD; EC 1.1.1.35): acetocetil CoA 0,1 mM (omitido nos controles), NADH 0,15 mM 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 na temperatura de ensaio ($V_{\text{máx}}$). A determinação dos valores de $V_{\text{máx}}$ *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 $V_{\text{máx}}$ é um indicador de capacidade funcional (GARLAND & CARTER, 1994; SUAREZ *et al.*, 1986).

Os resultados foram expressos em U.g-1 de tecido úmido, onde U representa uma unidade de atividade enzimática e é definida como a quantidade de enzima que converte 1 μmol de substrato a produto por minuto, a 25°C.

7. Perfil de ácidos graxos

7.1. Extração dos lipídios

Os lipídios das amostras de ventrículo cardíaco foram extraídos segundo o método de Folch modificado (FOLCH *et al.*, 1957). As amostras foram pesadas e diluídas em solução de clorofórmio:metanol (2:1), com 0,01% de hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante. A homogeneização foi feita por três vezes a 16.000 rpm, durante 10 s cada e com intervalos de resfriamento de 30 s, utilizando-se um homogeneizador do tipo ultraturrax' modelo T25 (IKA Labortechnik). Em seguida, o homogeneizado foi filtrado com papel filtro Wheatman N° 5, o frasco de homogeneização lavado duas vezes com solvente e o volume completado com o solvente de homogeneização até atingir 10 ml. Na sequência, foram adicionados 2 mL de NaCl 0,73% e a solução foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 min. A fase inferior, contendo os lipídios, foi removida pela técnica de dupla pipeta e transferida para outro frasco. O procedimento foi repetido 2 vezes adicionando-se clorofórmio à fase superior para remoção do conteúdo lipídico remanescente. Ao final, o solvente foi evaporado utilizando-se um fluxo de nitrogênio, ou as amostras foram guardadas com solvente e mantidas em freezer -20°C até o momento do uso.

7.2. Separação das classes de lipídios

A separação dos lipídios neutros e polares foi feita utilizando-se o método de cromatografia em coluna de sílica gel. A sílica foi seca em estufa a 110°C por 1 h e, após resfriamento em dessecador, foi introduzida no interior de pipetas Pasteur com lâ de vidro na extremidade inferior. Para remoção de possíveis resíduos orgânicos,

pipetou-se metanol e clorofórmio no topo da coluna, descartando-se o volume coletado na base. Em seguida adicionou-se a amostra diluída em clorofórmio e, em sequência, 3 mL da mistura clorofórmio:metanol:ácido fórmico (99:1:0.5) para eluir os lipídios neutros (principalmente triacilgliceróis) e 6 mL de metanol para eluir os lipídios polares (fosfolipídios). As frações correspondentes foram coletadas, o solvente parcialmente evaporado com fluxo de nitrogênio e o volume remanescente armazenando em freezer -20 °C para uso posterior, ou totalmente evaporado para uso imediato nas etapas a seguir.

7.3. Metilação e análise da composição dos ácidos graxos

Às frações lipídicas secas, polar e neutra, foram adicionados 2 mL de toluol e 3 mL de solução de cloreto de acetila (5% HCl em metanol), os frascos foram fechados, removendo-se o ar em contato com as amostras com fluxo de nitrogênio, e então a mistura foi incubada em banho a 70°C, por 2 h. Após resfriamento dos frascos em água, adicionou-se 5 mL de carbonato de potássio 6% e a fase superior contendo os metil ésteres foi retirada e transferida para tubos contendo 1 g de NaSO₄ para a retirada de resíduos de água. As amostras foram finalmente transferidas para outro tubo e evaporadas completamente com fluxo de nitrogênio, para análise do resíduo lipídico em cromatógrafo, ou apenas parcialmente evaporadas para proteção contra oxidação durante o armazenamento em freezer -20°C.

Os metil ésteres de ácidos graxos provenientes desta reação foram analisados em cromatógrafo gasoso Varian modelo 3900 acoplado a um ionizador de chama, equipado com a coluna CP Wax-52CB com espessura de 0,25 mm, diâmetro interno de 0,25 µm e comprimento de 30 m tendo o hidrogênio como gás de arraste. As amostras foram injetadas diluídas em hexano e foram submetidas à temperatura inicial de 170°C por 1 min, com um aumento de 2,5°C.min⁻¹ até atingir a temperatura final de 215°C, que foi mantida por 5 min.

Cada tipo de ácido graxo foi identificado por comparação com os tempos de retenção de um padrão externo contendo uma mistura de ácidos graxos (Supelco 37 *componentes* – Sigma-Aldrich; Figura 4). Os ácidos graxos presentes nas amostras e ausentes no padrão foram identificados com base nos resultados apresentados em Christie (1992) utilizando a mesma coluna já descrita. As concentrações relativas de

cada ácido graxo foram determinadas pela proporção entre a área de cada pico do cromatograma e a área total, sendo expressas em porcentagem.

Figura 4 – Cromatograma de uma amostra padrão (SUPELCO, 37 ‘components’) utilizado como comparação para identificar os ácidos graxos das amostras de ventrículo cardíaco de teiús.

8. Análise estatística

Dado o efeito de escala sobre a forma e função de órgãos e tecidos nos animais em geral (SCHIMIDT-NIELSEN, 1984) 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 ventricular e outras variáveis do miocárdio foram analisados nas diferentes fases do ciclo anual e em animais submetidos a 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). As equações de regressão linear significativas foram comparadas por meio do test 't' de Student.

A influência das fases do ciclo anual sobre variáveis morfológicas e bioquímicas do ventrículo cardíaco foi analisada por meio de ANOVA 'one way' e, face às indicações de variabilidade significativa, comparações múltiplas foram feitas entre as médias dos grupos de dados através do teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Os dados que não passaram pelo teste de normalidade foram analisados por meio do teste de variância não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para determinação de quais grupos diferiam entre si. Todas as comparações entre animais alimentados e submetidos a jejum por 20 dias na atividade de primavera foram feitas separadamente, por meio do teste 't' de Student. Quando os dados não seguiam as exigências de homogeneidade de variâncias ou normalidade, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Os valores de ácidos graxos expressos em porcentagem passaram por transformação arco-seno previamente à aplicação dos testes. A existência de correlação entre as atividades máximas de enzimas foi verificada pelo teste de correlação linear e expressa pelo coeficiente de correlação R.

Todas as análises foram feitas com base em Zar (1999) utilizando-se o programa Sigma Stat (Jandel Scientific Software). 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 ventrículo cardíaco

Na Tabela 1 estão apresentadas as massas corpórea e do ventrículo cardíaco de teiús jovens, ao longo do primeiro ciclo anual. Não há diferença significativa da massa corpórea entre os grupos experimentais analisados e, portanto, pode-se assumir que não há influência significativa do efeito alométrico associado ao crescimento nas comparações entre as fases do ciclo anual. Entretanto, nota-se uma tendência ao aumento da massa corpórea no grupo de animais submetidos ao jejum na primavera, os quais foram mortos mais tardiamente no ciclo anual ($P=0,089$). A massa ventricular média, em valores absolutos, também não varia entre os grupos, embora pareça existir uma tendência a valores menores nos grupos de animais de início do outono (os mais jovens), e após o despertar e ingestão de alimento ($P=0,08$).

No início da atividade de outono, em meados de abril, a massa ventricular relativa representa 0,16% da massa corpórea dos jovens teiús (Tabela 1). Essa porcentagem é cerca de 1,3 vezes maior no grupo de animais mortos no final do outono e 1,7 vezes maior no grupo de inverno, após 60 dias de jejum e depressão metabólica, quando o ventrículo cardíaco atingiu 0,27% da massa corpórea. No final do inverno, cerca de 48 h após o despertar e a ingestão de água, a massa ventricular relativa diminuiu para valores semelhantes aos observados no final do outono e, após a retomada da alimentação, volta a exibir uma porcentagem comparável a de animais dormentes ($P<0,001$). Na primavera, 30-40 dias após o despertar, a massa ventricular compreende 0,24% da massa corpórea dos teiús, uma porcentagem 14% menor em relação à fase anterior e 50% maior em relação ao início do outono. Embora não confirmada pela estatística, animais ativos na primavera submetidos a jejum apresentam redução de 19% da massa ventricular relativa quando comparados a animais alimentados, contrastando com as alterações observadas no jejum associado à dormência sazonal.

Após a eclosão, o coração dos jovens teiús cresce com o aumento da massa corpórea e, ao atingirem o outono, animais maiores possuem um ventrículo cardíaco menor em relação a animais menores segundo o coeficiente angular $b=0,8$, calculado

para esta fase do ciclo anual (Tabela 1 e Figura 5). Porém, os valores de b calculados separadamente para animais sacrificados na primeira e na segunda metade do outono ($b=0,70$ e $0,81$) diferem significativamente. Após 60 dias de dormência esta tendência se acentua muito ($b>1,14$) e, no conjunto, os dados sugerem uma mudança na relação alométrica entre a massa ventricular e a massa corpórea associada ao ciclo sazonal. Enquanto no início do outono estima-se uma variação da massa ventricular de 2,2 vezes para uma variação de 3 vezes na massa corpórea, no final do outono esta variação seria de 2,4 vezes e após 60 dias de dormência de 3,5 vezes, isto é, teiús maiores passaram a apresentar um ventrículo desproporcionalmente maior do que animais menores nesta fase do ciclo anual. Após o despertar e a ingestão apenas de água, o coeficiente angular diminui significativamente em relação à dormência ($b=0,78$), indicando que há uma acentuada diminuição massa ventricular relativa nos teiús de maior tamanho corpóreo. Como resultado, as estimativas sugerem uma variação de 2,4 vezes na massa ventricular para uma variação de 3 vezes da massa corpórea durante a fase inicial do despertar. Cerca de uma semana depois, após a ingestão de alimento, a massa ventricular aumenta desproporcionalmente nos animais maiores, conforme sugere o valor de $b=0,84$, significativamente diferente do grupo de animais que ingeriram apenas água. Contudo, 30-40 dias após o início da primavera o padrão alométrico novamente se modifica ($b=0,51$) e sugere um aumento desproporcional da massa ventricular nos teiús de menor tamanho corpóreo, de maneira que animais exibindo uma variação de 3 vezes na massa corpórea teriam uma diferença de apenas 1,8 vezes na massa ventricular. Em animais submetidos ao jejum na primavera, apesar da ausência de variação da massa ventricular relativa média o coeficiente $b=0,75$ é significativamente diferente do valor calculado para animais alimentados, sugerindo que o jejum teria causado uma redução substancial da massa ventricular apenas nos animais de menor tamanho corpóreo.

2. Histologia e Estereologia

A arquitetura tissular da parede do ventrículo cardíaco dos teiús é semelhante à descrita para outros répteis (POUPA & LINDTRÖM, 1983; TOTA, 1983). Na Figura 6, tomando-se por referência o ventrículo de animais em atividade de primavera, externamente encontra-se o epicárdio (Ep), uma camada delgada de tecido seroso associada a uma grande quantidade de vasos sanguíneos. Abaixo do epicárdio encontra-se o miocárdio misto, formado pela camada externa compacta (Co) e pela camada

interna esponjosa (Es), facilmente distinguíveis. Na camada miocárdica compacta as fibras musculares estão organizadas de maneira densa e, de acordo com a disposição dessas fibras, pode-se subdividir a camada compacta em uma subcamada externa, com fibras orientadas no sentido longitudinal, e uma subcamada interna, com fibras orientadas no sentido circular. A camada esponjosa é formada por uma rede de trabéculas musculares, com fibras orientadas em várias direções, separadas por espaços lacunares (La) que se comunicam com o lúmen do órgão. A camada mais interna, o endocárdio, reveste a superfície das trabéculas e é formada por células endoteliais achatadas, com núcleo oval e fortemente corado.

Na Figura 6 são apresentados cortes de fragmentos da parede ventricular dos teiús, nas diferentes fases do ciclo anual, e a Tabela 2 apresenta a densidade de área (A_A) de espaço lacunar do tecido nas fases correspondentes. Na atividade de outono, a camada miocárdica esponjosa apresenta-se densa, com trabéculas espessas e espaços lacunares reduzidos, que ocupam somente cerca de 8% da área total do corte. Esta configuração se mantém até o despertar e a ingestão de alimento, quando então já se observa uma tendência ao aumento dos espaços lacunares, que passam a ocupar 14% da área total do corte, juntamente a uma diminuição da espessura das trabéculas. Mais adiante na atividade de primavera, o miocárdio esponjoso apresenta-se extremamente reticulado, com 29% da área total do corte ocupado por espaços lacunares, e nesta fase a A_A difere estatisticamente de todas as fases anteriores ($P < 0,001$).

A densidade numérica (N_V) de cardiomiócitos, medida somente nas trabéculas musculares da camada miocárdica esponjosa e excluindo-se a região de espaços lacunares, é 37% menor na dormência em relação à atividade de primavera ($P = 0,032$; Figura 7, Tabela 3). Quando o percentual de tecido ocupado por espaços lacunares é considerado na estimativa de N_V , a variação observada passa a ser de 25% e, embora substancial, a diferença em relação à atividade de primavera torna-se marginalmente significativa ($P = 0,086$, dados não apresentados). Assumindo-se que o volume dos componentes intersticiais do músculo cardíaco (endoteliócitos, fibroblastos, músculo liso, fibras colágenas) é constante e de pequena magnitude, o volume calculado de um cardiomiócito na fase de atividade de primavera é, em média, $1.376 \mu\text{m}^3$ e estaria 52% aumentado na dormência ($2098 \mu\text{m}^3$, $P = 0,008$).

O número total de cardiomiócitos (N_t) foi estimado a partir do peso do órgão e de N_V , após correção da variação não significativa de peso absoluto do coração entre as fases (Tabela 3). A diferença entre os pesos individuais foi artificialmente corrigida

utilizando-se a porcentagem de variação da média nas duas fases. O número total de cardiomiócitos estimado é cerca de 2 vezes menor na dormência em relação à atividade de primavera ($P=0,027$) e, no conjunto, os dados sugerem que o aumento do volume dos cardiomiócitos na dormência e da densidade de cardiomiócitos na atividade, não são apenas consequência de variações do volume de células pré-existentes, mas também de variações do número de cardiomiócitos.

3. Composição macromolecular do tecido: teor de água, proteínas e lipídio total

Os teores de água, proteína total e solúvel e lipídio total estão apresentados na Tabela 4. A análise do teor de água do músculo cardíaco não indicou variações significativas em função da fase do ciclo anual ou no grupo de animais submetidos a jejum na primavera, mantendo-se entre 80 e 81%, muito embora o teste de ANOVA detectou a presença de diferenças marginalmente significativas, possivelmente relacionadas ao pequeno aumento do teor de água no grupo de dormência, de 1,0% e 1,7% em relação à atividade de outono e de primavera, respectivamente ($P=0,09$).

A medida de proteína total nos extratos submetidos à hidrólise ácida refere-se a todas as proteínas do tecido, miofibrilares e sarcoplasmáticas, enquanto que a fração solúvel dos extratos preparados em solução tampão contém a maioria das enzimas relacionadas à produção de ATP. A concentração de proteína total do ventrículo cardíaco, calculada para o tecido úmido e seco, bem como a concentração de proteínas solúveis, não variam ao longo do ciclo anual ou nos animais submetidos a jejum na atividade de primavera. Entretanto, nota-se uma tendência à diminuição da concentração de proteínas solúveis logo após o despertar e ingestão de água (17% em relação à atividade de outono), e em animais submetidos a jejum na primavera (19% em relação a animais alimentados).

Separadamente da medida do teor de proteínas totais e solúveis descritas anteriormente, a separação das frações protéicas sarcoplasmáticas e miofibrilares foi realizada (Tabela 5). A medida da concentração de proteínas sarcoplasmáticas no extrato centrifugado a 17.000g gerou resultados similares aos obtidos nos extratos utilizados para a medida das enzimas, nos quais utilizou-se a mesma velocidade de centrifugação, com uma tendência à diminuição (20% em relação à atividade de outono) logo após o despertar e ingestão de água ($P=0,092$). Um segundo extrato de proteínas

sarcoplasmáticas foi obtido, e a análise não revelou variação entre os grupos. O conteúdo de proteínas miofibrilares é 49% menor na atividade de outono em relação à primavera e permanece reduzido após 60 dias de dormência, aumentando após o despertar e ingestão apenas de água. O teste de ANOVA detectou uma variação marginalmente significativa, possivelmente entre os grupos de outono e dormência em relação ao despertar e atividade de primavera ($P=0,061$).

Em relação ao teor de lipídios, os valores obtidos pelo método gravimétrico foram, em média, 2 vezes maiores do que aqueles obtidos pelo método colorimétrico e, embora o padrão de variação ao longo do ciclo anual seja similar, pelo primeiro método as diferenças observadas são marginalmente significativas e pelo segundo tornam-se mais evidentes e alcançam significância. No geral, os resultados indicam que a concentração de lipídios totais no miocárdio dos teiús na atividade de outono é similar à observada na atividade de primavera, diminui 21% após 60 dias de dormência ($P<0,001$) e mantém-se reduzida após o despertar e ingestão de água. Um efeito similar foi observado em animais submetidos a 20 dias de jejum na primavera, havendo uma redução do teor de lipídios totais de 23% em relação a animais alimentados ($P=0,033$).

4. Atividades enzimáticas

A atividade máxima ($V_{\text{máx}}$) de enzimas do metabolismo energético do miocárdio dos teiús está apresentada na Tabela 6. A $V_{\text{máx}}$ de uma enzima (E) reflete a sua concentração no tecido, dado que $V_{\text{máx}} = k_{\text{cat}} \cdot [E]$ e k_{cat} , é uma constante equivalente ao número de moléculas de substrato convertido a produto por uma molécula de determinada enzima na unidade de tempo e em condições saturantes e não inibitórias de substratos e co-fatores (NELSON E COX, 2008). Embora existam evidências na literatura de diferenças metabólicas entre as camadas miocardial compacta e esponjosa do miocárdio (TOTA, 1983), as amostras de tecido analisadas no presente trabalho eram mistas e os resultados não distinguem eventuais heterogeneidades do tecido.

A medida de $V_{\text{máx}}$ da citrato sintase (CS) é amplamente empregada como indicadora da capacidade aeróbia do tecido, dado que é uma medida indireta da densidade de membrana mitocondrial interna. Os resultados indicam uma ausência de variação sazonal significativa da $V_{\text{máx}}$ da CS ao longo do primeiro ciclo anual dos teiús, observando-se apenas uma tendência ao aumento na dormência, de 27% em relação à atividade de outono ($P=0,103$), muito embora as taxas sejam muito similares às de

atividade de primavera. Em contraste, houve uma diminuição significativa de 22% da CS em animais submetidos ao jejum em relação a animais alimentados durante a atividade de primavera ($P=0,007$).

A enzima β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOAD) participa da via da β -oxidação de ácidos graxos e a medida de sua $V_{\text{máx}}$ fornece informações sobre o potencial do tecido para a utilização de ácidos graxos como substrato energético (BURNESSE *et al.*, 2005). A $V_{\text{máx}}$ da HOAD na atividade de outono foi similar à observada na atividade de primavera, porém, na dormência observa-se uma forte tendência à inibição das taxas, de cerca de 20% em relação à atividade de outono e de primavera, sendo significativa apenas em relação a esta última fase. No início do despertar e após a ingestão de água este efeito aparentemente é abolido, porém, após a ingestão de alimento as taxas são ainda menores do que na dormência, cerca de 29% em relação à atividade de outono e 33% em relação à atividade de primavera ($P=0,014$). Em contraste com o efeito de inibição observado na dormência, animais submetidos ao jejum na atividade de primavera não apresentaram variação significativa da HOAD em relação aos animais alimentados e a taxa manteve-se num patamar elevado.

A $V_{\text{máx}}$ da piruvato quinase (PK), última enzima da glicólise aeróbia, fornece informação sobre o potencial para utilização aeróbia de carboidratos. Os resultados não sugerem a ocorrência de variação sazonal significativa desta enzima ao longo do ciclo anual, exceto por uma tendência ao aumento das taxas na dormência em relação à atividade de outono. Em contraste, houve uma diminuição marginalmente significativa da PK nos animais submetidos ao jejum em relação aos animais alimentados na atividade de primavera (11%; $P=0,065$).

A medida de $V_{\text{máx}}$ da enzima lactato desidrogenase (LDH) indica o potencial do tecido para utilização anaeróbia de carboidratos e, no caso do tecido cardíaco, para utilização de lactato como substrato energético, dado que a isoforma predominante no miocárdio atua preferencialmente no sentido da formação de piruvato (EVERSE *et al.*, 1970). A análise estatística não indicou variação sazonal significativa ao longo do ciclo anual da enzima, nem um efeito nos animais submetidos ao jejum na primavera.

A $V_{\text{máx}}$ das enzimas foi também calculada por miligrama de proteína solúvel, com o objetivo de verificar a influência de possíveis alterações sazonais do conteúdo de água dos tecidos nos padrões observados. Por exemplo, durante a dormência, quando os animais não ingerem água, ou no início do despertar, quando grande quantidade de água é ingerida, a atividade de enzimas específicas poderia estar superestimada ou

subestimada em consequência do efeito geral de concentração ou diluição das proteínas no homogeneizado. Conforme já descrito, a análise do teor de água do tecido não sugere a ocorrência de variação sazonal, muito embora o método empregado não permita excluir a possibilidade de ajustes da concentração de água entre os compartimentos extra e intracelular. O teor de proteínas solúveis, medido no homogeneizado usado nos ensaios enzimáticos, também não difere significativamente entre os grupos experimentais (Tabela 4); nota-se apenas uma tendência a valores mais baixos no fim da dormência e início do despertar, 29% menores do que na atividade de primavera. Quando os dados de $V_{\text{máx}}$ são calculados por miligrama de proteína solúvel, o padrão geral que resulta não difere substancialmente do obtido com os dados expressos por miligrama de tecido e, sendo assim, os dados não foram reportados. O perfil de variação em grande parte se repete, embora os testes estatísticos deixem de apontar parte das diferenças entre os grupos experimentais, provavelmente em função da maior variabilidade introduzida pelas medidas da concentração de proteínas dentro de cada grupo. Dado que não há evidências de uma influência de variações do conteúdo de água sobre o perfil de variação de $V_{\text{máx}}$, optamos por discutir os resultados expressos somente por miligrama de tecido.

A razão entre a $V_{\text{máx}}$ das enzimas, calculada com os dados em U.g^{-1} tecido, (Tabela 7) permite avaliar o sentido preferencial do fluxo de substratos nas vias metabólicas do músculo cardíaco dos teiús e as eventuais mudanças que ocorrem em função da fase do ciclo anual ou em resposta à restrição alimentar na fase ativa (STUART & BALLANTYNE, 1997). A razão HOAD:CS é similar na atividade de outono e de primavera e diminui 41% na dormência em relação à atividade de outono ($P=0,01$). Em contraste, nos animais ativos submetidos ao jejum na primavera nota-se uma tendência marginalmente significativa ao aumento da razão HOAD:CS, de 28% em relação aos animais alimentados ($P=0,072$). A razão PK:CS não varia nos grupos experimentais analisados, assim como a razão LDH:CS, contudo, parece haver uma tendência à diminuição da LDH:CS de 29% na dormência em relação à atividade de outono. Em contraste, nos animais submetidos ao jejum na primavera há um aumento da razão LDH:CS de 26% em relação aos animais alimentados ($P=0,019$). A razão PK:LDH é menor na pré-dormência, com valores 28 e 16% menores que na dormência e atividade de primavera, respectivamente ($P=0,015$). Nos animais submetidos ao jejum na primavera há uma redução de 18% da razão PK:LDH em relação a animais alimentados ($P=0,037$).

Adicionalmente, analisou-se a existência de correlações significativas entre as atividades enzimáticas, buscando evidenciar os ajustes simultâneos que ocorrem num mesmo animal. Na maioria dos grupos experimentais, não há correlação significativa entre as $V_{\text{máx}}$ das enzimas analisadas, com exceção da correlação positiva entre a PK e LDH na atividade de outono ($P=0,014$, $r=0,948$) e uma tendência à uma correlação negativa entre HOAD e PK na atividade de primavera ($P=0,097$, $r=-0,733$). No grupo de teiús submetidos à privação alimentar, observa-se ainda uma tendência a uma correlação positiva entre a LDH e CS ($P=0,0868$, $r=0,823$).

5. Composição de ácidos graxos

5.1.1. Lipídios neutros

A Tabela 8 contém os símbolos numéricos e os nomes sistemáticos e/ou comuns de todos os ácidos graxos encontrados no ventrículo cardíaco dos teiús. A composição de ácidos graxos da fração lipídica neutra do miocárdio está apresentada na Tabela 9 e na Figura 8 encontra-se apresentado um gráfico comparativo da composição das frações lipídicas neutra e polar nos grupos experimentais analisados. A fração neutra contém principalmente os ácidos graxos que compõem os triacilgliceróis, que são os lipídios de reserva energética, armazenados em pequena quantidade em gotículas intracelulares (DUCHARME & BICKEL, 2008). Na atividade de outono, o percentual de ácidos graxos saturados (SFA) da fração neutra é similar ao da fração polar, contudo, a quantidade relativa de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) é 3 vezes maior ($P<0,001$) e a porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) é 41% menor na fração neutra em relação à fração polar ($P=0,004$), resultando em um total de ácidos graxos insaturados (UFA) similar nas duas frações lipídicas; padrão mantido após cerca de 60 dias de dormência. Após o despertar e ingestão de água, enquanto as proporções de SFA e UFA permanecem similares nas duas frações, uma alteração das proporções relativas de MUFA e PUFA na fração lipídica neutra resultou em uma proporção de MUFA similar na fração polar e neutra, enquanto a proporção de PUFA tende a ser maior na fração polar ($P=0,082$), sugerindo que nesta fase as duas frações lipídicas tendem a exibir composição similar em grande parte devido a mudanças na composição de ácidos graxos da fração neutra, enquanto a polar permanece relativamente constante. Após a primeira alimentação, PUFA e MUFA voltam a exibir uma relação de proporção

similar à da atividade de outono e dormência, com uma maior proporção de PUFA na fração polar e de MUFA na fração neutra, mas a proporção de SFA é 10% maior na fração neutra em relação à polar ($P=0,045$). Esta relação se inverte após 20-30 dias de atividade na primavera, e o conteúdo percentual de SFA é 25% maior na fração polar ($P=0,005$) e o de UFA é 15% maior na fração neutra; uma variação similar também é observada no grupo de animais submetidos a jejum na primavera em relação aos animais alimentados ($P=0,041$). No jejum, apesar do conteúdo percentual de PUFA 40% maior na fração lipídica polar, não há diferença estatística entre as frações, enquanto a proporção de MUFA permanece maior na fração neutra em relação à polar ($P=0,002$).

