

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta dissertação será
disponibilizado somente
a partir de 28/02/2020.

unesp 

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Efeitos da variação metabólica sazonal sobre a hematologia e sistema bioquímico antioxidante de *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae)

Gabriela de Sousa Martins

MESTRADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL



Biologia
Estrutural



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Gabriela de Sousa Martins

Efeitos da variação metabólica sazonal sobre a hematologia e sistema
bioquímico antioxidante de *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae)

São José do Rio Preto – SP
2018

Gabriela de Sousa Martins

Efeitos da variação metabólica sazonal sobre a hematologia e sistema bioquímico antioxidante de *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq - Processo 132013/2016-9

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini-Domingos

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

São José do Rio Preto – SP
2018

Martins, Gabriela de Sousa.

Efeitos da variação metabólica sazonal sobre a hematologia e sistema bioquímico antioxidante de *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae) /

Gabriela de Sousa Martins. -- São José do Rio Preto, 2018

82 f. : il.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Coorientador: Luiz Henrique Florindo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Ecologia animal. 2. Lagartos. 3. Células sanguíneas. 4. Stress oxidativo. 5. Hibernação. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 598.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Gabriela de Sousa Martins

Efeitos da variação metabólica sazonal sobre a hematologia e sistema bioquímico antioxidante de *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq - Processo 132013/2016-9

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP
Departamento de Biologia
Orientadora

Profa. Dra. Larissa Paola Rodrigues Venancio
Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB
Centro das Ciências Biológicas e da Saúde

Profa. Dra. Kênia Cardoso Bicego
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

São José do Rio Preto – SP
28 de Fevereiro de 2018

Este trabalho foi desenvolvido junto ao Centro de Estudos de Quelônios (CEQ) / Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), Departamento de Biologia, junto ao Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados, Departamento de Zoologia e Botânica, e junto ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática, Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, com auxílio financeiro do CNPq (processo 132013/2016-9).

Aos meus pais
Flávio e Madalena,
minha irmã
Flávia,
e meus afilhados
Henrique e Keitor

“É sobre ser abrigo e também ter
morada em outros corações”

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus que me deu firmeza e resiliência nos momentos difíceis e também trouxe conforto quando os obstáculos foram superados.

Aos meus pais, **Flávio e Madalena**, e minha irmã **Flávia**, por serem a minha inspiração diária, pelo apoio e dedicação durante toda a minha formação profissional, e pelo imenso amor e carinho que foram presentes todos os dias apesar da distância.

Aos meus afilhados, **Henrique e Heitor**, por representarem a forma de amor mais pura e doce que conheço, não existe nada comparável à alegria e leveza de estar ao lado de vocês.

Ao meu noivo, **Vitor**, pelos quatro anos de relacionamento e convivência diária e pelos muitos anos que ainda virão. Obrigada por ser meu porto seguro, por compartilhar tantos momentos felizes, planos e sonhos, e por aceitar a paternidade do **Ollie**, nosso bebê canino.

Aos meus tios, **Maria Helena e Arlindo**, e meu primo **Gabriel**, por serem a minha família em São José do Rio Preto, pelos almoços de domingo e pelos inúmeros momentos maravilhosos que compartilhamos.

Às minhas amigas de Altinópolis, **Débora, Thais, Taciani, Mariana e Gabriela**, pela amizade sólida e pelos inúmeros momentos que sempre estarão guardados em meu coração.

Às minhas eternas companheiras de CEQ, **Nathalia e Camila**, por me presentarem com muito mais que um mero coleguismo profissional, sendo responsáveis por um crescimento pessoal e profissional indescritível na minha vida. Obrigada pela amizade, paciência, e por serem sempre tão atenciosas e empenhadas em me ajudar durante o mestrado.

Às capivaras, **Mugs, Nayara, Camila, Letícia Sybuia e Letícia Orlandini**, por me proporcionarem as melhores risadas e conversas na salinha do laboratório, e pelo lindo laço de amizade que construímos e certamente permanecerá por muitos anos.

Aos amigos do LHGDH e CEQ, em especial, **Mariana, Patrícia, Larissa, e Gabriel**, pela ajuda, paciência e momentos de descontração.

Aos amigos do LZCV, **Isadora, Barnes, Ariela, Mariana, Vinícius, Victor**, por todo o suporte e ajuda com o cuidado e alimentação dos animais, pelas trocas de conhecimento e experiência, e por me acolherem tão bem durante estes dois anos.

Ao Laboratório de Química Bio-Orgânica Ambiental (LQBOA) e ao responsável, **Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima**, por disponibilizar os equipamentos necessários para as análises bioquímicas.

Ao amigo e excelente professor, **Dr. Danilo Grünig**, por disponibilizar seu tempo e paciência para transmitir conhecimento nos mais variados aspectos da ciência. Muito obrigada por todo o suporte na execução das metodologias, discussão de resultados e análises estatísticas, sem a sua contribuição este trabalho não seria possível.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo**, por acreditar no meu trabalho e me acolher tão bem no seu laboratório. Obrigada pelos conselhos e sugestões que com certeza engrandeceram a minha formação profissional.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos**, por abrir as portas do laboratório, depositar sua confiança, compartilhar conhecimentos e experiências, e, principalmente, por ter contribuído profissional e pessoalmente durante estes cinco anos de convívio diário.

E aos profissionais e pessoas nas quais me espelho, que impulsionaram o desejo de ser bióloga. Em especial: **Denise, Florindo, Ceron, Noll, Lilian Casatti, Kiko, Claudia Bonini, Eduardo, e Claudia Carareto**. Obrigada por todos os ensinamentos.

Ao CNPq e FAPERP pelo suporte financeiro.

Obrigada, UNESP/IBILCE, por ser lar e porto seguro.

*"Se vi mais longe foi por estar
de pé sobre ombros de gigantes"*

Isaac Newton

*“Inteligência é a capacidade de
se adaptar à mudança”*

Stephen Hawking

RESUMO

Lagartos da espécie *Salvator merianae* possuem comportamento de hibernação sazonal, resultado de um ritmo fisiológico endógeno da espécie e caracterizado por redução drástica da taxa metabólica. Assim, há uma diminuição da atividade geral destes animais, os quais cessam sua movimentação e alimentação, além de reduzirem significativamente a frequência cardíaca e respiratória. Dessa forma, a oscilação entre a estação ativa e hibernação em *S. merianae* tem como consequência uma exposição constante a situações de depleção e retomada do consumo de oxigênio, bem como de flutuações na formação de espécies oxidantes (EO), o que faz com que seja imprescindível a atuação de um sistema antioxidante eficaz que possa prevenir os danos oxidativos ao organismo destes animais. Além disso, estes ajustes podem comprometer as células sanguíneas, uma vez que, em répteis, os valores hematológicos estão sujeitos a inúmeras alterações dependentes das condições fisiológicas e comportamentais às quais estão submetidos. Com isso, este estudo buscou avaliar as possíveis modificações na condição corporal geral, no metabolismo redox e perfil hematológico, decorrentes das mudanças fisiológicas e metabólicas únicas ocorridas no ciclo anual de *S. merianae*. Para isso foram utilizados seis espécimes de teiús, disponibilizados pelo Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados da UNESP de São José do Rio Preto – SP. Os animais foram previamente pesados, a temperatura corpórea foi aferida e coletou-se amostras de sangue da veia caudal em três períodos: pré-hibernação (fevereiro), hibernação (julho) e despertar (agosto). O metabolismo redox consistiu na análise das enzimas antioxidantes, CAT, GPx, GR, G6PDH e GST, e biomoléculas oxidadas, enquanto o perfil hematológico foi avaliado por meio de hemograma. Observou-se que durante o ciclo fisiológico de *S. merianae* os animais perdem relativamente pouca massa corpórea nos meses de hibernação, a qual é recuperada rapidamente no despertar. Além disso, a temperatura corporal oscila conforme o padrão comportamental dos animais nas diferentes estações do ano. Com relação ao metabolismo redox, o aumento na atividade de algumas enzimas antioxidantes durante a hibernação e despertar, somado aos altos níveis de biomoléculas oxidadas, sugere que houve estresse oxidativo na condição hipometabólica, mas demonstra que estes animais são capazes de suportar oscilações no equilíbrio redox. Por fim, a hibernação em *S. merianae* demanda ajustes na série vermelha de modo a tornar o transporte de gases eficiente, e o hipometabolismo característico do período parece suprimir o sistema imune, como evidenciado na série branca do tecido sanguíneo.

