



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Mecanismos de ação antioxidante no estado de pós-hipóxia induzida em *Phrynops geoffroanus* (Testudines:Chelidae)

Nathalia Rossigalli Alves Costa

MESTRADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Nathalia Rossigalli Alves Costa

Mecanismos de ação antioxidante no estado de pós-hipóxia
induzida em *Phrynops geoffroanus* (Testudines:Chelidae)

São José do Rio Preto
2016

Nathalia Rossigalli Alves Costa

Mecanismos de ação antioxidante no estado de pós-hipóxia
induzida em *Phrynops geoffroanus* (Testudines:Chelidae)

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.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos

Co-orientadora: Profa. Dra. Larissa Paola Rodrigues Venancio

São José do Rio Preto
2016

Costa, Nathalia Rossigalli Alves.

Mecanismos de ação antioxidante no estado de pós-hipóxia induzida em *Phrynops geoffroanus* (Testudines:Chelidae) / Nathalia Rossigalli Alves Costa. -- São José do Rio Preto, 2016 79 p. : il., tabs.

Orientador: Claudia Regina Bonini Domingos

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

1. Biologia molecular. 2. Chelidae. 3. Hipóxia. 4. Estresse oxidativo. 5. Antioxidantes. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 598.13

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

Nathalia Rossigalli Alves Costa

Mecanismos de ação antioxidante no estado de pós-hipóxia
induzida em *Phrynops geoffroanus* (Testudines:Chelidae)

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.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini-Domingos
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Camilo Dias Seabra Pereira
UNIFESP – Baixada Santista

Prof. Dr. Marcelo Campos
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
2016

**Este trabalho foi desenvolvido junto ao Centro de Estudos de Quelônios (CEQ) /
Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH),
Departamento de Biologia, 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 da CAPES e FAPESP (processo 2014/22398-9).**

Dedico

Aos meus pais, **Eliane e Alcides**
E aos meus avós, **Cida, Toninho, Maria e Affonso**

“Família é onde a nossa história começa”

Agradecimentos

Sem fé, nada que realizei seria possível. Sem fé em Deus, sem fé em mim mesma.
Agradeço a Deus por permitir que eu acordasse todos os dias para perseguir meu sonho.

Agradeço aos meus pais, **Eliane** e **Alcides**, pelo esforço sem fim que possibilitou minha formação, e pelas bases fortes que me tornaram uma pessoa de bom caráter.

À minha família, tios, tias e primos, pelo suporte, pelas horas de descontração e pelo esforço para tentar entender minha profissão.

Aos meus avós, que não tem ideia do amor e gratidão que sinto pelo simples fato de existirem.

Ao meu amigo e namorado, **Paquito**, que há seis anos é a primeira pessoa que procuro, seja para pedir refúgio, seja para compartilhar alegrias.
Com você estou em paz.

Aos meus amigos de Monte Alto, em especial **Milena** e **Bruna**, simplesmente por serem as melhores.

À minha amiga **Poli**, pelas horas que passamos juntas nas estradas. O momento de ir e voltar para Rio Preto sempre foi ótimo graças à sua companhia.

Às minhas eternas companheiras de casa, **Lud** e **Lara**, pelas noites de estudos, pelos conselhos, pela paciência e pelo crescimento que tivemos juntas.
Vocês foram minha família em Rio Preto.

Aos amigos, **Carol**, **Ivã**, **Blah**, **Madalena**, **Dorigão**, **Yuri**, **Bitoca**, **Tropecinho**, **Urbs** e **Japa**, por tornarem os dias mais leves.

Às minhas companheiras, **Gabi** e **Camila**, por toda a ajuda, amizade e lealdade, por todos os dias que quebramos a cabeça atrás de ideias e soluções para nossas pesquisas, e pelas risadas que embalaram tudo isso.

À **Mugs**, minha primeira amiga de laboratório, por todos os desabafos, por toda a ajuda, e por sempre compartilhar comigo os momentos que traçaram nossa trajetória nesses cinco anos de convívio.

Ao time de basquete do Ibilce, em especial, **Deia**, **Manu**, **Jacque**, **Molina**, **Clara**, **Pauline**, **Safira**, **Bruna** e **Pézão**, pelas melhores quartas-feiras.

Aos amigos do LHGDH/CEQ, em especial **Lidi, Gi, Bacchi, Pei, Lucas, Tiago, Kexu, Belini, Coxinha, Paty, Renan, Willian, Paula, Bárbara e Isabela**, por toda a ajuda, paciência, e pelos nossos momentos de descontração.

Durante cinco anos vocês foram meus exemplos de profissionais, e em vocês encontrei tanto mestres, quanto amigos. Muito obrigada por tudo!

Ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática, pela disponibilização de equipamentos, tornando possível a realização deste trabalho, e, principalmente, pelo apoio que recebi dos alunos do laboratório.

Deia, Isa, Furto, Milena, Dany, Kexu, Ju: Obrigada por toda ajuda e paciência.

Ao professor **Eduardo Alves de Almeida**, exemplo de profissional e pessoa, sou grata por todo o suporte e paciência, por dividir comigo sua equipe e equipamentos, e por sempre estender as mãos para me ajudar.

À minha co-orientadora, **Larissa Paola Rodrigues Venancio**, agradeço por compartilhar um pouco de seu vasto conhecimento, por me nortear durante a pesquisa, por me ajudar em tudo que precisei, e por se dividir entre a “Profª. Dra.” e a amiga “Leuris”.

À minha querida orientadora **Claudia Regina Bonini-Domingos**, por ter aberto as portas de seu laboratório, por me permitir conhecer sua equipe, por compartilhar sua sabedoria, tanto em assuntos acadêmicos, quanto em assuntos pessoais. Carregarei comigo eternamente o que aprendi com você, e agradeço imensamente por ter sido minha mãe científica.

E aos meus professores, profissionais e pessoas nas quais me espelho, que impulsionaram o desejo de ser bióloga.

Em especial: **Denise, Florindo, Ceron, Eliane, Noll, Dani, Andreia, Lilian Casatti, Kiko, Claudia Bonini, Eduardo, Luciana e Claudia Carareto.**

Obrigada por todos os ensinamentos.

À CAPES e à FAPESP pelo suporte financeiro.

Obrigada, UNESP/IBILCE, por ser minha casa. O orgulho de fazer parte dessa universidade não cabe em mim. Estudar aqui foi a realização de um sonho.

“I get by with a little help from my friends”

The Beatles

*Não há obra humana que possa ser
comparada à plenitude da natureza, ao
resultado vivo de um trabalho de milhares
de anos: cada milímetro de rocha
movimentado, cada vento soprado, cada
semente que germinou.
A natureza se expande e minimiza em
dimensões criadas por si mesma.
Se divide entre a simplicidade e a maestria,
entre a ousadia e a timidez.*

Resumo

Phrynops geoffroanus (Testudines: Chelidae) compõe um grupo de répteis tolerantes a ambientes com variações na disponibilidade de oxigênio, representando um excelente modelo para estudos que visam compreender os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que envolvem a resistência ao estresse oxidativo e dano celular. Esses mecanismos permitem a sobrevivência em situações de privação de oxigênio, bem como a consequente reoxigenação dos tecidos, situação conhecida por liberar as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO), um grupo de moléculas capaz de interagir com outros componentes celulares. As ERO, quando em excesso, podem ser prejudiciais ao organismo, podendo levar à oxidação de componentes essenciais da célula, como proteínas, DNA e ácidos graxos. Os quelônios possuem alta capacidade antioxidante, capaz de combater os efeitos deletérios das ERO e, consequentemente, sobreviver de forma adequada após o período que estiveram sob estresse. Com isso, este estudo consistiu na avaliação dos mecanismos de ação antioxidante que atuam após a reoxigenação decorrente de um período de hipóxia induzida em *P. geoffroanus*, buscando avaliar a atividade dos principais agentes antioxidantes, assim como a existência de dano celular em cérebro, coração, fígado e pâncreas. Foram utilizados 20 indivíduos adultos coletados no rio Preto, pertencente à bacia Turvo/Grande, na cidade de São José do Rio Preto, São Paulo. Os animais foram aclimatados por 120 dias, e, após esse período, foram realizados os experimentos de normóxia e reoxigenação, em temperaturas controladas de 27°C e 17°C, correspondente à amplitude térmica do rio Preto durante o ano. Os tecidos dos animais foram coletados para posterior análise da atividade das enzimas catalase, glutathione redutase, glutathione S-transferase e glutathione peroxidase, além de uma análise dos níveis de peroxidação lipídica, por meio da quantificação do malondialdeído. Diferentemente do que era suposto, a maior atividade das enzimas avaliadas não foi observada em todos os tecidos expostos à reoxigenação. Observou-se a existência de dano celular decorrente da peroxidação lipídica, em especial nos organismos expostos à reoxigenação, evidenciando que o dano existe, apesar de baixo, quando comparado a outros animais. Os resultados obtidos neste trabalho, não somente poderão elucidar questões referentes à conservação de uma espécie muitas vezes negligenciada, mas também auxiliar no melhor entendimento sobre a história de vida, bioquímica e biologia celular desses animais, assim como na compreensão dos mecanismos de reparo do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, atividade enzimática, Chelidae

Abstract

Phrynops geoffroanus (Testudines: Chelidae), comprises a group of reptiles that are tolerant to variations in environmental oxygen availability. Due to this characteristic, they are considered an excellent model for studies that aim the understanding of the physiological and biochemical mechanisms involved in the resistance to oxidative stress and cell damage. During its evolution, some turtles have developed mechanisms that allow them to survive the oxygen deprivation and consequent reoxygenation of tissues, a condition known to release the so-called reactive oxygen species (ROS), a group of molecules that are capable of interacting with other cell components, in some cases, leading to oxidation of essential cell components, such as proteins, DNA, and fatty acids. These mechanisms are related to turtles high antioxidant capacity, that are able to combat the deleterious effects of ROS and, thus, adequately survive after the period they were under stress. Therefore, this study aimed to understand the antioxidant mechanisms that act in the organism after the reoxygenation, due to the previous period of induced hypoxia in *P. geoffroanus*. We evaluate the activity of some antioxidants enzymes, as well as the existence of cellular damage in brain, heart, liver and pancreas. 20 individuals were collected in Preto river, that belongs to the basin Turvo/Grande, in the city of São José do Rio Preto, São Paulo. The animals were acclimated for 120 days, and, thereafter, the normoxia and reoxygenation experiments were conducted under controlled temperatures of 27°C and 17°C, corresponding to the temperature range of Preto river during the year. After the extraction of tissues, analysis of the enzymatic activity of catalase, glutathione reductase, glutathione S-transferase and glutathione peroxidase, as well as analysis of the levels of lipid peroxidation by quantification of malondialdehyde, were performed. We concluded that the enzymatic activity was not higher in all tissues exposed to reperfusion. It was observed the existence of cellular damage due to lipid peroxidation, especially in organisms exposed to reoxygenation, concluding that the damage exists, although it's very low compared to other animals. The results of this study do not can only elucidate conservation issues of a species often neglected, but also contribute to a better understanding of the history of life, biochemistry and cell biology in these animals, as well as the understanding of oxidative stress repair mechanisms.

Keywords: Oxidative stress, enzymatic activity, Chelidae

Lista de Figuras

FIGURA 1. Esquema simplificado dos sistemas oxidativos e antioxidativos nas células. Radical superóxido (O_2^-) é formado no citossol, por enzimas que contém flavina (ex: FAD); e nas mitocôndrias, devido ao escape de elétrons provenientes da cadeia respiratória. Duas moléculas de superóxido reagem espontaneamente ou via SODs, produzindo peróxido de hidrogênio, o que permite que as ERO cheguem aos compartimentos celulares. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser metabolizado formando água e oxigênio molecular por diversos sistemas enzimáticos, ou convertido a radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$), o qual é muito reativo, por meio de reações catalisadas por metais, como demonstrado anteriormente pelas reações de Fenton e Haber-Weiss. Modificado de Nordberg e Arner, 2001.....23

FIGURA 2. Esquema simplificado demonstrando a ativação das defesas antioxidantes. A diminuição da disponibilidade de O_2 faz com que ocorra hipóxia celular, ocasionando a liberação das ERO pelas mitocôndrias. Durante o período em anóxia, não há liberação de ERO, em decorrência da ausência total de oxigenação. No entanto, durante a reoxigenação, a maior disponibilidade de O_2 conseqüentemente ocasiona uma nova formação de ERO, e em maior quantidade. A liberação das ERO pode causar oxidação de biomoléculas, sendo necessária a ativação de defesas antioxidantes. Modificado de Hermes-Lima e colaboradores, 2015.....24

FIGURA 3. Espécimes de *P. geoffroanus*. A) Espécime fotografado em seu ambiente natural, às margens do rio Preto. B) Espécime coletado para os experimentos no laboratório.....27

FIGURA 4: Fluxograma que representa como foram realizados os experimentos em hipóxia e reoxigenação, nos espécimes utilizados no estudo.....32

FIGURA 5. Tanques de fibra de vidro em que os animais ficaram alocados. A temperatura de 27°C foi controlada com a ajuda de termostatos (A), e a temperatura de 17°C , com a ajuda de refrigeradores (B).....33