A análise de variações da composição de ácidos graxos da fração neutra ao longo do ciclo anual fornece informações sobre uma possível seletividade de mobilização dos ácidos graxos armazenados no miocárdio, de modo similar ao que ocorre no tecido adiposo branco (RACLOT, 2003). Na atividade de outono, a somatória de SFA compreende 26% do total de ácidos graxos da fração lipídica neutra e não varia ao longo do ciclo anual ou em animais submetidos a jejum na primavera. Contudo, nota-se uma tendência a um aumento de 23% após o despertar e ingestão de alimentos em relação à atividade de outono. Os dois SFA mais abundantes, C18:0 e C16:0 (12,5 e 11,6% do total de ácidos graxos na atividade de outono, respectivamente), não variam em função do ciclo anual ou após o jejum na primavera. Os demais ácidos graxos estão presentes em pequena quantidade (<1%) e, dentre eles, destaca-se o aumento de 41% do conteúdo de C20:0 após o despertar e a primeira ingestão de alimento em relação ao outono. Mais adiante, 20-30 dias após a retomada da alimentação, os ácidos graxos C15:0, C20:0, C21:0 apresentam uma tendência similar de diminuição em relação ao outono (2,0; 1,8; e 7,0 vezes, respectivamente). Embora os padrões de variação sejam consistentes, as diferenças não foram confirmadas pela estatística, o que provavelmente se deve, em grande parte, à grande variabilidade individual dos dados, muito maior que a observada nos lipídios polares. No grupo de animais submetidos a jejum na primavera, as porcentagens do C15:0, C20:0 e C21:0 mostram forte tendência a um aumento em relação aos animais alimentados (2,0, 1,5 e 4,0 vezes, respectivamente), detectada pela estatística em relação aos dois últimos ácidos graxos ($P=0,074$; $P=0,042$).

O percentual de MUFA ($\Sigma n-9$, $n-7$) dos lipídeos neutros não se altera significativamente no ciclo sazonal ou no grupo de animais submetidos a jejum na primavera, embora a média varie de 26,8 a 42,8% do total de ácidos graxos. Ausência

de variação sazonal também é observada em relação ao MUFA mais abundante, C18:1n-9, que na atividade de outono representa 27% do total de ácidos graxos neutros. No entanto, destaca-se uma tendência à redução pela metade do C18:1n-9 nos animais submetidos a jejum na primavera em relação aos alimentados, não detectada pela estatística. O segundo ácido graxo mais abundante, C18:1n-7, representa 8,4% do total na atividade de outono e mostra uma tendência consistente à redução de 55%, 56% e 67% nas fases de dormência, despertar com ingestão de água e após ingestão de alimento, respectivamente, e ao aumento na atividade de primavera em relação ao outono ($P=0,069$). Apesar da forte tendência a um aumento de 71% do C18:1n-7 em animais submetidos ao jejum na primavera, a estatística não confirmou a diferença em relação aos animais alimentados, o que novamente reflete a grande variabilidade individual associada a um pequeno número de amostras disponíveis para análise. Outros MUFA foram encontrados em menor proporção (<3%) e não exibem variação sazonal, exceto o C17:1n-9, que diminui 7 vezes nos animais submetidos a jejum na primavera em relação aos animais alimentados ($P=0,027$).

O percentual de PUFA ($\Sigma n-3, n-6$) dos lipídios neutros compreende 31% do total de ácidos graxos na fase de outono e os valores médios variam de 24,9 a 40,9% durante o ciclo sazonal, junto a uma grande variabilidade individual, de modo que a estatística não detectou diferenças significativas entre os grupos de dados. Destaca-se, porém, uma tendência à diminuição de 21% da proporção de PUFA em animais dormentes, associada à pequena variação nas proporções de SFA e MUFA no sentido oposto ($\approx 10\%$ cada) e à significativa redução da concentração de lipídeos totais, reportada anteriormente. Entretanto, após o despertar e a ingestão de água a proporção de PUFA mostra uma tendência ao aumento, variando 29% em relação à atividade de outono. Esse efeito é acompanhado de uma tendência à diminuição de MUFA (32%), e o conjunto sugere mudanças na composição dos ácidos graxos neutros do miocárdio no início do despertar. Após cerca de 30 dias de atividade na primavera, a porcentagem de PUFA mantém-se elevada, com valores 20% maiores em relação à atividade de outono ($P=0,092$), e não há alteração no grupo submetido a jejum em relação a animais alimentados. Em consequência dessas alterações, a razão MUFA:PUFA é similar na atividade de outono e de primavera, porém, tende a ser 37% menor após o despertar e ingestão de água em relação ao outono ($P=0,071$).

As tendências de mudança sazonal da somatória de PUFA foram dadas, em grande parte, por dois PUFA mais abundantes, C18:2n-6 (8,7-14,7%) e C20:4n-6 (3,6-10,4%) e

pelo C22:6n-3 (<2,0%), os quais mostram uma acentuada tendência à redução na dormência e ao aumento no início do despertar, antes da ingestão de alimento. É interessante destacar que estes ácidos graxos não mostram a mesma variação no grupo de animais submetidos ao jejum na primavera. Entretanto, o jejum causou uma diminuição de 53% e 55% do C18:3n-3 e C20:2n-6, respectivamente ($P=0,098$; $0,053$), e um aumento de 83% do C22:5n-3 ($P=0,093$), marginalmente significativos, em relação aos animais alimentados.

A somatória de UFA é similar na atividade de outono e de primavera e também não se altera durante a dormência e no início do despertar, mas torna-se significativamente menor após a ingestão de alimento em relação ao grupo de atividade na primavera ($P=0,021$). A razão SFA:UFA é similar nos dois grupos de atividade e nos grupos de dormência e despertar com água, porém aumenta 31% após ingestão de alimento em relação ao outono, em consequência tanto do aumento de SFA quanto da diminuição de UFA, embora este efeito seja marginalmente significativo ($P=0,089$). Estas mudanças corroboram a hipótese de que ácidos graxos insaturados são preferencialmente mobilizados dos estoques lipídicos do miocárdio ao longo da fase hipometabólica até o momento do despertar. O jejum na primavera não causou alteração da somatória de UFA ou das razões calculadas, apesar da redução do teor de lipídios totais do tecido. Também não há variação do comprimento médio da cadeia dos ácidos graxos, ACL, no ciclo sazonal ou no grupo de animais submetidos a jejum na primavera em relação aos animais alimentados.

5.2. Lipídios Polares

A Tabela 10 apresenta a composição de ácidos graxos da fração lipídica polar do tecido coletado em diferentes fases do primeiro ciclo anual. Esta fração corresponde principalmente aos fosfolipídios que compõem todas as membranas celulares de todos os tipos celulares que compõem o miocárdio.

Na atividade de outono, cerca de 5 meses após a eclosão, a proporção de SFA nas membranas dos cardiomiócitos é de aproximadamente 28% e não varia entre as diferentes fases do ciclo anual ou nos animais submetidos ao jejum na atividade de primavera. Analisando-se os ácidos graxos individualmente, este padrão geral reflete a ausência de variação do SFA predominante, C18:0, que na atividade de outono representa 24% do total de ácidos graxos, e do C16:0, que representa 3% do total de

ácidos graxos na mesma fase, exceto por uma redução de 30% da proporção de C16:0 nos animais submetidos ao jejum na primavera em relação aos animais alimentados ($P=0,044$). Os demais SFA ocorrem em quantidades diminutas na fração polar ($<0,5\%$) e também apresentaram pouca variação entre os grupos experimentais, com exceção do C22:0, que exibe um aumento marginalmente significativo de 47% no despertar em relação à atividade de outono ($P=0,075$) e de 30% após 20 dias de jejum na primavera em relação aos animais alimentados ($P=0,051$), e do C17:0, que diminui 22% após o jejum na primavera ($P=0,036$).

De modo similar, a proporção de MUFA nas membranas dos cardiomiócitos não varia significativamente entre as diferentes fases do ciclo anual, mantendo-se entre 11,8 e 13,9% do total de ácidos graxos. Contudo, animais submetidos ao jejum na primavera apresentam redução marginalmente significativa de 21% do conteúdo total de MUFA em relação a animais alimentados ($P=0,099$). Esta redução se deu, em grande parte, devido a uma redução de 26% do conteúdo de C18:1n-9 neste grupo ($P=0,073$), uma vez que este é o MUFA mais abundante nas membranas dos cardiomiócitos dos teiús, representando cerca de 8% do conteúdo total de ácidos graxos. O segundo MUFA mais abundante, C18:1n-7 representa entre 2,6 e 3,6% do total de ácidos graxos e não varia em função do ciclo anual ou após 20 dias de jejum na primavera. Dos demais ácidos graxos, presentes em pequena quantidade, somente o C20:1n-9 apresenta variação, com diminuição de 36% nos animais submetidos ao jejum em relação a animais alimentados na primavera ($P=0,058$), contribuindo para a diminuição do total de MUFA observada neste grupo. A diminuição de MUFA nas membranas dos cardiomiócitos de animais submetidos a jejum na primavera foi dada pela redução de 25% de MUFA n-9, embora não significativa, além da variação de 10% do conteúdo de n-7.

Os PUFA perfazem em torno de 54% dos ácidos graxos das membranas dos cardiomiócitos na atividade de outono e essa soma não varia entre as diferentes fases do ciclo anual ou entre animais submetidos a jejum e alimentados na primavera. Os PUFA mais abundantes foram o C20:4n-6, o C18:2n-6 e o C22:6n-3, representando cerca de 27, 15 e 3% do total de ácidos graxos na atividade de outono, respectivamente, e nenhum deles varia significativamente ao longo do ciclo anual. Entretanto, o jejum na primavera causa um aumento de 14% do araquidônico ($P=0,035$) e uma acentuada redução de 40% do DHA, embora marginalmente significativa ($P=0,097$), em relação a animais alimentados. Dentre os demais ácidos graxos, os quais constituem frações menores, destacam-se o aumento do C22:4n-6 nos dois grupos de despertar em relação

à atividade de primavera ($P=0,015$), que por sua vez não difere da atividade de outono; e a gradual redução de 40, 70 e 78% do conteúdo de C20:5n-3 (eicosapentanoico - EPA) na dormência e no despertar após ingestão de água e após a ingestão de alimento, respectivamente, em relação ao outono, conforme indicado pela ANOVA ($P=0,026$), porém o teste de comparações múltiplas não detectou diferenças significativas entre os grupos de dados. Adicionalmente, nota-se uma redução de 34% conteúdo de EPA nos animais submetidos a jejum em relação aos animais alimentados, embora não confirmada pela estatística.

A fração correspondente à soma dos PUFA n-6 mostra uma tendência ao aumento após o despertar, seja após ingestão de água ou de alimento, em relação ao outono ($P=0,093$), assim como após o período de jejum na primavera em relação aos animais alimentados ($P=0,071$). Em ambos os casos, este aumento parece ter sido impulsionado principalmente pelos ácidos graxos C20:4n-6 e C22:4n-6. Um padrão oposto parece ocorrer com a soma dos PUFA n-3, que diminui 12 e 17% após o despertar, embora diferenças estatísticas não tenham sido detectadas. Do mesmo modo, nota-se a tendência a uma redução dos PUFA n-3 após um período de jejum na primavera, de 36% em relação aos animais alimentados ($P=0,054$). A maior parte da variação de PUFA n-3 deve-se à diminuição do C22:6n-3 e, como resultado do conjunto dessas variações, a razão n-6:n-3 tende a um aumento após o jejum na primavera, de 56%, em relação aos animais alimentados, embora não confirmado pela análise estatística ($P=0,101$).

A razão MUFA:PUFA não varia significativamente ao longo do ciclo sazonal, sugerindo que os pequenos ajustes descritos acima não modificam a proporcionalidade entre esses dois conjuntos de ácidos graxos nos fosfolípidios cardíacos em geral. Apenas nos animais submetidos a jejum na primavera nota-se uma diminuição de 25% em relação aos animais alimentados, marginalmente significativa ($P=0,070$), resultante da diminuição de MUFA (21%). O Índice de Insaturação (UI – ‘Unsaturation Index’) e o comprimento médio da cadeia não variaram em função do ciclo anual ou após 20 dias de jejum na primavera.

5.3. Efeito da massa corpórea sobre a composição de ácidos graxos dos fosfolípidios cardíacos

As figuras 9, 10 e 11 apresentam o resultado da análise de regressão entre a composição de ácidos graxos das membranas dos cardiomiócitos e a massa corpórea dos animais nos grupos experimentais estudados. Apesar do pequeno número de indivíduos e da pequena escala de tamanho em cada grupo, os quais dificultam a análise, alguns padrões consistentes foram observados. As somas de SFA, MUFA e PUFA, não exibem correlação com a massa corpórea em nenhum dos grupos experimentais analisados, e nem quando todas as fases são reunidas, no entanto, diversos ácidos graxos variam com a massa corpórea em alguma fase do ciclo anual.

A porcentagem do MUFA ácido oléico C18:1n-9 nas membranas dos cardiomiócitos apresenta uma correlação significativa com a massa corpórea na atividade de outono e o coeficiente angular da reta $b=0,40$ indica que animais maiores possuem um conteúdo maior deste ácido graxo nas membranas em relação aos animais menores (Figura 9). Com base na equação da reta, estima-se que para um aumento de 3 vezes na massa corpórea haveria um aumento de 1,5 vezes no conteúdo deste ácido graxo nas membranas dos cardiomiócitos dos jovens teiús. Este padrão, entretanto, não se mantém no grupo de dormência e, aparentemente, a relação entre essas variáveis se modifica após o despertar e a primeira alimentação ($P=0,09$), o expoente alométrico torna-se negativo e sugere uma diminuição do conteúdo de ácido oléico nos animais maiores ($b=-0,30$). Nesta fase, para um aumento de 3 vezes na massa corpórea, observou-se uma variação de 0,72 vezes do conteúdo de C18:1n-9. Nas demais fases, não se observa uma correlação entre o conteúdo de ácido oléico e a massa corpórea dos animais, sugerindo que não há um padrão consistente de variação dentro da faixa de tamanho analisada.

Embora o total de PUFA não apresente relação alométrica com a massa corpórea em nenhum dos grupos experimentais analisados, as duas maiores classes de PUFA, n-6 e n-3, relacionam-se alometricamente com a massa corpórea na atividade de outono e após o despertar e ingestão de água, respectivamente. Na atividade de outono, animais menores possuem uma maior proporção de PUFA n-6 em relação a animais maiores ($b=-0,12$) e o conteúdo de n-3 não possui relação com a massa corpórea. Já no despertar e após a ingestão de água, animais maiores possuem uma maior proporção de PUFA n-3 em suas membranas em relação a animais menores ($b=0,75$), enquanto a proporção de

PUFA n-6 não possui relação com a massa corpórea. A variação de PUFA n-3 no despertar provavelmente é resultado, em grande parte, da variação do C22:6n-3; e a variação de PUFA n-6 parece não estar relacionada com a variação de nenhum ácido graxo em particular. O C20:4n-6, que representa cerca de 30% dos ácidos graxos das membranas dos cardiomiócitos, não apresenta correlação significativa com a massa corpórea, exceto após o despertar e ingestão de água, quando há uma correlação positiva marginalmente significativa ($b=0,2$; $P=0,064$). O conteúdo do C22:5n-6 também não varia em função da massa corpórea no outono ou mesmo durante a dormência de inverno, porém, no início do despertar e após a ingestão de água observou-se uma correlação inversa significativa entre essas variáveis e o coeficiente $b=-0,45$ indica que animais de menor massa corpórea possuem uma fração relativamente maior deste ácido graxo nas membranas e, com base na equação da reta, para um aumento de 3 vezes da massa corpórea estima-se uma variação de 0,6 vezes no conteúdo de C22:5n-6 (Figura 10). Após a primeira alimentação, o expoente alométrico torna-se positivo ($b=0,35$) e o intercepto diminui, devido a uma diminuição no conteúdo de C22:5n-6 nas membranas dos cardiomiócitos de animais de menor massa corpórea e aumento em animais de maior massa corpórea. Após 20-30 dias de atividade na primavera há uma forte correlação entre essas variáveis e o coeficiente angular diminui para $b=-0,72$ ao mesmo tempo que o intercepto aumenta, indicando que animais menores tendem a exibir uma porcentagem maior do ácido graxo nas membranas em relação aos animais maiores após a retomada da atividade e do crescimento. Nesta fase, o conteúdo de C22:5n-6 apresenta uma variação de 0,45 vezes para um aumento de 3 vezes na massa corpórea. Nos animais submetidos a 20 dias de jejum na primavera, embora a regressão não seja estatisticamente significativa, o coeficiente da reta aumenta para $b=-0,18$ ao mesmo tempo que o intercepto diminui, sugerindo que há uma forte tendência à redução do conteúdo de C22:5n-6 nos animais menores, diminuindo a desproporção em função da massa corpórea.

Outro PUFA que apresenta variação em função da massa corpórea é o C22:6n-3 (Figura 10). Na atividade de outono, o conteúdo percentual do C22:6n-3 não varia em função da massa corpórea; na dormência, entretanto, a regressão é marginalmente significativa e o coeficiente angular da reta, $b=0,41$, sugere que a fração de C22:6n-3 nas membranas dos cardiomiócitos é relativamente menor nos animais menores ao longo desta fase. Estimativas com base na equação da reta mostram que para um aumento de 3 vezes da massa corpórea a porcentagem de C22:6n-3 aumenta 1,6 vezes.

No início do despertar, após a ingestão de água, nota-se uma forte correlação entre essas variáveis e a inclinação da reta se eleva para $b=0,81$ ao mesmo tempo que o intercepto diminui, de modo que para um aumento de 3 vezes da massa corpórea estima-se um aumento ainda maior, de 2,4 vezes, da fração de C22:6n-3 nesta fase. Aproximadamente uma semana após o despertar e a primeira alimentação, o expoente alométrico $b=0,37$ é menor do que no início do despertar e o intercepto da reta aumenta, sugerindo que a aparente desproporção do conteúdo de C22:6n-3 entre animais menores e maiores tende a diminuir, com a retomada da alimentação, embora a regressão seja marginalmente significativa. Surpreendentemente, após 20-30 dias de atividade na primavera o expoente alométrico da reta de regressão, $b=-0,9$, é muito menor do que nas fases anteriores e o intercepto maior e, embora a estatística não tenha confirmado a significância da regressão, o padrão consistente dos dados sugere uma completa inversão na relação entre essas variáveis após a retomada da atividade e do crescimento dos jovens teiús, de modo que para uma variação de 3 vezes da massa corpórea a porcentagem de C22:6n-3 seria cerca de 2,8 vezes maior nos animais menores. A análise do grupo submetido a 20 dias de jejum na primavera sugere uma tendência à diminuição do expoente alométrico em relação aos animais alimentados, de $b=-0,9$ para $-0,46$, traduzindo uma diminuição mais acentuada do conteúdo de C22:6n-3 nos animais de menor massa corpórea.

Tabelas

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

Fase do ciclo anual	Massa Ventricular		Massa Corpórea	a	b	R ²	P
	(g)	(%)					
Atividade de Outono (14)							
Early (4)	0,28 ± 0,04	0,16 ± 0,06 ^{c,e}	175, 25 ± 36,30	-2,116 ± 0,085	0,699 ± 0,0381 ^{b,c,d,e,f}	0,994	0,003
Late (10)	0,39 ± 0,05	0,21 ± 0,01	192,59 ± 29,75	-2,254 ± 0,188	0,811 ± 0,084 ^{a,c,d,f}	0,921	<0,001
Dormência de Inverno (14)	0,52 ± 0,04	0,27 ± 0,01 ^a	183,77 ± 23,01	-2,883 ± 0,311	1,140 ± 0,140 ^{a,b,d,e,f}	0,848	<0,001
Despertar							
água (17)	0,34 ± 0,03	0,21 ± 0,01	163,81 ± 17,20	-2,205 ± 0,156	0,784 ± 0,071 ^{a,b,c,e,f}	0,889	<0,001
alimento (4)	0,32 ± 0,07	0,28 ± 0,01 ^a	117,43 ± 33,17	-2,220 ± 0,039	0,836 ± 0,019 ^{a,c,d,f}	0,999	<0,001
Atividade de primavera							
Alimentado (15)	0,43 ± 0,03	0,24 ± 0,01	195,24 ± 22,97	-1,538 ± 0,118	0,514 ± 0,052 ^{a,b,c,d,e}	0,881	<0,001
Jejum (8)	0,56 ± 0,09	0,19 ± 0,01	305,23 ± 58,82	-2,116 ± 0,155	0,752 ± 0,064*	0,966	<0,001

Os valores são a média ± erro padrão da média (EPM), com o número de animais entre parênteses. A massa relativa do ventrículo cardíaco, corrigida pela massa corpórea, está representada em %. Regressões lineares foram realizadas com os valores transformados em log e descritos pela equação $\log_{10} Mv = \log a + b \log_{10} Mc$, onde *a* é o intercepto ± EPM, *b* é o coeficiente angular ± EPM, *Mv* é a massa ventricular e *Mc* a massa corpórea. R² é o coeficiente de determinação. ^a indica diferenças significativas em relação à atividade de outono inicial, ^b à atividade de outono final, ^c em relação à dormência de inverno, ^d em relação ao despertar (água), ^e em relação ao despertar (alimento), ^f em relação à atividade de primavera. * indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera.

Tabela 2 – Densidade de área (A_A) de espaços lacunares no miocárdio ventricular de lagartos teiú jovens no primeiro ciclo anual.

Fase do ciclo anual	A_A (cm ⁰)
Atividade de Outono (4)	0,08 ± 0,02
Dormência de Inverno (4)	0,08 ± 0,00
Despertar	
Água (4)	0,08 ± 0,01
Álimento (4)	0,14 ± 0,03
Atividade de primavera (5)	0,29 ± 0,02

Os valores são a média ± erro padrão da média, com o número de animais entre parênteses.

Tabela 3 – Densidade numérica (N_v) numérica de cardiomiócitos na camada miocárdial esponjosa e número total (N_t) de cardiomiócitos estimado para um coração de 0,3 g de lagarto teiú jovem em duas fases do primeiro ciclo anual de atividades.

Fase do ciclo anual	N_v (mm ³)	N_t
Dormência de Inverno (4)	479878,6 ± 23286,1	136783887,7 ± 15339489,4
Atividade de primavera (5)	759326,9 ± 74809,76	270743473,6 ± 28076601,3

Os valores são a média ± erro padrão da média, com o número de animais entre parênteses.

Tabela 4 – Concentração de água, proteínas e lipídio do ventrículo cardíaco de lagartos teiú jovens durante o primeiro ciclo anual de atividades.

Fase do ciclo anual	Proteína total (mg. g ⁻¹)			Proteínas solúveis	Lipídios Totais (mg.g ⁻¹)	
	Água	Tecido úmido	Tecido Seco		Gravimetria	Colorimetria
Atividade de Outono	80,31 ± 0,31	133,99 ± 8,41	682,28 ± 46,19	61,61 ± 10,15	36,18 ± 1,40	18,50 ± 0,59 ^{b,c}
Dormência de Inverno	81,11 ± 0,17	143,33 ± 10,15	758,74 ± 52,79	58,83 ± 4,27	31,25 ± 0,56	14,53 ± 0,22 ^{a,d}
Despertar						
Água	80, 63 ± 0,38	146,66 ± 11,04	761,27 ± 67,55	50,81 ± 4,53	32,32 ± 0,73	14,39 ± 0,26 ^{a,d}
Alimento	N.D.	N.D.	N.D.	61,05 ± 20,09	N.D.	N.D.
Atividade de primavera						
Alimentado	79,77 ± 0,49	136,77 ± 7,86	682,33 ± 51,62	71,35 ± 10,5	37,74 ± 2,92	19,24 ± 1,38 ^{b,c}
Jejum	80,64 ± 0,29	145,13 ± 8,70	751,31 ± 50,81	57,48 ± 6,56	30,21 ± 0,80	14,72 ± 0,44*

Os valores são a média ± erro padrão da média, de 6 animais para a medida da concentração de água, 5-6 animais para a medida da concentração de proteína total, 4-7 animais para a medida da concentração de proteínas solúveis e 6 animais para a medida de lipídio total. N.D. - não determinado. ^a indica diferenças significativas em relação à atividade de outono, ^b em relação à dormência de inverno, ^c em relação ao despertar (água), ^d em relação ao despertar (alimento), ^e em relação à atividade de primavera. * indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera.

Tabela 5 – Concentração de proteínas das frações sarcoplasmática 1, sarcoplasmática 2 e miofibrilar do ventrículo cardíaco de lagartos teiú jovens durante o primeiro ciclo anual de atividades

Fase do ciclo anual	Sarcoplasmática 1	Sarcoplasmática 2	Miofibrilar
Atividade de Outono (3)	86,54 ± 13,30	14,53 ± 1,03	14,08 ± 0,89
Dormência de Inverno (5)	73,21 ± 5,92	13,91 ± 0,92	15,37 ± 0,48
Despertar +água (5)	69,08 ± 5,87	15,58 ± 1,29	24,59 ± 5,51
Atividade de Primavera (6)			
Alimentado	99,75 ± 11,09	14,86 ± 0,70	27,46 ± 3,96

Os valores são a média ± erro padrão da média, com o número de animais entre parênteses.

Tabela 6 – Atividade máxima (U.g-1 tecido úmido; 25°C) de enzimas do metabolismo energético no ventrículo cardíaco de teiús jovens, durante o primeiro ciclo anual.

Fase do ciclo anual	CS	HOAD	PK	LDH
Atividade de Outono	29,57 ± 2,23	8,82 ± 0,57	103,34 ± 11,91	793,35 ± 55,59
Dormência de Inverno	37,59 ± 2,59	7,07 ± 0,80 ^e	120,09 ± 7,40	680,53 ± 30,87
Despertar				
Água	32,7 ± 3,51	7,97 ± 0,48	113,06 ± 5,46	738,90 ± 36,17
Alimento	29,03 ± 1,25	6,28 ± 0,59 ^e	N.D	N.D.
Atividade de Primavera				
Alimentado	36,45 ± 2,06	9,42 ± 0,52 ^{b,d}	114,76 ± 4,68	763,15 ± 50,02
Jejum	28,45 ± 1,15*	9,52 ± 1,48	102,02 ± 3,73	833,91 ± 56,04

Os valores são a média ± erro padrão da média, de 4-7 animais. N.D. - não determinado. ^a indica diferenças significativas em relação à atividade de outono, ^b em relação à dormência de inverno, ^c em relação ao despertar (água), ^d em relação ao despertar (alimento), ^e em relação à atividade de primavera. * indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera.