PALAVRAS-CHAVE: Teiús, Hibernação, Estresse Oxidativo, Células sanguíneas.

ABSTRACT

Tegu lizards, *Salvator merianae*, experience hibernation behavior as a result of an endogenous physiological rhythm, which is characterized by a drastic reduction in the metabolic rate. This condition leads to alterations on the behavior of these animals, with the decrease of their usual activities such as movements and feeding, in addition to significant reduction of heart and respiratory rates. Therefore, the oscillation between active and hypometabolic seasons in *S. merianae* results in constant exposure to depletion and resumption of oxygen, as well as fluctuations in the formation of oxidant species (OS), what makes essential the existence of an effective antioxidant system that should prevent oxidative damage in these animals. Moreover, these adjustments can affect the blood cells, because hematological values are susceptible to several changes in reptiles, depending on the physiological and behavioral conditions to which they are submitted. This work aimed to evaluate possible modifications in the general body condition, redox metabolism and hematological profile, resulted from the single physiological and metabolic changes in the annual cycle of *S. merianae*. The experiments were conducted with six specimens of tegus, available from the Comparative Vertebrate Zoophysiology Lab, from UNESP, São José do Rio Preto – SP. The animals were weighed, body temperature was measured and blood samples were collected from the caudal vein in three periods: active season (February), hibernation (July) and arousal (August). The redox metabolism evaluation consisted in the quantification of the antioxidant enzymes, CAT, GPx, GR, G6PDH and GST, and biomolecule oxidation levels, while the hematological profile was analyzed by hemogram. Thus, it was observed that, during the physiological cycle of *S. merianae*, the animals had a small lost of body mass during the months of hibernation, which was quickly recovered during arousal. In addition, the body temperature oscillates according to the behavior pattern of the animals during the different seasons of the year. In relation to redox metabolism, the increase in activity of some antioxidant enzymes during hibernation and arousal, combined with the high biomolecule oxidation levels, suggests that there was oxidative stress in the hypometabolic condition, but the lizards were able to tolerate oscillations in redox balance during their annual physiological cycle. Finally, hibernation in *S. merianae* requires adjustments in the red blood cells for efficient gas exchange, and the hypometabolism of the period appears to suppress the immune system.

KEYWORDS: Tegus, Hibernation, Oxidative Stress, Blood Cells.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Espécime de *Salvator merianae* em um parque nacional da Argentina. Fonte: Blog “Ray Cannon’s Nature Notes” 23
- FIGURA 2.** Ciclo anual fisiológico, metabólico e comportamental de *Salvator merianae*. As cores quentes (laranja e vermelho) representam o aumento progressivo da atividade metabólica que se inicia durante o despertar do animal e tem continuidade no período reprodutivo, cujo término é seguido por períodos de queda progressiva no metabolismo do animal (cores frias: verde e azul claro) até a completa inatividade e afagia características do período de hibernação (azul escuro). Fonte: Elaborado pela autora..... 24
- FIGURA 3.** Alterações fisiológicas durante o ciclo anual de *Salvator merianae*. **(A)** Valores mensais das frequências cardíaca (fH) e respiratória (fR); temperaturas da toca e corporais dos teiús. **(B)** Consumo estimado de oxigênio no mesmo período. O asterisco (*) indica valores significativamente inferiores aos valores do mês de janeiro, enquanto o símbolo “+” indica valores significativamente elevados em relação aos valores de janeiro. As linhas pontilhadas verticais indicam o período de hibernação. Fonte: Modificado de Sanders e colaboradores, 2015..... 26
- FIGURA 4.** Balanço redox em condições naturais e em situações de estresse oxidativo. **(A)** Em condições naturais, os animais mantêm um equilíbrio entre geração de espécies oxidantes e sua neutralização por meio do sistema de defesa antioxidante. **(B)** Por outro lado, o desequilíbrio do metabolismo redox, seja por meio do excesso de espécies oxidantes ou por ineficácia das defesas antioxidantes, pode causar o estresse oxidativo. Fonte: Modificado de Tomaselli e Barth, 2010..... 27
- FIGURA 5.** Sistema de defesa antioxidante e metabolismo redox. As enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx atuam na neutralização direta das espécies oxidantes potencialmente danosas ao organismo. O ciclo catalítico da GSH é mantido pelas enzimas GPx e GR, que atuam na oxidação e redução da glutatona, respectivamente. A redução de GSSG a GSH, catalisada pela GR, só é possível mediante a presença de níveis satisfatórios de NADPH, cuja manutenção depende da atuação da enzima G6PDH. Por fim, a GST catalisa a adição nucleofílica da GSH em uma grande variedade de eletrófilos e xenobióticos. Fonte: Elaborado pela autora..... 28

FIGURA 6. Espécimes de *Salvator merianae* em diferentes momentos do ciclo fisiológico. (A) Animais alocados em recinto externo durante os períodos de pré e pós-hibernação (metabolismo padrão). (B) Durante os três meses consecutivos de hibernação os animais foram mantidos em caixas plásticas com orifícios na porção superior para constante oxigenação. Fonte: Elaborado pela autora..... 35

FIGURA 7. Períodos experimentais e coleta das amostras de sangue de *Salvator merianae*. (A) Fluxograma representando os períodos experimentais e meses em que foram realizadas as coletas de amostras de sangue. (B) Aproximadamente 2 mL de amostras de sangue periférico da veia caudal foram retirados dos animais. Fonte: Elaborado pela autora..... 36

FIGURA 8. Variação da massa corpórea e temperatura corporal de *Salvator merianae* ao longo de seu ciclo fisiológico anual. (A) Peso (kg); e (B) Temperatura (°C). Os pontos (média ± erro-padrão) representam os valores correspondentes aos períodos de pré-hibernação, hibernação e despertar. *Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido de *post hoc* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos..... 43

FIGURA 9. Variações dos níveis dos marcadores do metabolismo redox de *Salvator merianae* ao longo de seu ciclo fisiológico anual. Atividade das enzimas (A) CAT; (B) GPx; (C) GR; (D) G6PDH; (E) GST; e (F) Biomoléculas Oxidadas. Barras: médias ± erro-padrão. Todos os marcadores apresentaram dados paramétricos, com aplicação do teste ANOVA para medidas repetidas, seguido de *post hoc* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos..... 44

FIGURA 10. (A) Registros ventilatórios de *Salvator merianae* [= *Tupinambis merianae*] evidenciando a alteração no padrão ventilatório de episódico a 17°C, intercalado por longos períodos de apneia (ausência de registro) (reta superior), para igualmente espaçado a 25°C (reta inferior). Modificado de Andrade e Abe, 1999. (B) A diminuição de O₂ faz com que ocorra hipóxia celular, ocasionando a liberação das EO pelas mitocôndrias. Durante o período em anóxia, não há liberação de EO, devido à ausência de O₂. Durante a reoxigenação, há maior disponibilidade de O₂, ocasionando formação de EO em maior quantidade. A liberação das EO pode causar oxidação de biomoléculas, sendo necessária a ativação de defesas antioxidantes. Modificado de Hermes-Lima e colaboradores, 2015..... 47