FIGURA 6. Representação do posicionamento da tela que impedia o acesso dos animais à superfície durante o período em hipóxia induzida.....35

FIGURA 7. A) Bombeamento de nitrogênio líquido nos tanques com a finalidade de diminuir a concentração de O_2 dissolvido na água. A quantidade O_2 dissolvido foi controlada com a ajuda de um oxímetro. B) Animais durante o experimento de hipóxia, impedidos de acessar a superfície por uma tela, que ficava embaixo d'água, como mostra a figura 6.....35

Lista de Tabelas e Quadros

QUADRO 1. Exemplificação das reações de Fenton e Haber-Weiss, em que as ERO reagem com o ferro, um importante catalisador de biomoléculas. Retirado de Ferreira e Matsubara (1997).....22

TABELA 1: Média e erro padrão (EP) da atividade enzimática da CAT, GR, GST e GPx nos quatro tecidos coletados de 20 indivíduos, comparando a atividade das enzimas nas temperaturas de 27°C e 17°C, separadas pelas condições de normóxia e reoxigenação. Valores de p sem *: teste *t-Student*; valores com *: teste de *Mann-Whitney*; nível de significância (p) <0,05, assinalado em negrito.....45

TABELA 2: Média e erro padrão (EP) da atividade enzimática da CAT, GR, GST e GPx nos quatro tecidos coletados de 20 indivíduos, comparando a atividade das enzimas nas condições de normóxia e reoxigenação, separadas pelas temperaturas de 27°C e 17°C. Valores de p sem *: teste *t-Student*; valores com *: teste de *Mann-Whitney*; nível de significância (p) <0,05, assinalado em negrito. N = normóxia, R = reoxigenação.....51

TABELA 3: Média e erro padrão (EP) referente aos níveis de MDA quantificados nos tecidos avaliados nas temperaturas e condições experimentais. £: significância do teste para avaliação da peroxidação entre temperaturas de cada condição experimental; #: significância dos testes da análise da peroxidação entre normóxia e reoxigenação para cada temperatura avaliada. §: teste *t-Student*; *: teste *Mann-Whitney*. Nível de significância (p) <0,05, assinalado em negrito.....54

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATP	Trifosfato de Adenosina
BHT	Hidroxitoluenobutilado
BSA	Albumina Bovina (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CAT	Catalase
CDNB	Dinitroclorobenzeno
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GST	Glutathione S-transferase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada

HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Performance com detectores Ultra Violeta
MDA	Malondialdeído
mg	Miligramas
mL	Mililitro
M	Mol
mM	Milimolar
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
nm	Nanômetros
NMDA	N-metil-D-aspartato
O₂	Oxigênio molecular
•O₂⁻	Radical superóxido
•OH	Hidroxila
p	Nível de significância
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil - Inibidor de Protease
PO₂	Pressão parcial de oxigênio
rcf	Força centrífuga relativa
rpm	Rotações por minuto
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido 2- tiobarbitúrico
tBOOH	Tert-Butil Hidroperóxido
Tris-HCl	Tampão Tris-Ácido Clorídrico

μL	Microlitro
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

Sumário

1.	Introdução	20
2.	Objetivos.....	30
2.1.	Objetivo Geral	30
2.2.	Objetivos Específicos.....	30
3.	Material e Método	32
3.1.	Coleta e Alocação dos Animais.....	32
3.2.	Experimentos em Normóxia e Reoxigenação.....	32
3.3.	Coleta dos Tecidos e Avaliação Bioquímica.....	36
3.4.	Análise Estatística	40
4.	Resultados e Discussão	42
4.1.	Avaliação do comportamento de <i>P. geoffroanus</i> durante o experimento de privação de oxigênio.....	42
4.2.	Análise da atividade das enzimas antioxidantes	44
4.3.	Avaliação da Peroxidação Lipídica (MDA)	53
5.	Conclusão	59
6.	Referências Bibliográficas	61

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Hipóxia pode ser definida como “escassez de oxigênio (O_2)” (RICHARDS, 2011). Um ambiente pode ser considerado hipóxico quando atinge nível de concentração de O_2 inferior à quantidade esperada na natureza. Desta forma, um ambiente aquático pode ser considerado normóxico quando os níveis de O_2 mantêm-se em 80% (aproximadamente 6 mg de O_2L^{-1} a 25°C), e hipóxico quando os níveis atingem aproximadamente 30%, o que corresponde a 2 mgL⁻¹ de O_2 (MUUSZE et al., 1998; WELKER et al., 2013).

A ocorrência de hipóxia tecidual, ou seja, quando o tecido atinge o estado fisiológico denominado de hipoxemia, é atribuída a fatores como alterações em mecanismos de transporte de O_2 , anemia ou mesmo deslocamento do organismo para áreas com baixa concentração de O_2 (HILL et al., 2012). Certo grau de privação de O_2 pode ser sustentado por todos os animais; no entanto, alguns apresentam maior resistência a ambientes com baixa concentração de O_2 (HOCHACHKA; LUTZ, 2001).

Existem adaptações fisiológicas, comportamentais e bioquímicas que permitem aos organismos administrar o estado de hipóxia (RICHARDS, 2011). Duas estratégias principais são utilizadas, enquanto o metabolismo ainda é totalmente aeróbico, para interagir com flutuações na disponibilidade de O_2 : os organismos considerados oxi conformistas (1), como vários invertebrados marinhos, tem sua taxa de absorção de O_2 dependente da concentração de O_2 no ambiente em que se encontram. Por outro lado, os organismos oxi reguladores (2), como a maioria dos vertebrados, costumam manter constante a absorção de O_2 , independente da pressão parcial de O_2 (PO_2) do ambiente (ABELE et al., 2007; WELKER et al., 2013).

Diferentes mecanismos fisiológicos ocorrem em animais tolerantes ou sensíveis a variações na disponibilidade de O_2 . Enquanto os tolerantes contam com mecanismos de conservação de energia, organismos sensíveis contam com vias de compensação de energia (GORR et al., 2006).

Organismos sensíveis sofrem alterações fisiológicas para compensar a diminuição da produção de ATP, quando enfrentam condições de redução de oxigênio. Isto faz com que vias metabólicas específicas sejam recrutadas, na tentativa de aumentar a produção de ATP, o que, por consequência, ocasiona um desvio do metabolismo aeróbio para

anaeróbio. Um rápido declínio na concentração de ATP causa despolarização contínua da membrana, aumento da concentração de íons de cálcio, ativação de proteases e morte celular, em espécies sensíveis à hipóxia (LUTZ; MILTON, 2004; NILSSON; LUTZ, 2004).

Em contrapartida, algumas adaptações fisiológicas e metabólicas estão presentes em organismos que suportam hipóxia grave por longos períodos. Os animais hipóxia-tolerantes apresentam estratégias fisiológicas que conservam ATP por meio da alteração do organismo para um estado hipometabólico reversível, em que as vias que utilizam ATP são suprimidas durante as situações de restrição ou ausência do oxigênio (BOUTILIER, 2001; HOCHACHKA; LUTZ, 2001, WELKER et al., 2013).

Como a maioria dos vertebrados, quelônios aquáticos são animais aeróbicos que dependem de O_2 para suas funções vitais. Porém, também são conhecidos pela capacidade de enfrentar períodos com pouca ou até mesmo nenhuma oxigenação. Para tal, possuem mecanismos bioquímicos e fisiológicos que permitem a sobrevivência em situações de baixa pressão de O_2 , dentre eles, a respiração auxiliar realizada pela pele, epitélio bucofaringeal e/ou mucosa cloacal, que, associada a particularidades circulatórias, possibilita a permanência desses animais por um longo tempo debaixo d'água (FEDER e BURGGREN, 1985; KING e HEATWOLE, 1994; JACKSON et al., 2004; HILL et al., 2012); ajustes que estão associados à neuroproteção do cérebro (KRIVORUCHKO; STOREY, 2010, HILL et al., 2012); estocagem de glicogênio no fígado (KRIVORUCHKO; STOREY, 2010); utilização do tecido esquelético para tamponar os efeitos do acúmulo de lactato e minimizar a acidose, e capacidade de depressão da taxa metabólica para apenas 10%-20%, em comparação com a taxa metabólica em aerobiose (KRIVORUCHKO; STOREY, 2010, 2015).

A respiração celular é um fator importante para a compreensão da capacidade que os quelônios possuem de permanecer e sobreviver a ambientes e situações em que a disponibilidade de O_2 é baixa ou restrita.

Naturalmente, na cadeia transportadora de elétrons, localizada nas cristas mitocondriais, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O) e liberação de gás carbônico (CO_2). Durante o processo de respiração celular, há formação de intermediários reativos, como os radicais

superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NELSON; COX, 2014). Esses intermediários reativos são denominados espécies reativas de O_2 (ERO) (NELSON; COX, 2014).

As ERO, portanto, são espécies químicas presentes na maioria dos sistemas biológicos, e ocorrem naturalmente em células eucarióticas, devido ao metabolismo energético dependente do uso de oxigênio. São produzidas de forma contínua pela respiração mitocondrial, além de outros agentes pró-oxidantes, sendo posteriormente eliminadas pelo sistema antioxidante (BARREIROS et al., 2006; KRIVORUCHKO; STOREY, 2010).

As ERO participam da sinalização redox, o que significa que, em certo nível, são essenciais para as funções naturais das células. Quando a presença de pró-oxidantes e de antioxidantes é proporcional, os níveis de danos oxidativos em biomoléculas são considerados fisiológicos. (MONAGHAN et al., 2009; METCALFE; ALONSO-ALVAREZ, 2010; WELKER et al., 2013).

Em condições naturais, os animais mantêm um equilíbrio entre geração e neutralização das ERO (WELKER et al., 2013). Entretanto, quando a taxa de produção de ERO excede a capacidade da defesa antioxidante, uma situação de estresse oxidativo pode se estabelecer, levando à oxidação de componentes essenciais das células, como proteínas, DNA e ácidos graxos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Moléculas contendo ferro são consideradas um importante catalisador na oxidação de biomoléculas, como mostram as reações de Fenton e Haber-Weiss, como exemplificado no quadro 1 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997):

Reação de Fenton:	Reação de Haber-Weiss:
$\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^-$	$\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^- \leftrightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
$2 \text{O}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$
$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$	$\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$

Quadro 1. Exemplificação das reações de Fenton e Haber-Weiss, em que as ERO reagem com o ferro, um importante catalisador de biomoléculas. Retirado de Ferreira e Matsubara, 1997.

Para protegerem-se contra os efeitos da oxidação, as células possuem um sistema de defesa que pode atuar contra o agente oxidante antes que haja lesão celular. Esse sistema é constituído por antioxidantes, como glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e vitamina E. Além desses, há também sistemas que realizam ação reparadora, atuando após a lesão ter ocorrido, como o ácido ascórbico, glutathiona redutase (GR) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), e glutathiona-S-transferase (GST), dentre outros (STOREY, 1996). A figura 1 demonstra a liberação de espécies de ERO pelo escape mitocondrial, e a ação de algumas enzimas para combatê-las.

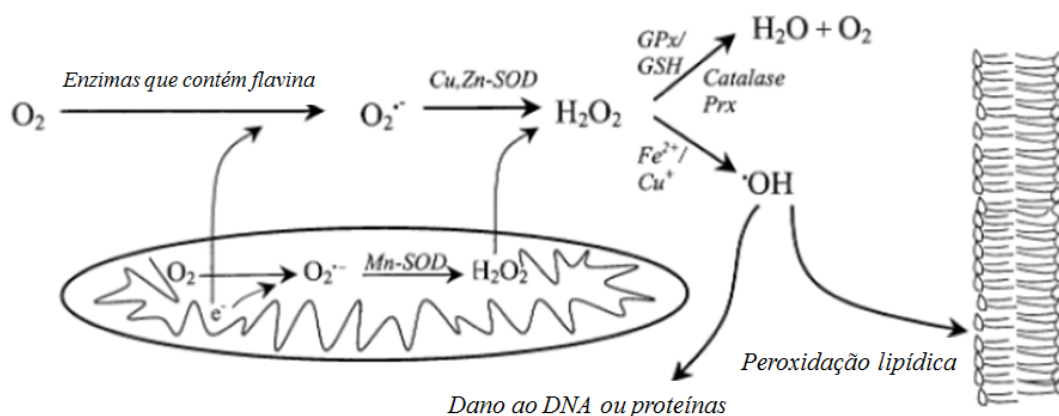


Figura 1. Esquema simplificado dos sistemas oxidativos e antioxidativos nas células. Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é formado no citossol, por enzimas que contém flavina (ex: FAD); e nas mitocôndrias, devido ao escape de elétrons provenientes da cadeia respiratória. Duas moléculas de superóxido reagem espontaneamente ou via SODs, produzindo peróxido de hidrogênio, o que permite que as ERO cheguem aos compartimentos celulares. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser metabolizado formando água e oxigênio molecular por diversos sistemas enzimáticos, ou convertido a radical hidroxila ($\cdot OH$), o qual é muito reativo, por meio de reações catalisadas por metais, como demonstrado anteriormente pelas reações de Fenton e Haber-Weiss. Modificado de Nordberg e Arner, 2001.