Tabela 7 – Razão entre as atividades máximas de enzimas do ventrículo cardíaco de lagartos teiú durante o primeiro ciclo anual

Fase do ciclo anual	HOAD:CS	PK:CS	LDH:CS	PK:LDH
Atividade de Outono	$0,28 \pm 0,03^b$	$3,19 \pm 0,49$	$25,42 \pm 3,11$	$0,13 \pm 0,00^b$
Dormência de Inverno	$0,17 \pm 0,02^{a,e}$	$3,32 \pm 0,27$	$18,02 \pm 1,72$	$0,18 \pm 0,01^a$
Despertar				
Água	$0,23 \pm 0,02$	$3,63 \pm 0,37$	$23,51 \pm 2,06$	$0,15 \pm 0,01$
Alimento	$0,22 \pm 0,02$	N.D	N.D.	N.D.
Atividade de Primavera				
Alimentado	$0,26 \pm 0,02^b$	$3,21 \pm 0,24$	$21,56 \pm 2,40$	$0,15 \pm 0,01$
Jejum	$0,34 \pm 0,03$	$3,60 \pm 0,11$	$29,22 \pm 1,30^*$	$0,12 \pm 0,01^*$

Os valores são a média $\pm$ erro padrão da média, de 4-7 animais. N.D. - não determinado. ^a indica diferenças significativas em relação à atividade de outono, ^b em relação à dormência de inverno, ^c em relação ao despertar (água), ^d em relação ao despertar (alimento), ^e em relação à atividade de primavera. * indica diferença significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera.

Tabela 8 – Lista dos ácidos graxos encontrados no músculo ventricular de lagartos teiú, seus símbolos numéricos e nomes comumente utilizados

Símbolo Numérico	Nomes Comuns
C14:0	Mirístico
C15:0	Pentadecílico
C16:0	Palmitico
C17:0	Margárico
C18:0	Esteárico
C20:0	Araquídico
C21:0	Heneicosílico
C22:0	Behênico
C24:0	Lignocérico
C16:1n-9	Palmitoléico
C16:1n-7	Palmitoléico
C17:1n-9	Malválico
C18:1n-9	Oléico
C18:1n-7	Vacênico
C20:1n-9	Gondótico
C22:1n-9	Erúcico
C24:1n-9	Nervônico
C18:2n-6	Linoleico
C20:2n-6	Eicosadienóico
C22:2n-6	Docosadienóico
C18:3n-6	γ -Linolênico
C18:3n-3	α –Linolênico
C20:3n-6	Dihomo- γ -linolênico
C20:3n-3	Eicosatrienóico
C18:4n-6	Octadecatetranóico
C20:4n-6	Araquidônico
C22:4n-6	Docosatetranóico
C20:5n-3	Eicosapentaenóico (EPA)
C22:5n-6	Docosapentanóico - (DPA)
C22:5n-3	Docosapentanóico
C22:6n-3	Docosahexanóico (DHA)

Tabela 9 – Composição de ácidos graxos dos lipídios neutros do miocárdio de lagartos teiú ao longo do primeiro ciclo anual de atividades

Ácido Graxo	Atividade de Outono	Dormência de Inverno	Despertar		Atividade de Primavera	
	(5)	(6)	Água (5)	Alimento (3)	Alimentado (6)	Jejum (6)
C14:0	0,38±0,06	0,82±0,19	0,85±0,24	0,78±0,18	0,40±0,08	0,55±0,09
C15:0	0,31±0,17	0,42±0,07	0,30±0,06	0,29±0,05	0,15±0,03	0,33±0,12
C16:0	11,65±2,25	14,84±1,41	9,60±2,33	15,12±3,58	9,60±1,05	9,27±1,88
C17:0	0,54±0,13	0,59±0,19	1,36±0,72	0,50±0,09	0,66±0,15	0,94±0,27
C18:0	12,48±1,41	11,25±0,43	15,44±3,65	14,20±2,06	12,20±0,88	11,71±0,34
C20:0	0,30±0,10	0,22±0,05	0,30±0,14	0,51±0,20	0,17±0,01	0,25±0,04**
C21:0	0,42±0,30	0,65±0,55	0,32±0,24	0,42±0,17	0,06±0,02	0,24±0,07*
C22:0	0,11±0,03	0,30±0,16	0,19±0,05	0,25±0,04	0,09±0,03	0,09±0,06
C24:0	0,25±0,12	0,04±0,02	0,41±0,29	0,54±0,26	0,33±0,31	0,16±0,07
C16:1n-9	0,77±0,17	1,39±0,40	1,94±0,54	1,37±0,25	0,75±0,12	1,07±0,21
C16:1n-7	1,39±0,15	2,60±0,83	1,84±0,62	2,62±1,08	1,54±0,35	1,45±0,44
C17:1n-9	0,12±0,08	0,23±0,09	0,15±0,15	0,09±0,09	0,14±0,04	0,02±0,02*
C18:1n-9	27,08±5,50	33,52±4,25	18,23±6,65	34,12±3,28	22,28±5,78	10,17±5,76
C18:1n-7	8,42±4,58	3,80±0,48	3,66±1,20	2,75±0,15	11,03±4,22	18,90±6,55
C20:1n-9	0,87±0,14	0,75±0,11	0,61±0,21	0,80±0,16	0,76±0,11	0,70±0,17
C22:1n-9	0,45±0,31	0,35±0,19	0,16±0,05	0,33±0,15	0,07±0,02	0,08±0,04
C24:1n-9	0,34±0,17	0,06±0,03	0,12±0,06	0,33±0,18	0,18±0,10	0,13±0,06
C18:2n-6c	8,76±0,76	7,17±1,11	10,25±0,93	9,13±1,69	14,70±4,07	12,17±5,09
C20:2n-6	0,50±0,08	0,26±0,07	0,27±0,10	0,18±0,09	0,49±0,10	0,22±0,08**
C22:2n-6	0,46±0,18	0,19±0,08	0,49±0,27	0,51±0,28	0,34±0,11	0,48±0,21
C18:3n-6	0,40±0,33	1,91±1,61	1,08±0,83	0,97±0,40	1,44±1,06	1,32±0,63
C18:3n-3	0,09±0,03	0,36±0,26	0,25±0,10	0,20±0,05	0,15±0,04	0,07±0,03**
C20:3n-6	0,44±0,07	2,31±1,69	0,45±0,07	0,41±0,07	0,38±0,06	0,70±0,38
C20:3n-3	0,06±0,03	0,20±0,09	0,27±0,21	0,01±0,01	0,20±0,06	0,15±0,05
C18:4n-6	3,01±1,07	4,39±1,78	6,39±3,85	1,99±0,33	2,73±0,92	4,35±1,24
C20:4n-6	10,43±3,59	3,63±0,44	11,92±5,63	4,97±1,07	8,33±2,25	10,67±3,39
C22:4n-6	1,82±0,33	1,21±0,21	1,52±0,16	1,39±0,43	1,46±0,24	1,48±0,25
C20:5n-3	0,91±0,40	0,18±0,08	3,71±3,20	1,13±0,52	3,60±1,94	1,86±1,00
C22:5n-6	0,93±0,12	0,61±0,11	1,25±0,47	0,56±0,12	0,86±0,16	0,91±0,40
C22:5n-3	2,73±1,73	2,16±1,34	1,14±0,44	0,73±0,22	2,36±1,31	4,33±1,53**
C22:6n-3	1,15±0,44	0,37±0,08	1,90±0,79	0,46±0,07	1,04±0,30	0,53±0,39**
ΣSFA	26,47±3,27	29,15±2,13	28,84±1,69	32,61±1,10	23,71±1,28	23,57±1,88
ΣMUFA	39,55±2,88	42,82±4,88	26,82±6,60	42,43±3,05	36,79±2,13	32,70±6,04
ΣPUFA	31,67±5,25	24,95±5,01	40,88±7,03	22,65±2,32	38,08±3,12	39,24±7,68
ΣUFA	71,21±3,09	67,77±1,27	67,70±1,11	65,08±0,98 ^e	74,87±1,21 ^d	71,94±2,07
SFA/UFA	0,38±0,06	0,43±0,04	0,43±0,03	0,50±0,02	0,32±0,02	0,33±0,03
MUFA/PUFA	1,44±0,29	2,15±0,47	0,90±0,36	1,94±0,31	1,03±0,16	1,17±0,36
Σn-9	29,64±5,28	36,30±4,16	21,20±6,88	37,05±3,24	24,18±5,89	12,16±5,69
Σn-7	9,82±4,54	6,39±1,04	5,50±1,77	5,37±0,94	12,57±4,25	20,34±6,80
Σn-6	26,74±4,06	21,67±3,59	33,62±5,54	20,11±2,18	30,73±3,22	32,30±6,29
Σn-3	4,93±1,81	3,28±1,73	7,26±3,02	2,53±0,71	7,35±2,21	6,95±2,50
n-9/n-3	11,84±4,70	24,11±5,69	10,24±6,06	18,42±6,80	5,79±2,67	5,39±4,28
n-6/n-3	7,92±2,13	12,87±3,64	8,56±2,61	10,14±4,01	7,91±2,65	7,90±1,89
UI	153,55±21,16	129,70±16,28	177,25±23,25	116,48±8,34	166,60±12,66	172,79±23,75
ACL	17,90±0,17	17,40±0,18	17,71±0,32	17,55±0,12	18,04±0,16	17,54±0,23

Os resultados estão expressos em % do total e representam a média ± erro padrão, com o número de amostras (n) de cada fase indicado entre (), onde cada amostra corresponde a um animal. ΣSFA=Σácidos graxos saturados; ΣMUFA=Σácidos graxos monoinsaturados; ΣPUFA=Σácidos graxos poliinsaturados; ΣUFA=Σácidos graxos insaturados (MUFA+PUFA); UI=índice de insaturação calculado pelo $\sum m_i.n_i$ onde m_i é a % do ácido graxo

insaturado e n_i é o número de insaturações deste ácido graxo; ACL= comprimento médio da cadeia, calculado como $[(\sum \%FA_{14} \cdot 14 + \dots + \sum \%FA_n \cdot n)]/100$, onde FA_n são todos os ácidos graxos de n átomos de carbono; $\sum n3 = \sum$ ácidos graxos $n3$; $\sum n6 = \sum$ ácidos graxos $n6$. ^dindica diferenças significativas em relação ao despertar (alimento); ^eem relação à atividade de primavera; ^{*} indica diferença significativa e ^{**} diferença marginalmente significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera.

Tabela 10 – Composição de ácidos graxos dos lipídios polares do miocárdio de lagartos teiú ao longo do primeiro ciclo anual de atividades

Ácido Graxo	Atividade de Outono	Dormência de Inverno	Despertar		Atividade de Primavera	
	(6)	(6)	Água (6)	Alimento (4)	Alimentado (7)	Jejum (6)
C14:0	0,23±0,05	0,23±0,09	0,32±0,04	0,37±0,07	0,28±0,09	0,22±0,03
C16:0	3,06±0,23	3,67±0,97	3,11±0,35	3,13±0,28	3,58±0,34	2,49±0,33*
C17:0	0,16±0,01	0,18±0,02	0,18±0,02	0,15±0,02	0,18±0,01	0,14±0,01*
C18:0	23,95±0,28	23,62±0,64	24,63±0,36	25,43±0,40	24,88±0,79	24,65±0,45
C20:0	0,12±0,02	0,12±0,01	0,19±0,05	0,12±0,01	0,14±0,03	0,15±0,01
C22:0	0,15±0,02	0,12±0,03	0,22±0,03	0,12±0,01	0,14±0,04	0,20±0,01**
C24:0	0,09±0,01	0,11±0,02	0,14±0,04	0,08±0,01	0,11±0,02	0,11±0,01
C16:1n-9	0,12±0,02	0,36±0,19	0,23±0,03	0,17±0,02	0,20±0,03	0,14±0,02
C16:1n-7	0,31±0,05	0,29±0,05	0,26±0,07	0,31±0,03	0,27±0,05	0,28±0,05
C17:1n-9	1,39±0,86	1,63±0,60	1,29±0,74	1,52±0,66	0,75±0,36	0,67±0,66
C18:1n-9	7,69±0,43	7,73±0,65	6,39±0,64	6,78±0,60	7,76±0,78	5,75±0,64**
C18:1n-7	3,16±0,13	3,46±0,32	3,11±0,27	3,63±0,21	2,96±0,33	2,64±0,18
C20:1n-9	0,20±0,02	0,22±0,01	0,20±0,01	0,22±0,01	0,22±0,03	0,14±0,02**
C24:1n-9	0,11±0,03	0,07±0,01	0,09±0,02	0,09±0,02	0,22±0,09	0,16±0,02
C18:2n-6c	15,24±1,38	13,72±0,63	15,39±0,49	16,24±0,59	11,63±1,97	14,42±2,07
C20:2n-6	0,41±0,11	0,33±0,04	0,26±0,03	0,28±0,02	0,29±0,03	0,26±0,02
C22:2n-6	0,14±0,06	0,05±0,01	0,18±0,07	0,14±0,03	0,12±0,06	0,10±0,05
C20:3n-6	0,46±0,07	0,71±0,25	0,39±0,06	0,40±0,05	0,96±0,38	0,41±0,04
C18:4n-6	0,98±0,57	0,32±0,07	0,95±0,28	0,40±0,03	1,36±0,70	0,64±0,15
C20:4n-6	26,97±0,60	26,56±0,82	28,02±0,91	27,99±1,14	27,26±1,36	31,02±0,76*
C22:4n-6	2,08±0,26	2,09±0,17	2,46±0,15 ^c	2,67±0,24 ^c	1,73±0,12 ^{c,d}	2,07±0,16
C20:5n-3	0,37±0,11	0,22±0,06	0,11±0,02	0,08±0,02	0,29±0,06	0,19±0,02
C22:5n-6	2,28±0,22	2,57±0,15	2,59±0,16	1,97±0,20	2,48±0,36	1,92±0,09
C22:5n-3	1,95±0,28	2,01±0,47	1,41±0,13	1,32±0,14	1,41±0,19	1,47±0,08
C22:6n-3	2,94±0,33	2,59±0,40	2,96±0,31	2,78±0,27	3,70±0,73	2,20±0,30**
ΣSFA	27,89±0,20	30,87±2,43	29,00±0,53	29,56±0,58	29,63±1,10	28,12±0,50
ΣMUFA	13,11±1,08	13,93±1,14	11,80±1,06	12,88±0,79	12,59±1,11	9,92±1,02**
ΣPUFA	53,96±0,86	51,76±1,71	54,77±0,71	54,33±1,09	52,50±2,06	54,81±1,54
ΣUFA	67,07±1,69	65,70±1,95	66,58±1,46	67,20±1,58	65,09±2,30	64,73±1,79
SFA/UFA	0,42±0,01	0,48±0,05	0,44±0,01	0,44±0,02	0,46±0,03	0,44±0,02
MUFA/PUFA	0,24±0,02	0,27±0,02	0,22±0,02	0,24±0,01	0,24±0,02	0,18±0,02**
Σn-9	9,58±1,00	10,17±1,09	8,37±0,98	8,86±0,86	9,23±1,05	6,94±0,89
Σn-7	3,47±0,16	3,75±0,32	3,37±0,25	3,94±0,22	3,23±0,37	2,92±0,22
Σn-6	48,57±0,90	46,78±1,39	50,25±0,49	50,09±0,96	46,15±1,68	50,85±1,61**
Σn-3	5,02±0,49	4,76±0,54	4,41±0,41	4,16±0,36	5,87±0,83	3,78±0,33**
n-9/n-3	1,92±0,12	2,37±0,44	1,98±0,29	2,22±0,41	1,68±0,17	1,91±0,30
n-6/n-3	10,29±1,32	10,43±1,09	11,91±1,18	12,35±1,18	8,99±1,38	14,02±1,40
UI	189,71±2,73	182,87±6,57	193,04±3,75	189,22±5,53	193,42±9,05	193,65±3,44
ACL	17,97±0,27	18,17±0,29	18,10±0,26	18,26±0,27	17,97±0,31	17,62±0,25

Os resultados estão expressos em % do total e representam a média ± erro padrão, com o número de amostras (n) de cada fase indicado entre (), onde cada amostra corresponde a um animal. ΣSFA=Σácidos graxos saturados; ΣMUFA=Σácidos graxos monoinsaturados; ΣPUFA=Σácidos graxos poliinsaturados; ΣUFA=Σácidos graxos insaturados (MUFA+PUFA); UI=índice de insaturação calculado pelo $\sum m_i \cdot n_i$ onde m_i é a % do ácido graxo insaturado e n_i é o número de insaturações deste ácido graxo; ACL= comprimento médio da cadeia, calculado como $[(\sum \%FA_{14} + \dots + \sum \%FA_n)]/100$, onde FA_n são todos os ácidos graxos de n átomos de carbono; Σn3=Σácidos graxos n3; Σn6=Σácidos graxos n6. ^cindica diferença significativa em relação ao despertar (água); ^dem relação ao

despertar (alimento); °em relação à atividade de primavera; * indica diferença significativa e ** diferença marginalmente significativa entre os grupos de animais alimentados e submetidos ao jejum na primavera.

Fíguas

Figura 6 – Cortes de fragmentos da parede ventricular de lagartos teiú jovens no primeiro ciclo anual. Em A, atividade de outono; B, dormência de inverno; C, despertar e ingestão de água; D, despertar e ingestão de alimento; E, atividade de primavera. Ep = epicárdio; Co = camada compacta; Es = camada esponjosa; La = lacuna. Coloração: hematoxilina e eosina. Barra de escala = 400µm.

Figura 7 – Cortes da camada miocárdial esponjosa de lagartos teiú jovens no primeiro ciclo anual. Em A, dormência de inverno e em B, atividade de primavera. Nota-se a que na dormência o miocárdio esponjoso possui aspecto mais ‘muscularizado’ e uma menor densidade de núcleos em relação à atividade de primavera. Coloração: hematoxilina e eosina. Barras de escala = 50 µm.

Figura 8 – Conteúdo percentual de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) nas frações lipídicas polar (1) e neutra (2) do músculo ventricular de lagartos teiú jovens no primeiro ciclo anual. As diferenças significativas ($P \leq 0,05$) e marginalmente significativa ($0,1 \geq P \geq 0,05$) da porcentagem destas classes de ácidos graxos entre as duas frações estão indicadas dentro das barras da classe de ácido graxo correspondente nas colunas da fração neutra por * e **, respectivamente.

Figura 9 – Relação alométrica entre o conteúdo percentual de C18:1n-9 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: $\% C18:1n-9 = a.Mc^b$, onde a = intercepto, b = coeficiente angular, $\% C18:1n-9$ = conteúdo percentual de C18:1n-9, Mc massa corpórea em gramas. R^2 = coeficiente de determinação. A reta foi traçada onde a regressão é significativa ($P \leq 0,05$) e tracejada onde é marginalmente significativas ($0,1 \geq P \geq 0,05$).

Figura 10 – Relação alométrica entre o conteúdo percentual de C22:5n-6 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: $\% \text{C22:5n-6} = a.Mc^b$, onde a = intercepto, b = coeficiente angular, $\% \text{C22:5n-6}$ = conteúdo percentual de C22:5n-6, Mc massa corpórea em gramas. R^2 = coeficiente de determinação. A reta foi traçada onde a regressão é significativa ($P \leq 0,05$) e tracejada onde é marginalmente significativas ($0,1 \geq P \geq 0,05$).

Figura 10 – Relação alométrica entre o conteúdo percentual de C22:6n-3 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: $\% \text{ C22:6n-3} = a.Mc^b$, onde a = intercepto, b = coeficiente angular, $\% \text{ C22:6n-3}$ = conteúdo percentual de C22:6n-3, Mc massa corpórea em gramas. R^2 = coeficiente de determinação. A reta foi traçada onde a regressão é significativa ($P \leq 0,05$) e tracejada onde é marginalmente significativas ($0,1 \geq P \geq 0,05$).

Discussão

VII. DISCUSSÃO

1. Efeitos da massa corpórea e da sazonalidade sobre a massa do ventrículo cardíaco

Após a eclosão na primeira metade do verão, os teiús crescem a taxas elevadas, aumentando a massa corpórea 5-7 vezes até o outono, quando a taxa de crescimento diminui progressivamente e alcança balanço negativo nos meses de inverno (SOUZA *et al.*, 2004). No início do outono, a massa do ventrículo cardíaco corresponde, em média, a 0,16% da massa corpórea dos jovens teiús, sendo, porém, relativamente maior nos animais de menor tamanho corpóreo ($b < 1,0$). Neste contexto, é necessário considerar que as alterações da massa ventricular e das demais variáveis analisadas no presente estudo são produto de uma interação complexa entre um ritmo sazonal sobreposto ao processo de crescimento e desenvolvimento ontogenético.

Durante o outono, fase na qual os teiús acumulam grande quantidade de lipídios em depósitos abdominais e subcutâneos, há um aumento mais acentuado da massa ventricular em relação ao aumento da massa corpórea, de forma que a massa ventricular relativa passa a representar 0,21% no final do outono. Adicionalmente, a mudança do expoente b de 0,70 para 0,81 indica que esse aumento da massa ventricular relativa é mais acentuado nos animais maiores. Uma mudança do expoente alométrico durante o outono também foi reportada para os estoques lipídicos, segundo a qual animais maiores acumulam maior quantidade de lipídeos nos corpos gordurosos abdominais que animais menores (SOUZA *et al.*, 2004). Portanto, o aumento da massa ventricular concomitante ao acúmulo de grande quantidade de lipídios na fase que antecede a dormência sugere uma relação entre estes eventos.

A tendência a um aumento da massa ventricular relativa, particularmente em animais de maior massa corpórea, se acentua muito após aproximadamente 2/3 da duração total da fase de dormência, quando se observa uma inversão do padrão alométrico entre essas variáveis ($b > 1,0$). Utilizando as equações geradas, estima-se que após 2/3 da fase de dormência teiús com 100 e 300 g de massa corpórea apresentariam um aumento da massa ventricular de 26 e 112%, respectivamente, em relação ao início do outono. Em um tempo de dormência similar, teiús jovens perdem até 15% da massa corpórea máxima atingida no final do outono, principalmente devido à perda

evaporativa de água e, em menor proporção, ao catabolismo de substratos (SOUZA *et al.*, 2004). Este aumento da massa ventricular relativa poderia ser um efeito artificial, causado pela diminuição da massa corpórea, no entanto, o aumento médio observado ($\approx 28\%$ em relação ao final do outono) é consideravelmente maior do que seria esperado pelo efeito somente da diminuição da massa corpórea ($\approx 15\%$). Aumento da massa cardíaca relativa durante a dormência sazonal também foi observado no lagarto *Liolaemus nigroviridis* e no esquilo *Spermophilus lateralis* (NAYA *et al.*, 2009; WICKLER *et al.*, 1991) embora o estímulo indutor e a importância desta hipertrofia não sejam conhecidos. No geral, corações maiores bombeiam um maior volume sistólico e permitem que grande quantidade de sangue seja movimentada pelo sistema circulatório, garantindo oxigenação adequada dos tecidos (O'BRIEN *et al.*, 2000). O conjunto dessas evidências, portanto, sugere que o aumento da massa ventricular dos teiús nos meses de outono e inverno poderia ser causado por um aumento da massa muscular, e não apenas pelo acúmulo de substratos energéticos. Essa hipertrofia do órgão seria dada por hipertrofia dos cardiomiócitos, por hiperplasia, ou por uma combinação de ambos, compensando o potencial aumento da viscosidade sanguínea, causado pela perda evaporativa de água do fluido extracelular (SOUZA *et al.*, 2004), e da resistência periférica, causado por vasoconstrição e redistribuição de fluxo sanguíneo durante a dormência. Este ajuste, juntamente com a elevação da FC, seria particularmente importante no despertar, garantindo o rápido restabelecimento do fluxo sanguíneo e o fornecimento de O_2 e nutrientes a órgãos e tecidos.

Mais da metade da redução da massa corpórea durante a dormência é compensada no início do despertar após a ingestão de água, o que provavelmente contribui para a diminuição da massa ventricular relativa observada neste grupo. Esta diminuição, contudo, é mais pronunciada em animais maiores, de maneira que para um teiú de 100 g, estima-se uma redução da massa ventricular em relação à dormência de cerca de 8%, aproximadamente equivalente ao ganho de massa corpórea por re-hidratação dos tecidos, enquanto que para um teiú de 300 g a redução seria de cerca de 38%, resultando num padrão alométrico similar ao observado no outono ($b < 1,0$). É possível que tanto o aumento da massa ventricular na dormência quanto a diminuição após o despertar sejam mais pronunciados nos animais maiores devido a uma maior perda evaporativa de água, resultante de uma depressão metabólica menos acentuada em relação aos animais de menor massa corpórea (SOUZA *et al.*, 2004). Contudo, o menor grau de depressão metabólica nos animais maiores estaria associado a uma maior

redução dos estoques de substratos e da massa corpórea, causando uma tendência oposta à observada no despertar. As alterações de massa corpórea, portanto, não são suficientes para explicar a variação desproporcional da massa ventricular nos animais maiores e, os dados sugerem a existência de algum outro mecanismo responsável por este fenômeno.

Adicionalmente, uma vez que 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 (HOCHACKA *et al.*, 2003), as diferenças de tamanho do coração podem contribuir em algum grau para a diferença inter-individual na taxa metabólica dos jovens teiús, particularmente no estado hipometabólico. Em humanos, o coração representa 0,4% da massa corpórea, no entanto, devido à elevada taxa metabólica do tecido, o metabolismo cardíaco é responsável por cerca de 10% do metabolismo basal (SCHMIDT-NIELSEN, 1984). Porém, em comparações interespecíficas de mamíferos, a massa no coração não varia com a massa corpórea e, portanto, não contribui para a variação alométrica da TM, que parece ser mais influenciada pela variação da massa de outros órgãos, como o trato gastrointestinal. Nos teiús, a variação da massa ventricular com a massa corpórea pode contribuir em algum grau para as variações da TM (SOUZA *et al.*, 2004). No início do outono, a massa ventricular relativa é maior nos teiús menores ($b=0,70$), assim como a TM ($b=0,75$), muito embora a massa ventricular seja tão diminuta, menor que 0,2%, que muito provavelmente o metabolismo do órgão não influencia de maneira significativa a TM do animal. Na dormência, a massa ventricular relativa é maior nos teiús maiores ($b=1,14$), assim como a TM ($b=1,12$), e embora a massa ventricular continue representando uma fração reduzida da massa corpórea, $\approx 0,3\%$, é possível que a influência do metabolismo cardíaco na variação alométrica da TM possa ser maior devido à acentuada depressão metabólica exibida por tecidos como o muscular esquelético, que representa cerca de 30% da massa corpórea dos vertebrados (SCHMIDT-NIELSEN, 1984).