FIGURA 11. Biossíntese de hormônios sexuais com atuação da GST e níveis de testosterona observados ao longo do ciclo anual de *Salvator merianae*. **(A)** Duas vias biossintéticas levando aos hormônios esteroides testosterona e progesterona, nota-se que a GST possui papel fundamental em ambas as vias. Modificado de Johansson e Mannervik, 2001. **(B)** Níveis plasmáticos de testosterona durante o ciclo reprodutivo/sazonal de espécimes machos de *Salvator merianae* [= *Tupinambis merianae*]. É importante destacar que o período corresponde ao despertar (Setembro) coincide com os maiores níveis de testosterona. Modificado de Chamut e colaboradores, 2012..... 50

FIGURA 12. Células sanguíneas de *Salvator merianae* coradas com Panótico®. **A e B** – Policromatófilos em diferentes estágios de maturação, **C** – Eritrócito Maduro, **D** – Linfócito, **E** – Monócito, **F e G** – Azurófilos, **H** – Monócito reativo, **I** – Basófilo, **J** – Heterófilo, **K** – Eosinófilo. Barra = 5 µm. Fonte: Elaborado pela autora..... 51

FIGURA 13. Alterações eritrocitárias encontradas durante o ciclo anual de *Salvator merianae*. **(A)** Eritrócito binucleado; **(B)** Policromatófilo; **(C)** Poiquilocitose e Anisocitose. Barra = 5 µm. Fonte: Elaborado pela autora..... 54

FIGURA 14. Cartão de referência para leitura do hematócrito. Fonte: Quimis®..... 74

FIGURA 15. Cartão de referência para leitura do hematócrito. Área de contagem na Câmara de Neubauer. Os quadrantes representados pela letra “L” são destinados à contagem de leucócitos, enquanto os cinco quadrantes centrais designados com a letra “H” são utilizados para contagem dos eritrócitos. Fonte: Modificado de CriaCAC, 2011..... 76

FIGURA 16. Fórmulas matemáticas para o cálculo dos índices hematimétricos. Fonte: Elaborado pela autora..... 77

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1. Comparação das variáveis da série vermelha de *Salvator merianae* entre os períodos experimentais avaliados. EP: erro-padrão. *Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido de *post hoc* de *Tukey*. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos..... 54

TABELA 2. Comparação das variáveis da série branca de *Salvator merianae* entre os períodos experimentais avaliados. EP: erro-padrão. ¹Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido de *post hoc* de *Tukey*. ²Teste de *Friedman*, complementado por *Dunnnett*. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina Trifosfato
BO	Biomoléculas Oxidadas
CAT	Catalase
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHGM	Concentração de Hemoglobina Globular Média
CO₂	Dióxido de carbono
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EO	Espécies Oxidantes
EP	Erro-padrão
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FADH₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo
<i>fH</i>	Frequência cardíaca
fL	Fentolitro
<i>fR</i>	Frequência respiratória
<i>g</i>	Giro
g	Gramma
G6P	Glicose 6-fosfato
G6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida

GSSG	Glutationa dissulfeto
GST	Glutationa S-transferase
HCl	Ácido Clorídrico
HGM	Hemoglobina Globular Média
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
HPLC-FD	Cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a detector de fluorescência
kg	Quilograma
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
K₂HPO₄	Fosfato de potássio dibásico
L	Litro
M	Mol
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm³	Milímetro cúbico
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma

nm	Nanômetro
O₂	Oxigênio molecular
O₂^{·-}	Radical superóxido
·OH	Hidroxila
<i>p</i>	Nível de significância
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PO₄⁻	Fosfato
POS	Preparação para o estresse oxidativo - " <i>Preparation for oxidative stress</i> "
ROO[·]	Peroxila
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido 2- tiobarbitúrico
tBOOH	Tert-Butil Hidroperóxido
TMP	Tetrametoxipropano
Tris-HCl	Tampão Tris-Ácido Clorídrico
VGM	Volume Globular Médio
β	Beta
°C	Graus Celsius
Δ	Delta
®	Marca Registrada
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
%	Porcentagem
*	Asterisco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GERAL.....	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE.....	35
3.2. METABOLISMO REDOX.....	36
3.3. PERFIL HEMATOLÓGICO	39
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. PESO E TEMPERATURA.....	42
4.2. METABOLISMO REDOX	43
4.3. PERFIL HEMATOLÓGICO	51
5. CONCLUSÃO.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
APÊNDICE A – PROTOCOLOS PARA ENSAIOS BIOQUÍMICOS	68
APÊNDICE B – PROTOCOLOS PARA ANÁLISE HEMATOLÓGICA.....	74
ANEXO	81

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O hipometabolismo pode ser definido como a redução na atividade metabólica por vezes associado a um período de inatividade ou dormência, sendo uma importante estratégia adaptativa para organismos sujeitos a condições de estresse como baixa oxigenação, desidratação, congelamento, jejum, estivação, entre outras (ALMEIDA; MASCIO, 2011; DUTTON; TAYLOR, 2003; HERMES-LIMA et al., 2015). Assim, em resposta a condições adversas, a supressão metabólica minimiza os gastos energéticos, permitindo a sobrevivência de algumas espécies por longos períodos de tempo (ALMEIDA; MASCIO, 2011; JACKSON, 2004; WELKER, 2009). Além do hipometabolismo, existem outras alterações fisiológicas que permitem a sobrevivência nessas situações severas, como redirecionamento sanguíneo para os órgãos vitais e emprego de vias anaeróbias como fonte de energia (WELKER, 2009).

Dentre as condições inóspitas que alguns organismos suportam, podemos citar a hipóxia e a anóxia, cujas definições relacionam-se à diminuição progressiva da saturação de oxigênio (O₂) disponível no meio. Um ambiente considerado “normóxico”, ou seja, com níveis adequados de oxigenação, possui saturação de O₂ próxima a 80%, enquanto a hipóxia ambiental ocorre quando os níveis de oxigênio atingem aproximadamente 30%, e a anóxia quando não há O₂ disponível no meio (COSTA, 2016; WELKER, 2009). Assim, muitas espécies animais são constantemente expostas à baixa oxigenação, como por exemplo, peixes pulmonados que realizam longos mergulhos; exposição aérea de animais aquáticos durante o ciclo das marés; quelônios dulcícolas que habitam lagos que congelam nas estações frias; entre outros (ALMEIDA; MASCIO, 2011; HERMES-LIMA et al., 2015; MOREIRA et al., 2016). Entre as inúmeras adaptações que esses animais possuem para suportar a privação de oxigênio, a supressão metabólica e entrada em um estado de letargia e inatividade representa menor gasto energético e manutenção das funções vitais (ALMEIDA; MASCIO, 2011; DZAL et al., 2015).

A desidratação e o congelamento possuem efeitos fisiológicos e bioquímicos semelhantes, com consequências como redução de volume sanguíneo e aumento na viscosidade do sangue, o que induz à perda na capacidade cardiovascular aeróbia e declínio no consumo de O₂, podendo levar à hipóxia tecidual (HERMES-LIMA et al., 2015). Em resposta à desidratação severa, principalmente em estações de seca, alguns animais podem manifestar um estado de dormência denominado estivação, no qual há redução da taxa metabólica (FERREIRA-CRAVO; WELKER; HERMES-LIMA, 2010; MOYES; SCHULTE, 2010).