Um exemplo desse processo ocorre em órgãos de mamíferos sujeitos à isquemia e reoxigenação. Em tecidos de mamíferos submetidos à isquemia, com hipoxemia progressiva, observa-se que o retorno à condição aeróbia gera uma situação potencialmente perigosa de superprodução ERO, pois a taxa de formação dessas espécies reativas sofre um grande aumento, imediatamente após o retorno do oxigênio (ZWEIER et al., 1987; BAKER et al., 1988).

Um desequilíbrio redox entre a formação de radicais livres e os níveis de antioxidantes ocorre após reoxigenação, resultando em estresse oxidativo, situação que requer a ativação das defesas antioxidantes (Figura 2). (VETTERLEIN et al., 2003; WALSHE; D'AMORE, 2008; HERMES-LIMA et al., 2015).

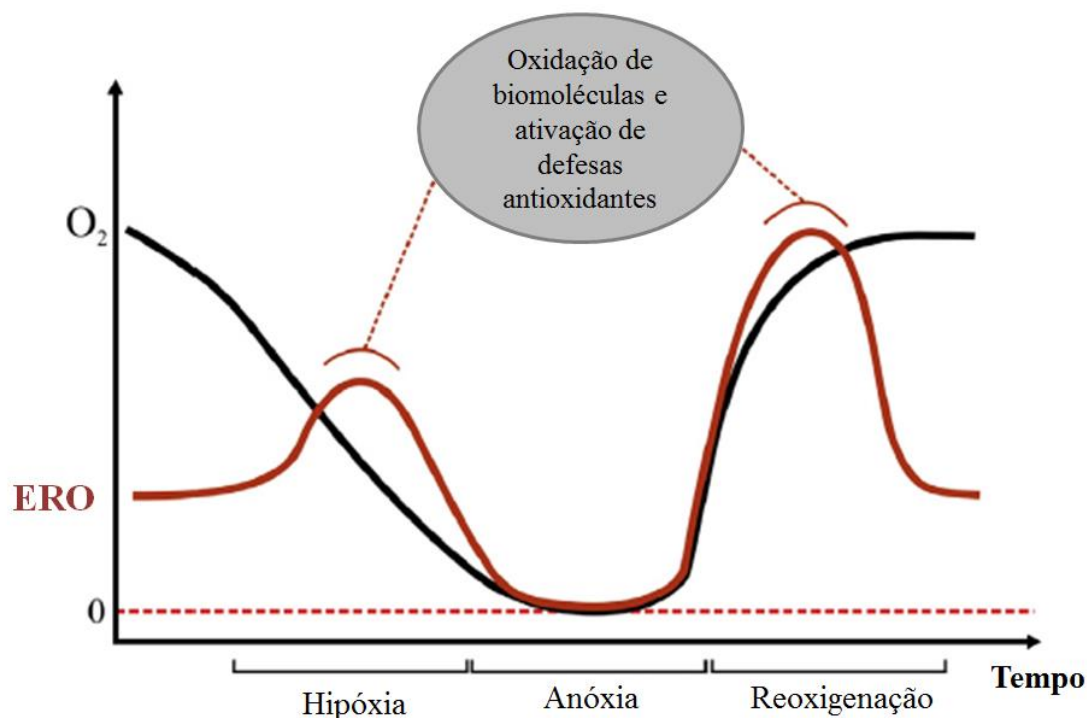


Fig. 2. Esquema simplificado demonstrando a ativação das defesas antioxidantes. A diminuição da disponibilidade de O_2 faz com que ocorra hipóxia celular, ocasionando a liberação das ERO pelas mitocôndrias. Durante o período em anóxia, não há liberação de ERO, em decorrência da ausência total de oxigenação. No entanto, durante a reoxigenação, a maior disponibilidade de O_2 consequentemente ocasiona uma nova formação de ERO, e em maior quantidade. A liberação das ERO pode causar oxidação de biomoléculas, sendo necessária a ativação de defesas antioxidantes. Modificado de Hermes-Lima e colaboradores, 2015.

Esse desequilíbrio pode ocasionar outra situação potencialmente perigosa para as células: a peroxidação dos lipídeos. A peroxidação lipídica ocorre como consequência do estresse oxidativo, e tem sido considerada uma das maiores causadoras da perda da função celular, pois acarreta alterações na estrutura e permeabilidade das membranas, podendo, inclusive, resultar em seu rompimento e exposição do material celular. O processo de peroxidação lipídica ocorre em decorrência da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, os quais são particularmente suscetíveis a ataques por ERO (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Essa condição acontece após a retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos por uma ERO. Há formação de um radical lipídico, o qual pode reagir com o oxigênio molecular, resultando na formação de um radical peroxil. Esse pode sequestrar um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo adjacente, resultando em uma cadeia de reações autocatalíticas que levam à oxidação das membranas em hidroperóxidos lipídicos. Estes, posteriormente, podem ser metabolizados enzimaticamente, produzindo uma série de produtos de menor peso molecular, como cetonas e aldeídos, cujo principal é o malondialdeído (MDA) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; ANTUNES et al., 2008, SILVA, 2011).

No entanto, diferente do que ocorre em mamíferos, quelônios aquáticos desenvolveram mecanismos específicos que permitem sua adequação a situações de privação de oxigênio, os quais possibilitam a sobrevivência mesmo após esses tipos de estresse (STOREY, 2007; GORR et al., 2010).

É possível encontrar diversas informações na literatura acerca das respostas e mecanismos adaptativos que permitem longos períodos de submersão anóxica em quelônios de água doce, como em *Chrysemys picta picta* e em *Trachemys scripta elegans*, tartarugas dulcícolas norte-americanas e de clima frio (WILLMORE; STOREY, 1997; HERMES-LIMA et al., 2002; HOCHACHKA; LUTZ, 2001; LUTZ; MILTON, 2004; WILLMORE; STOREY, 2005; STOREY, 2007; KRIVORUCHKO; STOREY, 2010; PAMENTER et al., 2011).

A evolução da tolerância natural à ausência total ou parcial de oxigenação, dessas e de outra tartaruga de água doce, a *Chrysemys picta bellii*, pode ser atribuída a uma capacidade incomum, porém muito bem desenvolvida, de ocasionar a entrada e o retorno muito rápidos em estados estacionários de depressão metabólica (HILL, 2012). Esses animais, anaeróbicos facultativos, utilizam o metabolismo anaeróbico não só para manter as taxas pré-existentes de produção de ATP, mas para sustentar as taxas reduzidas de energia durante a hipóxia (BOUTILIER, 2001).

A resistência ao estresse oxidativo pode ser correlacionada com a longevidade, pois, organismos que são tolerantes a algum tipo de estresse, geralmente não sofrem danos causados por outros agentes estressores. Considerando que o envelhecimento é muitas vezes caracterizado pela diminuição da capacidade de resistência ao estresse,

seguido de degeneração celular, um animal que possui eficientes mecanismos de proteção ao dano oxidativo é mais propenso a minimizar os efeitos do envelhecimento (KRIVORUCHKO; STOREY, 2010). Tal hipótese explicaria o fato de os quelônios não aparentarem possuir o perfil de senescência observado em outros grupos, pois a taxa de mortalidade não aumenta e a taxa de reprodução não decresce com o avanço da idade (FINCH, 2009).

As espécies endêmicas da América do Sul ainda são pouco estudadas, até mesmo a respeito de aspectos básicos da história natural, e informações a respeito de como essas espécies se comportam frente à baixa oxigenação não são encontradas na literatura.

Phrynops geoffroanus (SCHWEIGGER, 1892), popularmente conhecido como cágado-de-barbelas (Figura 3), é uma espécie dulcícola cuja distribuição geográfica é considerada a maior dentre todos os membros da família Chelidae (VOGT, 2008). Ocorrem em zonas tropicais e temperadas que abrangem, no território brasileiro, regiões da bacia Amazônica no Pará e Amazonas, em Rondônia, Minas Gerais e São Paulo. Habitam pequenos rios de correnteza, rios meândricos, lagos e canais poluídos do perímetro urbano (VOGT, 2008).

A espécie é conhecida pela facilidade de sobrevivência em águas poluídas, sendo comumente encontradas ao longo da bacia hidrográfica do Turvo/Grande, que abrange a região Noroeste do estado de São Paulo, onde se encontra o município de São José do Rio Preto. A bacia do Turvo/Grande é considerada, já há alguns anos, a mais poluída do estado (COMITÊ DA BACIA HIDROGRÁFICA TURVO/GRANDE, 2014). Apesar das condições, muitas vezes inóspitas para outros tipos de organismos, o grande número de espécimes encontrados pode estar relacionado à alta disponibilidade de alimento, gerado por dejetos de esgoto urbano e biomassa em geral (VENANCIO et al., 2013).

Venancio e colaboradores (2009, 2010, 2013) sugerem que o aumento da capacidade antioxidante, e consequente suporte ao dano oxidativo, estão relacionados com a adaptabilidade desses animais à contaminação presente na bacia hidrográfica em questão, indicando que a relação entre esses mecanismos e a presença de contaminantes ambientais pode ter implicações evolutivas.

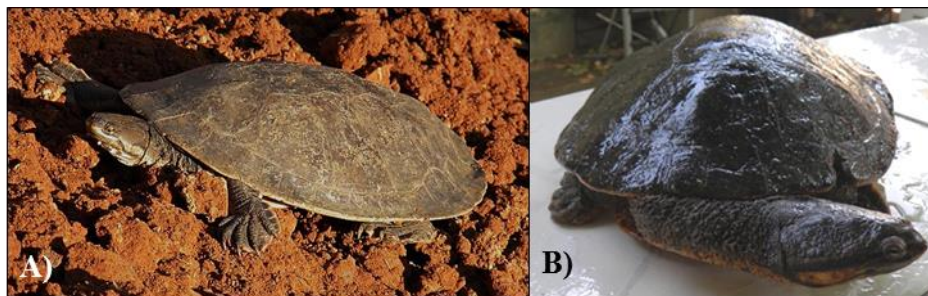


Fig. 3. Espécimes de *P. geoffroanus*. A) Espécime fotografado em seu ambiente natural, às margens do rio Preto. B) Espécime coletado para os experimentos no laboratório. Fonte: própria autora.

As estações do ano e a variação da temperatura das águas podem ser relacionadas com o comportamento realizado por *P. geoffroanus*. Essa espécie pode ser facilmente encontrada na superfície e nas margens do rio durante os períodos de sol, principalmente durante a manhã (VOGT, 2008). Porém, em estações mais frias, a exemplo das tartarugas hipóxia-tolerantes como *Trachemys scripta* e *Chrysemys picta*, que permanecem longos períodos embaixo d'água quando enfrentam baixas temperaturas, o assolhamento de *P. geoffroanus* diminui consideravelmente e, muitas vezes, quando se vai a campo, é raro encontrá-los.

Há uma relação entre temperatura e as condições de disponibilidade de O_2 : em se tratando de animais ectotérmicos, os quelônios, quando em contato com baixas temperaturas, sofrem também diminuição do metabolismo (HILL et al., 2012). A diminuição do metabolismo, associado à economia das reservas energéticas, resulta em hipóxia tecidual (hipoxemia), pois a disponibilidade de O_2 para os tecidos é reduzida (MADSEN et al., 2013).

Um exemplo do que ocorre com esses animais, nessas condições, é a adaptação cardiovascular às baixas temperaturas, que consiste em um aumento na afinidade da hemoglobina pelo O_2 , independentemente de ATP, durante a aclimação à hibernação, juntamente com redução da taxa de vasoconstrição periférica no coração (DAMSGAARD et al., 2013). No cérebro, há também ajustes relacionados à supressão metabólica, os quais incluem a regulação das atividades dos canais iônicos, a intensificação dos processos inibitórios do cérebro e a supressão de processos excitatórios, como, por exemplo, diminuição da atividade do receptor do N-metil-D-

aspartato (NMDA) e supressão da atividade neuronal do ácido gama-aminobutírico (GABA) (LUTZ et al., 2003; KRIVORUCHKO; STOREY, 2015).

A avaliação de tecidos, como coração, encéfalo, fígado e pâncreas de *P. geoffroanus*, pode auxiliar em um maior entendimento em relação à influência da temperatura e da condição de oxigenação no funcionamento de algumas enzimas antioxidantes, além de possibilitar a compreensão de questões relacionadas à presença ou ausência de dano celular causado pela peroxidação lipídica, em decorrência dessas duas condições.

Informações existentes na literatura, referente a outras espécies de tartarugas dulcícolas (WILLMORE; STOREY, 1997; KRIVORUCHKO; STOREY, 2010), nos levaram a acreditar que os índices de atividade das enzimas antioxidantes seriam maiores nos tecidos dos animais que foram expostos à condição de hipóxia, seguida de reoxigenação. Em relação ao dano celular decorrente da peroxidação lipídica, o esperado era que, devido ao fato de tartarugas dulcícolas possuírem diversos mecanismos que reparam e/ou protegem danos causados pela ausência total ou parcial de oxigenação, os valores desse marcador seriam baixos ou até mesmo inexistentes.

A escassez de registros na literatura, em relação a tartarugas dulcícolas Sul-Americanas, deve-se ao fato desses animais não constituírem um grupo de interesse comercial. No entanto, tratando-se de uma espécie endêmica, cujo habitat natural sofreu modificações extremas ao longo dos anos, tornando-se inóspito para muitas outras espécies, é importante que se conheça dados sobre sua história natural e mecanismos biológicos utilizados como adaptativos. Estudos com essa vertente podem, não somente contribuir para questões de conservação de uma espécie muitas vezes negligenciada, mas também auxiliar no melhor entendimento das estratégias de sobrevivência utilizadas por esses animais.