A FC e a taxa metabólica massa específica variam em função da massa corpórea de diversos animais, endotérmicos e ectotérmicos, segundo o coeficiente angular $b=-0,25$. Ambas, por sua vez, exibem forte correlação, razão pela qual a FC é usada para inferir a taxa metabólica de animais no campo (ELSE & HULBERT, 1983; FICK, 1870; MCPHEE *et al.*, 2003; SCHMIDT-NIELSEN, 1984). Apesar da ausência de medidas sistemáticas de FC dos teiús ao longo do ano, com base nas medidas de taxa metabólica realizadas por Souza e colaboradores (2004) podemos supor que a FC de teiús jovens diminui progressivamente ao longo do outono, alcançando os menores

valores na dormência (≈ 12 bpm; ABE, 1983). A redução da FC, portanto, se daria em paralelo ao aumento da massa ventricular. Com base em evidências de que o estiramento do músculo é um dos principais fatores que induzem hipertrofia cardíaca, Aho & Vornanen (2001) propuseram que a diminuição da FC de peixes mantidos em baixas temperaturas permitiria uma extensão do tempo de enchimento ventricular e maior estiramento do miocárdio, induzindo a hipertrofia cardíaca comumente associada à aclimatação a baixas temperaturas. Embora a dormência sazonal nos teiús ocorra a temperaturas amenas ($\approx 17^\circ\text{C}$), é provável que a diminuição progressiva da FC, associada à diminuição da taxa metabólica, seja capaz de induzir o aumento de massa ventricular por um mecanismo semelhante. Uma vez que o aumento de massa ventricular ao longo do outono e inverno é mais pronunciado em animais de maior massa corpórea, animais menores possivelmente apresentam alguma limitação a um aumento da massa ventricular de mesmas proporções que animais maiores. Dado que a hipertrofia por sobrecarga de volume sanguíneo implica em um aumento da taxa de deposição de proteínas, seja por um aumento da síntese ou diminuição da degradação ou por uma combinação de ambos, esta limitação pode resultar da reduzida capacidade de armazenamento de substratos e da maior depressão do metabolismo nos animais menores. De qualquer modo, um dos principais alvos de depressão metabólica na dormência sazonal é a síntese protéica (GUPPY & WITHERS, 1999), provavelmente devido ao seu elevado custo energético nas células de vertebrados em geral, o que torna o aumento de massa ventricular em paralelo à depressão do metabolismo nos jovens teiús um fenômeno bastante intrigante. As variações de massa ventricular poderiam ser dadas, ainda que parcialmente, por acúmulo e mobilização de substratos energéticos, entretanto esta hipótese é pouco provável uma vez que o conteúdo de glicogênio e lipídio representa cerca de 0,5% do peso úmido do miocárdio, conforme será analisado com mais detalhes posteriormente.

No início do despertar e após a ingestão de água, há uma tendência à diminuição da massa ventricular relativa em relação à dormência, a qual está associada a uma acentuada mudança no expoente alométrico calculado para esta fase, $b=0,78$, em relação à dormência ($b>1$), indicando uma significativa redução da massa ventricular nos animais de maior massa corpórea no terço final da dormência e início do despertar. Cerca de uma semana mais tarde, a primeira alimentação parece reverter essa tendência e a massa ventricular relativa assume valores muito próximos aos da dormência. O expoente alométrico calculado para este grupo, $b=0,84$, é significativamente maior do

que para o início do despertar após ingestão apenas de água e sugere que animais maiores exibem rápido aumento da massa ventricular em resposta à retomada da alimentação. Uma acentuada hipertrofia cardíaca pós-prandial foi observada em cobras píton, que exibem aumento de 40% da massa ventricular apenas 48 h após a ingestão de alimento, como resultado de um aumento da expressão de proteínas contráteis (ANDERSEN *et al.*, 2005). Evidências similares foram encontradas com trutas arco-íris submetidas a 6 dias de jejum, as quais apresentam aumento da taxa de síntese protéica no ventrículo cardíaco apenas 3 h após a realimentação (MCMILLAN & HOULIHAN, 1988). Nos teiús, é provável que o aumento de massa ventricular que se segue à primeira alimentação após a dormência seja induzido pelo aumento de demanda imposto pela alimentação e reativação do metabolismo após o despertar.

Na natureza, lagartos teiú são forrageadores ativos, cuja dieta é composta de pequenas refeições diárias e a ingestão de grande quantidade de alimento é ocasional (KLEIN *et al.*, 2006). Assim como outros animais que apresentam alimentação frequente, nos teiús, a amplitude do aumento do metabolismo que se segue à alimentação (ação dinâmica específica ou ADE) é menor que em lagartos que se alimentam esporadicamente, como os do gênero *Varanus* (SECOR & PHILLIPS, 1997). Animais de alimentação frequente mantêm TMR relativamente mais alta entre as refeições e não apresentam atrofia substancial de órgãos como observado em alimentadores esporádicos (KLEIN *et al.*, 2006). Entretanto, ao longo da fase de dormência os jovens teiús permanecem 4-5 meses em jejum e dados recentes mostram que esses animais apresentam cerca de 30% de atrofia da massa do intestino médio durante essa fase (NASCIMENTO, 2009). Portanto, a amplitude da ADE após a fase de dormência é possivelmente maior do que a que se segue à alimentação na fase ativa. Do mesmo modo, após um mês de estivação induzida em laboratório, anuros apresentam ADE mais pronunciada em comparação com animais que permaneceram ativos (SECOR, 2005). Assim, nos teiús, um efeito mais sutil de aumento da massa ventricular, o qual não é detectado na média dos dados, teria persistido 72 h após a retomada da alimentação no despertar.

Na primavera, os jovens teiús entram em uma fase de intenso crescimento (SOUZA *et al.*, 2004) e a massa ventricular média dos animais compreende 0,24% da massa corpórea, uma proporção ligeiramente menor em relação à fase anterior porém 50% maior em relação ao início da atividade de outono. O expoente da equação alométrica calculado para esta fase indica que os animais menores exibem um aumento

da massa ventricular mais acentuado em relação aos animais maiores ($b=0,51$). Considerando que o consumo de O_2 massa específico dos teiús jovens é similar no início da atividade de outono e na atividade de primavera (SOUZA *et al.*, 2004), as diferenças da massa ventricular relativa e do padrão alométrico constatadas entre essas duas fases constituem evidências adicionais da complexa interação entre um ritmo sazonal endógeno e o desenvolvimento ontogenético dos jovens teiús. Com base nas equações geradas, a massa cardíaca relativa de um teiú de 100 g é 40% maior do que a de um teiú de 300 g no início da atividade de outono, enquanto que na atividade de primavera essa diferença atinge 70%. Visto de outra forma, a massa ventricular relativa de um teiú de 100 g é 62% maior na atividade de primavera que na atividade de outono, enquanto que para um teiú de 300 g a diferença entre as fases seria de 32%. Animais menores também exibem um crescimento mais acentuado da massa intestinal na primavera, quando o coeficiente alométrico tende a zero ($b=0,14$; NASCIMENTO, 2009). No conjunto, esses dados ressaltam a preponderância do uso de recursos alimentares para o crescimento e aumento de massa dos tecidos após o despertar, em contraste com a deposição de substratos e formação de estoques energéticos durante o outono.

Quando submetidos ao jejum na primavera, os teiús apresentaram uma tendência não significativa de redução da massa ventricular relativa. O expoente da equação alométrica para este grupo ($b=0,75$) difere do calculado para o grupo de animais alimentados ($b=0,51$), e indica que o efeito do jejum se expressa com maior intensidade em animais de menor massa corpórea, revertendo a tendência ao aumento desproporcional do ventrículo nos animais menores durante a primavera. Desse modo, estima-se que a massa do ventrículo de um teiú de 100 g diminui cerca de 21% enquanto que a de um animal de 300 g praticamente não se altera após 20 dias de jejum na primavera. O efeito do jejum sobre a massa do intestino médio é mais acentuado, porém o padrão de variação é similar, diminuindo 50% e 17%, em animais de 100 e 300 g, respectivamente, em relação a animais alimentados (NASCIMENTO, 2009). Esses dados constituem forte evidência de que o músculo ventricular seria preservado no jejum em detrimento de órgãos do trato digestório, entretanto, animais de massa corpórea reduzida, que provavelmente dispõem de menos recursos energéticos, aparentemente catabolizam componentes do miocárdio mais precocemente, ou mais intensamente, do que animais maiores. Segundo MCCUE (2010), a redução da massa corpórea geralmente observada em animais submetidos à restrição alimentar resulta da

soma das variações da massa dos órgãos individuais e diferentes graus de perda de massa em diferentes órgãos podem refletir priorização funcional. Adicionalmente, a tendência à redução da massa ventricular em animais ativos submetidos ao jejum, contrasta com o aumento observado nos animais em jejum associado à dormência sazonal e evidencia a importância dos ajustes sazonais, que antecedem o jejum prolongado e preservam o órgão com vistas à rápida retomada de sua função no despertar.

2. Morfologia e reorganização estrutural do miocárdio

A morfologia do miocárdio apresenta características próprias nos diferentes grupos de vertebrados e pode se modificar em função do desenvolvimento ou ciclo anual de atividades (BARNI *et al.*, 1994; CERRA *et al.*, 2004; POUPA & LINDSTRÖM, 1983). Nos animais que possuem miocárdio do tipo misto, a camada esponjosa parece ser mais flexível à reorganização estrutural e metabólica em diversas situações (TOTA, 1983). No presente trabalho, observamos que a camada esponjosa do miocárdio de teiús jovens apresenta alterações marcantes ao longo do primeiro ciclo anual de atividades. O grupo de atividade de outono utilizado para as análises histológicas corresponde a animais mortos no final desta fase, em meados de junho e, com base nas alterações da massa ventricular discutidas no item anterior, analisadas em um grupo maior de animais, esse grupo já apresentaria uma massa ventricular cerca de 30% maior do que no início do outono. Nesta fase, a camada miocardial esponjosa apresenta-se densa, com feixes musculares justapostos e poucos espaços lacunares em relação ao aspecto do tecido na atividade de primavera. Esta configuração se mantém até o início do despertar, porém, após a primeira alimentação já se observa um aumento da área ocupada por espaços lacunares. Na atividade de primavera, há uma clara mudança da estrutura do tecido, que passa a apresentar camadas compacta e esponjosa conspícuas, semelhante à reportada para outros ectotermos com miocárdio misto (POUPA & LINDSTRÖM, 1983; TOTA, 1983). Deste padrão emergem duas hipóteses: as alterações observadas seriam resultado do desenvolvimento ontogenético dos jovens teiús ou fariam parte de ajustes sazonais, inerentes ao ciclo anual de atividades?

No início da vida embrionária dos vertebrados, o miocárdio é essencialmente esponjoso e avascular e a camada compacta se desenvolve posteriormente, com o espessamento da parede ventricular e desenvolvimento do sistema coronariano.

(HAGENSEN *et al.*, 2008; LUTTUN & CARMELIET, 2003; TOTA, 1983). No lagarto *Chalcides ocellatus*, a estrutura do miocárdio contendo uma camada esponjosa e uma compacta aparece cedo, durante o desenvolvimento embrionário (FARINA-LIPARI, 1990). Em algumas espécies de peixes e répteis que apresentam miocárdio do tipo misto, o crescimento e maturação do órgão parecem envolver diminuição de espaços lacunares e aumento da espessura das trabéculas. Com o crescimento, as enguias apresentam aumento de espessura da camada miocardial compacta e do diâmetro das trabéculas que formam a camada esponjosa, paralelamente a uma redução dos espaços lacunares. Essas alterações da estrutura são acompanhadas de um aumento do débito cardíaco apesar da massa ventricular relativa se manter constante (CERRA *et al.*, 2004). Em lampreias, a massa ventricular relativa duplica da fase larval para a fase adulta, juntamente com um aumento do diâmetro e do número de fibras que compõem a camada esponjosa, que deixa de ser uma rede frouxa de feixes musculares e assume a aparência de uma massa muscular densa, com poucos espaços lacunares (CLARIDGE & POTTER, 1974 *apud* POUPA & LINDSTRÖM, 1983). Os autores sugerem que as alterações observadas estão relacionadas a uma melhora do desempenho cardíaco em animais em estágios mais avançados do desenvolvimento. Com base nestes padrões, parece improvável que as alterações sazonais observadas no miocárdio de teiús jovens resultem de um padrão de desenvolvimento ontogenético que ocorre na direção contrária à observada em outros vertebrados ectotérmicos. Entretanto, poucos trabalhos têm analisado a morfologia do miocárdio misto em animais que apresentam dormência sazonal. No peixe pulmonado *Protopterus dolloi*, a estrutura geral do miocárdio foi mantida durante a estivação (ICARDO *et al.*, 2008), enquanto que em *Rana esculenta* houve uma tendência à formação de trabéculas mais espessas durante a dormência de inverno (BARNI *et al.*, 1994). Desta forma, assumindo que as características do miocárdio dos teiús no final do outono fazem parte do repertório de ajustes sazonais, pode-se supor que no início desta fase a morfologia do tecido é similar à observada na atividade de primavera e que a camada esponjosa torna-se mais “muscularizada” à medida que a FC diminui e a massa ventricular aumenta ao longo do outono e inverno. Na retomada da atividade, com o aumento da demanda imposta sobre o miocárdio, as alterações observadas seriam induzidas, resultando em trabéculas musculares menos espessas e espaços lacunares abundantes, com aumento da área de superfície endocardial para troca de gases e nutrientes.

Com base na lei de Laplace ($T = P \times R$, onde T = tensão, P = pressão e R = raio da câmara), O'BRIEN e colaboradores (2000) enfatizam que um coração maior necessita de paredes mais espessas para sustentar a tensão necessária para gerar pressão interna equivalente à de um coração menor. O aspecto mais denso da camada miocárdica esponjosa dos teiús no final da atividade de outono e meados da dormência pode ser a causa do aumento de massa ventricular ou consequência de um espessamento das trabéculas musculares em compensação ao aumento do tamanho do ventrículo. Por outro lado, a configuração do miocárdio esponjoso na atividade é ideal para o desenvolvimento de pressão intraventricular com baixa tensão nos músculos das trabéculas, uma vez que as centenas de pequenos compartimentos que compõem a camada esponjosa podem contribuir para uma ejeção eficaz e rápida e para o desenvolvimento de pressão sem grande tensão nas trabéculas musculares (O'BRIEN *et al.*, 2000; TOTA, 1983). Assim, de acordo com os autores citados, a camada esponjosa interna funciona como centenas de pequenas bombas auxiliares à grande bomba, que é a camada compacta externa, e essa morfologia minimiza a espessura da parede ventricular e assegura a eficácia da difusão do oxigênio para as mitocôndrias do miocárdio.

Embora com as técnicas testadas não tenha sido possível a marcação seletiva de vasos no miocárdio dos teiús, é possível notar a presença de grande número de vasos na camada miocárdica compacta. Em répteis não-crocodilianos, a camada miocárdica compacta é irrigada por circulação coronariana, enquanto a camada miocárdica esponjosa é nutrida apenas pelo sangue que flui pelas lacunas entre as trabéculas musculares (OLU *et al.*, 1978; POUPA & LINDSTRÖM, 1983). No entanto, a importância funcional da circulação coronariana para o desempenho cardíaco de répteis é pouco conhecida. Cascavéis *Crotalus durissus* com oclusão coronariana completa mantêm frequência cardíaca e pressão arterial normais no repouso e durante atividade física de curta duração, evidenciando a importância da circulação no sistema de lacunas para a perfusão do miocárdio nestes animais (HAGENSEN *et al.*, 2008). Inspirados neste modelo de perfusão, cardiologistas clínicos desenvolveram uma técnica na qual regiões isquêmicas no ventrículo esquerdo são submetidas a um procedimento cirúrgico com laser para abertura de canais que possibilitam o contato do sangue que flui pela câmara cardíaca com as áreas isquêmicas do miocárdio, de modo que o miocárdio assume uma aparência similar ao de répteis (MIRHOSEINI *et al.*, 2006).

Nos teiús, a presença de trabéculas espessas, juntamente com a redução da FC e consequente redução da taxa de renovação do sangue presente no lúmen ventricular

durante a dormência, sugerem uma redução da perfusão do miocárdio esponjoso nesta fase. Em contraste, o fluxo sanguíneo no coração de mamíferos hibernantes, como marmotas e esquilos, é mantido durante a hibernação, ao contrário do que se observa em outros órgãos, inclusive cérebro, o que provavelmente contribui para a resistência da função cardíaca à hipotermia, ao contrário de animais não hibernantes (BURLINGTON & MILSON, 1993; KUDEJ & VATNER, 2003). Nos teiús, a importância da preservação da função cardíaca durante a fase dormiente estaria relacionada ao eventual aumento da taxa metabólica em consequência de um aumento da temperatura externa (ANDRADE & ABE, 1999) e também no momento do despertar. Desse modo, a aparente redução da perfusão do miocárdio nestes animais deve ser acompanhada por uma inibição coordenada do metabolismo celular, possibilitando que um novo estado de equilíbrio seja alcançado sem danos ao tecido. Alternativamente, à semelhança do que ocorre durante a ontogenia dos vertebrados, é possível que os espaços lacunares tenham se convertido em canalículos capazes de manter a perfusão da camada miocardial esponjosa e possivelmente a comunicação entre o sangue presente nas lacunas e a circulação coronariana. Além disso, a presença ou gênese de vasos no miocárdio esponjoso de teiús durante a dormência ou na fase que a antecede, não é hipótese descartada. No coração de embriões de galinha, o contato entre o endotélio que reveste as trabéculas induz um aumento da atividade mitótica endotelial e a formação dos primeiros capilares, que suprirão a parede ventricular em crescimento (RYCHTEROVA 1971, 1977, *apud* POUPA & LINDSTRÖM, 1983). Sugere-se, ainda, que a compactação do miocárdio esteja intimamente relacionada à sua vascularização e que a hipóxia possa ser um dos fatores que induzem a formação de vasos (POUPA & LINDSTRÖM, 1983). Em répteis crocodilianos, a vascularização do miocárdio esponjoso parece estar associada ao ventrículo completamente dividido com separação dos fluxos arterial e venoso (OLU *et al.*, 1978). O padrão de vascularização do coração de teiús e possíveis alterações em função do crescimento e ciclo anual permanecem questões abertas para estudo.

A contribuição de alterações do número de cardiomiócitos (hiperplasia) e do aumento do diâmetro de cada cardiomiócito (hipertrofia) que compõe as trabéculas da camada miocardial esponjosa, para os ajustes discutidos acima, foi analisada nas fases de dormência de inverno e atividade de primavera. Estas fases representam extremos no que se refere ao grau de atividade dos animais e às alterações de A_A de espaços lacunares já descritas. O mecanismo pelo qual o crescimento ventricular é alcançado é

de importância crucial no que concerne à troca de substâncias, tais como gases e íons, entre os meios intra e extracelular, uma vez que a razão superfície:volume diminuiu à medida que o diâmetro celular aumenta (DRIEDZIC & GESSER, 1994; POUPA & LINDSTRÖM, 1983). O menor valor de N_V e o maior volume do cardiomiócito em animais dormentes sugerem que a maior massa ventricular relativa e a maior espessura das trabéculas musculares observadas nesta fase resultam, ao menos em parte, de hipertrofia dos cardiomiócitos. Entretanto, devido à ausência de dados no início da atividade de outono, não é possível afirmar se o aumento da massa ventricular relativa que ocorre durante a atividade de outono e dormência resulta, também, de hiperplasia. Na atividade de primavera, a estimativa de N_V de cardiomiócitos foi 58% maior em relação à fase dormente, o que resulta em um volume médio calculado de um cardiomiócito 52% maior na dormência em relação à atividade. É provável que o maior conteúdo de glicogênio (SOUZA *et al.*, 2004) e o pequeno aumento do teor de água no miocárdio de animais dormentes contribuam em algum grau para esse aumento de volume dos cardiomiócitos no miocárdio esponjoso durante esta fase. Em associação a esta hipótese, o aumento da área de espaços lacunares na atividade de primavera poderia ocorrer, ao menos em parte, como resultado de um “esvaziamento” e redução de volume dos cardiomiócitos, que conseqüentemente passam a se situar mais próximos uns dos outros, levando, portanto, a uma superestimativa de N_V nesta fase. Evidências de alteração da massa ventricular por hipertrofia também foram reportadas para o peixe pulmonado *Protopterus dolloi*, no qual a área celular média e a área de citoplasma aumentam significativamente durante a estivação e este efeito foi atribuído à presença de áreas citoplasmáticas claras, provavelmente ocupadas por glicogênio (ICARDO *et al.*, 2008).

Alterações em componentes da matriz extracelular, tais como fibroblastos (que podem constituir mais de dois terços das células do coração) e fibras colágenas, não investigadas no presente trabalho, não estão descartadas e podem contribuir para as alterações de massa ventricular nos teiús. O colágeno extracelular, que em excesso está associado a algumas condições patológicas, como à hipertrofia secundária à hipertensão arterial e ao miocárdio hibernante crônico em humanos (HEUSCH *et al.*, 2005), é um importante elemento de suporte e ligação e proporciona rigidez ao miocárdio, adicionando resiliência estrutural e contribuindo para o desempenho mecânico do coração (WEBER, 1989 *apud* CERRA *et al.*, 2004). Em enguias, a melhora do

desempenho cardíaco com o crescimento dos animais foi acompanhada por um aumento do colágeno na camada miocárdica compacta (CERRA *et al.*, 2004).

O volume médio de um cardiomiócito, estimado a partir das medidas de N_V , é $2.098 \mu\text{m}^3$ na dormência e $1.376 \mu\text{m}^3$ na atividade. Esses valores são compatíveis com as estimativas a partir de medidas lineares para outros ectotermos ($2.300 \mu\text{m}^3$ no lagarto varanídeo e na tartaruga; $2.900 \mu\text{m}^3$ no sapo; $2.500 \mu\text{m}^3$ na truta arco-íris) e cerca de mil vez menores em relação às estimativas feitas para os cardiomiócitos de mamíferos ($34.400 \mu\text{m}^3$ no rato; $30.000 \mu\text{m}^3$ no coelho) (CLARK & RODNICK, 1998; GALLI *et al.*, 2006; GALLI *et al.*, 2009; SATOH *et al.*, 1996; SHIELS & WHITE, 2008; VORNANEN *et al.*, 2002). O menor volume dos cardiomiócitos de ectotermos é resultado de uma morfologia que aparentemente prioriza o aumento de área de superfície celular, com cardiomiócitos mais longos e de menor diâmetro em relação aos de mamíferos. A manutenção de uma razão superfície:volume elevada nestes animais é fundamental, devido à ausência de um sistema de túbulos T e de um RS bem desenvolvido, de maneira que a contração dos cardiomiócitos de ectotermos é mais dependente do cálcio proveniente do meio extracelular do que do cálcio proveniente do RS. Adicionalmente, em peixes e répteis, a dependência do RS para geração de força de contração apresenta relação com o nível de atividade do animal, com o RS tornando-se mais importante em espécies com altas frequências cardíacas, como é o caso do lagarto teiú, e/ou pressão arterial (DRIEDZIC & GESSER, 1994; GALLI *et al.*, 2006; HELLE, 1983; POUPA & LINDSTRÖM, 1983; SHIELS & WHITE, 2008). Se a importância relativa do Ca^{2+} proveniente do meio extracelular e RS se altera ao longo do ciclo anual, é uma questão a ser investigada. No entanto, a redução do volume celular na atividade de primavera certamente aumenta a razão superfície:volume e favorece a troca de substâncias entre os compartimentos intra e extracelular, provavelmente otimizando a eficiência das correntes iônicas e o desempenho cardíaco nos teiús. Estas diferenças sazonais de volume celular lembram observações inter-específicas em mamíferos, segundo as quais animais com FC elevada possuem cardiomiócitos menores em relação a animais com FC mais baixas (POUPA & LINDSTRÖM, 1983).

A contribuição da hiperplasia para a maior densidade de cardiomiócitos na atividade de primavera foi avaliada de maneira indireta, considerando-se o percentual da área de tecido ocupado por espaços lacunares na estimativa de N_V . Esse artifício de cálculo resultou em uma densidade 34% maior na atividade de primavera, em lugar de 58%, em relação à dormência. O número total de cardiomiócitos estimado para um

ventrículo cardíaco de teiú com 0,3 g é de aproximadamente 137 milhões na dormência e de 270 milhões na atividade de primavera, uma diferença de aproximadamente 2 vezes. Estes valores são compatíveis com os reportados para a truta (300 milhões de cardiomiócitos com volume médio de $1.200 \mu\text{m}^3$, em um coração de 0,66 g) e superiores aos reportados para o rato (48 milhões de cardiomiócitos em um coração de 0,60 g), coerentemente com o maior volume dos cardiomiócitos no rato (ANVERSA *et al.*, 1978 *apud* CLARK & RODNICK, 1998; CLARK & RODNICK, 1998). No conjunto, os dados sugerem que a maior N_V na atividade de primavera resulta, ao menos parcialmente, de hiperplasia, que pode ter ocorrido em algum momento entre a fase dormente e a atividade de primavera. Este ajuste pode ser de natureza sazonal e ocorrer independente da fase do ciclo de vida dos teiús, ou associado com a retomada do crescimento e desenvolvimento dos jovens teiús, como tem sido observado em diversos vertebrados ectotérmicos. O aumento da massa ventricular com o crescimento de enguias jovens (2-3 anos) é acompanhado por um aumento do número de cardiomiócitos nas camadas esponjosa e compacta, juntamente com uma redução da área de secção transversa e do compartimento miofibrilar (CERRA *et al.*, 2004). Em trutas arco-íris, a hipertrofia ventricular durante a maturação sexual é resultado de uma combinação de hipertrofia e hiperplasia dos cardiomiócitos (CLARK & RODNICK, 1998). Os resultados do presente estudo sugerem que uma combinação desses dois mecanismos, aparentemente em etapas distintas do ciclo anual, integra o repertório de ajustes que compatibilizam o crescimento e maturação dos teiús com a existência de um ritmo endógeno sazonal nesses animais.