Dormência é um termo amplamente utilizado que inclui uma variedade de alterações bioquímicas e fisiológicas envolvendo estados de depressão metabólica e letargia (MOYES; SCHULTE, 2010; WITHERS; COOPER, 2010). Os estados dormentes podem estar

relacionados a ritmos circanuais ou responder a fatores ambientais, como disponibilidade de água e/ou alimento e temperatura. Podem variar de acordo com a duração (menos de 24 horas, dias consecutivos, toda uma estação ou por vários anos) e se manifestar de diferentes formas (diapausa, torpor, estivação e hibernação) (WITHERS; COOPER, 2010). Devido à amplitude de fatores que podem influenciar um estado dormente, as classificações existentes podem ser confusas e contraditórias, além da possibilidade de encontrarmos diferentes tipos de dormência sendo referidos para uma mesma espécie e fenômeno (MOYES; SCHULTE, 2010; WELKER, 2009; WITHERS; COOPER, 2010).

A diapausa pode ser definida como a interrupção do desenvolvimento de um estágio de vida, muitas vezes com a finalidade de evitar condições ambientais desfavoráveis, sendo comum em espécies de insetos (DENLINGER, 2002). Com relação ao torpor, as definições são um pouco mais confusas. Welker (2009) e Moyes e Schulte (2010) o definem como sendo uma condição hipometabólica de curta duração que geralmente ocorre em ciclos circadianos. Por outro lado, Withers e Cooper (2010) consideram que o torpor se manifesta como um estado hipometabólico geralmente relacionado a alterações ambientais diárias ou sazonais (hibernação no inverno e estivação no verão). Além disso, segundo estes últimos autores, o torpor em ectotérmicos se manifesta como um estado letárgico sazonal, ou seja, mais longo, podendo ocorrer mesmo em temperaturas ambientais e corporais constantes, o que não ocorreria em endotérmicos.

A estivação, mencionada anteriormente, pode ocorrer em situações de privação de água e alimento associada a fatores adversos, como condições áridas e temperaturas elevadas (WITHERS; COOPER, 2010). Assim, muitas espécies de animais, como peixes pulmonados, anfíbios, répteis, pequenos mamíferos e até mesmo espécies de invertebrados, podem vivenciar esse estado de inatividade (FERREIRA-CRAVO; WELKER; HERMES-LIMA, 2010). Para que seja possível sustentar longos períodos de estivação, os organismos possuem adaptações bioquímicas e fisiológicas, as quais estão intimamente relacionadas ao sistema respiratório (FERREIRA-CRAVO; WELKER; HERMES-LIMA, 2010; HERMES-LIMA et al., 2015). Em caramujos terrestres estivadores, por exemplo, a ventilação possui períodos de apneia, o que diminui consideravelmente a perda de água por evaporação, mas também pode causar oscilações no pH e hipoxemia (hipóxia do sangue) (FERREIRA-CRAVO; WELKER; HERMES-LIMA, 2010).

A hibernação, por outro lado, pode ser definida como um estado de letargia de longa duração, em que a temperatura corporal e o metabolismo reduzem, permitindo a conservação da energia em ambientes extremos (DUTTON; TAYLOR, 2003; MOYES; SCHULTE, 2010;

WITHERS; COOPER, 2010). Em muitos casos, acredita-se que a redução na temperatura corporal (geralmente em estações frias) ocasionaria essa supressão metabólica. No entanto, em algumas espécies hibernantes, a letargia e inatividade precedem reduções consideráveis na temperatura corporal, podendo então ser um mecanismo regulatório que antecede o estresse fisiológico (DUTTON; TAYLOR, 2003). Assim, a forma como essas estratégias comportamentais e fisiológicas são integradas e empregadas em ectotérmicos não é bem compreendida (SANDERS et al., 2015). Existem muitos estudos atuais sobre hibernação em mamíferos, como esquilos do ártico, morcegos, *hamsters*, entre outros (BOUMA; CAREY; KROESE, 2010; BOUMA et al., 2010; BOYER; BARNES, 1999; CAREY; FRANK; SEIFERT, 2000; ORR et al., 2009). No entanto, apesar de pouco explorado entre os pesquisadores, sabe-se que este estado dormente ocorre não só em endotérmicos, mas também nos ectotérmicos (ANDRADE et al., 2004a; DUTTON; TAYLOR, 2003; WITHERS; COOPER, 2010).

Lagartos da espécie *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae), popularmente conhecidos como “teiús branco e preto”, são répteis onívoros com ampla distribuição pela América do Sul, ocorrendo principalmente no Brasil, Uruguai, Bolívia, Paraguai e Argentina (Figura 1) (BIBRON; DUMÉRIL, 1854).

Figura 1. Espécime de *Salvator merianae* em um parque nacional da Argentina.



Fonte: Blog “Ray Cannon’s Nature Notes”.

Assim como outros animais ectotérmicos, *S. merianae* possuem mecanismos fisiológicos e estratégias termorregulatórias diretamente associadas a mudanças sazonais (ANDRADE et al., 2004b; MILSOM et al., 2008; SANDERS et al., 2015). No entanto, estes lagartos possuem um ciclo anual que envolve mudanças fisiológicas e metabólicas únicas,

ocorridas em cinco períodos principais no decorrer do ano: período reprodutivo (Setembro a Dezembro), período pós-reprodutivo (Dezembro a Fevereiro), início da hibernação (Fevereiro a Abril), período de hibernação (Abril a Julho) e despertar (Julho a Setembro) (Figura 2) (MILSOM et al., 2012).

Figura 2. Ciclo anual fisiológico, metabólico e comportamental de *Salvator merianae*.



As cores quentes (laranja e vermelho) representam o aumento progressivo da atividade metabólica que se inicia durante o despertar do animal e tem continuidade no período reprodutivo, cujo término é seguido por períodos de queda progressiva no metabolismo do animal (cores frias: verde e azul claro) até a completa inatividade e afagia características do período de hibernação (azul escuro). Fonte: Elaborado pela autora.

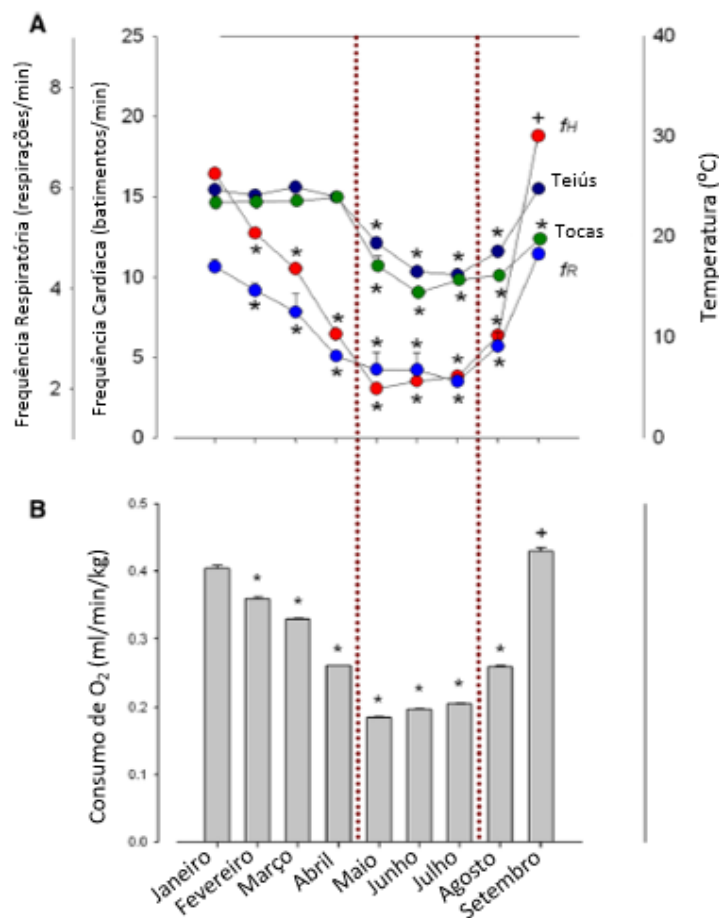
O período reprodutivo de *S. merianae* é caracterizado pelo investimento energético na corte, acasalamento, nidificação e postura de ovos, de forma que precisam se alimentar constantemente e recompor seus estoques energéticos para que a reprodução seja bem sucedida (ANDRADE et al., 2004a; MILSOM et al., 2012). Em seguida, o período pós-reprodutivo é marcado por uma diminuição na atividade geral do animal, porém continuam forrageando e estocando energia para os meses subsequentes (MILSOM et al., 2012). A partir do fim de fevereiro e início de março, os animais sofrem queda no metabolismo e mostram-se visivelmente menos ativos e desinteressados em forragear. Este período representa o início da hibernação, em que os teiús se comportam emergindo mais tardiamente de suas tocas durante a manhã e retornando mais cedo ao entardecer (MILSOM et al., 2012).