OBJETIVOS



2. Objetivos

2.1.Objetivo Geral

Compreender os mecanismos de ação antioxidante, por meio de valores de atividade enzimática, assim como a presença ou ausência de dano celular, após indução de hipóxia, seguida de reoxigenação, na espécie *Phrynops geoffroanus*.

2.2.Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o perfil de atividade das enzimas relacionadas à capacidade antioxidante (CAT, GR, GST e GPx) em coração, encéfalo, fígado e pâncreas, com relação à temperatura e condição de oxigenação;
- 2) Observar se houve ocorrência de lesão celular pela liberação de espécies reativas de oxigênio após reoxigenação, por meio da avaliação da peroxidação lipídica (MDA).

MATERIAL E MÉTODO

3. Material e Método

3.1. Coleta e Alocação dos Animais

Foram utilizados 20 espécimes adultos de *P. geoffroanus*, sem distinção de sexo, capturados no percurso do rio Preto, bacia hidrográfica do Turvo/Grande, em área localizada no perímetro urbano da cidade de São José do Rio Preto, São Paulo (20°47'01"S; 49°23'07"O). Todos os animais foram mantidos em tanques de fibra de vidro (1000L) preenchidos com aproximadamente 500L de água sem cloro, em temperatura ambiente, com acesso ao fundo do tanque e plataforma seca para permitir o acesso à superfície. A alimentação foi feita com carne bovina, peixe e ração durante o período de aclimação, que durou 120 dias. Esse período foi necessário para possibilitar a descontaminação dos animais, visto que estes foram coletados em ambiente conhecido pela intensa deposição de dejetos orgânicos provenientes de captação de esgoto ineficiente. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP/IBILCE (No. 070/2013) e pelo IBAMA/SISBIO (No. 37360-1).

3.2. Experimentos em Normóxia e Reoxigenação

A Figura 4 demonstra de forma simplificada como foram organizados os experimentos, em normóxia e reoxigenação.

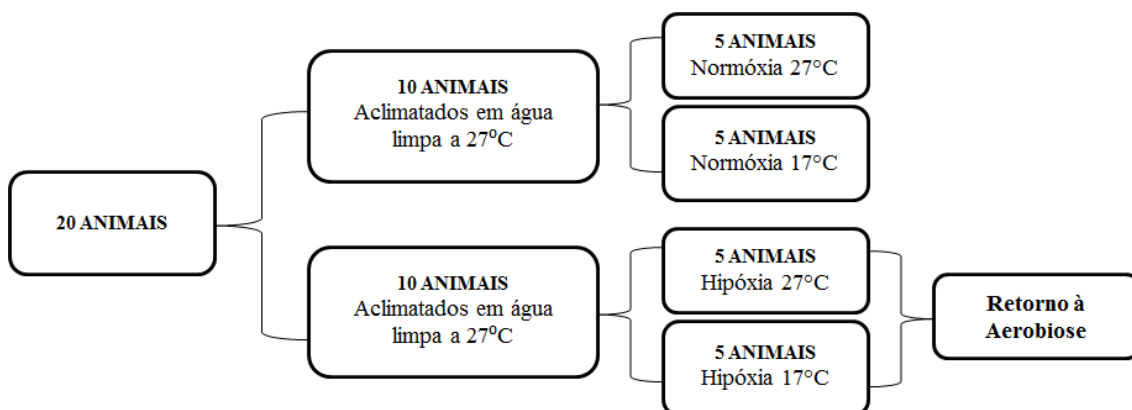


Figura 4: Fluxograma que representa como foram realizados os experimentos em normóxia e reoxigenação, nos espécimes utilizados no estudo.

- *Experimento em normóxia*

O período em normóxia consistiu em permitir o livre acesso à superfície do tanque, simulando o comportamento natural dos animais, porém, com as temperaturas controladas. Após os 120 dias de aclimação, os indivíduos foram divididos em dois grupos, totalizando 10 animais. Um grupo de cinco indivíduos foi mantido em tanque com água limpa com temperatura de 27°C, controlada por aquecedores com termostatos (Atman®, 110V), durante sete dias. Outro grupo, também com cinco indivíduos, foi mantido em um tanque com água limpa a 17°C, resfriada com a ajuda de três refrigeradores digitais (Chiller Gelaqua® 1/3 Hp), também durante sete dias (Figura 5).

A variação, de aproximadamente 10°C, entre um grupo e outro, teve a finalidade de verificar as possíveis diferenças existentes na ação de enzimas antioxidantes em temperaturas diferentes. As temperaturas foram escolhidas baseando-se na amplitude térmica das águas superficiais que foram determinadas no rio Preto ao longo do ano por Melo e colaboradores (2009) e no fato de que o metabolismo do animal é dependente da temperatura.

As temperaturas foram monitoradas com ajuda de termômetro líquido em vidro (Incoterm®, escala -10°C +250°C, 300mm) durante todo o experimento.



Fig. 5. Tanques de fibra de vidro em que os animais ficaram alocados. A temperatura de 27°C foi controlada com a ajuda de termostatos (A), e a temperatura de 17°C, com a ajuda de refrigeradores (B). Fonte: própria autora.

- *Experimento em reoxigenação*

Durante essa etapa, 10 indivíduos também foram coletados e armazenados em tanques com água limpa por 120 dias. Um grupo de cinco indivíduos foi mantido a 27°C com a ajuda de termostatos, e outro grupo a 17°C com a ajuda de refrigeradores, ambos durante sete dias.

Para realizar o experimento de reoxigenação, foi necessário o borbulhamento de nitrogênio líquido na água, com a finalidade de garantir que os níveis de O₂ dissolvido seriam baixos, a ponto de o ambiente aquático do tanque ser considerado hipóxico (30%) (WELKER, et al., 2013). Este procedimento foi fundamental para a realização do experimento de submissão à hipóxia, pois *Phrynops geoffroanus*, apesar de ser uma espécie de respiração prioritariamente pulmonar, também é capaz de realizar trocas gasosas por meio do tegumento cloacal (GOULART, 2004).

Dessa forma, o borbulhamento garante a situação de hipóxia necessária para responder as perguntas propostas neste trabalho. A literatura utilizada para embasar metodologicamente esse experimento também salienta o uso de nitrogênio líquido para realização de testes com a tartaruga dulcícola norte-americana *Trachemys scripta elegans*, espécie resistente a anóxia, amplamente conhecida como organismo modelo para estudos de estresse oxidativo (WILLMORE; STOREY, 1997).

Antes de iniciarmos o borbulhamento de nitrogênio líquido, a quantidade de O₂ dissolvido na água foi medida com a ajuda de um oxímetro (Hanna® instruments). A porcentagem de oxigênio dissolvido em ambos os tanques era de 80%. O borbulhamento ocorreu durante 40 minutos, tempo suficiente para que os níveis de oxigênio dissolvido chegassem a 30%, valor que já caracteriza o ambiente aquático como hipóxico (NILSSON; ÖSTLUND-NILSSON, 2004; VAQUER-SUNYER; DUARTE, 2008; LEVIN et al., 2009). Após o borbulhamento, foi colocada uma tela que impedia os animais de acessarem a superfície (Figuras 6 e 7).

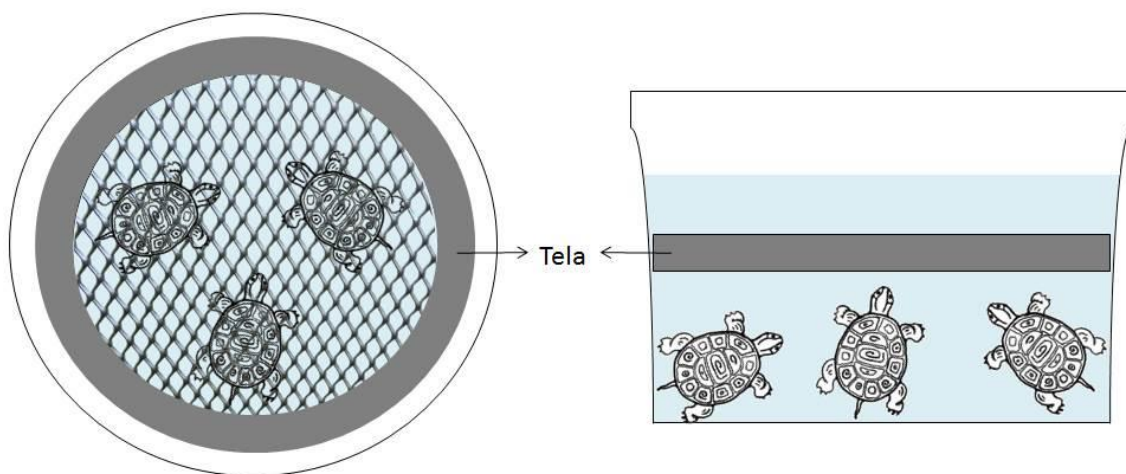


Fig. 6: Representação esquemática do posicionamento da tela que impedia o acesso dos animais à superfície durante o período em hipóxia induzida.



Fig. 7: A) Bombeamento de nitrogênio líquido nos tanques com a finalidade de diminuir a concentração de O_2 dissolvido na água. A quantidade de O_2 dissolvido foi controlada com a ajuda de oxímetro. B) Animais durante o experimento de hipóxia, impedidos de acessar a superfície por uma tela, que ficava embaixo d'água, como mostra a figura 6. Fonte: própria autora.

Os animais permaneceram em hipóxia durante 2 horas, em temperaturas controladas de 27°C e 17°C. Durante todo esse período, os tanques foram monitorados, para evitar que os animais empurrassem a tela e alcançassem a superfície. Após esse período, a tela foi retirada, e o acesso à superfície foi permitido. Durante 24 horas após a retirada da tela, os animais puderam acessar a superfície livremente, e, após esse período, foi realizada a eutanásia para coleta dos tecidos. O período de 24 horas foi fundamental para permitir que a reoxigenação dos tecidos e avaliação da atividade

enzimática do sistema antioxidante e peroxidação lipídica, como preconizado em estudo realizado com tartarugas norte-americanas (WILLMORE; STOREY, 1997).

3.3. Coleta dos Tecidos e Avaliação Bioquímica

Após os experimentos em normóxia e reoxigenação, os indivíduos foram pesados e medidos em relação ao comprimento e largura da carapaça. A eutanásia ocorreu por superdosagem do anestésico Thiopental® (60 a 100mg/Kg), etapa que garante que o processo seja indolor ao animal. Em seguida, foram aplicados de 1 a 2mmol/Kg de cloreto de potássio (KCl), um íon cardiotóxico que produz fibrilação ventricular cardíaca e morte, entre 1 a 2 minutos (GUIA BRASILEIRO DE BOAS PRÁTICAS PARA A EUTANÁSIA EM ANIMAIS). Posteriormente, realizou-se a abertura do plastrão e crânio. A abertura do plastrão foi realizada com ajuda de serra elétrica oscilatória utilizada para corte de gesso (modelo 18018, Nevoni®), e a abertura do crânio ocorreu manualmente com a auxílio de instrumentos cirúrgicos, o que possibilitou a integridade do encéfalo no momento da coleta.

Os tecidos coletados foram armazenados em freezer -80°C, e, posteriormente, foram homogeneizados para realização dos ensaios bioquímicos. O procedimento de abate foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo CEUA. Os tecidos utilizados (encéfalo, coração, pâncreas e fígado) foram escolhidos com base na função que desempenham no organismo, a fim de avaliar como ocorre a ação das enzimas antioxidantes e o dano celular, na proteção dos sistemas nervoso, circulatório, digestivo e hormonal, quando esses tecidos encontram-se em situação de privação de oxigênio e posterior reoxigenação.

Segundo Ferreira e Matsubara (1997), os métodos mais utilizados para aferição indireta das ERO e, consequentemente, das lesões oxidativas, são os espectrofotométricos e cromatométricos, que quantificam a atividade enzimática de SOD, CAT, GPx e GR e/ou a concentração de tripeptídeos como GSH, GSSG, GST e aldeídos, como MDA.

O material biológico foi adicionado em meio de reação específico, para cada enzima avaliada, e a variação da absorbância por produção ou consumo do substrato foi

quantificada. Posteriormente, a taxa de variação da absorbância foi relacionada com a quantificação protéica, obtida pelo método de Bradford (1976), resultando no valor da atividade enzimática.

- *Homogeneização dos Tecidos para os Ensaio Bioquímicos das Enzimas CAT, GPx e GST:*

Diluiu-se 100µL de inibidor de protease (PMSF) em 300mL de tampão Tris-HCl 0,2mM (pH 7,5). 600µL dessa solução foram homogeneizadas com 150mg de tecidos (proporção utilizada para eppendorfs de 2mL). A amostra, então, foi centrifugada durante 20 minutos em 9.000 rcf a 2°C.

Separou-se o sobrenadante, e a amostra foi centrifugada novamente por 1 hora em 50.000 rcf a 1°C.