3. Mudanças sazonais da composição macromolecular do miocárdio

Ao longo da dormência, os teiús perdem cerca de 15% da massa corpórea, sendo mais da metade atribuída à perda evaporativa de água (SOUZA *et al.*, 2004). As alterações de massa e morfologia do ventrículo cardíaco, bem como as atividades enzimáticas medidas no presente estudo, poderiam ser influenciadas por uma alteração do estado de hidratação do tecido. No entanto, o conteúdo de água do miocárdio não se altera significativamente nas fases do ciclo anual analisadas, com exceção da tendência a um aumento de 1,7% na fase dormente. Essa reduzida variação do conteúdo de água não é suficiente para explicar o aumento de 52% do volume dos cardiomiócitos na dormência em relação à atividade de primavera, conforme estimativas apresentadas

anteriormente. A tendência ao aumento da hidratação do miocárdio na fase hipometabólica é intrigante, uma vez que nesta fase a desidratação é um problema potencial para os animais. Em outros tecidos do teiú analisados o teor de água permanece constante, como no músculo puboischiotibialis da pata e no intestino (DANTONIO *et al.*, 2010; NASCIMENTO, 2009), ou diminui, como no músculo da cauda (SOUZA *et al.*, 2004). O aumento de mais de 2 vezes do conteúdo de glicogênio no miocárdio durante a dormência e, conseqüentemente, da água associada a este substrato, e a diminuição do conteúdo deste substrato no músculo caudal (SOUZA *et al.*, 2004) poderiam explicar a diferença do padrão de variação do teor de água no músculo cardíaco e caudal durante o estado hipometabólico. Considerando um coração hipotético de 1,0 g e que cada grama de glicogênio é armazenada associada a 2,0 g de água (WILLMER *et al.*, 2005), o aumento do teor de água total na dormência em relação à atividade de outono seria de 8,0 mg, enquanto que o aumento da água associada ao glicogênio seria de 3,0 mg, cerca de 38% da variação do conteúdo de água do tecido. Além disso, o nível de hidratação dos cardiomiócitos e o acúmulo de glicogênio podem estar associados por outro mecanismo; em hepatócitos de mamíferos, o aumento do nível de hidratação celular favorece a síntese de glicogênio, além de inibir a proteólise e induzir maior proteção contra danos oxidativos (HÄUSSINGER, 1996). Além do aumento conteúdo de glicogênio, a redução do conteúdo lipídico total do miocárdio dos teiús durante a dormência sugere que os lipídios são a fonte preferencial de energia nesta fase e a oxidação destes compostos, embora a taxas muito reduzidas, resulta na liberação de água metabólica que poderia contribuir para o aumento do conteúdo de água do tecido. Considerando um coração de 1,0 g de massa e que a oxidação de cada grama de lipídio libera 1,07 g de água (WILLMER *et al.*, 2005), a redução de 3,97 mg dos lipídios totais na dormência liberaria 4,25 mg de água, que corresponde a 53% da variação do conteúdo de água total do tecido na dormência em relação à atividade de outono (8 mg). Assim, o acúmulo de glicogênio e a oxidação dos lipídios poderiam explicar quase completamente o aumento do teor de água no tecido durante a dormência.

Uma vez que o estado de hidratação das células é um importante determinante da função celular (HÄUSSINGER, 1996), estes resultados sugerem que mecanismos distintos podem atuar na regulação do nível de hidratação em diferentes tecidos dos teiús. Mudanças no estado de hidratação dos cardiomiócitos teriam conseqüências funcionais importantes, uma vez que perturbações osmóticas influenciam a atividade

elétrica e a habilidade de contração do músculo cardíaco. O aumento da hidratação celular, por exemplo, aumenta a excitabilidade e reduz a duração do potencial de ação em cardiomiócitos de rato (HÄUSSINGER, 1996; LANG *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2002). Estes efeitos poderiam favorecer o rápido retorno da função do órgão no despertar dos teiús, elevando a FC até um patamar compatível com a atividade. Por outro lado, a desidratação acarreta em danos severos para os tecidos e os animais desenvolveram diversos mecanismos que reduzem a perda de água durante a dormência. A escolha de abrigos subterrâneos, a formação de revestimentos corpóreos e a adoção de determinadas posturas minimizam a área de tegumento exposta e, juntamente com a vasoconstrição periférica e a adoção de um padrão de ventilação episódica, reduzem substancialmente a perda evaporativa de água pela superfície corpórea (STOREY, 2002; ANDRADE & ABE, 1999). Adicionalmente, vários peixes, anfíbios, e alguns répteis aumentam a osmolaridade dos fluidos corpóreos através da síntese e/ou acúmulo de osmólitos orgânicos e inorgânicos, dentre eles a uréia. Nos teiús, há um aumento de 5% da osmolaridade do plasma na dormência, mas esse aumento parece ser resultado de desidratação do animal, já que a concentração de uréia não varia ao longo do ciclo anual (SOUZA *et al.*, 2004).

O jejum por restrição alimentar durante a atividade de primavera não resultou em variação significativa do teor de água do miocárdio, sugerindo que o estado de hidratação das células pode ser regulado de maneira distinta do jejum associado à dormência sazonal. Alternativamente, a duração do jejum (20 dias) talvez não tenha sido suficiente para a manifestação de alterações detectáveis com os métodos empregados. O aumento do conteúdo de água dos tecidos é uma observação comum em diversos animais submetidos à restrição alimentar, cujos mecanismos promotores e importância funcional não são claros (MCCUE, 2010). No bacalhau *Gadus Mohua*, 74 a 80% do volume das fibras musculares brancas é ocupado por água em animais alimentados e a restrição alimentar aumenta este percentual para mais de 90% (LOVE, 1980 *apud* BEAULIEU & GUDERLEY, 1998). Sugere-se que o aumento do conteúdo de água seja induzido pela maior pressão osmótica resultante do elevado nível de metabólitos nos tecidos e que seja importante ao atenuar a diminuição de volume das fibras musculares, causada pelo jejum (BEAULIEU & GUDERLEY, 1998; MCCUE, 2010).

Durante fases de escassez de nutrientes, os triacilgliceróis armazenados em gotículas lipídicas são catabolizados a glicerol e ácidos graxos livres que, nos músculos

esquelético e cardíaco, são utilizados para fornecimento de energia para o próprio tecido na β -oxidação mitocondrial (DUCHARME & BICKEL, 2008). O teor de lipídios no miocárdio estimado por gravimetria é comparável ao obtido pela mesma técnica para o tecido hepático e maior que no músculo branco (SOUZA *et al.*, 2004). Uma vez que o fígado é um dos órgãos de armazenamento de lipídios em vertebrados ectotérmicos (SHERIDAN, 1994) a concentração de lipídios no miocárdio dos teiús ativos é relativamente alta, no entanto, devido ao tamanho reduzido do coração, sua contribuição para o armazenamento de lipídios do organismo é pequena. A concentração de lipídios no ventrículo cardíaco dos teiús é similar na atividade de outono e de primavera, sugerindo que não há acúmulo de lipídios no músculo cardíaco em antecipação à dormência, como observado nos depósitos subcutâneo e abdominal. Após 60 dias de dormência há uma diminuição de aproximadamente 20% do teor de lipídios, que se mantém após o despertar e ingestão de água, retornando a valores comparáveis aos da atividade de outono após 30 dias de atividade na primavera. Padrão de variação semelhante foi observado no músculo da cauda, contrastando com o fígado, onde a concentração de lipídios não varia ao longo do ciclo anual (SOUZA *et al.*, 2004). A manutenção da concentração de lipídios no terço final da dormência e após o despertar sugerem que os estoques lipídicos do miocárdio são utilizados mais intensamente no início da dormência, provavelmente tamponando possíveis desequilíbrios entre os níveis circulantes de substratos e o metabolismo cardíaco até que um novo equilíbrio seja alcançado. A redução da concentração de lipídios total no ventrículo cardíaco dos teiús na dormência não confirma a hipótese de que o aumento de massa ventricular durante a atividade de outono e dormência seria dado pela deposição de lipídios, como no coração de esquilos hibernantes (BURLINGTON *et al.*, 1972). Uma redução do teor de lipídios de magnitude semelhante à observada na dormência ocorre no músculo ventricular dos teiús submetidos a jejum na primavera, sugerindo que a diminuição do conteúdo de lipídios no miocárdio é uma resposta comum ao jejum, associado ou não à dormência sazonal. A redução do teor de lipídios pode ainda, além de resultar da mobilização dos triacilgliceróis (lipídios neutros) armazenados em gotículas intracelulares, também ser influenciada por uma redução do conteúdo de fosfolipídios (lipídios polares), distinção não realizada no presente trabalho. No hepatopâncreas do caracol *Cepaea nemoralis*, o conteúdo de fosfolipídios mitocondriais diminuiu durante a estivação (STUART *et al.*, 1998).

Em animais que apresentam jejum sazonal, além do catabolismo de lipídios nota-se algum grau de catabolismo protéico, importante no fornecimento de aminoácidos para gliconeogênese e substratos anapleróticos. No entanto, ao contrário de lipídios, que são armazenados em um órgão ou tecido especializado, as proteínas são mobilizadas de estruturas que desempenham outras funções, como os músculos esquelético, liso e cardíaco (CASTELINI & REA, 1992; MCCUE, 2010; SWAIN, 1992). Somando-se a estes efeitos, no estado dormente os animais permanecem imóveis a maior parte do tempo e a atrofia muscular decorrente de inatividade parece ser comum à vasta maioria dos vertebrados estudados (HUDSON & FRANKLIN, 2002). Durante 4-5 meses de dormência os jovens teiús permanecem em jejum e inativos no interior da toca, e sua FC é drasticamente reduzida. Decorridos cerca de 60 dias de dormência, há uma redução do conteúdo de proteínas no músculo da cauda e da pata posterior de 14 e 18% em relação ao outono, respectivamente, que atinge 50 e 67% no momento do despertar (DANTONIO *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2004), indicando acentuada proteólise dos músculos esqueléticos durante a dormência e particularmente no despertar e retorno à atividade, sem prejuízo aparente à locomoção. Em contraste, no presente estudo verificou-se que o conteúdo total de proteínas no miocárdio não varia ao longo do ciclo anual ou em animais submetidos ao jejum na primavera, o que sugere uma provável hierarquia de mobilização de proteínas entre estes órgãos. Um padrão semelhante foi reportado para o esquilo *S. lateralis*, de atrofia de músculos esqueléticos e hipertrofia cardíaca após 6 meses de hibernação (WICKLER *et al.*, 1991; STEFFEN *et al.*, 1991). A magnitude da atrofia dos músculos esqueléticos do esquilo foi comparável à apresentada por ratos submetidos à imobilização artificial dos membros por um tempo muito menor, de 1-2 semanas (HUDSON & FRANKLIN, 2002), evidenciando a presença de mecanismos que preservam a função muscular em animais que apresentam fases de inatividade espontânea.

Restrição da atividade muscular pode resultar em mudanças profundas na capacidade funcional do músculo esquelético e do sistema cardiovascular. A inatividade frequentemente leva a uma diminuição da síntese protéica e a um balanço proteico negativo, que resultam em atrofia muscular (HUDSON & FRANKLIN, 2002; WICKLER *et al.*, 1991). A severidade da atrofia parece depender de diversos fatores, dentre os quais, a magnitude relativa do estímulo de desuso, a taxa metabólica massa específica e a extensão dos danos oxidativos. Neste cenário, a ausência de redução do conteúdo total de proteínas no músculo cardíaco, em contraste com o padrão observado

no músculo esquelético, possivelmente está relacionada ao menor estímulo de desuso dado pela atividade contínua, embora reduzida, apresentada por esse órgão durante a fase hipometabólica. Adicionalmente, a ativação do sistema de proteção antioxidante representa um mecanismo potencial para reduzir os danos causados por ROS a proteínas do tecido e a perda de massa muscular e pode ter importante papel na manutenção da função cardíaca nos teiús. Evidências nesse sentido seriam, por exemplo, o aumento de atividade da catalase, enzima que catalisa a degradação de H_2O_2 em O_2 , no coração e no cérebro do esquilo *S. tridecemlineatus* durante a hibernação e o aumento nos níveis de componentes do sistema de proteção antioxidante no músculo esquelético do sapo *Scaphiosus cauchii*, durante a estivação (PAGE *et al.*, 2009; HUDSON & FRANKLIN, 2002).

A variação do conteúdo proteico total pode não refletir os ajustes que ocorrem em frações proteicas sub-celulares do tecido, como a miofibrilar e a sarcoplasmática. Nos extratos preparados com amostras do tecido cardíaco dos teiús, o conteúdo de proteínas totais, sarcoplasmáticas e solúveis, não varia nas fases do ciclo anual estudadas. No entanto, o conteúdo de proteínas miofibrilares é menor no final da atividade de outono e dormência em relação ao despertar seguido de ingestão de água e atividade de primavera. A presença de um conteúdo de proteínas miofibrilares reduzido antes da dormência sugere que esta redução pode constituir um ajuste antecipatório à dormência. Já o aumento do conteúdo de proteínas miofibrilares após o despertar e apenas ingestão de água sugere um ajuste relacionado à retomada da atividade e aumento da demanda sobre a função cardíaca. Infelizmente, não dispomos de dados sobre os efeitos do jejum na fase ativa e as possíveis diferenças em relação ao jejum associado à dormência sazonal não foram avaliados.

Durante a migração, comportamento marcado por jejum associado à atividade física intensa, a ave *Sylvia borin* apresenta uma redução de cerca de 22% da massa dos músculos relacionados ao voo e dos membros posteriores, entretanto, nos músculos do voo há uma redução maior do conteúdo de proteínas miofibrilares enquanto que nos músculos das patas as proporções entre as frações não se alteram (BAUCHINGER & BIEBACH, 2001). Os autores sugerem que a maior atividade dos músculos envolvidos no voo migratório causaria maiores danos às proteínas e consequentemente uma maior taxa de proteólise da fração miofibrilar. Além disso, sugerem que a redução seletiva da fração miofibrilar aumentaria a razão entre mitocôndrias e miofibrilas, resultando em melhora do desempenho muscular. Nos teiús, o aumento da massa ventricular ao longo

da atividade de outono e dormência é acompanhado de uma redução seletiva do conteúdo de proteínas miofibrilares e este ajuste poderia, da mesma forma, contribuir para uma melhora do desempenho do órgão durante o estado hipometabólico e no despertar. Durante a dormência, apesar da diminuição das taxas de respiração mitocondrial, o fornecimento de ATP para o aparato de contração poderia ser mantido. Esta hipótese será analisada mais adiante, junto à discussão sobre a atividade da enzima CS.

Além de variar entre diferentes grupos musculares, o impacto do jejum sobre as frações proteicas difere entre as espécies. Em contraste com a ausência de variação nos exemplos acima, o jejum causa uma redução pronunciada da fração sarcoplasmática no músculo esquelético do bacalhau *Gadus morhua* e da ave *Eremophila alpestris* (BEAILIEU & GUDERLEY, 1998; SWAIN, 1992). Sugere-se que o catabolismo desproporcional das proteínas do sarcoplasma seja resultado de uma maior susceptibilidade à proteólise e que a conservação das proteínas miofibrilares permitiria a recuperação mais rápida da capacidade locomotora, uma vez que a reposição das proteínas sarcoplasmáticas se daria mais rapidamente. A manutenção da constituição protéica muscular depende de um balanço dinâmico entre os processos de síntese e degradação de proteínas. No geral, a taxa de renovação da fração protéica sarcoplasmática é de dias, enquanto a da fração miofibrilar é de semanas (GOLDSTEIN & REDDY, 1967 *apud* BAUCHINGER & BIEBACH, 2001). No músculo esquelético de ratos submetidos a jejum por 4 dias a proporção entre proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares é mantida constante como resultado de uma diminuição mais acentuada da taxa de síntese protéica da fração miofibrilar, cuja taxa de renovação é mais lenta e este padrão de ajuste contribuiria para a manutenção da composição do tecido em diversas condições fisiológicas (BATES & MILLWARD, 1983).

Adicionalmente, várias evidências na literatura sugerem que os efeitos do jejum e da dormência sazonal sobre o conteúdo protéico podem envolver um aumento da meia-vida das proteínas (STOREY, 1997). No coração da ave *Coturnix coturnix japonica*, a fração protéica solúvel aumentou após 3 dias de jejum, principalmente como resultado de uma diminuição da proteólise (BUSH & MARQUARDT, 1978 *apud* CRIE *et al.*, 1980). Assim, as alterações do conteúdo de proteínas miofibrilares no coração dos teiús podem resultar de uma interação complexa entre os ajustes das taxas de síntese e de degradação das proteínas das diferentes frações.

4. Efeitos do jejum e da dormência sazonal sobre as atividades enzimáticas

Em contraste com outros tecidos do teiú, como o músculo esquelético e órgãos do trato digestório, destaca-se no tecido cardíaco a relativa constância da atividade máxima de enzimas metabólicas durante o ciclo anual. Essa tendência estaria refletida na ausência de variação da concentração de proteínas solúveis nos extratos, discutida acima, e sugere manutenção da capacidade máxima em etapas importantes de regulação das vias envolvidas na produção de ATP no tecido cardíaco.

A atividade das enzimas glicolíticas PK e LDH, por exemplo, é muito similar nos grupos experimentais, sugerindo que a capacidade de utilização de glicose e lactato como substratos energéticos é mantida ao longo do ciclo anual. Em relação a outros tecidos do teiú, a atividade da PK é menor no miocárdio que no músculo esquelético e no cérebro, tecidos com forte preferência por carboidratos, porém é mais que 2 vezes superior à atividade no fígado e no intestino (NASCIMENTO, 2009; S. C. R. de SOUZA, dados não publicados), revelando a importância destes compostos como fonte de energia para o tecido. Em comparação com o coração de outros vertebrados, a atividade da PK no coração dos teiús é bastante similar, situando-se acima da média para ectotermos (DRIEDZIC & GESSER, 1994). A atividade da LDH, porém, é a maior dentre os tecidos do teiú já analisados (S. C. R. de SOUZA dados não publicados) e maior que no coração da maioria dos vertebrados cujos dados tivemos acesso, com exceção do coração de alguns peixes pulmonados (DRIEDZIC & GESSER, 1994; ALMEIDA-VAL & HOCHACHKA, 1995). Existem pelo menos 5 diferentes isômeros da LDH, uma enzima tetramérica constituída pela combinação de dois tipos de subunidades, muscular (M) e cardíaca (H). A LDH constituída por subunidades M funciona preferencialmente como piruvato redutase, enquanto a enzima constituída por subunidades H funciona preferencialmente como lactato desidrogenase, embora também possa atuar como piruvato redutase, e é abundante em tecidos predominantemente aeróbios como o miocárdio (BURLINGTON & SAMPSON 1968; EVERSE *et al.*, 1970; VORNANEN, 1994). Desta maneira, a elevada atividade máxima da LDH no músculo cardíaco dos teiús sugere grande capacidade de utilização do lactato proveniente de outros tecidos, além do potencial de uso de carboidratos em condições anaeróbias, e a ausência de variação sugere que estas capacidades são preservadas no estado hipometabólico. A captação do lactato circulante é proporcional à sua concentração plasmática (KODDLE *et al.*, 2007) que, nos teiús, poderia estar reduzida

na dormência devido à cessação da locomoção. Entretanto, os níveis plasmáticos de lactato não se alteram significativamente no ciclo sazonal e os valores são cerca de 25% maiores na dormência em relação à atividade de primavera (SOUZA *et al.*, 2004). Uma vez que a LDH é mantida em altas concentrações no miocárdio, o conjunto dos dados sugere que o lactato poderia ser usado continuamente pelo tecido em vias aeróbias de produção de energia, embora a taxas reduzidas, uma vez que o metabolismo do tecido encontra-se inibido durante esta fase. Adicionalmente, no miocárdio de esquilos terrícolas e do morcego *M. lucifugus*, a proporção de subunidades M e H varia durante a hibernação (BURLINGTON & SAMPSON 1968; MOON, 1978 *apud* STOREY, 1997) e ajustes desta natureza, não investigados no presente trabalho, podem ocorrer no miocárdio, favorecendo mudanças do fluxo preferencial de substratos em função de sua disponibilidade. Nos teiús, a redução da FC e as mudanças estruturais descritas anteriormente sugerem que o suprimento sanguíneo e de O₂ para o miocárdio pode estar diminuído na dormência e, neste caso, um aumento do potencial anaeróbio do tecido poderia contribuir para manutenção da homeostase energética. Entretanto, dados prévios mostram que a concentração de lactato diminui significativamente no miocárdio de animais dormentes (CARVALHO, 1999) e, portanto, a manutenção da atividade da LDH num patamar elevado não parece estar associada com um aumento da atividade anaeróbia no tecido durante esta fase. Desse modo, independente de ajustes da composição de subunidades, é provável que a manutenção de altas concentrações da LDH no miocárdio de animais dormentes, assim como da PK, esteja relacionada com o súbito aumento da demanda de energia com o aumento da atividade do órgão em resposta a estímulos externos durante a dormência ou no despertar.

Estudos com outras espécies também mostram ausência de variação da atividade da PK e LDH no coração de animais em estado dormente, por exemplo, na estivação do peixe pulmonado *Protopterus dolloi* e do molusco terrestre *Cepacea nemoralis* e na hibernação de esquilos terrícolas e do rato saltador *Zapus hudsonius* (BROOKS & STOREY, 1992; FRICK *et al.*, 2008a; STOREY, 1997; 1987 STUART *et al.*, 1998). Portanto, durante jejum e depressão metabólica sazonal, a inibição do fluxo de substratos na via glicolítica aparentemente não envolve diminuição da concentração destas enzimas no tecido cardíaco. Por outro lado, assim como para o lactato, a taxa de captação de glicose pelo miocárdio é determinada em grande parte pela disponibilidade plasmática deste substrato (KODDLE *et al.*, 2007) e, nos jovens teiús, os baixos níveis plasmáticos de glicose durante a dormência sugerem que o fornecimento de glicose para

o tecido encontra-se reduzido (SOUZA *et al.*, 2004). Além disso, o aumento da fração ativa da enzima glicogênio sintase (GS) e diminuição da fração ativa da glicogênio fosforilase (GP) sugerem que uma maior proporção da glicose captada pelo miocárdio está sendo direcionada para a síntese de glicogênio, reduzindo ainda mais o fluxo de carboidratos na via glicolítica durante a dormência (CARVALHO, 1999; SOUZA *et al.*, 2004). Outro importante ponto de regulação do uso aeróbio de glicose, a atividade da hexoquinase (HK), enzima que catalisa a conversão de glicose a glicose-6-fosfato; e os níveis de um dos substratos da PK, o PEP, estão diminuídos no miocárdio dos teiús durante a dormência, muito embora a concentração de piruvato se mantenha inalterada, sugerindo um acúmulo deste intermediário (CARVALHO, 1999; S. C. R. de SOUZA dados não publicados). Um acúmulo de piruvato pode ser resultado de manutenção das taxas de conversão de lactato pela LDH e/ou de inibição das vias metabólicas de “escoamento” do piruvato, tais como vias anapleróticas de reposição de intermediários do ciclo do ácido cítrico e de oxidação do piruvato à acetil-CoA pelo complexo mitocondrial piruvato desidrogenase (PDH) (DEPRE *et al.*, 1999; KODDLE *et al.*, 2007). Segundo Storey (1997), a inibição sistemática das enzimas glicolíticas pode, de fato, ser menos importante na depressão metabólica em condições aeróbias, quando o controle da oxidação mitocondrial de substratos provavelmente é mais relevante para a supressão do metabolismo.

A participação do piruvato em diversas vias metabólicas coloca a PK em uma posição de interseção metabólica (MUÑOZ & PONCE, 2003) e evidencia a importância da manutenção de sua atividade para a função do órgão. O pequeno estoque de glicogênio formado no músculo cardíaco dos teiús durante a dormência tem o potencial de tamponar desequilíbrios temporários entre a atividade do órgão e o suprimento de substratos, dado que a capacidade de reagir a estímulos é mantida durante a dormência e aumentos de demanda cardíaca, sejam em resposta a predadores ou por elevação da temperatura no interior do hibernáculo, podem ocorrer. A utilização do glicogênio no miocárdio dos teiús durante a dormência é inibida pela diminuição da porcentagem de GP na forma fosforilada ativa, com manutenção da atividade total (CARVALHO, 1999). A regulação por fosforilação é facilmente reversível, de maneira que em uma condição de aumento de demanda os estoques de glicogênio podem se tornar rapidamente disponíveis. Em contraste, reverter a inibição metabólica dada pela diminuição dos níveis de enzimas requer o tempo e a energia necessários para a síntese e pode ser menos vantajoso quando o tempo é um fator crítico. Dado que ao contrário

da HK, a PK participa da glicogenólise, a inibição da atividade da HK e a manutenção da PK sugerem que a oxidação de glicose exógena encontra-se inibida, mas que a glicogenólise foi retida em um estado de prontidão. Sapos, moluscos e peixes pulmonados também apresentam redução da HK durante a estivação, mas não da PK (BROOKS & STOREY, 1992; COWAN *et al.*, 2000; FRICK *et al.*, 2008a). A inibição da utilização da glicose plasmática durante o jejum preserva este substrato para o sistema nervoso central, que depende em grande parte da oxidação de carboidratos para a produção de ATP, ao contrário do miocárdio, que possui a capacidade para oxidar grande variedade de substratos (KODDLE *et al.*, 2007).

No coração dos teiús, a razão PK:LDH é menor que 0,2 em todas as fases, sugerindo que a capacidade de formação de piruvato a partir de lactato (atividade predominante da LDH) é maior que a capacidade de formação de piruvato a partir de PEP (atividade da PK). Em contraste, no músculo cardíaco de mamíferos quantidades aproximadamente iguais do piruvato utilizado para a formação de acetil-CoA são provenientes da glicólise e da oxidação do lactato (STANLEY *et al.*, 2005) e, de modo geral, a atividade da LDH no coração de endotermos tende a ser menor que em ectotermos, o inverso sendo observado para a PK (DRIEDZIC & GESSER, 1994), sugerindo que no coração de ectotermos a contribuição da LDH para a formação de piruvato pode ser ainda maior. Nos teiús, a razão PK:LHD tende a permanecer baixa e constante nas fases do ciclo sazonal, favorecendo em qualquer circunstância a oxidação do lactato disponível na corrente sanguínea. Na dormência nota-se um aumento em relação ao outono, sugerindo um aumento do potencial de formação de piruvato a partir da glicose, cuja disponibilidade é reduzida durante o jejum sazonal. Alternativamente, este aumento da razão PK:LDH pode favorecer o uso aeróbio de glicose em detrimento da glicólise anaeróbia, aumentando a eficiência energética do tecido. Um padrão similar foi observado no tecido intestinal dos teiús (NASCIMENTO, 2009), enquanto que no músculo esquelético vermelho e branco a razão PK:LDH não varia ao longo do ciclo anual (S. C. R. de SOUZA, dados não publicados).

Em condições de suprimento adequado de O₂, aproximadamente 10-40% do acetil-CoA produzido no tecido cardíaco é proveniente do piruvato, enquanto 60-90% é proveniente da β -oxidação de ácidos graxos (DRIEDZIC & GESSER, 1994; KODDLE *et al.*, 2007). No miocárdio dos teiús durante a atividade de primavera, a V_{máx} da HOAD, enzima mitocondrial limitante das taxas de β -oxidação de ácidos graxos, é 7 vezes mais alta que no músculo esquelético branco e 3 vezes mais alta que no cérebro.