A hibernação de *S. merianae* é resultado de um ritmo fisiológico endógeno da espécie, sem relação aparente com variáveis ambientais, caracterizada por completa afagia e inatividade

(SOUZA et al., 2004). Apesar de ocorrer durante o inverno e as temperaturas corporais do lagartos serem em média de 17°C, um aumento ocasional na temperatura ambiental não acarreta alterações comportamentais, como aumento da atividade dos animais, indicando que a supressão metabólica não é um simples efeito do frio (ANDRADE; ABE, 1999). Os animais permanecem nesta condição cerca de quatro a cinco meses, em suas tocas, cujas entradas permanecem bloqueadas por detritos e terra, indicando seu compromisso comportamental com o período de hibernação (MILSOM et al., 2012). Ao fim do ciclo anual, os lagartos despertam e emergem de suas tocas, com elevadas frequências cardíacas e respiratórias, prontos para retomar seu metabolismo e atividade, pois a prioridade biológica é o investimento energético para o período reprodutivo subsequente (corte, acasalamento, nidificação e postura de ovos) (MILSOM et al., 2012; SANDERS et al., 2015).

Além das alterações comportamentais, a hibernação é caracterizada por inúmeros ajustes fisiológicos, incluindo: reduções da temperatura corporal, das frequências cardíaca e respiratória, e do consumo de oxigênio (Figura 3) (SANDERS et al., 2015). A redução do consumo de O₂ durante o período de hibernação em *S. merianae* tem relação direta com alterações fisiológicas no padrão respiratório, uma vez que, durante a estação ativa, a ventilação ocorre em respirações uniformemente espaçadas, enquanto que o período de hibernação é caracterizado por episódios respiratórios intercalados por longos períodos de apneia (ANDRADE; ABE, 1999). Consequentemente, pode haver maior dificuldade no transporte de gases respiratórios, assim como em situações de hipóxia, estivação e jejum (ANDRADE et al., 2004b; HERMES-LIMA et al., 2015).

A função primordial do sistema cardiorrespiratório é extrair oxigênio da atmosfera, para que este possa ser utilizado na respiração celular pelas mitocôndrias, a fim de realizar o fornecimento energético necessário para manutenção das funções biológicas (DZAL et al., 2015; MOYES; SCHULTE, 2010). A respiração celular acontece em três estágios principais: 1) oxidação de moléculas orgânicas (glicose, ácidos graxos e alguns aminoácidos); 2) a energia liberada é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos NADH e FADH₂; 3) os elétrons são transferidos ao O₂ (o aceptor final de elétrons) por meio da cadeia respiratória e, durante a transferência de elétrons, uma grande quantidade de energia é liberada e conservada na forma de ATP, por um processo chamado de fosforilação oxidativa. Assim, o O₂ sofre uma redução tetravalente, resultando na formação de água (H₂O) e liberação de gás carbônico (CO₂) (NELSON; COX, 2014).

Figura 3. Alterações fisiológicas durante o ciclo anual de *Salvator merianae*.

(A) Valores mensais das frequências cardíaca (fH) e respiratória (fR); temperaturas da toca e corporais dos teiús. (B) Consumo estimado de oxigênio no mesmo período. O asterisco (*) indica valores significativamente inferiores aos valores do mês de janeiro, enquanto o símbolo “+” indica valores significativamente elevados em relação aos valores de janeiro. As linhas pontilhadas verticais indicam o período de hibernação. Fonte: Modificado de Sanders e colaboradores, 2015.

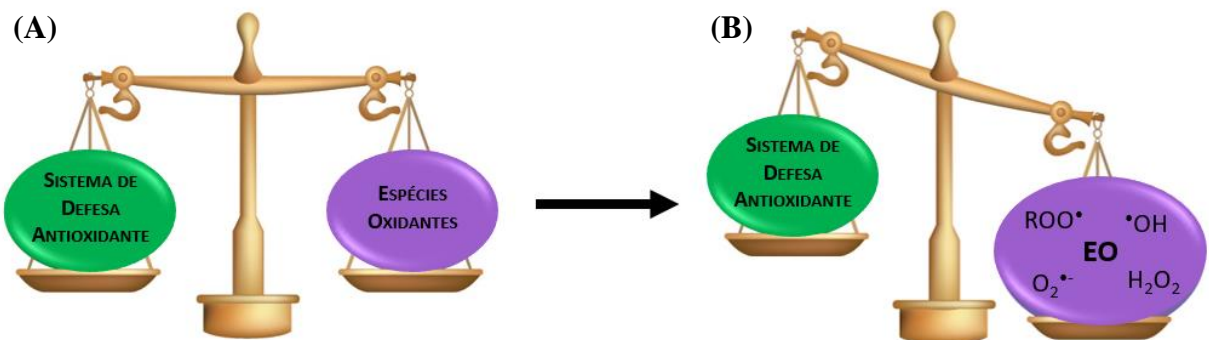
Em condições adequadas de oxigenação, cerca de 0,1-0,2% do oxigênio consumido é convertido nas chamadas espécies oxidantes (EO) (ou espécies reativas de oxigênio – ERO), devido à redução incompleta do O₂ na cadeia respiratória mitocondrial (ALMEIDA; MASCIO, 2011). As principais espécies oxidantes produzidas durante a respiração celular são: radical superóxido (O₂^{•-}); hidroxila (•OH); peroxila (ROO[•]); peróxido de hidrogênio (H₂O₂); entre outros (ALMEIDA; MASCIO, 2011; BARBOSA et al., 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As EO estão presentes na maioria dos sistemas biológicos e ocorrem naturalmente em células eucarióticas devido ao metabolismo energético dependente do uso de O₂ (BARBOSA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2007). Em condições naturais, os animais mantêm um equilíbrio entre geração e neutralização destas espécies químicas. Entretanto, quando a taxa de

produção de EO excede a capacidade de defesa antioxidante, ou quando as defesas antioxidantes são insuficientes ou ineficazes, o estresse oxidativo pode se estabelecer, levando à oxidação de componentes essenciais da célula, como proteínas, DNA e ácidos graxos (Figura 4) (MOREIRA et al., 2017; ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2007; TOMASELLI; BARTH, 2010).