O sobrenadante (fração citosólica) foi coletado e distribuído em tubos de 0,5 mL para avaliação das enzimas CAT, GST, GR e GPx.

- *Avaliação Enzimática da Catalase (CAT) (BEUTLER, 1975, com modificações):*

A atividade da CAT foi medida quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela enzima, por meio do decréscimo da absorbância em 240 nm, a 27°C e 17°C.

O tampão para a reação de CAT foi composto por Tris-HCl (1M) e EDTA (5mM) em pH 8. O meio de reação foi composto pelo tampão de CAT, H₂O₂ e água ultra pura para ajuste da molaridade em 10mM.

Para avaliação da quantidade de amostra a ser utilizada no ensaio, também foram testadas várias reações com volumes de amostras diferentes, a fim de identificar o volume ideal para que a reação ocorresse de maneira linear e decrescente. Para os animais em normóxia, a quantidade de amostra utilizada foi 5µL para coração, 1µL para encéfalo, 0,5µL para fígado e 5µL para pâncreas. Já em reoxigenação, a quantidade utilizada foi 5µL para coração, 20µL para encéfalo, 1µL para fígado e 5µL para pâncreas. Para CAT, não há necessidade de utilizar o branco.

- *Atividade enzimática da GR (Glutathione Redutase)* (CARLBERG; MANNERNVIK, 1985):

A atividade da GR foi medida com base no consumo do NADPH, que é estimado por meio da variação de absorbância e acompanhado a 340nm a 27°C e 17°C, na presença do substrato GSSG. A metodologia consiste na redução da GSSG a GSH pela GR, por meio da oxidação do NADPH.

Para avaliação da quantidade de amostra a ser utilizada no ensaio, também foram testadas várias reações, a fim de identificar o volume ideal para que a reação ocorresse de maneira linear e decrescente. Para os animais em normóxia, as quantidades de amostra utilizadas foram 10µL para coração, encéfalo e fígado, e 20µL para pâncreas. Para os animais em reoxigenação, 20µL para coração, encéfalo e fígado, e 14µL para pâncreas.

O meio de reação consistiu de 20 µL de glutathione oxidada (GSSG), 20µL de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida (NADPH) e 950µL de tampão Fosfato de Potássio 0,1M pH 7,5, EDTA 1mM. O branco foi composto por 10µL de tampão Tris-HCl 20mM (pH 7,5), 70µL de meio de reação e 20µL de solução de NADPH.

- *Atividade enzimática da GST (Glutathione S-transferase)* (KEEN, 1976, com modificações):

A partir da fração citosólica obtida na homogeneização dos tecidos, foi realizado o ensaio para avaliação da atividade enzimática da GST, baseando-se na reação $\text{GSH} + \text{CDNB} \leftrightarrow \text{CDNB-SG} + \text{HCl}$.

A reação foi conduzida com tampão fosfato de potássio 0,2M, pH 6,5, GSH 200mM, CDBN 200mM e amostra. Para avaliação da quantidade de amostra a ser utilizada no ensaio foram testadas várias reações com volumes de amostras diferentes para cada tecido, a fim de identificar o volume ideal para que a reação ocorresse de maneira linear e crescente, indicando o consumo do substrato. Desta forma, para os animais em normóxia foram utilizadas as seguintes concentrações, com volume final de 1mL: 20µL de amostra de coração e encéfalo, 1µL de amostra de fígado e 6µL de amostra de pâncreas. Para os animais em reoxigenação, a quantidade utilizada foi de

50µL de amostra de coração, 40µL de amostra de encéfalo, 1µL de amostra de fígado e 6µL de amostra de pâncreas.

A análise espectrofotométrica foi realizada a 17°C e 27°C para os tecidos dos animais mantidos nessas temperaturas, e o comprimento de onda foi de 340nm. Um branco foi utilizado para garantir o funcionamento da reação, consistindo na mistura de 10µL de tampão Tris HCl 20mM (pH 7,5), 50µL de meio de reação de GSH e 50µL de meio de reação de CDNB.

- *Avaliação Enzimática da Glutathione Peroxidase (GPx) (SIES et al., 1979):*

Este método é baseado na medida do decréscimo da absorbância, a 340 nm, promovido durante a redução da glutathione oxidada (GSSG). A redução é catalisada por GR em presença de NADPH nas temperaturas avaliadas no estudo.

O ensaio foi realizado adicionando amostra homogeneizada a 10µL de peróxido de terc-butila (128µL de tBOOH diluídos em 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 mM, pH 6,5) e a 980µL de meio de reação. O meio de reação foi preparado pela adição de 25mL de tampão fosfato de potássio 0,1mM, pH 6,5 10mL de EDTA, 15mL de água ultra-pura, 11µL de GR, 16 mg de GSH e 8,6 mg de NADPH.

Para avaliação da quantidade de amostra a ser utilizada no ensaio foram testadas várias reações com volumes de amostras diferentes para cada tecido a fim de identificar o volume ideal para que a reação ocorresse de maneira linear e decrescente. Para os animais em normóxia, utilizou-se 20µL de amostra de coração, 15µL de encéfalo, 10µL de fígado e 15µL de pâncreas. Para os animais em reoxigenação, as quantidades utilizadas foram 30µL de amostra de coração, encéfalo e pâncreas, e 20µL de amostra de fígado. O branco utilizado consistiu em 990µL de meio de reação e 10µL de tBOOH.

- *Quantificação de Proteínas Totais*

A avaliação da proteína total foi realizada utilizando o método de Bradford (1976). Para tanto, foi utilizado 995µL de reagente de Bradford e 5µL de amostra de cada tecido avaliado. As amostras foram deixadas no escuro durante 20 minutos, e em seguida a absorbância foi avaliada a 540 nm. Para a curva padrão foram utilizadas cinco

concentrações diferentes de BSA (*Bovine serum albumin*), que foram avaliados em conjuntos com as amostras.

- *Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica* (ALMEIDA et al. 2004):

Para avaliação dos níveis de peroxidação lipídica, 100mg de tecido foram homogeneizados em 1,5 ml de sacarose a 0,25M, contendo 0,05% de hidroxitoluenobutilado (BHT), afim de evitar a auto-oxidação. Em seguida, 200µl de SDS a 10% e 500µl de TBA 0,4% diluído em HCl 0,2 M foram adicionados à solução.

A mistura foi aquecida num banho de água fervente durante 60 minutos. Foi analisada a presença do produto formado entre malondialdeído (MDA), produto da lipoperoxidação, e o ácido 2- tiobarbitúrico (TBA), por meio de HPLC-UV em 532nm. A fase móvel foi composta por solução de fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,0 com 40% de metanol, bombeada isocraticamente (1mL/min). A quantificação do MDA foi feita com base em uma curva padrão, injetando-se previamente, no HPLC, concentrações conhecidas de padrões de MDA derivados com TBA.

3.4. Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade das variâncias por Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para avaliação da atividade enzimática entre as temperaturas, foram aplicados Teste *t-Student* para dados paramétricos ou *Mann-Whitney* para dados não paramétricos, adotando nível de significância de 5%. Os mesmos testes foram utilizados para avaliação da peroxidação lipídica tecido-específica nos animais em normóxia e reoxigenação, nas duas temperaturas. Para avaliação da influência da temperatura e da condição de oxigenação (normóxia e reoxigenação) sobre o dano celular, foi realizado teste de ANOVA fatorial (*two-way ANOVA*), complementado por Tukey. O software utilizado foi STATISTICA®8.0 (StatSoft).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

O objetivo central desse estudo consistiu em avaliar o comportamento das enzimas associadas à capacidade antioxidante, assim como o possível dano celular, em animais expostos às condições de normóxia e reoxigenação. Para alcançá-lo, foi necessária a submissão dos animais à hipóxia, uma situação cujos danos ainda não podem ser encontrados na literatura, para a espécie *P. geoffroanus*. Desta forma, um relato relacionado ao que se observou no comportamento dos espécimes, frente à privação de oxigenação, faz-se necessário, colaborando com informações sobre a tolerância desse animal a esse tipo de estresse.

4.1. Avaliação do comportamento de *P. geoffroanus* durante o experimento de privação de oxigênio

O período em hipóxia teve duração de 2 horas, em que se observou o comportamento de *P. geoffroanus* em relação à privação de oxigenação. Apesar da facilidade de encontrar estudos deste tipo na literatura com outros modelos animais, como mostra a revisão de Hermes-Lima e colaboradores (2015), dados a respeito do comportamento e tolerância de *P. geoffroanus* em relação a esse tipo de estresse ainda são inexistentes. Desta forma, o referencial teórico baseou-se no que é conhecido para tartarugas dulcícolas que possuem comportamento natural de mergulho e hibernação durante épocas frias (KRIVORUCHKO; STOREY, 2010). Essas espécies conseguem permanecer por até três meses submersas em corpos d'água, cuja superfície sofre congelamento, suportando, ao mesmo tempo, diminuição da temperatura e da disponibilidade de O₂ (WILLMORE; STOREY, 1997; JACKSON et al., 2004).

No entanto, em se tratando de uma espécie endêmica de ambientes tropicais, *P. geoffroanus* não necessariamente possui a mesma tolerância e mesmo comportamento, em comparação com as espécies de clima frio. Desta forma, o período em hipóxia serviu não somente para efetuar o procedimento necessário para posterior averiguação do possível dano causado pela reoxigenação, mas também, como um registro do comportamento do organismo de interesse.

Presumia-se que, ao notar a privação de oxigênio, o comportamento dos indivíduos consistiria em diminuição de atividades como o nado, a fim de diminuir a taxa metabólica (STOREY, 1997; 2007). No entanto, observou-se que, em 27°C, durante os primeiros 15 minutos em hipóxia, iniciou-se um comportamento agressivo, em que os indivíduos mordiscavam e empurravam uns aos outros. Este comportamento agressivo cessou aos 40 minutos, e os espécimes se mantiveram no fundo do tanque até o final das duas horas, não respondendo aos estímulos de movimentação da água, ou aos estímulos físicos (toques com auxílio de bastões), realizados pelos experimentadores. Quando a tela foi retirada, e o acesso à superfície foi liberado, os espécimes emergiram à superfície, realizaram longa respiração e permaneceram letárgicos por aproximadamente uma hora após o término do experimento, retornando ao comportamento normal (nado e movimentação para superfície e fundo do tanque) posteriormente.

Os animais mantidos a 17°C já se encontravam no fundo do tanque quando a tela foi colocada. A procura pela superfície ocorreu após 15 minutos, bem como o comportamento agressivo. No entanto, após 25 minutos de observação, os movimentos cessaram, e os indivíduos permaneceram no fundo do tanque até o final do experimento. Os animais mantidos em diferentes temperaturas evidenciaram importantes diferenças comportamentais. O tempo de percepção do impedimento do acesso à superfície e início do comportamento agressivo foi o mesmo para os dois grupos experimentais (15 minutos). Entretanto, os animais mantidos à 27°C cessaram sua movimentação e se posicionaram praticamente imóveis no fundo do tanque em um tempo cerca de 1,6 vezes maior que os animais mantidos à 17°C. Este dado sugere que os animais mantidos em temperatura mais baixa podem entrar em estado hipometabólico mais precocemente dos que os animais mantidos em temperaturas mais elevadas. O hipometabolismo, por sua vez, relaciona-se diretamente com a tolerância à hipóxia (KRIVORUCHKO; STOREY, 2010; WELKER et. al., 2013).

O conhecimento do comportamento dos animais expostos a variações na temperatura e disponibilidade de oxigenação pode auxiliar na melhor compreensão do que depois é observado, quando se analisa a ação das enzimas antioxidantes e os possíveis danos celulares.

4.2. Análise da atividade das enzimas antioxidantes

- Análise da atividade enzimática em relação à temperatura

Os animais em normóxia e reoxigenação foram submetidos aos experimentos em temperaturas de 27°C e 17°C, que correspondem à amplitude térmica do rio Preto, em perímetro urbano, durante o ano (MELO et al., 2009). Essa variação é importante, pois a temperatura está relacionada com os mecanismos de tolerância à hipóxia existente em muitas espécies, visto que a diminuição no metabolismo do animal ocorre, normalmente, em conjunto com a diminuição da temperatura no local em que o animal se encontra (HILL et al., 2012).

Os quelônios, organismos ectotérmicos, ajustam sua temperatura corpórea conforme a variação da temperatura ambiental, sendo que a diminuição do metabolismo reduz a demanda de oxigênio, levando os tecidos a uma situação temporária de hipoxemia (LARSON et al., 2014).

Mecanismos que permitem a tolerância a baixas temperaturas, e, conseqüentemente, a situações de privação de oxigênio, são bem conhecidos em tartarugas dulcícolas norte americanas como *Chrysemys picta bellii* e *Trachemys scripta elegans*, consideradas organismos modelos em estudo de resistência ao frio e baixa oxigenação (STOREY, 2006). A ausência de estudos relacionados a esses aspectos em *P. geoffranus* dificulta o estabelecimento de respostas concretas relacionadas à tolerância desses animais à hipóxia e baixas temperaturas, porém, instiga-nos a entender melhor suas adaptações, não só nessas condições, mas também em relação ao ambiente quente a que esses animais estão submetidos na América do Sul, e, em especial, no Brasil.