No entanto, a atividade desta enzima é 2 vezes maior no intestino e 3 vezes maior no fígado em relação ao miocárdio (S. C. R. de SOUZA, dados não publicados). O padrão de variação da enzima no miocárdio é semelhante ao previamente reportado por Souza e colaboradores (2004) para este mesmo tecido e acompanha a redução da FC e da taxa metabólica do animal, com significativa redução durante a dormência e despertar, retornando às taxas da pré-dormência na atividade de primavera. Padrão de variação semelhante foi observado no músculo branco (S. C. R. de SOUZA, dados não publicados) e intestino (NASCIMENTO, 2009) dos teiús e no coração do peixe pulmonado *P. dolloi* durante a estivação (FRICK *et al.*, 2008b). Uma vez que os lipídios são o substrato energético preferencial nos tecidos do teiú e de diversos animais que ingressam em um estado de depressão metabólica em condições aeróbias, como indicam os valores de QR próximos a 0,7 durante esta fase (CAREY *et al.*, 2003; CARVALHO, 1999), a redução dos níveis da HOAD muito provavelmente compatibiliza o fluxo de ácidos graxos às taxas de oxidação mitocondrial reduzidas e, ao mesmo tempo, contribui para a economia energética dos tecidos.

O músculo cardíaco é notável pela sua flexibilidade metabólica, caracterizada pela habilidade de utilização de vários substratos e pela capacidade de mudar o substrato preferencial em função do contexto fisiológico (TAEGTMEYER *et al.*, 2004). No coração de humanos que habitam regiões de altitude elevada, por exemplo, observa-se uma contribuição elevada de carboidratos para o suprimento energético relativamente a humanos que vivem no nível do mar, ajuste semelhante sendo observado na aclimação de ratos à hipóxia hipobárica. Esta reorganização metabólica provavelmente foi selecionada, dado que o rendimento energético da oxidação de carboidratos, por mol de O₂, é maior que o de lipídios (HOCHACHKA, 2002). Em contraste, no jejum e na hibernação em mamíferos, condições nas quais substratos e não O₂, são limitantes, há um aumento da utilização relativa de lipídios no miocárdio, favorecendo o maior rendimento de ATP por mol de substrato oxidado (CAREY *et al.*, 2003). Assim, em diferentes contextos fisiológicos, os ajustes do metabolismo cardíaco parecem favorecer a eficiência energética (HOCHACHKA, 2002).

Na atividade de primavera, a CS, enzima mitocondrial indicadora da capacidade aeróbia, é mais alta no ventrículo cardíaco do que em todos os tecidos do teiú já analisados, sendo cerca de 2 vezes maior que no cérebro, quase 5 vezes maior que no fígado e 6 vezes maior que no intestino (NASCIMENTO, 2009; SOUZA *et al.*, 2004; S. C. R. de SOUZA, dados não publicados). Os valores encontrados também tendem a ser

mais altos que os reportados por Souza e colaboradores (2004) para o mesmo tecido, o que possivelmente decorre da utilização de ultra-som na homogeneização das amostras no presente trabalho promovendo maior dissociação da enzima que se encontra ligada à membrana mitocondrial interna. É intrigante o fato de que a depressão metabólica é acompanhada por uma forte tendência ao aumento da atividade CS no miocárdio dos teiús, ao contrário do que se observa no intestino (NASCIMENTO, 2009), sugerindo um aumento da capacidade aeróbia durante esta fase. Resultados semelhantes foram reportados para a CS do miocárdio de hamsters e esquilos, os quais, curiosamente, também apresentam hipertrofia cardíaca durante a hibernação (WICKLER *et al.*, 1991). Em roedores de laboratório, utilizados como modelo de hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de volume, como na gestação e no treinamento físico aeróbio; e de pressão, a expressão de enzimas mitocondriais aumenta proporcionalmente ao aumento de massa do órgão ou mais, como é o caso do aumento da capacidade oxidativa do coração em animais submetidos ao treinamento aeróbio (RIMBAUD *et al.*, 2009). A atividade da CS exibe correlação positiva com o desempenho cardíaco de diversos vertebrados, quando ambos os parâmetros são expressos por unidade de massa de tecido (DRIEDZIC & GESSER, 1994). Assim, a forte tendência ao aumento da CS no coração dos teiús evidencia a importância da manutenção da função cardíaca durante a fase hipometabólica e em preparação para o despertar, quando a retomada da atividade e da alimentação impõe um aumento de demanda ao sistema cardiovascular que pode ser superior à demanda regularmente imposta na fase ativa. Alterações da capacidade aeróbia do tecido podem ser dadas por biogênese e aumento da densidade mitocondrial, por alteração das propriedades das mitocôndrias (tais como área de membrana mitocondrial interna e quantidade de proteínas enzimas), ou por uma combinação de ambos (ST-PIERRE & BOUTILIER, 2001). Nos teiús, a hipertrofia cardíaca aparentemente é acompanhada por esses processos, resultando no aumento proporcional ou mais que proporcional da capacidade aeróbia ao longo da atividade de outono e dormência.

Segundo Stuart e Ballantyne (1997), a razão entre a atividade de enzimas envolvidas no catabolismo de carboidratos e lipídios e a atividade CS fornece índices que permitem avaliar a capacidade destas vias em relação à do ciclo do ácido cítrico. No presente estudo, a razão HOAD:CS no miocárdio dos teiús é baixa na atividade de outono, cerca de 0,3, e permanece aproximadamente constante nas demais fases do ciclo anual. Este dado indica que os ajustes nestas enzimas são proporcionais e a CS possui o

potencial de catalisar a entrada de praticamente todo o acetil-CoA formado pela HOAD no ciclo do ácido cítrico, ao contrário de tecidos como fígado e intestino, os quais constituem prováveis sítios de cetogênese na dormência (NASCIMENTO, 2009; SOUZA *et al.*, 2004). A razão HOAD:CS torna-se ainda menor na dormência, indicando que a capacidade de condensação do acetil-CoA pela CS é ainda maior que a capacidade de formação de acetil-CoA pela HOAD nesta fase. A razão LDH:CS também é menor durante a dormência, sugerindo que nesta fase a capacidade de formação de piruvato a partir de lactato (atividade da LDH) encontra-se reduzida em relação à capacidade do ciclo do ácido cítrico (atividade da CS) de oxidar este substrato.

A ausência de redução do teor de proteínas e da atividade máxima da maioria das enzimas analisadas durante a dormência, com exceção da HOAD, evidencia a natureza conservativa do metabolismo energético no tecido cardíaco dos teiús, a exemplo do que foi sugerido para outros animais que exibem jejum e depressão metabólica sazonal (ST-PIERRE & BOUTILIER, 2001; STUART *et al.*, 1998). No coração de *C. nemoralis*, por exemplo, das 11 enzimas do metabolismo intermediário analisadas, nenhuma apresentou variação significativa (STUART *et al.*, 1998). Este padrão contrasta com as alterações em outros tecidos do teiú; por exemplo, no músculo esquelético e no intestino médio há uma redução do teor de proteínas e inibição de um grande número de enzimas (SOUZA *et al.*, 2004; NASCIMENTO, 2009), indicando que a depressão metabólica é desproporcional nos diferentes órgãos. Em contraste com o coração, a locomoção e a atividade do sistema digestório são suspensas durante a dormência, e as alterações observadas nestes tecidos contribuem substancialmente para a economia energética ao reduzir o custo de manutenção dos tecidos. A contínua atividade cardíaca durante a dormência, embora a uma taxa reduzida, e a exigência de prontidão funcional do órgão no momento do despertar provavelmente constituem forças seletivas que resultam na conservação do metabolismo cardíaco em diversos animais que apresentam dormência sazonal.

Em contraste com a quase ausência de efeitos do jejum na fase dormente, o jejum de 20 dias em teiús ativos causa alterações distintas no metabolismo do miocárdio. Com exceção da LDH, que também não varia, a PK e a CS diminuem, enquanto que a HOAD é mantida constante. A redução da capacidade aeróbia do miocárdio nesse grupo de animais, como indica a inibição da CS, constitui evidência adicional da existência de mecanismos que preservam a função cardíaca na dormência. A inibição proporcional da CS e da PK resulta em manutenção da razão PK:CS,

sugerindo inibição do uso aeróbio de glicose no miocárdio após a fase de restrição alimentar. Outros contrastes em relação ao jejum na dormência são a diminuição da razão PK:LDH e aumento da razão LDH:CS, que reforçam a idéia de um ajuste que inibe a oxidação de glicose e aumenta a oxidação de lactato. Evidências com o coração de ratos submetidos a jejum reforçam essa hipótese, uma vez que se observam inibição da glicólise, aumento da captação do lactato circulante e alteração da constituição da LDH, ajustes que favorecem a oxidação do lactato (GOLD & YAFFE, 1978; YAFFE & GOLD, 1979). Neste grupo experimental, a correlação positiva entre LDH e CS sugere a existência de um mecanismo de controle que age regulando as taxas destas duas enzimas. A ausência de variação da HOAD sugere que a capacidade de oxidação de lipídios é mantida e o aumento da razão HOAD:CS indica que no miocárdio dos teiús submetidos a jejum possa haver um excedente de acetil-CoA destinado à cetogênese. A manutenção da HOAD no coração de animais submetidos à restrição alimentar e sua inibição durante o jejum sazonal também foi observada no peixe pulmonado *Protopterus dolloi* (FRICK *et al.*, 2008b). Considerando que em ambas as situações ocorrem mobilização de estoques lipídicos e depleção das reservas do miocárdio, esses dados sugerem que o efeito distinto sobre a HOAD na dormência promove inibição do fluxo de ácidos graxos para o metabolismo mitocondrial e prolonga a disponibilidade deste substrato enquanto que no jejum os lipídios intracelulares são intensamente catabolizados e mais rapidamente esgotados.

5. Influência da sazonalidade e do jejum na composição de ácidos graxos do miocárdio

5.1. Composição dos lipídios neutros e polares

No outono, cerca de 5 meses após a eclosão dos jovens teiús, a proporção de SFA no miocárdio é similar nas frações lipídicas neutra e polar porém a de MUFA é 3 vezes maior e a de PUFA 41% menor na fração neutra em relação à fração polar. Uma maior proporção de MUFA nos lipídios neutros e de PUFA nos lipídios polares parece ser um padrão comum no tecido cardíaco de outros animais, como iguanas (SIMANDLE *et al.*, 2001), aves (MUCUE *et al.*, 2009) e ratos (NIKOLAIDIS *et al.*, 2006); e também ocorre em outros tecidos, como no fígado dos teiús (HADDAD, 2007) e no músculo esquelético do beija-flor e da cascavel (INFANTE *et al.*, 2001), de modo que parece ser uma característica bem conservada.

No outono, MUFA são os ácidos graxos mais abundantes nos lipídios neutros dos teiús, seguidos por PUFA, e SFA. Em relação aos corpos gordurosos abdominais (HADDAD, 2007), os lipídios neutros cardíacos possuem uma menor proporção de SFA e MUFA e um conteúdo cerca de 2 vezes maior de PUFA, que se reflete no UI, sugerindo uma maior fluidez dos TAG armazenados no coração em relação aos corpos gordurosos abdominais. Essa característica pode ser importante para mobilização das reservas lipídicas do próprio tecido durante a transição para o estado dormente. Quando comparados aos lipídios neutros do fígado, o conteúdo percentual de SFA e de PUFA e o UI são similares, porém a proporção de MUFA é 1,5 vez maior no coração. A composição de ácidos graxos dos lipídios neutros no coração dos teiús é semelhante à de iguanas *D. dorsalis* alimentadas com dieta rica em UFA (SIMANDLE *et al.*, 2001), com um total de SFA e UFA similar, embora a proporção de MUFA seja 78% maior e a de PUFA 45% menor nos teiús.

Após cerca de 60 dias de dormência, a significativa redução da concentração de lipídios totais do miocárdio é acompanhada apenas de uma pequena variação na composição dos lipídeos neutros, com uma tendência à diminuição de 21% da proporção de PUFA em relação ao outono. No início do despertar e após ingestão de água, a proporção de PUFA aumenta 29% em relação à atividade de outono enquanto a de MUFA diminui 32%. Embora esses dados não tenham alcançado significância estatística, estas mudanças sugerem que UFA são preferencialmente mobilizados dos estoques lipídicos do miocárdio ao longo da fase hipometabólica e no despertar, de tal modo que após a primeira alimentação a somatória de UFA é significativamente menor no tecido. No entanto, o aumento da proporção de PUFA no início do despertar e após ingestão de água é intrigante. Uma possibilidade de interpretação seria que os PUFA são preferencialmente mobilizados até certo momento da fase de dormência e a proporção desta classe de ácidos graxos gradativamente se tornaria reduzida e, então, os MUFA seriam consumidos no restante da fase de dormência e no início do despertar. Após a ingestão de alimentos, a tendência à diminuição da proporção de PUFA pode ser resultado de uma maior deposição das outras classes de ácidos graxos, dado que após a alimentação, o estoque miocardial de lipídios provavelmente é restaurado.

Ao contrário do tecido cardíaco, nos corpos gordurosos abdominais dos teiús, a proporção de PUFA é menor ao final da dormência e início do despertar em relação ao outono (HADDAD, 2007). Nos adipócitos, a mobilização seletiva de ácidos graxos é influenciada pela estrutura molecular, de modo que para um dado comprimento de

cadeia, a taxa de mobilização aumenta com o aumento do número de insaturações; para um dado número de insaturações, a mobilização aumenta com a diminuição do comprimento da cadeia. Ou seja, a taxa de mobilização é maior quanto menor e mais insaturado for o ácido graxo (RACLOT, 2003). Sugere-se que a disposição física dos ácidos graxos na gotícula lipídica, com ácidos graxos mais apolares (saturados e de cadeia longa) no interior da gotícula e ácidos graxos mais polares (insaturados e de cadeia curta) na superfície, bem como propriedades intrínsecas da lipase hormônio sensível (HSL), expressa no tecido adiposo e no miocárdio de mamíferos, favoreçam a mobilização preferencial de ácidos graxos insaturados e de cadeia curta (LEWIN & COLEMAN, 2003; RACLOT, 2003). Embora estas relações tenham sido estabelecidas com base em observações feitas no tecido adiposo de mamíferos, é possível que os mecanismos responsáveis por essa seletividade atuem em outras espécies e tecidos, tais como o cardíaco. Por exemplo, em comparação com ratos saudáveis, ratos hipertensos desenvolvem hipertrofia cardíaca e depleção seletiva do conteúdo de triglicerídeos no miocárdio, com diminuição principalmente de PUFA com 2 e 3 insaturações (PERONA & RUIZ-GUTIERREZ, 2005). A tendência à redução da proporção de PUFA nos lipídios neutros dos teiús durante a dormência aparentemente está associada a mudanças na proporção de ácidos graxos individuais com alto grau de insaturação, como a acentuada redução de 65% do C20:4n-6 e de 68% do C22:6n-3 e, embora represente uma pequena proporção do total de ácidos graxos, o C20:5n-3 diminui 80% na dormência em relação à atividade de outono. Os ácidos graxos C20:4n-6 e C20:5n-3 são os PUFA n-6 e n-3 com as maiores taxas de mobilização relativa em adipócitos e o C22:6n-3 possui uma taxa de mobilização moderada (RACLOT, 2003).

Em contraste, nos animais submetidos a jejum na primavera as somatórias de SFA, MUFA, PUFA e UFA no tecido cardíaco não variam em relação a animais alimentados, sugerindo que a redução do conteúdo lipídico do miocárdio é acompanhada de uma redução de proporções similares nestas classes de ácidos graxos. Esta tendência também é evidente nos ácidos graxos individuais, de modo que as variações não parecem seguir o mesmo padrão de mobilização preferencial observado no jejum associado à dormência, exceto por um aumento da proporção de C20:0 e C21:0, ácidos graxos de baixa taxa de mobilização, e redução do C22:6n-3 e C20:2n-6, que possuem de taxa de mobilização moderada em adipócitos.

Algumas evidências sugerem padrões distintos de mobilização dos ácidos graxos do tecido adiposo em mamíferos hibernantes. No tecido adiposo de marmotas *Marmota*

flaviventris, SFA são mais mobilizados, enquanto equidnas mobilizam mais intensamente MUFA durante a fase hipometabólica (FALKENSTEIN *et al.*, 2001; FLORANT *et al.*, 1990). Sugere-se que estas diferenças sejam relacionadas à necessidade de retenção de PUFA no tecido adiposo, uma vez que estes ácidos graxos parecem influenciar positivamente diversos aspectos da hibernação em mamíferos. Em esquilos, dietas com alto teor de PUFA causam aumento do número de animais que entram em torpor, redução da faixa de regulação da temperatura corpórea e da taxa metabólica durante a depressão metabólica e um aumento da duração das fases de torpor e da taxa de sobrevivência durante a hibernação (DARK, 2005; FRANK, 1992). Nestes animais, o aumento da proporção de PUFA nos depósitos lipídicos na fase que antecede a hibernação, em grande parte devido a uma preferência espontânea por alimentos com alto teor destes ácidos graxos, diminui o ponto de fusão dos lipídios armazenados e permite que a mobilização aconteça nas temperaturas corpóreas reduzidas típicas da hibernação ($\approx 0^{\circ}\text{C}$). A ausência de alterações desta natureza nos lipídios neutros do miocárdio dos teiús, bem como de outros tecidos analisados (HADDAD, 2007), possivelmente está relacionada à dormência em temperaturas amenas ($\approx 17^{\circ}\text{C}$), mais favoráveis à mobilização dos lipídios armazenados. Além disso, em condições de laboratório, o uso de uma dieta padronizada ao longo do ciclo anual impossibilita uma eventual influência da dieta sobre a composição lipídica dos tecidos, que seria dada pela preferência por alimentos específicos ou por variações sazonais da composição dos itens alimentares na natureza. No entanto, variações de fotoperíodo induzem alterações da composição de ácidos graxos em mamíferos heterotermos, mesmo com uma dieta padronizada entre os grupos, embora este efeito seja muito menos pronunciado no tecido adiposo em relação ao músculo esquelético, sugerindo que a dieta possivelmente exerce maior influência nas variações sazonais da composição dos lipídios neutros (GEISER *et al.*, 2007).

Nos teiús, o maior teor de PUFA na fração polar deve-se principalmente ao maior conteúdo percentual de C20:4n-6 e a maior proporção de MUFA na fração neutra deve-se à maior proporção de C18:1n-9 e C18:1n-7. Essa composição tende a manter-se constante nas fases do ciclo sazonal analisadas, porém, no despertar, alterações da composição na fração neutra sugerem mobilização seletiva dos ácidos graxos nesta fase de transição, conforme discutido anteriormente. De um modo geral, a composição de ácidos graxos da fração neutra parece ser muito mais susceptível a variações durante o ciclo sazonal do que a fração polar, a qual exibe uma notável constância. Em iguanas

Dipsosaurus dorsalis, a suplementação da dieta com SFA ou UFA causa mudanças substanciais na composição de ácidos graxos dos lipídios neutros de diversos tecidos, inclusive coração, mas a fração polar é pouco afetada (SIMANDLE *et al.*, 2001). Além disso, em ratos, a composição de ácidos graxos dos lipídios neutros é muito similar entre os tecidos, no entanto, a composição dos lipídios polares parece ser controlada de maneira mais rígida, como sugere o grande número de diferenças e a maior especificidade dessa fração entre os tecidos, sendo o coração o órgão com a composição mais diferenciada (NIKOLAIDIS *et al.*, 2006). A defesa de uma composição de ácidos graxos dos fosfolipídios ajustada à função do órgão e constante parece ser fundamental para preservar o seu papel funcional, especialmente em órgãos como o cérebro e o coração, enquanto que a composição dos lipídios neutros é mais afetada pela composição da dieta e padrões seletivos de mobilização. No entanto as diferenças nas proporções de SFA, MUFA e PUFA dos lipídios neutros de diferentes tecidos dos teiús sugerem que a composição desta fração lipídica também é regulada de maneira tecido-específica.

Uma das hipóteses centrais do presente estudo, baseada na teoria das membranas como marca-passo do metabolismo celular (HULBERT & ELSE, 2000), é que a composição de ácidos graxos dos fosfolipídios cardíacos poderia ser alvo de regulação durante a depressão metabólica sazonal nos teiús, mais especificamente, que uma redução do conteúdo de PUFA e um aumento de MUFA poderiam causar mudanças na atividade de enzimas associadas a membranas do tecido. Os resultados do presente estudo, no entanto, revelam uma notável constância das somatórias de MUFA e PUFA ao longo do ciclo anual e sugerem que este mecanismo não ocorre ou, alternativamente, que não afeta de modo abrangente os fosfolipídios do tecido cardíaco dos teiús. Da mesma maneira, a dormência sazonal nos teiús aparentemente não envolve remodelamento dos ácidos graxos polares do fígado e músculo esquelético (HADDAD, 2007). Ao contrário do esperado, há uma tendência à diminuição de MUFA nos fosfolipídios totais e mitocondriais do fígado e totais do músculo esquelético na dormência e, no presente trabalho, o mesmo padrão foi observado em animais ativos submetidos a jejum, sugerindo que, nos teiús, os MUFA teriam um papel de maior relevância nos ajustes ao jejum associado à dormência sazonal bem como à restrição alimentar na fase ativa.

Um dos primeiros indícios de uma relação entre a teoria das membranas como marca-passo do metabolismo e a dormência sazonal veio de trabalhos com o caracol

terrestre *Cepaea nemoralis*, no qual se observou uma redução de 15% do conteúdo percentual de PUFA e aumento de 37% de MUFA na membrana mitocondrial do hepatopâncreas durante a estivação, acompanhados de uma acentuada redução do conteúdo de cardiolipina e da atividade da CCO, de magnitude similar ($\approx 80\%$) (STUART *et al.*, 1998). Recentemente, resultados similares em um estudo sobre a estivação do peixe pulmonado *P. dolloi* sugerem que a redução do conteúdo de cardiolipina na membrana mitocondrial pode constituir um mecanismo comum de inibição da CCO durante a depressão metabólica (FRICK *et al.*, 2010). A CCO encontra-se ligada à cardiolipina na membrana mitocondrial e a remoção deste fosfolípido da membrana resulta em perda da estrutura e função da enzima (ROBINSON, 1993). Em contraste com o amplo conjunto de dados que consolidou a teoria das membranas como marca-passo do metabolismo, os quais foram obtidos em comparações interespecíficas com vertebrados e invertebrados (revisão em HULBERT, 2000), não temos conhecimento de outras evidências de um papel de alterações da composição de ácidos graxos das membranas na regulação do metabolismo em um contexto intraespecífico, com exceção dos ajustes associados ao desenvolvimento ontogenético (EBERSPACHER *et al.*, 2005). Assim como nos teiús, a estivação em dois sapos do gênero *Cyclorana* e no caracol *Helix aspersa* não envolve alterações da composição de ácidos graxos dos fosfolípidios dos tecidos ou da membrana mitocondrial (BERNER *et al.*, 2009; BISHOP *et al.*, 2002). Em animais ectotérmicos, capazes de ingressar em um estado de dormência em temperaturas ambientais amenas, como os teiús e exemplos acima, variações intraespecíficas da taxa metabólica talvez estejam relacionadas a mudanças mais sutis em ácidos graxos e fosfolípidios que têm o potencial de modular a atividade de proteínas específicas como no caso da interação entre a CCO e a cardiolipina, e não a mudanças de composição abrangentes, que resultam em alteração das propriedades físicas das membranas. Na membrana mitocondrial, poucas moléculas lipídicas separam as proteínas de membrana (HAZEL & WILLIAMS, 1990), de modo que associações específicas entre lipídios e proteínas podem ser mais importantes na regulação metabólica durante o ciclo sazonal do que propriedades mais gerais, como a fluidez da membrana (KRAFFE *et al.*, 2007).

Em mamíferos hibernantes, entretanto, o aumento da fluidez das membranas em antecipação à fase hipometabólica parece ser determinante para manutenção da função cardíaca nas baixas temperaturas típicas da hibernação ($\approx 0^\circ\text{C}$). A composição das membranas e dos depósitos lipídicos de mamíferos não hibernantes encontra-se ajustada

para a função à aproximadamente 37°C e tendem a se tornar menos fluidos à medida que a temperatura corpórea declina. A redução da fluidez das membranas prejudica a função de transportadores e receptores a ela associados ao restringir as mudanças conformacionais das moléculas, sendo um dos motivos pelos quais, abaixo de 20°C, a maioria dos mamíferos não hibernantes sofre falência cardíaca em consequência de arritmias e fibrilação ventricular (ANDREWS, 2007; STOREY, 2004). À medida que o inverno se aproxima pequenos mamíferos hibernantes se alimentam preferencialmente de plantas e sementes com alto teor de PUFA n-3 e n-6, aumentando a deposição de estoques energéticos e a porcentagem destes ácidos graxos em suas membranas (MCLENNAN & ABEYWARDENA, 2005). Em esquilos *Spermophilus richardsonii*, há um aumento da fluidez e do conteúdo de UFA nas membranas dos cardiomiócitos durante a hibernação em relação à fase de atividade (CHARNOCK *et al.*, 1980). Após a hibernação, as alterações da composição lipídica das membranas são revertidas e os animais ativos na primavera são tão suscetíveis aos efeitos letais da hipotermia quanto não hibernantes (STOREY, 2004). Essas observações reforçam a hipótese de que nos teiús e outros ectotermos, a ausência de um padrão de variação semelhante ao de mamíferos pode ser explicado pela dormência em temperaturas amenas e, por outro lado, os consistentes resultados com diferentes tecidos dos teiús sugerem que as variações sazonais da composição lipídica e da fluidez das membranas em mamíferos são, de fato, ajustes mais relacionados com a adaptação à temperatura do que à condição hipometabólica.

Um aumento da proporção de PUFA nos fosfolipídios das membranas também ocorre durante a aclimação a temperaturas reduzidas em vertebrados ectotérmicos, um fenômeno conhecido como adaptação homeoviscosa (HAZEL, 1995). No lagarto *Phrynocephalus przewalskii* a exposição a temperaturas reduzidas (4°C) induz um aumento do teor de PUFA e redução de SFA nos triglicerídeos e fosfolipídios cardíacos, efeito oposto ao observado após exposição a altas temperaturas (38°C) (SHEN *et al.*, 2005). No entanto, a influência de tais alterações sobre a fluidez das membranas não explica o porquê do aumento da proporção de PUFA em vez de MUFA, dado que MUFA são superiores aos PUFA com respeito à magnitude (expressa por dupla ligação) da influência que exercem na fluidez da membrana e ao menor custo metabólico de sua produção. Neste contexto, sugere-se que a alteração do nível de insaturação das membranas possa não ser o único “objetivo” dos ajustes na composição lipídica das

membranas observados em antecipação à hibernação em mamíferos e durante adaptação a temperaturas reduzidas em ectotermos (KRAFFE *et al.*, 2007).