Para neutralizar os possíveis efeitos deletérios das EO, os organismos aeróbicos possuem um sistema de defesa antioxidante, que atua inativando estas espécies químicas reativas antes que danifiquem as macromoléculas celulares (ALMEIDA; MASCIO, 2011; VASCONCELOS et al., 2007). Os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não-enzimáticos. A linha de defesa enzimática é composta principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), e glutathiona peroxidase (GPx) (ALMEIDA; MASCIO, 2011; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HUBER; ALMEIDA, 2008).

Figura 4. Balanço redox em condições naturais e em situações de estresse oxidativo.

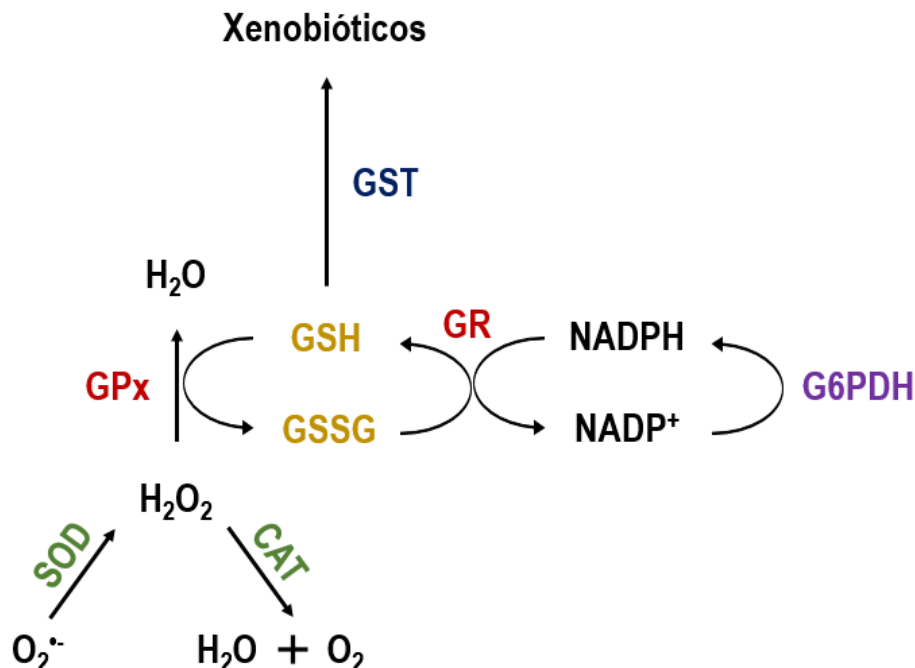


(A) Em condições naturais, os animais mantêm um equilíbrio entre geração de espécies oxidantes e sua neutralização por meio do sistema de defesa antioxidante. (B) Por outro lado, o desequilíbrio do metabolismo redox, seja por meio do excesso de espécies oxidantes ou por ineficácia/insuficiência das defesas antioxidantes, pode causar o estresse oxidativo. Fonte: Modificado de Tomaselli e Barth, 2010.

A SOD é a enzima responsável pela decomposição do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), convertendo-o em O_2 e H_2O_2 . O H_2O_2 , apesar de pouco reativo, é capaz de atravessar as membranas celulares e gerar o radical hidroxila ($\bullet OH$), sendo potencialmente perigoso quando em excesso no organismo (BARBOSA et al., 2010; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Já a CAT, atua na decomposição do H_2O_2 em O_2 e H_2O , eliminando os riscos tóxicos dessa espécie oxidante quando em excesso (ALMEIDA; MASCIO, 2011). A GPx, por sua vez, também atua na decomposição do H_2O_2 e outros peróxidos orgânicos, envolvendo nesse processo catalítico a oxidação concomitante da glutathiona reduzida (GSH) (ALMEIDA; MASCIO, 2011; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006) (Figura 5).

A GSH é um tripeptídeo importante na biotransformação e detoxificação de xenobióticos, atuando também como um dos tipos de defesa não enzimática contra o estresse oxidativo, assim como os tocoferóis, ácido ascórbico, β -caroteno, entre outros (HUBER; ALMEIDA, 2008; LU, 2013). Dessa forma, o ciclo catalítico da glutatona confere uma proteção pautada na redução de espécies oxidantes concomitantemente com a oxidação da GSH em sua forma oxidada, a glutatona dissulfeto (GSSG) (HUBER; ALMEIDA, 2008; LU, 2013). Além disso, para que os níveis de GSH sejam mantidos e a molécula possa desempenhar seu papel redutor, é necessário um fornecimento constante de NADPH pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2014). Além das enzimas convencionais relacionadas ao ciclo da glutatona, a família da glutatona *S*-transferase (GST) também desempenha funções catalíticas importantes. As GSTs são enzimas que catalisam o ataque nucleofílico da GSH a xenobióticos ou eletrófilos, ou seja, são muito importantes na detoxificação celular (HUBER; ALMEIDA, 2008).

Figura 5. Sistema de defesa antioxidante e metabolismo redox.



As enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx atuam na neutralização direta das espécies oxidantes potencialmente danosas ao organismo. O ciclo catalítico da GSH é mantido pelas enzimas GPx e GR, que atuam na oxidação e redução da glutatona, respectivamente. A redução de GSSG a GSH, catalisada pela GR, só é possível mediante a presença de níveis satisfatórios de NADPH, cuja manutenção depende da atuação da enzima G6PDH. Por fim, a GST catalisa a adição nucleofílica da GSH em uma grande variedade de eletrófilos e xenobióticos. Fonte: Elaborado pela autora.

Em casos de transição do hipometabolismo aeróbico (por exemplo, estivação ou hibernação) para taxa metabólica padrão, há uma fase intermediária de alto consumo de oxigênio, que pode estar associada ao aumento na produção de EO danosas à estrutura e permeabilidade das membranas celulares (ORR et al., 2009). Assim, o retorno ao metabolismo aeróbico, após anóxia/hipóxia ou eventos hipometabólicos, geralmente é acompanhado de aumento das defesas antioxidantes, indicando que animais emergindo de estados hipometabólicos podem vivenciar estresse oxidativo (HERMES-LIMA et al., 2015; MOREIRA et al., 2016; ORR et al., 2009).

Anteriormente, acreditava-se que os níveis de EO, respostas antioxidantes e danos oxidativos seriam dependentes e diretamente proporcionais à disponibilidade de O₂ (HERMES-LIMA et al., 2015). Dessa forma, em situações de baixa oxigenação ou eventos hipometabólicos, a produção de EO seria menor, em oposição aos eventos posteriores de reoxigenação e despertar que deteriam maior susceptibilidade à ocorrência de estresse oxidativo (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2007). No entanto, ao longo dos anos, alguns autores observaram que, durante os eventos de baixa oxigenação, as respostas antioxidantes aumentavam, o que soava contraditório uma vez que a indução de enzimas antioxidantes requereria aumento na produção de EO (HERMES-LIMA; STOREY; STOREY, 1998; HERMES-LIMA et al., 2015; LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2007).

Diante disso, foi proposto que a resposta antioxidante elevada ocorre como forma de preparar os animais para o suposto aumento na formação de EO e estresse oxidativo durante a fase posterior de reoxigenação/despertar, teoria denominada de “*Preparation for oxidative stress – POS*” (Preparação para o estresse oxidativo, em português) (HERMES-LIMA; STOREY; STOREY, 1998; MOREIRA et al., 2017). Além da capacidade antioxidante, alguns autores verificaram aumento na peroxidação lipídica (ou biomoléculas oxidadas) durante eventos de hipóxia, sugerindo que a produção de EO poderia aumentar em condições de baixa oxigenação, possivelmente devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2007). Deve-se considerar também que, apesar do efeito protetor que a *POS* emprega aos eventos de reoxigenação, concomitantemente, pode levar ao aumento no dano oxidativo durante a hipóxia (ALMEIDA; MASCIO, 2011).