A atividade enzimática da CAT, GR, GST e GPx nos diferentes tecidos dos animais expostos a temperaturas diferentes se encontram na tabela 1. Realizamos uma comparação entre as temperaturas utilizadas no estudo, separadamente, nos experimentos de normóxia e reoxigenação.

Nos tecidos dos animais em normóxia, de modo geral, os valores médios das enzimas apresentaram-se maiores em 27°C. A atividade da CAT mostrou-se maior à 27°C em relação à 17°C no pâncreas, mas não mostrou diferença estatisticamente

significativa entre as temperaturas nos demais tecidos avaliados. Da mesma forma, a atividade da GR e GST no fígado, e GST no pâncreas não apresentaram valores estatisticamente diferentes entre as temperaturas. Houve diferenças na atividade da GPx em todos os tecidos, e, em todas os casos, a atividade foi maior na temperatura de 27°C.

Nos tecidos em reoxigenação, houve diferença estatisticamente significativa somente para CAT, no encéfalo, e para GST, no coração e fígado, sendo que, para CAT, a maior atividade foi observada a 27°C, e para GST, em 17°C.

Tabela 1: Média e erro padrão (EP) da atividade enzimática da CAT, GR, GST e GPx nos quatro tecidos coletados de 20 indivíduos, comparando a atividade das enzimas nas temperaturas de 27°C e 17°C, separadas pelas condições de normóxia e reoxigenação. Valores de p sem *: teste t-Student; valores com *: teste de Mann-Whitney; nível de significância (p) <0,05, assinalado em negrito.

Atividade Enzimática	Coração (média±EP)		P	Encéfalo (média±EP)		P	Fígado (média±EP)		P	Pâncreas (média±EP)		P
	27°C	17°C		27°C	17°C		27°C	17°C		27°C	17°C	
Normóxia												
CAT (U/mg prot)	13,07 ±0,61	11,93 ±0,71	0,26	3,43 ±0,25	2,50 ±0,44	0,34*	74,81 ±11,21	83,22 ±10,72	0,60	5,50 ±0,15	4,79 ±0,21	0,02
GR (mU/mg prot)	28,54 ±3,22	19,89 ±0,47	0,02	34,29 ±2,79	21,92 ±2,05	<0,01	27,73 ±3,38	21,97 ±1,35	0,15	37,03 ±6,58	20,49 ±0,59	0,03
GST (mU/mg prot)	185,49 ±10,06	124,86 ±8,50	<0,01	319,6 ±18,8	218,7 ±24,8	0,01	2225,5 ±227,5	2297,57 ±259,6	0,84	154,84 ±26,35	192,94 ±16,95	0,25
GPx (mU/mg prot)	5,58 ±0,72	3,04 ±0,51	0,02	5,89 ±0,21	2,19 ±0,13	<0,01	6,23 ±0,31	3,98 ±0,49	<0,01	3,68 ±0,09	2,50 ±0,38	0,01
Reoxigenação												
CAT (U/mg prot)	22,67 ±2,86	24,12 ±1,06	0,91*	5,93 ±1,83	2,15 ±0,25	<0,01*	57,18 ±10,47	46,43 ±3,65	0,36	4,11 ±0,85	3,30 ±0,32	0,46*
GR (mU/mg prot)	36,44 ±1,64	32,46 ±2,16	0,17	29,77 ±2,22	28,31 ±2,24	0,91*	26,31 ±0,69	27,02 ±1,18	0,62	21,18 ±1,82	28,93 ±3,29	0,25*
GST (mU/mg prot)	147,53 ±7,49	98,67 ±4,50	<0,01	147,57 ±15,84	167,2 ±28,7	0,75*	891,50 ±117,0	1462,07 ±69,10	<0,01*	132,65 ±17,56	181,81 ±12,40	0,05*
GPx (mU/mg prot)	18,95 ±1,42	17,13 ±1,80	0,45	12,97 ±4,73	10,02 ±0,73	0,75*	24,43 ±3,88	29,50 ±2,52	0,30	28,47 ±1,76	24,19 ±2,86	0,20

Em *P. geoffroanus*, a CAT é a enzima com maior atividade, chegando ao máximo de 83,22 U/mg de proteína no fígado, e o mínimo de 2,05 U/mg de proteína, no

encéfalo. Os altos índices de atividade estão relacionados à função que a CAT desempenha na proteção antioxidante no organismo. A CAT é uma hemeproteína presente no citoplasma, que atua como catalisadora da redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O e O_2 . O H_2O_2 , apesar de não ser, por definição, um radical livre, devido à ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente reativo, porque participa da reação que produz o radical hidroxila ($\cdot OH$), considerada a ERO mais prejudicial ao organismo (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

No coração, encéfalo e fígado de *P. geoffroanus*, a CAT foi a única enzima que não sofreu alterações quando comparou-se as duas temperaturas em normóxia. Isso pode significar que a diferença de $10^\circ C$ entre as temperaturas talvez não seja suficiente para gerar alterações na atividade dessa enzima, nesses organismos.

Diferenças foram observadas somente no pâncreas em normóxia, em que a atividade da CAT foi maior em $27^\circ C$ ($p = 0,02$), o que talvez esteja relacionado à função do pâncreas, que, por ser um órgão com função de secreção hormonal e digestiva, pode exercer maior atividade quando o animal encontra-se exposto a maiores temperaturas, em que, comumente, o comportamento do animal é mais ativo e a busca por alimento acontece em maior frequência. Essa situação pode significar que há necessidade de maior oxigenação devido ao metabolismo, o que por consequência resulta na geração de mais ERO, como o peróxido de hidrogênio, e, por isso, uma alta na atividade da CAT nesse tecido.

Há dificuldade em encontrar estudos que avaliem a atividade enzimática no pâncreas, especialmente em répteis, restando apenas comparações com organismos invertebrados, em que, na verdade, se avalia o hepatopâncreas (HERMES-LIMA, et al., 1998; HERMES-LIMA et al., 2015). Todavia, esses estudos são voltados somente à condição de oxigenação, e não a variações enzimáticas associadas às alterações na temperatura. Desta forma, o relato do comportamento enzimático das temperaturas no pâncreas, apesar de pouco conclusivo, fornece informações que poderão ser futuramente utilizadas para comparações com outros animais.

Estudos com outros animais ectotérmicos, como peixes da espécie *Robius paganellos*, buscaram observar a variação na atividade da CAT em resposta a aumentos

na temperatura em que os espécimes foram expostos. Para essa espécie, a atividade da CAT aumentou conforme as temperaturas ficaram mais altas em músculo, fígado e brânquias (VALDÍVIA et al., 2014).

Quando as alterações na atividade da CAT eram associadas à temperatura e diminuição na disponibilidade de O₂, as serpentes *Thamnophis sirtalis* mostraram aumento na atividade dessa enzima conforme a temperatura diminuía, e, nas tartarugas *Trachemis scripta*, a atividade da CAT diminuía conforme a temperatura diminuía (HERMES-LIMA; SAVÍN, 2002; LI, 2010). Em contrapartida, alterações na atividade da CAT em diferentes temperaturas também foram observadas em hamsters (*Cricetulus barabensis*) expostos a baixas e altas temperaturas. Neste caso, a atividade da CAT aumentou conforme diminuía a temperatura a que os hamsters foram expostos, sendo essa relação indiretamente proporcional e devida ao aumento metabólico dos organismos endotérmicos, quando enfrentam baixas temperaturas (CHEN et al., 2014).

Essas comparações demonstram que a atividade da CAT é modulada de forma diferente em cada organismo, de acordo com as adaptações que possuem, as dificuldades térmicas que enfrentam, e o ambiente em que estão inseridos. Em alguns casos, enzimas como a CAT possuem atividade dependente da temperatura, podendo apresentar atividade inversa ou diretamente proporcional à temperatura em que se encontram.

Em relação à atividade da GR, houve diferença entre as temperaturas avaliadas no coração, encéfalo e pâncreas, em normóxia, sendo maior na temperatura mais alta em todos os casos. Porém, em reoxigenação, não foram observadas diferenças na atividade dessa enzima entre nenhuma das temperaturas.

A GR tem a função de recuperar a GSH que foi oxidada à GSSG em decorrência da exposição ao agente oxidante. Este processo é importante para manter a integridade do sistema de proteção celular.

Ainda não há informações na literatura sobre a atividade da GR em *P. geoffroanus* nessas condições térmicas. Porém, em estudo realizado com a rã-da-floresta (*Rana sylvatica*), conhecida por sua tolerância ao congelamento, a atividade da GR sofreu alterações de acordo com a temperatura, porém, diferentemente do que foi observado em *P. geoffroanus*, houve aumento da atividade enzimática conforme a

diminuição da temperatura. Esse comportamento enzimático é denominado por alguns autores como “preparação para o estresse oxidativo” (preparation for oxidative stress) (HERMES-LIMA et al., 1998), visto que, durante o congelamento, a rã-da-floresta atinge um estado de isquemia em seus tecidos. Desta forma, para essa espécie, o aumento da atividade dessa enzima atua protegendo o organismo das ERO que serão formadas durante a reoxigenação dos tecidos previamente congelados (JOANISSE; STOREY, 1996).

Em *Trachemis scripta elegans* expostas a baixas temperaturas, que, inclusive, resultaram em anóxia com duração de cinco horas, observou-se um aumento na atividade da GR no fígado e músculo (HERMES-LIMA et al., 2015), situação que também é diferente do que foi observado em *P. geoffroanus*. Desta forma, não podemos concluir que a atividade da GR foi afetada pela variação nas temperaturas utilizadas nesse estudo. Provavelmente, a maior atividade dessa enzima, observada em coração, encéfalo e pâncreas dos animais em normóxia (27°C), faz parte do comportamento enzimático natural dessa condição. A ausência de diferenças entre as temperaturas, para todos os tecidos dos animais expostos à reoxigenação, pode significar que a variação de 10°C, nessa condição, não desempenha uma situação que necessita de recrutamento dessa enzima para atuar no resgate da GSH nessas temperaturas.

Depois da CAT, a GST foi a enzima com maior atividade observada nos tecidos, com níveis máximos de 2297,57 mU/mg de proteína no fígado, e mínimo de 124,86 mU/mg de proteína no coração.

As GSTs pertencem a uma superfamília enzimática, multigênica, que catalisam a adição nucleofílica do tiol da GSH em uma grande variedade de eletrófilos. Agem no organismo assegurando proteção, não apenas contra eletrófilos, que tendem a ser tóxicos para a célula, mas também contra os oxidantes que eles reduzem (WILLMORE; STOREY 2005).

Estudos apontam a ocorrência de aumento na expressão da GST quando na presença de estresse termal, como ocorre no coração de *Rana sylvatica*, e em alguns répteis, como em *Chrysemis picta marginata*, principalmente quando esses também são expostos a períodos em anóxia (STOREY, 2006; WELKER et al., 2013). No entanto,

nota-se que em *P. geoffroanus* o mesmo não ocorreu, ou seja, a maior atividade dessas enzimas foi observada na maior temperatura do experimento (27°C).

Houve diferenças na atividade da GST, entre as temperaturas, no coração e encéfalo em normóxia, sendo maior na temperatura mais alta. Em reoxigenação, a diferença ocorreu entre as temperaturas de coração e fígado, e, para os dois casos, a atividade foi maior na temperatura mais baixa. Isso pode significar que, nos animais expostos à reoxigenação, essa enzima pode ter atuado como uma forma de proteção contra os danos causados pela diminuição de O₂, possivelmente, atuando em conjunto com a diminuição metabólica decorrente da queda da temperatura.

A GPx foi a única enzima que teve sua atividade alterada entre as temperaturas em todos os tecidos, nos animais expostos à condição normóxica. Assim como observado em grande parte das condições e tecidos analisados, a maior atividade da GPx também aconteceu na temperatura mais alta. No entanto, não houve diferenças na atividade da GPx, entre as temperaturas, nos organismos do experimento de reoxigenação.

A GPx tem como função catalisar a redução do H₂O₂ ou hidroperóxidos orgânicos em água ou no álcool correspondente, respectivamente, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como redutor (URSINI et al., 1995). Essa enzima ajuda a degradar baixas concentrações de H₂O₂, ao contrário da CAT, que degrada o peróxido de hidrogênio em altas concentrações no organismo (WILLMORE; STOREY, 1997).

A atividade da GPx foi maior no fígado em comparação com os outros tecidos, e os menores valores foram observados no encéfalo. No entanto, nos animais em normóxia, mantidos a 17°C, observou-se que a atividade da GPx foi menor em todos os tecidos, principalmente no fígado. Esses resultados permitem concluir que a atividade da GPx sofre alterações em relação a temperatura. O aumento da atividade da GPx na temperatura mais alta também pode ser devido ao comportamento ativo dessa espécie em períodos de calor, como mencionado anteriormente.

- *Análise da defesa antioxidante de acordo com a disponibilidade de oxigênio*

O comportamento das enzimas antioxidantes em animais que enfrentam condições de privação de oxigênio são bem conhecidas em animais que também enfrentam períodos de estresse térmico. A proteção que é requerida para evitar danos provenientes da falta de oxigenação, atrelada ao estado hipometabólico resultante das diminuições de temperatura, consiste em um mecanismo bem desenvolvido nesses animais. A ausência de experimentações em *P. geoffroanus* nos faz questionar se a mesma resposta ocorreria neste animal, especialmente pelo fato de habitarem águas relativamente quentes, sem quedas drásticas na temperatura durante o ano.