Recentemente foi proposto por Ruf e Arnold (2008) que, em mamíferos hibernantes, o principal alvo dos ajustes da proporção de PUFA seria a Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático do coração e que esta enzima não seria regulada pelo total de PUFA, mas pela razão entre PUFA n-6 e n-3. Uma razão n-6:n-3 elevada nas membranas do retículo sarcoplasmático permitiria algum grau de compensação dos efeitos inibitórios das baixas temperaturas sobre a atividade da Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase e contribuiria para a manutenção de um balanço iônico adequado à função contrátil. Além disso, MUFA n-9, particularmente C18:1n-9, poderiam mimetizar os efeitos positivos de PUFA n-6 na hibernação (GEISER *et al.*, 1994). Nos teiús, essa hipótese encontra algum suporte em evidências de alteração sazonal do teor de MUFA nos fosfolipídios extraídos do tecido muscular esquelético e hepático (HADDAD, 2007). No entanto, no presente estudo, a constância das proporções de MUFA n-9, C18:1n-9, e PUFA n-3 e n-6, bem como as razões n-6:n-3 e n-9:n-3 ao longo do ciclo anual permite descartar um papel de tais ajustes na manutenção da função cardíaca durante a dormência sazonal nos teiús. Adicionalmente, dado que os teiús apresentam depressão metabólica de magnitude similar a de pequenos mamíferos hibernantes, mas em temperaturas muito mais amenas, a constância da composição lipídica dos cardiomiócitos dos teiús reforça a hipótese de que os ajustes apresentados por mamíferos hibernantes estão associados principalmente à sobrevivência nas baixas temperaturas da hibernação e não à depressão metabólica. De um total de mais de 30 ácidos graxos analisados na fração polar do miocárdio, apenas 3 apresentam tendência estatística à variação ao longo do ciclo anual, enquanto que no músculo esquelético e no fígado, 8 e 11 ácidos graxos, respectivamente, apresentam variação significativa (HADDAD, 2007).

A constância da composição dos lipídios polares também sugere uma adaptação para a função frente à variação diária da temperatura corpórea na fase ativa. Após deixarem seus abrigos pela manhã, teiús ativos se expõem ao sol e têm sua temperatura corpórea aumentada em 10-15°C em apenas 5-7 h, atingindo 36-37°C, e reduzindo na mesma magnitude, embora mais lentamente, durante o fim da tarde e noite (KLEIN *et al.*, 2006). À medida que o inverno se aproxima, este ritmo se modifica, com uma redução progressiva das horas de atividade até que o animal abandona o ritmo diário de atividade e permanece na toca a temperaturas relativamente constantes e reduzidas ($\approx 17^\circ\text{C}$). Assim, os teiús provavelmente possuem uma constituição lipídica ajustada

para a função em um amplo intervalo de temperaturas, de tal modo que a temperatura que marca a transição de estado das membranas provavelmente situa-se abaixo do valor mínimo a que os animais estão sujeitos durante os meses de inverno. Por outro lado, uma temperatura corpórea levemente reduzida durante os meses de inverno, associada à ausência de ajustes da composição lipídica das membranas, teria o potencial de contribuir em algum grau para a inibição metabólica e economia energética, devido ao efeito resultante de restrição da mobilidade estrutural das proteínas nela inseridas e ausência de custos associados ao remodelamento da composição das membranas (STOREY, 2004).

Contrastando com a constância da composição de ácidos graxos do ventrículo cardíaco durante o jejum associado à dormência sazonal, é interessante notar a maior variabilidade em animais ativos submetidos à restrição alimentar, tanto na fração neutra quanto na polar. Esta diferença pode estar relacionada à pronunciada depressão metabólica e à existência de uma fase de preparação para o jejum na dormência, ausentes no grupo submetido ao jejum na fase ativa. A proporção de MUFA, por exemplo, que não varia ao longo do ciclo anual, mostra tendência à redução de 20% no jejum, principalmente devido a tendência à redução do C18:1n-9 e do C20:1n-9, alterações que podem estar relacionadas à mobilização de lipídios polares para a produção de ATP. Além disso, esta redução foi, em grande parte, responsável pela tendência à diminuição da razão MUFA:PUFA no jejum, dado que a somatória de PUFA não varia. Dentre os PUFA, a proporção de C20:4n-6 aumenta 14% no jejum, de modo semelhante ao observado no coração de galinhas poedeiras em jejum e camundongos alimentados com dieta deficiente em ácidos graxos essenciais (LEFKOWITH *et al.*, 1985; SAZABÓ *et al.*, 2005). Uma outra diferença seria a forte tendência à redução de 40% do conteúdo percentual de C22:6n-3 no jejum e, dada a correlação positiva entre a concentração deste ácido graxo nas membranas e a atividade de várias enzimas, como a Na^+, K^+ -ATPase e a Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase (FELLER *et al.*, 2002; TURNER *et al.*, 2003; SWANSON *et al.*, 1989), esta redução sugere uma inibição da atividade destas proteínas. Na ave migratória *Calidris pusilla*, correlações positivas entre a atividade das enzimas CS e HOAD e o conteúdo de n-3 nos fosfolipídios dos músculos do vôo e nos depósitos lipídicos sugerem que estes ácidos graxos influenciam o metabolismo celular por mecanismos que envolvem a sua incorporação às membranas bem como ao tecido adiposo (MAILLET & WEBER, 2007). Nos teiús, a redução do conteúdo de C22:6n-3 nas frações lipídicas neutra e polar associada à inibição da

atividade da CS sugere que um mecanismo similar possa atuar durante o jejum na fase ativa, inibindo a função cardíaca e contribuindo para a economia energética.

A análise da composição de ácidos graxos dos lipídios polares totais feita no presente trabalho inclui os fosfolipídios que integram todas as membranas celulares e sub-celulares de todos os tipos de células que compõem o tecido, bem como todas as classes de fosfolipídios encontrados nas membranas (HULBERT *et al.*, 2002b). Uma desvantagem deste tipo de abordagem é que variações da composição de fosfolipídios e membranas específicos, como a cardiolipina e a membrana mitocondrial, por exemplo, podem ficar obscurecidas. Por outro lado, esta análise permite uma visão geral dos efeitos do jejum e da depressão metabólica sazonal sobre a composição do tecido em contraste com outros tecidos do mesmo animal e com o mesmo tecido de outros animais que exibem dormência sazonal, revelando padrões comuns de variação e novos caminhos para investigação.

5.2. Efeito da massa corpórea sobre a composição de ácidos graxos dos lipídios polares do miocárdio

A despeito da constância das médias do conteúdo percentual dos ácidos graxos ao longo do ciclo anual, a análise de regressão sugere uma forte relação entre o conteúdo de determinados ácidos graxos e a massa corpórea dos jovens teiús. Esse efeito alométrico não se manifesta nos totais de SFA, MUFA, PUFA e UFA, os quais não exibem correlação com a massa corpórea nos grupos experimentais analisados ou mesmo quando todas as fases são reunidas em um único conjunto de dados. No entanto, as porcentagens individuais de C18:1n-9, C22:6n-3 e C22:5n-6 exibem padrões consistentes de variação com a massa corpórea, que se modificam em determinadas fases do ciclo anual. Com base em estimativas geradas pela equação da reta, na atividade de outono um teiú de 300 g possui 55% mais C18:1n-9 nos fosfolipídios cardíacos em relação a um animal de 100 g, enquanto que após o despertar e ingestão de água o expoente alométrico torna-se negativo e um teiú de 100 g possui 55% mais C18:1n-9 em relação a um animal de 300 g, uma completa inversão da relação observada na atividade de outono! Em comparações interespecíficas de aves, tanto a soma de MUFA quanto o conteúdo individual de C18:1n-9 dos lipídios polares do músculo esquelético possuem correlação positiva com a massa corpórea, similar ao observado para o C18:1n-9 nos teiús ativos no outono, e sugere-se que esta variação

esteja associada à redução da intensidade metabólica em função do aumento da massa corpórea das espécies (HULBERT *et al.*, 2002a). Desse modo, o menor conteúdo de C18:1n-9 nos animais menores durante o outono e a progressiva inversão deste padrão durante a fase de dormência e início do despertar, juntamente com a redução da proporção de C22:6n-3 (ver abaixo) podem estar associados com a maior magnitude de depressão metabólica nos animais de massa corpórea mais reduzida, conforme evidências reportadas por Souza e colaboradores (2004).

Dentre os PUFA, o C22:5n-6 exibe uma relação significativa com a massa corpórea em vários grupos experimentais e, curiosamente, a média do conteúdo percentual deste ácido graxo não varia no ciclo anual ou nos animais ativos submetidos a jejum, reforçando a hipótese de que possíveis variações sazonais foram obscurecidas por variações em função da massa corpórea dentro dos grupos experimentais de dados. O conteúdo de C22:5n-6 representa uma proporção relativamente constante do total de ácidos graxos independente de variações da massa do animal na fase de outono e dormência de inverno, porém, no início do despertar um teiú de 100 g possui um conteúdo de C22:5n-6 64% maior em relação a um teiú de 300 g, tendência inversa à do C20:4n-6. Após a primeira alimentação, esta relação se altera, porém os resultados da análise para esta fase devem ser interpretados com cautela, devido ao reduzido número de animais neste grupo. Após cerca de um mês de atividade na primavera, o expoente alométrico é novamente negativo ($b = -0,74$), sugerindo que o conteúdo de C22:5n-6 tende a ser consideravelmente maior nos animais menores após o despertar e durante a atividade de primavera. A forte relação alométrica do C22:5n-6 com a massa corpórea sugere um papel deste ácido graxo na reorganização metabólica nos teiús, no entanto, as implicações de tais variações para a fisiologia do animal não são conhecidas. O C22:5n-6 é formado a partir do C18:2n-6 pela mesma via enzimática envolvida na síntese do C22:6n-3 a partir do C18:3n-3 e a disponibilidade relativa destes dois ácidos graxos essenciais precursores pode influenciar as concentrações finais de C22:5n-6 e C22:6n-3 (SCHMITZ & ECKER, 2008). O suprimento inadequado de PUFA n-3 durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento resulta em uma redução dos níveis de C22:6n-3 e aumento de C22:5n-6 em tecidos neuronais, causando prejuízos visuais, cognitivos e comportamentais em ratos (AKBAR *et al.*, 2005). O mecanismo responsável por estes efeitos não é claro, mas sabe-se que a substituição do C22:6n-3 por C22:5n-6, apesar da semelhança estrutural entre estes ácidos graxos, tem implicações importantes para as propriedades físicas da membrana, em parte, devido a

uma maior flexibilidade do C22:6n-3 conferida pela dupla ligação adicional próxima à extremidade metil da cadeia (ELDHO *et al.*, 2003). Nos teiús, a relação entre as proporções de C22:5n-6 e C22:6n-3 com a massa corpórea é semelhante na maioria das fases analisadas, exceto após o despertar e ingestão de água, quando o expoente alométrico é negativo para o C22:5n-6 e positivo para o C22:6n-3, sugerindo que nesta fase, a proporção de C22:5n-6 aumenta em relação à de C22:6n-3 nos animais menores.

O C22:6n-3 é o ácido graxo com maior número de insaturações e possui características únicas devido à sua síntese, que envolve um passo de degradação nos peroxissomos, e a suas propriedades físicas (SPRECHER, 2000). Calcula-se que o C22:6n-3 possa assumir centenas de possíveis conformações na membrana, várias envolvendo o posicionamento da extremidade metil da molécula voltada para a superfície externa da bicamada, o que pode explicar porque altas concentrações de C22:6n-3 são associadas com o aumento da atividade de várias enzimas de membrana, como a Na^+, K^+ -ATPase e a Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase (FELLER *et al.*, 2002; TURNER *et al.*, 2003; SWANSON *et al.*, 1989). Nos teiús, a proporção de C22:6n-3 nos fosfolipídios cardíacos não varia em função da massa corpórea na atividade de outono, porém exibe algum grau de correlação com a massa corpórea em várias fases do ciclo anual, muito embora a reta seja significativa apenas no grupo de despertar após a ingestão de água. Nesta fase, o conteúdo percentual de C22:6n-3 é 2,4 vezes maior em um animal de 300 g do que em um de 100 g, uma relação inversa àquela observada em comparações interespecíficas de mamíferos e aves. Aproximadamente uma semana após o despertar e a primeira alimentação a desproporção diminui e após cerca de um mês de atividade na primavera há uma completa inversão desta relação ($b = -0,9$), de modo que para uma variação de 3 vezes da massa corpórea a concentração de C22:6n-3 seria cerca de 2,8 vezes maior nos animais menores, uma relação similar à observada em comparações interespecíficas de mamíferos e aves. O menor conteúdo percentual de C22:6n-3 nos fosfolipídios de animais menores durante a dormência e o despertar sugerem uma relação com a maior magnitude de depressão metabólica apresentada pelos animais nessa faixa de tamanho (SOUZA *et al.*, 2004); e a tendência à redução da desproporção após a primeira alimentação sugere o início de um processo de recuperação. O surpreendente aumento do conteúdo de C22:6n-3 nos fosfolipídios cardíacos dos animais menores na atividade de primavera, de mais de 2 vezes para um animal de 100 g em relação à fase anterior, é consistente com observações anteriores de que os animais nesta faixa de tamanho crescem a taxas elevadas (SOUZA *et al.*, 2004) e

o aumento do C22:6n-3 no miocárdio pode estar associado a uma maior FC e taxa metabólica dos animais de massa corpórea reduzida, de modo similar às observações de Gudbjarnason e colaboradores (1978 *apud* HULBERT, 2002b) para comparações interespecíficas de mamíferos. Uma redução do expoente alométrico da massa do coração e da massa do intestino médio dos teiús também foi observada na atividade de primavera (NASCIMENTO, 2009), evidenciando a elevada taxa de crescimento dos órgãos internos de alta demanda energética, o que provavelmente contribui para uma maior taxa metabólica dos animais menores nesta fase. Em beija-flores, o conteúdo percentual de C22:6n-3 no músculo peitoral, caracterizado pela alta frequência de contração e por uma das maiores taxas de consumo de O₂ conhecidas entre os vertebrados, é 4 vezes maior que no músculo da pata. Em cascavéis, a concentração de C22:6n-3 também é maior no músculo do chocalho em relação ao músculo peitoral (INFANTE *et al.*, 2001). Sugere-se que a presença de altas concentrações de C22:6n-3 em músculos com alta frequência de contração deva-se a necessidades específicas de proteínas de transporte iônico do retículo sarcoplasmático e de enzimas da cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias, por fosfolipídios contendo C22:6n-3 em sua estrutura.

Neste contexto, é interessante que o jejum por restrição alimentar em animais ativos na primavera causa uma redução mais pronunciada do conteúdo percentual de C22:6n-3 nos animais menores, sugerindo uma maior inibição de proteínas associadas à membrana e possivelmente uma maior inibição da função cardíaca e do metabolismo nos animais menores. No jejum, teiús de 100 e 300 g apresentariam uma redução do conteúdo percentual de C22:6n-3 de 43 e 6%, respectivamente, em relação a animais alimentados. Na atividade de primavera, animais menores investem grande parte da energia no crescimento, como sugerem a redução do expoente alométrico para a massa do coração e intestino (NASCIMENTO, 2009), e provavelmente dispõem de menos recursos para lidar com a imprevisibilidade de alimentos na fase ativa, como também sugerem a redução mais pronunciada da massa intestinal e cardíaca nos animais menores submetidos a jejum. Assim, a redução da proporção de C22:6n-3, consistentemente associada com altas taxas de transporte iônico e metabolismo nos animais, pode constituir um mecanismo de redução do gasto energético e extensão do tempo de sobrevivência com base nos substratos endógenos durante o jejum. No conjunto, os dados sugerem um papel do C22:6n-3 nas variações de taxa metabólica em

função da massa corpórea no ciclo anual de atividades e no jejum associado à imprevisibilidade de alimentos na fase ativa.

Conclusões

VIII. CONCLUSÕES

1. A massa ventricular relativa aumenta no outono e início da dormência em teiús jovens e esse aumento é mais pronunciado nos animais de maior massa corpórea. Aparentemente, esse efeito é causado por um aumento proporcional de vários componentes macromoleculares do tecido e, ao menos em parte, por hipertrofia dos cardiomiócitos. Em contraste, a massa ventricular diminui em animais submetidos ao jejum na atividade e este efeito é mais acentuado em animais menores.
2. O miocárdio esponjoso dos teiús é denso e com poucos espaços lacunares no outono, dormência e início do despertar, tornando-se extremamente reticulado na primavera. Esta alteração se opõe à tendência esperada com base no desenvolvimento ontogenético e provavelmente constitui um ajuste morfológico sazonal do tecido cardíaco.
3. A densidade numérica de cardiomiócitos é menor na dormência e o volume do cardiomiócito é maior em relação à primavera, sugerindo que a reduzida área de lacunas nesta fase resulta, ao menos em parte, da hipertrofia dos cardiomiócitos. O menor volume dos cardiomiócitos na primavera pode ser a causa, ao menos parcial, do aumento da área de lacunas nesta fase.
4. O teor de água do miocárdio não varia no ciclo sazonal, exceto por um pequeno aumento na dormência que seria explicado pelas alterações concomitantes do teor de substratos no tecido. Este aumento, no entanto, é insuficiente para explicar o aumento do volume dos cardiomiócitos.
5. O teor de proteínas totais e solúveis não varia no ciclo sazonal, contrastando com a redução observada em outros órgãos na dormência e no jejum na fase ativa, o que sugere uma provável hierarquia de mobilização de proteínas entre os órgãos.
6. O conteúdo de proteínas miofibrilares é reduzido no outono e dormência e aumenta logo no início do despertar, após a ingestão de água.
7. Reservas lipídicas do miocárdio aparentemente são utilizadas mais intensamente durante a primeira metade do tempo total de dormência e o grau de depleção é similar ao observado após 20 dias de jejum na primavera.

8. Na dormência, a inibição do catabolismo de carboidratos e de lactato no miocárdio não envolve alteração da capacidade de fluxo destes substratos, dada pela PK e LDH. A inibição das taxas de oxidação lipídica envolve uma redução da atividade HOAD e a forte tendência ao aumento da enzima mitocondrial CS na dormência evidencia a importância da manutenção da função cardíaca durante esta fase e em preparação para o súbito aumento da demanda no despertar. Em contraste, após jejum na fase ativa a inibição da PK sugere inibição da oxidação de glicose e o tecido aparentemente preserva a capacidade de oxidação de lactato. A ausência de variação da HOAD e a inibição da CS sugerem que a capacidade de oxidação de lipídios continua elevada e o aumento da razão HOAD:CS sugere a ocorrência de cetogênese no tecido durante o jejum por restrição alimentar.
9. Aparentemente, UFA são preferencialmente mobilizados das reservas lipídicas do miocárdio ao longo da dormência e no despertar. Em contraste, no jejum na primavera ocorre uma redução de proporções similares nas classes de ácidos graxos.
10. A notável constância da composição de ácidos graxos dos lipídios polares no ciclo anual sugere que os ajustes sazonais não afetam de modo abrangente os fosfolipídios do tecido cardíaco e, portanto, não confirma a hipótese de um papel preponderante deste mecanismo na regulação metabólica durante a dormência sazonal nos teiús. O contraste entre este padrão e as evidências obtidas com mamíferos deve-se, provavelmente, à ocorrência de dormência em temperaturas ambientais mais amenas nos teiús e sugere que os ajustes da composição lipídica de membranas em mamíferos estariam relacionados com a adaptação às baixas temperaturas corpóreas durante a hibernação.
11. Em contraste com o jejum na dormência, o jejum na fase ativa induz uma maior variação da composição de ácidos graxos na fração neutra e polar do miocárdio, diferença possivelmente relacionada à depressão metabólica e à existência de uma fase de preparação para a dormência.
12. O conteúdo dos ácidos graxos C18:1n-9, C22:5n-6 e C22:6n-3 varia em função da massa corpórea em determinadas fases do ciclo anual e após o jejum na fase ativa; e as alterações do padrão alométrico sugerem uma relação entre o conteúdo destes ácidos graxos e as diferenças de taxa metabólica em função da massa corpórea.

Referências Bibliográficas

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A. S. Estivation in South American amphibians and reptiles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 1241–1247, 1995.
- ABE, A. S. Observations on dormancy in tegu lizards – *Tupinambis teguixim* (Reptilia, Teiidae). **Naturalia**, v. 8, p. 235-239, 1983.
- AHO, E. & VORNANEN, M. Cold Acclimation increases basal heart rate but decreases its thermal tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 171, p. 173-179, 2001.
- AHO, E.; VORNANEN, M. Seasonality of ATPase activities in crucian carp (*Carassius carassius* L.) heart. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 16, p. 355-364, 1997.
- AKBAR, M., CALDERON, F.; WEN, Z.; KIM, H-Y. Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 10858–10863, 2005.
- ALMEIDA-VAL, V. M. & HOCHACHKA, P. W. Air-breathing fishes: Metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 5, p. 45-55, 1995.
- ANDERSEN, J. B.; ROURKE, B. C.; CAIOZZO, V. J. BENNET, A. F.; HICKS, J. W. Postprandial cardiac hypertrophy in pythons. **Nature**, v. 434, p. 37-38, 2005.
- ANDRADE, D. V. & ABE, A. S. Gas exchange and ventilation during dormancy in the Tegu lizard *Tupinambis merianae*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 3677–3685, 1999.
- ANDRADE, D. V. SANDERS, C.; MILSON, W. K.; ABE, A. S. Overwintering in Tegu Lizards. In: BARNES, B. M.; CAREY, H. V. eds **Life in the Cold: Evolution, Mechanisms, Adaptation, and Application**. Twelfth International Hibernation Symposium. Biological Papers of the University of Alaska, n. 27. Fairbanks, Alaska, USA: Institute of Arctic Biology, University of Alaska, 2004. p. 339-348.
- ANDREWS, M. T. Advances in molecular biology of hibernation in mammals. **BioEssays**, v. 29, p. 431–440, 2007.
- ANVERSA, P.; KAJSTURA, J.; LERI, A.; BOLLI, R. Life and Death of Cardiac Stem Cells, A Paradigm Shift in Cardiac Biology. **Circulation**, v. 113, p. 1451-1463, 2006.
- BARNI, S.; BERNINI, F.; FENOGLIO, C.; REGGIANI, C. Adaptations of the frog myocardium to conditions of natural hibernation: morphofunctional changes. **Bollettino di Zoologia**, v. 61, p. 317-324, 1994.
- BATES, P. C. & MILLWARD, D. J. Myofibrillar protein turnover. **Biochemical Journal**, v. 214, p. 587-592, 1983.
- BAUCHINGER, U. & BIEBACH, H. Differential catabolism of muscle protein in Garden Warblers (*Sylvia borin*): flight and leg muscle act as a protein source during long-distance migration. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 171, p. 293-301, 2001.
- BEAILIEU, M-A. & GUDERLEY, H. Changes in qualitative composition of white muscle with nutritional status of Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 121, p. 135-141, 1998.
- BERNER, N. J.; ELSE, P. L.; HULBERT, A. J.; MANTLE, B. L.; CRAMP, R. L.; FRANKLIN, C. E. Metabolic depression during aestivation does not involve

- remodeling of membrane fatty acids in two Australian frogs. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 179, p. 857-866, 2009.
- BISHOP, T.; OCLOO, A.; BRAND, M. D. Structure and function of mitochondria in hepatopancreas cells from metabolically depressed snails. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 75, p. 134-144, 2002.
- BROOKS, S. P. J. & STOREY, K. B. Mechanisms of glycolytic control during hibernation in the ground squirrel *Spermophilus lateralis*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 162, p. 23-28 1992.
- BURLINGTON, R. & SAMPSON, J. H. Distribution and activity of lactic dehydrogenase isozymes in tissues from a hibernator and a non-hibernator. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 17, n. 25, p. 185-192, 1968.
- BURLINGTON, R. F. & MILSON, W. K. Differential effects of acetylcholine on coronary flow in isolated hypothermic hearts from rats and ground squirrels. **The Journal of Experimental Biology**, v. 185, p. 17-24, 1993.
- BURLINGTON, R. F.; BOWERS, W. D.; DAUM, R. C.; ASHBAUGH, P. Ultrastructural changes in the heart tissue during hibernation. **Cryobiology**, v. 9, p. 224-228, 1972.
- BURNESS, G.; CHARDINE, J. W.; DARVEAU, C-A. Flight muscle enzyme activities do not differ between pelagic and near-shore foraging seabird species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 140, p. 52-58, 2005.
- BUTTGEREIT, F.; BRAND, M. D. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. **Biochemical Journal**, v. 312, p. 163-167, 1995.
- CAREY, H. V.; ANDREWS, M. T.; MARTIN, S. L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 1153-1181, 2003.
- CARVALHO, J. E. **Controle da homeostase metabólica na dormência sazonal em lagartos teiú (*Tupinambis merianae*)**. 1999, 73p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Geral), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- CASEY, T. M.; PAKAY, J. L.; GUPPY, M. ARTHUR, P. G. Hypoxia causes downregulation of protein and RNA synthesis in non-contracting mammalian cardiomyocytes. **Circulation Research**, v. 90, p. 777-783, 2002.
- CASTELINI, M. A. & REA, L. D. The biochemistry of natural fasting at its limits. **Experientia**, v. 48, p. 575-581, 1992.
- CERRA, M. C.; IMBROGNO, S.; AMELIO, D.; GAROFALO, F.; COLVEE, E.; TOTA, B.; ICARDO, J. M. Cardiac morphodynamic remodelling in the growing eel (*Anguilla Anguilla L.*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 2867-2875, 2004.
- CHARNOCK, J. S.; GIBSON, R. A.; MCMURCHIE, E. J.; RAISON, J. K. Changes in the fluidity of myocardial membranes during hibernation: relationship to myocardial adenosinetriphosphatase activity. **Molecular Pharmacology**, v. 18, p. 476-482, 1980.
- CHRISTIE, W.W. **Gas chromatography and lipids**. Scotland: The Oily Press, 1992. 307 p.
- CLARK, R. & RODNICK, K. J. Morphometric and biochemical characteristics of ventricular hypertrophy in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1541-1552, 1998.
- COWAN, K. J.; MACDONALD, J. A.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Metabolic reorganization and signal transduction during estivation in spadefoot toad. **Experimental Biology On line**, v. 5, p. 61-85, 2000.