Apesar dos estudos atuais indicarem que a *POS* ocorre em, pelo menos, 83 espécies animais, distribuídas em oito filos, ainda existem três principais questionamentos e desafios: 1) os mecanismos moleculares que induzem a *POS*; 2) as origens evolutivas da *POS* nos animais; e 3) a ocorrência de *POS* em ambientes naturais (MOREIRA et al., 2017). Além disso, vale ressaltar que o proposto por essa teoria não é um mecanismo universal de adaptação que os

animais possuem para lidar com a baixa oxigenação, uma vez que há estudos com as mais variadas respostas do metabolismo oxidativo nessas condições (HERMES-LIMA et al., 2015; MOREIRA et al., 2016, 2017).

Durante períodos hipometabólicos, existem outros ajustes sistêmicos como a redistribuição do fluxo sanguíneo, redução do tempo de coagulação e da concentração de eritrócitos e leucócitos, entre outros (FRANCO; CONTRERAS; NESPOLO, 2013). Os eritrócitos são responsáveis pelo transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos, estas células lidam continuamente com o estresse oxidativo, pois as altas concentrações de O₂ e ferro (no grupo heme da hemoglobina) suscetibiliza a formação de espécies oxidantes (ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2014). Os leucócitos, por sua vez, são responsáveis pela função imunológica e, em répteis estão sujeitos a inúmeras alterações que dependem da condição fisiológica e comportamental a que estão submetidos (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011).

Apesar de vários fatores atuarem sobre os aspectos hematológicos de répteis, algumas alterações são indicativas de determinados distúrbios. Por exemplo, a ocorrência de células binucleadas, divisões nucleares anormais, ou atividade mitótica em eritrócitos de répteis, indicam uma resposta regenerativa, que pode ser devido ao despertar de longo período de hibernação, ou em decorrência de doenças inflamatórias graves (CAMPBELL, 2015; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013). A poiquilocitose indica uma variação acentuada na forma dos eritrócitos, já a anisocitose é a variação acentuada no tamanho dos glóbulos vermelhos (CAMPBELL, 2015). A ocorrência de poiquilocitose e anisocitose leves é considerada normal para muitas espécies de répteis; contudo, frequências moderadas e graves destas anormalidades podem ser indicativas de anemia regenerativa ou outros distúrbios do eritrócito (CAMPBELL, 2015; GOULART, 2004; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013). O aumento do número de leucócitos no sangue (leucocitose), em geral, é resultado de processos infecciosos, mas também pode estar relacionado a situações de estresse ou traumatismo. Em contrapartida, a diminuição do número de leucócitos (leucopenia) pode estar relacionada com doenças virais, infecção bacteriana grave e toxemias (CAMPBELL, 2015; FALCE, 2009).

Para mamíferos, sabe-se que a hibernação afeta os parâmetros hematológicos, provocando anemia aguda e depressão do sistema imune (leucopenia) (BOUMA; CAREY; KROESE, 2010; FRANCO; CONTRERAS; NESPOLO, 2013). No entanto, para ectotérmicos, além dos estudos serem escassos, a resposta dos componentes sanguíneos pode variar. Para a espécie de serpente *Naja haje* foi registrado uma redução dos componentes da série vermelha (hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos, etc.), enquanto os valores leucocitários aumentaram durante a hibernação (AL-BADRY; EL-DEIB; NUZHYY, 1992). Por outro lado, a

hibernação pode associar-se à perda de eletrólitos e água, causando desidratação, diminuição de volume plasmático e, conseqüentemente, uma hemoconcentração, ou seja, aumento das variáveis hematológicas em lagartos (TROIANO; GOULD; GOULD, 2008).

Portanto, as respostas hematológicas, juntamente com o entendimento dos mecanismos de controle do estresse oxidativo, são fundamentais, pois possibilitam o esclarecimento de alterações metabólicas e adaptações que permitem que os lagartos da espécie *S. merianae*, suportem anualmente a oscilação sazonal do consumo de oxigênio e um período hipometabólico tão prolongado como a hibernação.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

- As variações referentes ao peso corporal durante o ciclo fisiológico de *S. merianae* nos permitem concluir que estes animais não só perdem relativamente pouca massa corpórea nos três meses de hibernação, como também a recuperam rapidamente com poucos dias de alimentação e hidratação no despertar. Com relação à temperatura corporal é possível destacar que as oscilações encontradas adequam-se ao padrão comportamental dos animais nas diferentes estações do ano.

- O padrão de aumento na atividade de algumas enzimas antioxidantes de *S. merianae* durante a hibernação e despertar, somado aos altos níveis de biomoléculas oxidadas, sugere que houve estresse oxidativo na condição hipometabólica, com consequências oxidativas que permaneceram evidentes mesmo com o retorno de sua atividade metabólica padrão. Além disso, é notório que estes animais são capazes de suportar oscilações no equilíbrio redox durante seu ciclo fisiológico anual.

- O comportamento anual de hibernação em *S. merianae* requer ajustes na série vermelha do perfil hematológico para um transporte de gases eficiente em condições hipometabólicas. Além disso, o hipometabolismo característico do período de hibernação parece suprimir o sistema imune, no entanto a relação dos tipos leucocitários se altera possivelmente conforme as prioridades imunológicas de cada período.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-BADRY, K. S.; EL-DEIB, S.; NUZHAY, S. Haematological changes correlated with the hibernation cycle in the Egyptian cobra (*Naja haje haje*). **Journal of Thermal Biology**, v. 17, n. 2, p. 107–109, 1992.
- ALMEIDA, E. A. DE; MASCILO, P. DI. Hypometabolism and antioxidative defense systems in marine invertebrates. In: **Hypometabolism: Strategies of Survival in Vertebrates and Invertebrates**. [s.l.: s.n.]. p. 39–55, 2011.
- ANDRADE, D. V. DE; 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. et al. Overwintering in Tegu Lizards. **Life in the cold: evolution, mechanisms, adaptation, and application. Twelfth International Hibernation Symposium.**, p. 339–348, 2004a.
- ANDRADE, D. V. et al. Seasonal changes in blood oxygen transport and acid-base status in the tegu lizard, *Tupinambis merianae*. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 140, p. 197–208, 2004b.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BAYIR, A. et al. Metabolic responses to prolonged starvation, food restriction, and refeeding in the brown trout, *Salmo trutta*: Oxidative stress and antioxidant defenses. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 159, p. 191–196, 2011.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: A manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, 1975.
- BIBRON, G.; DUMÉRIL, A. *Erpétologie Générale ou Histoire Naturelle Complète des Reptiles*. **Smithsonian**, p. 822, 1854.
- BOUMA, H. R. et al. Blood cell dynamics during hibernation in the European Ground Squirrel. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, p. 319–323, 2010.
- BOUMA, H. R.; CAREY, H. V.; KROESE, F. G. M. Hibernation: the immune system at rest? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 4, p. 619–624, 2010.
- BOYER, B. B.; BARNES, B. M. Molecular and metabolic aspects of mammalian hibernation. **BioScience**, v. 49, n. 9, p. 713–724, 1999.
- CARLBERG, I.; MANNERVICK, B. Glutathione reductase. **Method. Enzymol.** v.113, p.484-490, 1985.

CAMPBELL, T. W. Evaluation of the Blood Film. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 18, n. 1, p. 117–135, 2015.

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

CARVALHO, R. L. et al. Morphological, cytochemical, and ultrastructural observations on the blood cells of the reptile *Tupinambis merianae* (Squamata). **Comparative Clinical Pathology**, v. 15, p. 169–174, 2006.