Algo que é observado durante as coletas e pesquisas de campo realizadas pelo grupo, é que, nos meses mais frios do inverno, *P. geoffroanus* parece alterar seu comportamento em decorrência da queda da temperatura. Os banhos de sol, que acontecem normalmente durante as manhãs e consistem em um comportamento natural do grupo (VOGT, 2008), não são tão recorrentes nessa época do ano.

Diferentemente de tartarugas dulcícolas de regiões frias, espécimes de *P. geoffroanus* não estão expostos a grandes quedas na temperatura, a ponto de permanecerem submersos por dias. Esses animais diminuem sua atividade, muito provavelmente em decorrência da diminuição na taxa metabólica, quando enfrentam temperaturas menores, especialmente durante o fim da tarde e noite (VOGT, 2008).

No entanto, a atividade pode continuar de forma usual durante as horas do dia em que as temperaturas estão mais altas, o que é refletido diretamente na atividade enzimática, quando submetemos esses animais à privação de oxigênio seguida de reoxigenação, condição que, conhecidamente, é potencial causadora de ERO, em grande parte dos organismos.

Levando em consideração essas informações, optou-se por comparar os resultados obtidos, separadamente, em cada uma das temperaturas do estudo. Desta forma, analisou-se a atividade enzimática dos indivíduos expostos a normóxia e reoxigenação, em 27°C e 17°C. Os resultados podem ser visualizados na tabela 2.

Na temperatura de 27°C, diferenças na atividade foram observadas para: CAT, no coração, em que a maior atividade ocorreu em reoxigenação; GR e GST, no pâncreas, com maior atividade em normóxia; e GPx, em que houve diferenças em todos

os tecidos, sendo que, em todos eles, a maior atividade foi observada nos indivíduos que enfrentaram o estresse da privação de oxigênio seguida de reoxigenação por 24 h.

Na temperatura de 17°C, houve diferenças na atividade da CAT no coração (maior em reoxigenação), fígado (maior em normóxia) e pâncreas (maior em reoxigenação). A atividade da GR foi maior no coração, fígado e pâncreas em reoxigenação, enquanto que, para GST, houve maior atividade em normóxia, tanto para o coração, quanto para o fígado. A GPx apresentou diferença entre as condições de oxigenação em todos os tecidos, e, em todos os casos, a maior atividade foi observada nos indivíduos expostos a reoxigenação.

Tabela 2: Média e erro padrão (EP) da atividade enzimática da CAT, GR, GST e GPx nos quatro tecidos coletados de 20 indivíduos, comparando a atividade das enzimas nas condições de normóxia e reoxigenação, separadas pelas temperaturas de 27°C e 17°C. Valores de p sem *: teste t-Student; valores com *: teste de *Mann-Whitney*; nível de significância (p) <0,05, assinalado em negrito. N = normóxia, R = reoxigenação.

Atividade Enzimática	Coração (média±EP)		P	Encéfalo (média±EP)		P	Fígado (média±EP)		P	Pâncreas (média±EP)		P
27° C	N	R		N	R		N	R		N	R	
CAT (U/mg prot)	13,07 ±0,61	22,67 ±2,86	<0,01*	3,43 ±0,25	5,93 ±1,83	0,75*	74,81 ±11,21	57,18 ±10,47	0,28	5,50 ±0,15	4,11 ±0,85	0,25
GR (mU/mg prot)	28,54 ±3,22	36,44 ±1,64	0,06	34,29 ±2,79	29,77 ±2,22	0,34*	27,73 ±3,38	26,31 ±0,69	0,69	37,03 ±6,58	21,18 ±1,82	0,04
GST (mU/mg prot)	185,49 ±10,06	147,53 ±7,49	0,01	319,65 ±18,82	147,57 ±15,84	<0,01	2225,5 ±227,59	891,50 ±117,04	<0,01	154,84 ±26,35	132,65 ±17,56	0,50
GPx (mU/mg prot)	5,58 ±0,72	18,95 ±1,42	<0,01	5,89 ±0,21	12,97 ±4,73	0,04*	6,23 ±0,31	24,43 ±3,88	<0,01*	3,68 ±0,09	28,47 ±1,16	<0,01
17°C	N	R		N	R		N	R		N	R	
CAT (U/mg prot)	11,93 ±0,71	24,12 ±1,06	<0,01	2,50 ±0,44	2,15 ±0,25	0,32	83,22 ±10,72	46,43 ±3,65	<0,01*	4,79 ±0,21	3,30 ±0,32	<0,01
GR (mU/mg prot)	19,89 ±0,47	32,46 ±2,16	<0,01*	21,92 ±2,05	28,31 ±2,24	0,06	21,97 ±1,35	27,02 ±1,18	0,02	20,49 ±0,59	28,93 ±3,29	<0,01*
GST (mU/mg prot)	124,86 ±8,50	98,67 ±4,50	0,02	218,73 ±24,86	167,27 ±28,74	0,34*	2297,57 ±259,60	1462,07 ±69,10	<0,01*	192,94 ±16,95	181,81 ±12,40	0,61
GPx (mU/mg prot)	3,04 ±0,51	17,13 ±1,80	<0,01*	2,19 ±0,13	10,02 ±0,73	<0,01*	3,98 ±0,49	29,50 ±2,52	<0,01*	2,50 ±0,38	24,19 ±2,86	<0,01*

As enzimas em normóxia e reoxigenação, responderam de formas diversas nos tecidos avaliados, nas duas temperaturas. Para a GPx, os resultados mostraram diferenças na condição de oxigenação em todos os tecidos, tanto a 27°C, quanto a 17°C.

Uma possível explicação para o fato da atividade desta enzima estar maior nos tecidos que sofreram com a reoxigenação pode relacionar-se com um aumento na quantidade de peróxido de hidrogênio formado no período em que os tecidos foram reoxigenados. Diversos estudos demonstram que a GPx é uma das enzimas que mais apresenta aumento nos níveis de atividade, quando o organismo enfrenta situações como hipóxia e anóxia (HERMES-LIMA et al., 2015).

Para impedir o dano oxidativo produzido pelo radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), as células contam com a enzima superóxido dismutase (SOD), para catalisar a reação que transforma o $\bullet\text{O}_2^-$ em O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo este, então, reduzido pela GPx (WILSON; COX, 2014). Dessa forma, podemos inferir que houve formação de ERO durante o período de reoxigenação.

A CAT, outra enzima com função de degradar o peróxido de hidrogênio, também apresentou maior atividade no coração submetido à reoxigenação na temperatura de 27°C. Na temperatura mais baixa, a CAT apresentou maior atividade em reoxigenação para o coração, mas o fígado e o pâncreas apresentaram maior atividade em normóxia. Como dito anteriormente, a GPx atua reduzindo o H_2O_2 em menor quantidade em comparação com a CAT. Isso pode significar que houve formação dessa ERO, porém, os níveis podem não ter sido tão altos a ponto de ocasionar um aumento na atividade da CAT em todos os tecidos, como ocorreu com a GPx.

Os dados observados, quando se compara a atividade de todas as enzimas, podem ser considerados discrepantes, e, na maioria das vezes, a maior atividade enzimática foi observada nos indivíduos em normóxia. A atividade das enzimas é variável nos tecidos, desempenhando maior ou menor atividade, e/ou, resposta enzimática mais rápida ou mais lenta de acordo com a função de cada um. Da mesma forma que cada tecido responde de uma determinada maneira à hipóxia e reoxigenação, cada animal também responde a esse estresse de maneiras distintas.

Existe a possibilidade da atividade enzimática já estar normalizada ou em processo de normalização devido ao período de 24h de reoxigenação. Sendo assim, não

foi possível afirmar se houve maior ou menor atividade enzimática durante o período de reoxigenação. No entanto, podemos supor que, no momento da coleta dos tecidos, ou seja, 24 horas após a exposição à hipóxia, essa atividade já pode ter sofrido decréscimo, nos tecidos em que não se observou diferenças entre os tratamentos de normóxia e reoxigenação. Outra possibilidade é que a defesa antioxidante ainda pode estar atuando, naqueles tecidos em que se observou diferença significativa entre os tratamentos utilizados.

O fato da GPx ter mostrado diferenças na atividade entre as condições de oxigenação, sendo maior durante a reoxigenação, é um exemplo de que a defesa contra as ERO ocorreu, visto que a liberação de peróxido de hidrogênio pode ser uma condição potencialmente danosa por possibilitar a produção de EROs mais prejudiciais, como mencionado anteriormente.

Além disso, o período de duas horas de hipóxia pode não ter sido suficiente ao ponto de ocasionar um aumento na produção de ERO, quando os tecidos foram reoxigenados. Desta maneira, não podemos dizer que não houve liberação de ERO, porém, o tempo de exposição à hipóxia, seguido das 24 horas de oxigenação, pode não ter sido suficientemente estressante ao organismo a ponto de ocorrer uma liberação tão alta de ERO que necessitasse o recrutamento de todas as enzimas antioxidantes.

4.3. Avaliação da Peroxidação Lipídica (MDA)

Na tabela 3 encontram-se os resultados da avaliação de MDA em cada amostra tecidual, dos indivíduos em normóxia e em reoxigenação, nas diferentes temperaturas. Não houve diferença estatística na produção de MDA entre as temperaturas avaliadas no estudo, tanto nos animais em normóxia, quanto nos animais em reperfusão. Porém, foram observadas diferenças entre as condições de oxigenação no coração, fígado e pâncreas, sendo que, para todos os casos, a maior quantidade de MDA foi encontrada nos tecidos dos animais que sofreram reoxigenação, o que indica a existência de lesão celular.

Tabela 3: Média e erro padrão (EP) referente aos níveis de MDA quantificados nos tecidos avaliados nas temperaturas e condições experimentais. £: significância do teste para avaliação da peroxidação entre temperaturas de cada condição experimental; #: significância dos testes da análise da peroxidação entre normóxia e reoxigenação para cada temperatura avaliada. §: teste *t-Student*; *: teste *Mann-Whitney*. Nível de significância (p) <0,05, assinalado em negrito.

MDA (pmol/mg)	Coração (média±EP)		p£	Encéfalo (média±EP)		p£	Fígado (média±EP)		p£	Pâncreas (média±EP)		p£
Normóxia (n=10)	27°C	17°C	0,53 [§]	27°C	17°C	0,11*	27°C	17°C	0,25*	27°C	17°C	0,18 [§]
	5,07 ±0,24	4,64 ±0,62		59,59 ±15,87	27,65 ±6,25		10,07 ±4,24	15,33 ±3,57		13,63 ±1,37	19,67 ±3,87	
Reoxigenação (n=10)	27°C	17°C	0,07*	27°C	17°C	0,16 [§]	27°C	17°C	0,17*	27°C	17°C	0,22 [§]
	31,60 ±10,17	14,74 ±3,58		86,49 ±15,71	57,10 ±10,97		81,06 ±20,84	35,47 ±10,91		18,90 ±1,41	14,11 ±3,33	
p[#]	<0,01*	0,02*		0,26 [§]	0,07*		0,01*	0,07*		0,02[§]	0,30 [§]	

Com o objetivo de verificar se existe influência da temperatura (27°C e 17°C) associada à condição de oxigenação (normóxia e reperfusão) na peroxidação lipídica, foram realizados testes de ANOVA fatorial (*two-way ANOVA*).

Os resultados obtidos após essa análise demonstraram que, no coração ($p < 0,01$; $F = 11,48$) e fígado ($p < 0,00$; $F = 14,21$), a peroxidação lipídica não foi influenciada pela temperatura, mas sim pelas condições de oxigenação, resultando em um aumento na produção de MDA em reoxigenação, o que indica dano celular.

Quando os fatores temperatura e condição de oxigenação foram analisados separadamente, com ajuda de teste *t-Student* e *Mann-Whitney*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de MDA, no encéfalo. No entanto, ao testar a associação das condições experimentais, temperatura e oxigenação, notou-se que a produção de MDA neste tecido foi influenciada pela a condição normóxica em temperatura baixa ($p = 0,04$; $F = 4,82$), e pela condição de reoxigenação, em temperatura alta ($p = 0,03$; $F = 5,71$).

Ao unir os resultados obtidos pelos testes *t-Student/Mann-Whitney* e *two-way ANOVA*, podemos inferir que, apesar de os testes para duas amostras independentes não mostrar diferenças entre as condições de oxigenação, o teste *two-way ANOVA* mostrou que a ausência de oxigênio impactou a concentração de MDA no encéfalo, demonstrando que a alteração na disponibilidade de O_2 é capaz de alterar os valores de

MDA para esse tecido. No entanto, não é possível comprovar que a existência desse impacto tenha sido suficiente para ocasionar lesão nas células encefálicas, o que pode ser confirmado pela ausência de diferenças estatisticamente significativas quando testou-se as duas amostras (normóxia e reoxigenação).

A peroxidação lipídica é uma condição dependente da existência de O_2 como substrato. Como o O_2 é uma molécula apolar, sua solubilidade na porção lipídica da membrana é alta, o que faz com que a PO_2 na porção hidrofóbica seja maior que a PO_2 na porção aquosa do citosol (HERMES-LIMA et al., 2015).