- CRIE, J. S.; SANFORD, C. F. WILDENTHAL, K. Influence of starvation and refeeding on cardiac protein degradation in rats. **Journal of Nutrition**, v. 110, p. 22-27, 1980.
- DANTONIO, V.; FERRO, R. S.; PEREIRA, I. C.; SILVEIRA, L. C.; SOUZA, S. C. R. Variação sazonal do teor de proteínas e do potencial glicolítico do músculo esquelético de lagartos teiú *Tupinambis merianae* no primeiro ciclo anual de atividades, In: XXV Reunião Anual da FeSBE, 2010, Águas de Lindóia.CD-ROM.
- DARK, J. Annual Lipid Cycles in Hibernation: Integration of Physiology and Behavior. **Annual Reviews Nutrition**, v; 25, p. 469-497, 2005.
- DEPRE, C.; VANOVERSCHELDE, J. J.; TAEGTMEYER, H. Glucose for the Heart. **Circulation**, v. 99, p. 578-588, 1999.
- DERICKSON, W. K. Lipid storage and utilization in reptiles. **American Zoologist**, v. 16, p. 711-723, 1976.
- DRIEDZIC, W. R. & GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperatures. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 221-258, 1994.
- DUCHARME, N. A. & BICKEL, P. E. Lipid Droplets in Lipogenesis and Lipolysis. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p.942-949, 2008.
- EBERSPACHER, B. E.; ORGANISCIAC, D. T.; MASSARO, E. J. Alterations in lipid composition of liver cell plasma membranes during development. **Journal of Experimental Zoology**, v. 199, n. 2, 2005.
- EL-DEIB, S. Lipid changes in blood serum and tissues of the Egyptian Cobra "*Naja haje haje*" during the hibernation cycle. **Journal of Thermal Biology**, v. 30, p. 51-59, 2005.
- ELDHO, N. V.; FELLER, S. E.; TRISTRAM-NAGLE, S.; POLOZOV, I. V.; GAWRISCH, K. Polyunsaturated docosahexaenoic vs docosapentaenoic acids differences in lipid matrix properties from the loss of one double bond. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 6409-6421, 2003.
- ELSE, P. L. & HULBERT, A. J. A comparative study of the metabolic capacity of hearts from reptiles and mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76, n. 3, p. 553-557, 1983.
- EVERSE, J.; BERGER, R. L.; KAPLAN, N. O. Physiological concentrations of lactate dehydrogenases and substrate inhibition. **Science**, v. 168, p. 1236-1238, 1970.
- FAHLMAN, A.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Gene up-regulation in heart during mammalian hibernation. **Cryobiology**, v. 40, p.332-342, 2000.
- FALKENSTEIN, F. KÖRTNER, G.; WATSON, K.; GEISER, F. Dietary fats and body lipid composition in relation to hibernation in free-ranging echidnas. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 171, p. 189-194, 2001.
- FARINA-LIPARI, E. Differentiation of the ventricular myocardium of the heart of *Chalcides ocellatus* (Reptilia). **Boll. Zool.**, v. 57, p. 39-43, 1990.
- FELLER, S. E.; GAWRISCH, K.; MACKERELL JR, A. D. Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 2, p. 318-326, 2002.
- FICK, A. Über die Messung des Blutquantums in den Herzventrikeln. **Sitz. Physik. Med. Ges.** v. 2, p. 16, 1870.
- FLORANT, G. L.; NUTTLE, L. C.; MULLINEX, D. E.; RINTOUL, D. A. Plasma and white adipose tissue lipid composition in marmots. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. 1123-1131, 1990.

- FOLCH, J.; LESS, M. & STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-503, 1957.
- FRANK, C. L. The influence of dietary fatty acids on hibernation by golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). **Physiological Zoology**, v. 65, n. 5, p. 906-920, 1992.
- FRICK, N. T.; BYSTRIANSKY, J. S. IP, Y. K.; CHEW, S. F.; BALLANTYNE, J. S. Carbohydrate and amino acid metabolism in fasting and aestivating African lungfish (*Protopterus dolloi*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 151, p. 85-92, 2008a.
- FRICK, N. T.; BYSTRIANSKY, J. S. IP, Y. K.; CHEW, S. F.; BALLANTYNE, J. S. Lipid, ketone body and oxidative metabolism in the African lungfish, *Protopterus dolloi* following 60 days of fasting and aestivation. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 151, p. 93-101, 2008b.
- FRICK, N. T.; BYSTRIANSKY, J. S.; IP, Y. K.; CHEW, S. F.; BALLANTYNE, J. S. Cytochrome c oxidase is regulated by modulations in protein expression and mitochondrial membrane phospholipid composition in estivating African lungfish. **American Journal of Physiology**, v. 298, p. 608-616, 2010.
- FRINGS, C.S.; FENDLY, T.W.; DUNN, R.T. & QUENN, C.A. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 673-674, 1972.
- GALLI, G. L. J.; GESSER, H.; TAYLOR, E. W.; SHIELS, H. A.; WANG, T. The role of sarcoplasmic reticulum in the generation of high rates and blood pressures in reptiles. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 1956-1963, 2006.
- GALLI, L. J.; WARREN, D. E.; SHIELS, H. A. Ca^{2+} cycling in cardiomyocytes from a high-performance reptile, the varanid lizard (*Varanus exanthematicus*). **American Journal of Physiology**, v. 297, p. 1636-1644, 2009.
- GARLAND, T.J.; CARTER, P. Evolutionary physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 56, p. 579-621, 1994.
- GAROFALO, F.; IMBROGNO, S.; GATTUSO, A.; SPENA, A.; CERRA, M. C. Cardiac morpho-dynamics in *Rana esculenta*: Influence of sex and season. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, p. 82-89, 2006.
- GEISER, F.; MCALLAN, B. M.; KENAGY, G. J. The degree of dietary fatty acid unsaturation affects torpor patterns and lipid composition of a hibernator. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 164, p. 299-305, 1994.
- GEISER, F.; MCALLAN, B. M.; KENAGY, G. J.; HIENERT, S. M. Photoperiod affects daily torpor and tissue fatty acid composition in deer mice. **Naturwissenschaften**, v. 94, p. 319-325, 2007.
- GOFFART, S.; von KLEIST-RETZOW, J.; WIESNER, R. J. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 64, p. 198-207, 2004.
- GOLD, A. J. & YAFFE, S. R. Effects of prolonged starvation on cardiac energy metabolism in the rat. **Journal of Nutrition**, v. 108, p. 410-416, 1978.
- GROSSFIELD, A.; FELLES, S. E.; PITMAN, M. C. A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by n-3 polyunsaturated lipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 13, p. 4888-4893, 2006.
- GUPPY, M. & WITHERS, P. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. **Biological Reviews**, v. 74, p. 1-40, 1999.

- HADDAD, L. S. **O papel dos lipídios na reorganização metabólica associada à dormência sazonal no lagarto teiú *Tupinambis merianae***. 2007, 81p. Tese (Doutorado em Fisiologia Geral), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- HAGENSEN, M. K.; ABE, A. S.; FALK, E.; WANG, T. Physiological importance of coronary arterial blood supply to the rattlesnake heart. **The Journal of Experimental Biology**, v. 211, p. 3588-3593, 2008.
- HÄUSSINGER, D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. **Biochemical Journal**, v. 313, p. 697-710, 1996.
- HAZEL, J. R. & WILLIAMS, E. E. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. **Progress in Lipid Research**, v. 29, n. 3, p. 167-227, 1990.
- HAZEL, J. R. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? **Annual Reviews**, v. 57, p. 19-42, 1995.
- HELDMAIER, G.; ORTMANN, S.; ELVERT, R. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 141, p. 317-329, 2004.
- HELLE, K. B. Structures of functional interest in the myocardium of lower vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76A, n. 3, p. 447-452, 1983.
- HEUSCH, G.; SCHULZ, R.; RAHIMTOOLA, S. H. Myocardial hibernation: a delicate balance. **American Journal of Physiology**, v. 288, 948-999, 2005.
- HICKS, J. W. The physiological and evolutionary significance of cardiovascular shunting patterns in reptiles. **News in Physiological Sciences**, n. 17, p. 241-245, 2002.
- HOCHACHKA, P. W. & GUPPY, M. **Metabolic Arrest and the Control of Biological Time**. (University Press, Harvard). 1987. p. 227.
- HOCHACHKA, P. W. Lactate dehydrogenases in poikilotherms: definition of a complex isozyme system. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 18, p. 261-269, 1966.
- HOCHACHKA, P. W.; DARVEAU, C. A.; ANDREWS, R. D.; SUAREZ, R. K. Allometric cascade: a model for resolving body mass effects on metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 134, p. 675-691, 2003.
- HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical adaptation: mechanisms and process in physiological evolution**. 1ª ed. New York: Oxford University Press. 2002.
- HUDSON, N. J. & FRANKLIN, C. E. Maintaining muscle mass during extended disuse: aestivating frogs as a model species. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 2297-2303, 2002.
- HULBERT, A. J. & ELSE, P. L. Membranes and the setting of energy demand. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 1593-1599, 2005.
- HULBERT, A. J.; ELSE, P. L. Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Annu Rev Physiol.*, 62: 207-235, 2000.
- HULBERT, A. J.; FAULKS, S.; BUTTEMER, W. A.; ELSE, P. L. Acyl composition of muscle membranes varies with body size in birds. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 3561-3569, 2002a.
- HULBERT, A. J.; RANA, T.; COUTURE, P. The acyl composition of mammalian phospholipids: an allometric analysis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 132, p. 515-527, 2002b.
- ICARDO, J. M.; AMELIO, D.; GAROFALO, F.; COLVEE, E.; CERRA, M. C.; WONG, W. P.; TOTA, B.; IP, Y. K. The structural characteristics of the heart

- ventricle of the African lungfish *Protopterus dolloi*: freshwater and aestivation. **Journal of Anatomy**, v. 213, p. 106-119, 2008.
- INFANTE, J. P.; KIRWAN, R. C.; BRENNAN, J. T. High levels of docosahexaenoic acid (22:6n-3)-containing phospholipids in high-frequency contraction muscles of hummingbirds and rattlesnakes, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 130, p. 291-298, 2001.
- KHAL, J. & TISDALE, M. J. Downregulation of muscle protein degradation in sepsis by eicosapentaenoic acid (EPA). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 375, p. 238-240 2008.
- KLEIN, W.; PERRY, S. F.; ABE, A. S.; ANDRADE, D. V. Metabolic Response to Feeding in *Tupinambis merianae*: Circadian Rhythm and a Possible Respiratory Constraint. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 79, n. 3, p. 593–601, 2006.
- KNIGHT, J. E.; NARUS, E. N.; MARTIN, S. L.; JACOBSON, A.; BARNES, B. M.; BOYER, B. B. mRNA stability and polysome loss in hibernating arctic ground squirrels (*Spermophilus parryii*). **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 17, p. 6374-6379, 2000.
- KOODLE, I. F.; van der STOK, J.; SMOLENSKI, R. T.; JONG, J. W. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 146, p. 26-39, 2007.
- KRAFFE, E.; MARTY, Y.; GUDERLEY, H. Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 149-165, 2007.
- KUDEJ, R. K. & VATNER, S. F. Nitric oxide-dependent vasodilation maintains blood flow in true hibernating myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 35, p. 931-935, 2003.
- LANG, F.; BUSCH, G.L.; RITTER, M.; VÖLKL, H.; WALDEGGER, S.; GULBINS, E.; HÄUSSINGER, A. D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 247–306, 1998.
- LEE, A. G. How lipids and proteins interact in a membrane: a molecular approach. **Molecular Biosystems**, v. 1, p. 203-212, 2005.
- LEFKOWITH, J. B.; FLIPPO, V.; SPRECHER, H.; NEEDLEMAN, P. Paradoxical conservation of cardiac and renal arachidonate content in essential fatty acid deficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 29, p. 15736-15744, 1985.
- LEWIN, T. M. & COLEMAN, R. A. Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1634, p. 63-75, 2003.
- LI, G-R.; ZHANG, M.; SATIN, L. S.; BAUMGARTEN, C. M. Biphasic effects of cell volume on excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. **American Journal of Physiology**, v. 282, p. 1270–1277, 2002.
- LILLYWHITE, H. B.; ZIPPEL, K. C.; FARREL, A. P. Resting and maximal heart rates in ectothermic vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 124, p. 369-382, 1999.
- LOWRY, O.H.; RESENBROUGHT, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-257, 1951.
- LUTTUN, A. & CARMELIET, P. De novo vasculogenesis in the heart. **Cardiovascular Research**, v. 58, p. 378-389, 2003.

- MACDONALD, J. A.; STOREY, K. B. Regulation of ground squirrel Na⁺,K⁺-ATPase activity by reversible phosphorylation during hibernation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 254, p. 424-429, 1999.
- MAILLET, D. & WEBER, J-M. Relationship between n-3 PUFA content and energy metabolism in the flight muscles of a migrating shorebird: evidence for natural doping. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 413-420, 2007.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. 1ed. Rio de Janeiro: EdUERJ, 1995, 131p.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 4, p. 469-486, 2003.
- MCCUE, M. D. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 156, p. 1-18, 2010.
- MCLENNAN, P. L. & ABEYWARDENA, M. Y. Membrane basis for fish oil effects on the heart: linking natural hibernators to prevention of human sudden cardiac death. **Journal of Membrane Biology**, v. 206, p. 85-102, 2005.
- MCMILLAN, D. N. & HOULIHAN, D. N. The effect of refeeding on tissue protein synthesis in rainbow trout. **Physiological Zoology**, v. 61, n. 5, p. 429-441, 1988.
- MCPHEE, J. M.; ROSEN, D. A. S.; ANDREWS, R. D.; TRITES, E. W. Predicting metabolic rate from heart rate in juvenile Steller sea lions *Eumetopias jubatus*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 1941-1951, 2003.
- MILLIGAN, C. L.; GIRARD, S. S. Lactate metabolism in rainbow trout. **The Journal of Experimental Biology**, v. 180, p. 175-193, 1993.
- MIRHOSEINI, M.; CAYTON, M.; SHELGIKAR, S. An insight into laser revascularization of the heart. **The Journal of Tehran University Heart Center Fall**, v. 1, n. 3, p. 121-124, 2006.
- MUCUE, M. D.; AMITAI, O.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; MCWILLIAMS, S. R.; PINSHOW, B. Effects of dietary fatty acid composition on fatty acid profiles of polar and neutral lipid tissue fractions in zebra finches, *Taeniopygia guttata*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 154, p. 165-172, 2009.
- MUÑOZ, M. E. & PONCE, E. Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 135, p. 197-218, 2003.
- NASCIMENTO, L. F. R. **Reorganização estrutural e metabólica do intestino associada ao jejum e dormência sazonal em lagartos teiú *Tupinambis merianae***. 2009, 80p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Geral), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- NAYA, D. E.; VELOSO, C.; SABAT, P.; BOZINOVIC, F. Seasonal Flexibility of Organ Mass and Intestinal Function for the Andean Lizard *Liolaemus nigroviridis*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 311A, p. 270-277, 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3^a ed. New York: Worth Publishers, 2008. 1158 p.
- NIKOLAIDIS, M. G.; PETRIDOU, A.; MOUGIOS, V. Comparison of the phospholipid and triacylglycerol fatty acid profile of rats serum, skeletal muscle and heart. **Physiological Research**, v. 55, p. 259-265, 2006.
- O'BRIEN, K. M.; XUE, H.; SIDELL, B. D. Quantification of distance within the spongy myocardium of hearts from antarctic fishes. **Respiratory Physiology**, v. 122, p. 71-80, 2000.
- OLU, R. Blood supply of the compact and spongy myocardium of fish, amphibian and reptiles (Resumo). **Arkh Anat Gistol Embriol**. V. 75, n. 7, p. 91-5, 1978.

- OSTADAL, B.; OSTADALOVA, I.; DHALLA, N. S. Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: comparative and ontogenetic aspects. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 3, 1999.
- PAGE, M. M.; PETERS, C. W.; STAPLES, J. F.; STUART, J. A. Intracellular antioxidant enzymes are not globally upregulated during hibernation in the major oxidative tissues of the 13-lined ground squirrel *Spermophilus tridecemlineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 152, p. 115–122, 2009.
- PARRA, J.; PETTE, D. Effects of low-frequency stimulation on soluble and structurebound activities of hexokinase and phosphofructokinase in rat fast-twitch muscle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1251, p. 154–160, 1995.
- PENNISI, E. The dynamic gut. **Science**, v. 307, p. 1896–1899, 2005.
- PEPE, S. & MCLENNAN, P. L. Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and postischemic recovery of contractile function. **Circulation**, v. 105, p. 2303–2308, 2002.
- PERHONEN, M. A.; FRANCO, F.; LANE, L. D.; BUCKEY, J. C.; BLOMQUIST, C. G.; ZERWEKH, J.; PESHOCK, R. M.; WEATHERALL, P. T.; LEVINE, B. D. Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 645–653, 2001.
- PERONA, J. S. & RUIZ-GUTIERREZ, V. Triacylglycerol molecular species are depleted to different extents in the myocardium of spontaneously hypertensive rats fed two oleic acid-rich oils. **American Journal of Hypertension**, v. 18, n. 1, p. 72–80, 2005.
- PIERSMA, T. & DRENT, J. Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 5, p. 228–233, 2003.
- POUPA, O. & LINDSTRÖM, L. Comparative and scaling aspects of heart and body weights with reference to blood supply of cardiac fibers. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76A, n. 3, p. 413–421, 1983.
- PRENDERGAST, B. J.; FREEMAN, D. A.; ZUCKER, I.; NELSON, R. J. Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of immune responses in ground squirrels. **American Journal of Physiology**, v. 282, p. 1054–1062, 2002.
- RACLOT, T. Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. **Progress in lipid Research**, v. 42, p. 257–288, 2003.
- RIMBAUD, S.; SANCHEZ, H.; GARNIER, A.; FORTIN, D.; BIGARD, X.; VEKSLER, V.; VENTURA-CLAPIER, R. Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 46, p. 952–959, 2009.
- ROBINSON, N. C. Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 25, p. 153–163, 1993.
- ROLFE, D. F. S.; BROWN, G. C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 731–758, 1997.
- RUF, T.; ARNOLD, W. Effects of polyunsaturated fatty acids on hibernation and torpor: a review and hypothesis. **American Journal of Physiology**, v. 294, p. 1044–1052, 2008.
- SATOH, H.; DELBRIDGE, L. M. D.; BLATTER, L. A.; BERS, D. M. Surface:Volume Relationship in Cardiac Myocytes Studied with Confocal Microscopy and Membrane Capacitance Measurements: Species-Dependence and Developmental Effects. **Biophysical Journal**, v. 70, p. 1494–1504, 1996.

- SAZABÓ, A.; FÉBEL, H.; MÉZES, M.; HORN, P.; BALOGH, K.; ROMVÁRI, R. Differential utilization of hepatic and myocardial fatty acids during forced molt of laying hens. **Poultry Science**, v. 84, p. 106-112, 2005.
- SCHIMIDT-NIELSEN, K. **Scaling: Why is animal size so important?** New York: Cambridge University Press, 1984. 241p.
- SCHMITZ, G. & ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 147-155, 2008.
- SECOR, S. M. & PHILLIPS, J. A. Specific dynamic action of a large carnivorous lizard, *Varanus albigularis*. **Comparative Biochemistry Physiology A**, v. 117, p. 515-522, 1997.
- SECOR, S. M. Physiological responses to feeding, fasting and estivation for anurans. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 2595-2608, 2005.
- SHARMA, S.; ADROGUE, J. V.; GOLFMAN, L.; URAY, I.; LEMM, J.; YOUKER, K.; NOON, G. P.; FRAZIER, O. H.; TAEGTMEYER, H. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. **The FASEB Journal**, v. 18, p. 1692-1700, 2004.
- SHEN, J-M.; LI, R-D.; GAO, F-Y. Effects of ambient temperature on lipid and fatty acid composition in the oviparous lizards, *Phrynocephalus przewalskii*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 142, p. 293-301, 2005.
- SHERIDAN, M. A. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.107, n. 4, p. 495-508, 1994.
- SHIELS, H, A. & WHITE, E. The Frank-Starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. **The Journal of Experimental Biology**, v. 211, p. 2005-20013, 2008.
- SIMANDLE, E. T.; ESPINOZA, R. E.; NUSSEAR, K. E.; TRACY, C. R. Lizards, lipids and dietary links to animal function. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.74, n. 5, p. 625-640, 2001.
- SKEPPER, J. N. & NAVARATNAM, V. Ultrastructural features of left ventricular myocytes in active and torpid hamsters compared with rats: a morphometric study. **Journal of Anatomy**, v. 186, p. 585-592, 1995.
- SMITH, H. J.; LORITE, M. J.; TISDALE, M. J. Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis/degradation in murine C2C12 myoblasts: modulation by eicosapentaenoic acid. **Cancer research**, v. 59, p. 5507-5513, 1999.
- SOUZA, S. C. R.; CARVALHO, J. E.; ABE, A. S.; BICUDO, A. E. P. W.; BIANCONCINI, M. S. C. Seasonal metabolic depression, substrate utilization and changes in scaling patterns during the first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis merianae*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 307-318, 2004.
- SPRECHER, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1486, p. 219-231, 2000.
- STANLEY, W. C.; RECCHIA, F. A.; LOPASCHUK, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. **Physiological Reviews**, v. 85, p.1093-1129, 2005.
- STARCK, J. M. 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). 1ª ed, Science Publishers: Enfield, New Hampshire. 2005. cap. 07, p. 175-200.
- STEFFEN, J. M.; KOEBEL, D. A.; MUSACCHIA, X. J.; MILSON, W. K. Morphometric and metabolic indices of disuse in muscles of hibernating ground squirrels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 99, n. 4, p. 815-819, 1991.

- STOREY, K. B. Regulation of Liver Metabolism by Enzyme Phosphorylation during Mammalian Hibernation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 4, p. 1670-1673, 1987.
- STOREY, K. B. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. 1ª ed. New Jersey: Willey-Liss, Hoboken, 594p., 2004.
- STOREY, K. B. Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A**, v. 133, p. 733-754, 2002.
- STOREY, K. B. Metabolic regulation in mammalian hibernation: enzyme and protein adaptations. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118A, v. 4, p. 1115-1124, 1997.
- STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. **Biological Reviews**, v. 79, p. 2207-2333, 2004.
- STOREY, K. S.; STOREY, J. M. Tribute to P. L. Lutz: putting life on 'pause' – molecular regulation of hypometabolism. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p.1700-1714, 2007.
- ST-PIERRE, J. & BOUTILIER, R. G. Aerobic capacity of frog skeletal muscle during hibernation. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 74, n. 3, p. 390-397, 2001.
- STUART, J. A.; BALLANTYNE, J. S. Importance of ketone bodies to the intermediary metabolism of the terrestrial snail *Archachatina ventricosa*: evidence from enzyme activities. **Comparative Biochemistry and Physiology Parte B**, v. 117, p. 197-201, 1997.
- STUART, J. A.; GILLIS, T. E.; BALLANTYNE, J. S. Compositional correlates of metabolic depression in the mitochondrial membranes of estivating snails. *Am J Physiol.*, 275:R1977-R1982, 1998.
- STUART, J. A.; OOI, E-L.; BALLANTYNE, J. S. Maximal activities of enzymes of intermediary metabolism in the estivating terrestrial snail *Cepacea nemoralis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v.120, p. 417-423, 1998.
- SUAREZ, R. K.; LIGHTON, J. R. B.; JOOS, B.; ROBERTS S. P.; HARRISON, J. F. Energy metabolism, enzymatic flux capacities, and metabolic flux rates in flying honeybees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 12616-12620, 1996.
- SUAREZ, R. K.; MALLET, M. D.; DAXBOECK, C.; HOCHACHKA, P. W. Enzymes of energy metabolism and gluconeogenesis in the pacific blue marlin, *Makaira nigricans*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 64, n. 3, p. 694-697, 1986.
- SUN, X.; HOAGEL, T.; BAI, P.; DING, Y.; CHEN, Z.; ZHANG, R.; HUANG, W.; JAHANGIR, A.; PAW, B.; LI, Y-G.; XU, X. Cardiac hypertrophy involves both myocyte hypertrophy and hyperplasia in anemic zebrafish. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. 1-12, 2009.
- SWAIN, S. D. Flight muscle catabolism during overnight fasting in a passerine bird, *Eremophila alpestris*. **Journal of Comparative Physiology**, v. 162, p. 385-392, 1992.
- SWANSON, J. E.; LOKESH, B. R.; KINSELLA, J. E. Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase of mouse cardiac sarcoplasmic reticulum is affected by membrane n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid content. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 364-372, 1989.
- TAEGTMEYER, H.; GOLFMAN, L.; SHARMA, S.; RAZEGHI, P.; ARSDALL, M. V. Linking Gene Expression to Function: Metabolic Flexibility in the Normal and Diseased Heart. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1015, p. 202-213, 2004.

- TAEGLMEYER, H.; WILSON, C. R.; RAZEGHI, P.; SHARMA, S. Metabolic energetics and genetics in the heart. The New York Academy of Sciences, v. 1047, p. 208-218, 2005.
- TOTA, B. Vascular and metabolic zonation in the ventricular myocardium of mammals and fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 76A, n. 3, p. 423-437, 1983.
- TRACY, C. R.; DIAMOND, J. Regulation of gut function varies with life-history traits in chuckwalla (*Sauromalus obesus*: Iguanidae). **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 78, p. 469-481, 2005.
- TURNER, N.; ELSE, P. L.; HULBERT, A. J. Docosahexaenoic acid (DHA) content of membrane determines molecular activity of the sodium pump: implications for disease states and metabolism. **Naturwissenschaften**, v.90, p. 521-523, 2003.
- VORNANEN, M. Seasonal variation of crucian carp (*Carassius carassius* L.) heart: glycogen stores and lactate dehydrogenase activity. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, p. 433-442, 1994.
- VORNANEN, M.; SHIELSB, H. A. FARRELL, A. P. Plasticity of excitation-contraction coupling in fish cardiac myocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 132, p. 827-846, 2002.
- WALLIN, E. & HEIJNE, G. V. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. **Protein Science**, v. 7, p. 1029-1038, 1998.
- WANG, T.; ANDERSEN, J. B.; HICKS, J. W. Effects of Digestion on the Respiratory and Cardiovascular Physiology of Amphibians and Reptiles. In: **Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates**. STARCK, J. M.; WANG, T. (eds). 1ª ed, Science Publishers: Enfield, New Hampshire. 2005. cap. 11, p. 279-303.
- WHITEHOUSE, A. S. & TISDALE, M. J. Downregulation of ubiquitin-dependent proteolysis by eicosapentanoic acid in acute starvation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 598-602, 2001.
- WICKLER, S. J.; HOYT, D. F.; BREUKELLEN, F. V. Disuse atrophy in the hibernating golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. **American Journal of Physiology**, v. 261, p. 1214-1217, 1991.
- WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. **Environmental Physiology of Animals**. 1ª ed. Oxford: Blackwell Science, 2005.
- YAFFE, S. R. & GOLD, A. J. Effect of prolonged starvation on substrate uptake in the isolated perfused rat heart. **Journal of Nutrition**, v. 109, p. 2140-2145, 1979.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4º ed. New Jersey: Prentice-Hall. 1999. 663p.