CHAMUT, S. et al. Testosterone and reproductive activity in the male tegu lizard, *Tupinambis merianae*. **Hepetological Conservation and Biology**, v. 7, n. 3, p. 299–305, 2012.

COSTA, N. R. A. **Mecanismos de ação antioxidante no estado de pós-hipóxia induzida em *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae)**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto, 2016.

DA SILVEIRA, L. C. **Variação sazonal do metabolismo energético no primeiro ciclo anual de lagartos teiú *Tupinambis merianae*: correlatos com atividades diárias, adiposidade e proteção antioxidante**. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015.

DENLINGER, D. L. Regulation of Diapause. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 93–122, 2002.

DOMIJAN, A.-M. et al. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL – application to various biological samples. **Biomedical Chromatography**, v. 29, p. 41–46, 2015.

DUTTON, C. J.; TAYLOR, P. A comparison between pre- and posthibernation morphometry, hematology, and blood chemistry in viperid snakes. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 34, n. 1, p. 53–58, 2003.

DZAL, Y. A. et al. Oxygen in demand: How oxygen has shaped vertebrate physiology. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, 2015.

FALCE, M. C. L. B. **Hematologia de répteis - Revisão Bibliográfica**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Castelo Branco - Instituto Quallitas de Pós Graduação, 2009.

FERREIRA-CRAVO, M.; WELKER, A. F.; HERMES-LIMA, M. The Connection Between Oxidative Stress and Estivation in Gastropods and Anurans. In: **Aestivation: Molecular and Physiological Aspects**. [s.l: s.n.]. p. 47–61, 2010.

FORMAN, H. J. et al. Even free radicals should follow some rules: a suggested guide to free radical research terminology and methodology. **Free Radical Terminology**, v. 2, p. 1–7, 2015.

FRANCO, M.; CONTRERAS, C.; NESPOLO, R. F. Profound changes in blood parameters during torpor in a South American marsupial. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 166, n. 2, p. 338–342, 2013.

FURNÉ, M. et al. Oxidative stress parameters during starvation and refeeding periods in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v. 15, p. 587–595, 2009.

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

GOULART, C. E. S. Herpetologia, Herpetocultura e Medicina de Répteis, 1ª ed. Ed. L. F. **Livros de Veterinária LTDA**, p. 21-56, 99-108, 131-144. 2004.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. [s.l: s.n.]. p. 319–368, 2004.

HERMES-LIMA, M. et al. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 1122–1143, 2015.

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

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

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

JACKSON, D. C. Acid-base balance during hypoxic hypometabolism: selected vertebrate strategies. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 141, p. 273–283, 2004.

JOHANSSON, A.; MANNERVIK, B. Human Glutathione Transferase A3-3, a Highly Efficient Catalyst of Double-bond Isomerization in the Biosynthetic Pathway of Steroid Hormones *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 35, p. 33061–33065, 2001.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanisms for the several activities of the glutathione S transferase. **J. Biol. Chem.** 251, 6183 – 6188, 1976.

LU, S. C. Glutathione Synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143–3153, 2013.

LUSHCHAK, V. I. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, p. 100–107, 2001.

- LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 148, p. 390–397, 2007.
- MAFFEI, F.; HEUBEL, M. T. C. D.; SILVA, F. B. DA. Genética e hematologia de lagartos do gênero *Tupinambis* (Sauria: Teiidae). **Salusvita**, v. 26, n. 3, p. 337–346, 2007.
- MARTINS, G. DE S. et al. Cytochemical characteristics of blood cells from Brazilian tortoises (Testudines: Testudinidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2016.
- MILSOM, W. K. et al. Seasonal changes in daily metabolic patterns of tegu lizards (*Tupinambis merianae*) placed in the cold (17°C) and dark. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 81, n. 2, p. 165–175, 2008.
- MILSOM, W. K. et al. Seasonal Changes in Thermoregulatory Strategies of Tegu Lizards. In: **Living in a Seasonal World**. [s.l: s.n.]. p. 317–324, 2012.
- MORALES, A. E. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 139, p. 153–161, 2004.
- MOREIRA, D. C. et al. How widespread is preparation for oxidative stress in the animal kingdom? **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 200, p. 64–78, 2016.
- MOREIRA, D. C. et al. Current trends and research challenges regarding “Preparation for Oxidative Stress”. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 1–8, 2017.
- MOYES, C. D.; SCHULTE, P. M. **Princípios de Fisiologia Animal**. 2ª Edição ed. 2010.
- MUSTAFA, S. A. et al. Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 1455–1466, 2011.
- NARDINI, G.; LEOPARDI, S.; BIELLI, M. Clinical Hematology in Reptilian Species. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 16, p. 1–30, 2013.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 2014.
- NOWAKOWSKA, A. et al. Effect of winter torpor upon antioxidative defence in *Helix pomatia*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 87, p. 471–479, 2009.
- ORR, A. L. et al. Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 153, n. 2, p. 213–221, 2009.
- ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 143–183, 2007.

- PÉREZ-JIMÉNEZ, A. et al. The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 155, p. 506–516, 2012.
- RAMOS-VASCONCELOS, G. R.; HERMES-LIMA, M. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 675–685, 2003.
- SANDERS, C. E. et al. Daily and annual cycles in thermoregulatory behaviour and cardio-respiratory physiology of black and white tegu lizards. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 185, p. 905–915, 2015.
- SIES, H et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Lett.** v.103, p.287-290, 1979.
- SILVA, D. G. H. DA et al. Impact of genetic polymorphisms in key enzymes of homocysteine metabolism on the pathophysiology of sickle cell anemia. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 106, p. 53–61, 2017.
- SOUZA, S. C. R. DE et al. Seasonal metabolic depression, substrate utilisation and changes in scaling patterns during the first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis merianae*). **Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 307–318, 2004.
- STACY, N. I.; ALLEMAN, A. R.; SAYLER, K. A. Diagnostic Hematology of Reptiles. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, p. 87–108, 2011.
- STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1715–1733, 1996.
- SYKES IV, J. M.; KLAPHAKE, E. Reptile Hematology. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 11, p. 481–500, 2008.
- TATTERSALL, G. J. et al. Seasonal reproductive endothermy in tegu lizards. **Science Advance**, v. 2, p. 1–7, 2016.
- TOMASELLI, G. F.; BARTH, A. S. Oxidative stress irritates the heart. **Nature Medicine**, v. 16, n. 6, p. 648–649, 2010.
- TROIANO, J. C.; GOULD, E. G.; GOULD, I. Hematological reference intervals in argentine lizard *Tupinambis merianae* (Sauria — Teiidae). **Comparative Clinical Pathology**, v. 17, p. 93–97, 2008.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.
- WELKER, A. F. **Efeito da flutuação da disponibilidade de oxigênio e da privação alimentar sobre o metabolismo de radicais livres**. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2009.

WELKER, A. F.; MOREIRA, D. C.; HERMES-LIMA, M. Roles of catalase and glutathione peroxidase in the tolerance of a pulmonate gastropod to anoxia and reoxygenation. **Journal of Comparative Physiology B**, 2016.

WITHERS, P. C.; COOPER, C. E. Metabolic Depression: A Historical Perspective. In: **Aestivation: Molecular and Physiological Aspects**. [s.l: s.n.]. p. 1–23, 2010.

ZHANG, F.; GU, H.; LI, P. A Review of Chelonian Hematology. **Asian Herpetological Research**, v. 2, n. 1, p. 12–20, 2011.

ZWIETEN, R. VAN; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 377–386, 2014.