Em nosso estudo, a maior produção de MDA foi observada em organismos expostos a reoxigenação, o que pode ser explicado pelo fato de ocorrer um aumento na formação de ERO pelas mitocôndrias, em especial $\bullet O_2^-$ e H_2O_2 , na reentrada de O_2 (HERMES-LIMA, 2004). Desta forma, a maior produção de MDA observada no coração, encéfalo e fígado, pode ser decorrente da reoxigenação, demonstrando que houve algum grau de lesão celular ocasionado após a hipóxia.

A avaliação da peroxidação lipídica, associada a respostas oferecidas pelo comportamento das enzimas antioxidantes, são capazes de fornecer explicações a alguns danos, ou a ausência deles, em células dos tecidos que se procurou estudar. Em geral, organismos em que a ação de agentes antioxidantes acontece em menor escala, são mais suscetíveis à peroxidação lipídica (DOYOTTE et al., 1997; COSSU et al., 2000).

Este não parece ser o caso de *P. geoffroanus* em relação a variações na temperatura, pois a atividade enzimática observada nos animais tratados em normóxia foi suficiente para atuar como forma de proteção, evitando altos níveis de peroxidação lipídica nos tecidos avaliados (Tabela 3).

Nos animais em reoxigenação, em que houve diferenças em comparação aos animais em normóxia, coração, fígado e pâncreas demonstraram que o dano celular existiu. Para o encéfalo, que não apresentou diferenças na formação de MDA entre normóxia e reoxigenação, esse resultado pode significar que a proteção conferida às células encefálicas foi eficiente, a ponto de impedir que a lesão ocorresse, ou, que o momento em que realizou-se a coleta dos tecidos foi demasiadamente curto, a ponto de o dano celular ocasionado pelas ERO não ter conseguido atingir as células encefálicas.

Os valores de peroxidação encontrados podem ser considerados inferiores em comparação a estudos realizados em mamíferos, e mostram-se semelhantes aos níveis encontrados em *T. s. elegans* (WILLMORE; STOREY, 1996; LI et al., 2010), demonstrando que, apesar de sofrer os danos, a proteção celular de *P. geoffroanus* aparenta ser suficiente ao ponto de evitar danos maiores, diferente de situações em que, por exemplo, a produção de MDA é 100x maior em situação de reoxigenação em comparação com normóxia, como observado em outros organismos (HERMES-LIMA et al., 2015).

Alguns tecidos são mais suscetíveis à peroxidação lipídica, como é o caso do encéfalo, para a maioria dos animais (LI et al., 2010). A privação de O₂ pode ser considerada uma situação catastrófica, especialmente para os mamíferos. A exigência de ATP das células cerebrais desse grupo, por unidade de tempo, é muito maior que a taxa na qual essas células são capazes de produzir ATP por vias aeróbicas (HILL et al., 2012). Quando há uma limitação na disponibilidade de O₂, a concentração de ATP nas células cerebrais decai rapidamente. Essa situação causa um desequilíbrio nas bombas iônicas dependentes de ATP, impossibilitando a polarização normal da membrana, o que ocasiona diversos danos, como, por exemplo, a incapacidade de produzir impulsos nervosos (HILL et al., 2012).

Quando vertebrados, como aves e mamíferos de respiração aérea, mergulham por longos períodos, há necessidade de recorrer à glicólise anaeróbia. Ocorre, então, uma subdivisão metabólica em seus corpos, de modo que as reservas de O₂ sejam preferencialmente distribuídas para o encéfalo, para que ele permaneça em catabolismo aeróbio (HILL et al., 2012).

No entanto, alguns répteis, como os quelônios, são capazes de tolerar anóxia em todo o seu organismo, incluindo o encéfalo, durante mergulhos prolongados. Eles utilizam a depressão metabólica do encéfalo para a manutenção da integridade desse tecido durante a privação de oxigenação. Para isso, as sinapses entre as células cerebrais são suprimidas na ausência ou limitação de O₂, e a atividade bioelétrica mediada por íons é reduzida, fazendo com que o cérebro permaneça “eletricamente silencioso” (HILL et al., 2012). Esse é o motivo pelo qual as tartarugas que mergulham por períodos prolongados deixam de ser comportamentalmente alertas (HILL et al., 2012),

atingindo um estágio de letargia, provavelmente semelhante ao ocorrido com *P. geoffroanus* durante a exposição à hipóxia, nesse experimento.

Devido a essa resposta, há uma diminuição no bombeamento de íons no cérebro e na polarização da membrana. A necessidade de ATP para manter a integridade do tecido é diminuída, o que permite que a glicólise anaeróbia atenda à quantidade de ATP necessária, evitando que as concentrações cerebrais de ATP caiam (HILL et al., 2012).

Além disso, uma variedade de mecanismos de proteção é ativada a nível molecular no encéfalo das tartarugas, incluindo aumento das proteínas *heat shock*, fatores anti-apoptóticos e antioxidantes (KRIVORUCHKO; STOREY, 2010). Isso condiz com a ideia de que a longevidade observada nos quelônios está diretamente relacionada à alta capacidade antioxidante presente nesses animais, que atua como proteção contra a peroxidação lipídica, o que significa que, provavelmente, existe uma relação entre a ação de enzimas antioxidantes e dano celular (LI et al., 2010; KRIVORUCHKO; STOREY, 2010).

Desta forma, conclui-se que, em *P. geoffroanus* submetidos à hipóxia, seguida de reoxigenação, a lesão celular decorrente da peroxidação lipídica ocorre em alguns tecidos, porém, em quantidades muito menores em comparação à outros animais submetidos ao mesmo tipo de situação (LI et al., 2010), o que refuta a ideia de que não haveria dano celular após o estresse, mas corrobora a hipótese de que o dano seria baixo, em comparação a outras espécies submetidas a condições semelhantes (STOREY, 1997).

Os resultados obtidos nesse trabalho, em relação à peroxidação lipídica e à atividade das enzimas antioxidantes, demonstram que, assim como outras espécies de quelônios, *P. geoffroanus* possui mecanismos fisiológicos e bioquímicos de defesa, capazes de auxiliar em situações de privação de oxigênio.

CONCLUSÃO

5. Conclusão

Apesar da atividade das enzimas antioxidantes ter sido maior em alguns tecidos dos animais expostos à reoxigenação, não pudemos corroborar a hipótese de que essa situação ocorreria em todos os tecidos dos animais expostos a essa condição.

A atividade das enzimas foi menor em temperaturas mais baixas, e maior na temperatura mais alta, na maioria dos tecidos em condição de normóxia. Porém, na reoxigenação, esse padrão não se repetiu. Desta forma, conclui-se que a atividade das enzimas pode ser influenciada pela temperatura quando o animal está em condições normais de oxigenação, porém, quando exposto ao estresse da privação de oxigênio, é essa a condição que mais influencia na atividade das enzimas avaliadas, e não só a temperatura.

Em relação à peroxidação lipídica, observou-se a existência de dano celular, em especial nos organismos expostos à reoxigenação. Porém, a proteção conferida pelas enzimas é eficiente, pois, apesar de existir a lesão, essa pode ser considerada baixa em *P. geoffroanus*. Sendo assim, refutamos a hipótese de que a proteção antioxidante seria capaz de impedir que o dano celular ocorresse, mas corroboramos a premissa de que a proteção seria eficiente a ponto de garantir que o dano fosse baixo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

- ABELE, D., PHILIPP, E., GONZALEZ, P.M., PUNTARULO, S. Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. **Front. Biosci.** 12, 933–946, 2007.
- ALMEIDA, E. A. et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. **Mar. Pollut. Bull.**, v.49, p.386 -392, 2004.
- ANTUNES, M. V. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 279-287, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.
- BAKER, J.E., FELIX, C.C., OLINGER, G.N., KALYANARAMAN, B. Myocardial ischemia and reperfusion — direct evidence for free-radical generation by electron-spin resonance spectroscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 85, 2786–2789, 1988.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: A manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, 1975.
- BOUTILIER, R.G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. **J. Exp.Biol.** 204, 3171–3181, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248 – 254, 1976.
- CARLBERG, I.; MANNERVICK, B. Glutathione reductase. **Method. Enzymol.**, v.113, p.484 - 490, 1985.
- CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS À AGRICULTURA.** A Classificação Climática de Koeppen para o Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>>. Acesso em: Maio de 2015.
- CHEN, K. et al. Energy budget, oxidative stress and antioxidant in striped hamster acclimated to moderate cold and warm temperatures. **Journal of Thermal Biology.** 44, 35–40. 2014.
- COMITÊ DA BACIA HIDROGRÁFICA TURVO/GRANDE, UNIDADE DE GERENCIAMENTO DE RECURSOS HÍDRICOS 15 (CBH-TG-UGRHI15).** Relatório de situação dos recursos hídricos 2014, UGRHI – Turvo/Grande. Disponível em:<<http://www.comitetg.sp.gov.br/cbhtg/downloads/relatorios-de->

situacao/category/31-ano-2014>, download de Relatório de Situação dos Recursos Hídricos 2014 da UGRHI 15 - Ano base 2013. Acesso em Junho de 2015.

COSSU, C., DOYOTTE, A., BABUT, M., EXINGER, A., VASSEUR, P. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Uniotumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. **Ecotoxicol. Environ. Safety** 45, 106–121, 2000.

DAMSGAARD, C.; STORZ, J.F.; HOFFMANN, F.G.; FAGO, A. Hemoglobin isoform differentiation and allosteric regulation of oxygen binding in the turtle, *Trachemysscripta*. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 305, R961–R967, 2013.

DOYOTTE, A., COSSU, C., JACQUIN, M.C., BABUT, M., VASSEUR, P. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. **Aquat. Toxicol.** 39, 93–110, 1997.

FEDER, M. E.; BURGGREN, W. W. Skin breathing in vertebrates. **Scientific American**. vol. 253, No. 5. 1985.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**. 43(1): 61-8, 1997.

FINCH, C.E. Update on slow aging and negligible senescence - a mini-review. **Gerontology**. 55:307-13, 2009.

GORR, T.A., GASSMANNA, M., WAPPNER, P. Sensing and responding to hypoxia via HIF in model invertebrates. **J. Insect Physiol.** 52, 349–364, 2006.

GORR, T.A. et al. Hypoxia tolerance in animals: biology and application. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.83, n.5, p.733 - 752, 2010.

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

GUIA BRASILEIRO DE BOAS PRÁTICAS PARA A EUTANÁSIA EM ANIMAIS, Material de Consulta do Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em: <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/images/ceua/guiabbp_eutan%C3%A1sia_animal.pdf> . Acessado em: Janeiro de 2016.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, ed. Oxford University, 1999.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comp. Biochem. Physiol. B**, 120, p.437-448, 1998.

HERMES- LIMA, M.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: **Protein Adaptations and Signal Transduction**, capítulo 20, pp.263- 287, 2001.

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

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. Em: Functional metabolism: regulation and adaptation** (ed. Storey, K. B., pp. 319-368. Hoboken. NJ. 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**. 89. 1122-1143. 2015.

HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. **Fisiologia Animal**. 2a. Ed. – Porto Alegre : Artmed. p.168-188. 2012.

HOCHACHKA, P.W.; LUTZ, P.L. Mechanism, origin and evolution of anoxia tolerance in animals. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.130B, p.435 - 459, 2001.

JACKSON, D.C. et al. Oxidative cost of breathing in the turtle *Chrysemys picta belli*. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.261, p. R2315-R1328, 2004.

JOANISSE, D.R.; STOREY, K.B. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze tolerant wood frog. **American Journal of Physiology**, v.271, R545-R553, 1996.

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.

KING, P.; HEATWOLE, H. Non-pulmonary respiratory surfaces of the chelid turtle *Elseya latisternum*, **Herpetologica**, v.50, p.262-265, 1994.

KRIVORUCHKO, A.; STOREY, K.B. Forever young: mechanisms of natural anoxia tolerance and potential links to longevity. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v.3., p.186 - 198, 2010.

KRIVORUCHKO, A.; STOREY, K.B. Turtle anoxia tolerance: Biochemistry and gene regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1850, 1188–1196, 2015.

LARSON, J. et al. No oxygen? No problem! Intrinsic brain tolerance to hypoxia in vertebrates. **The Journal of Experimental Biology**, v. 217, p.1024-1039, 2014.

LEVIN, L.A., EKAU, W., GOODAY, A.J., JORISSEN, F., MIDDELBURG, J.J., NAQVI, S.W.A., NEIRA, C., RABALAIS, N.N., ZHANG, J. Effects of natural and human-induced hypoxia on coastal benthos. **Biogeoscience**. 6, 2063–2098, 2009.

LI F., YANG Z., LU Y., WEI Y., WANG J., et al. Malondialdehyde suppresses cerebral function by breaking homeostasis between excitation and inhibition in turtle *Trachemys scripta*. **Plos One**, 5(12): e15325, 2010.

LUTZ, P.L.; MILTON, S.L. Negotiating brain anoxia survival in the turtle. **Journal of Experimental Biology**, v.207, p.3141 - 3147, 2004.

LUTZ, P.L.; PRENTICE, H.M.; MILTON, S.L. Is turtle longevity linked to enhanced mechanisms for surviving brain anoxia and reoxygenation? **Exp. Gerontol.** 38, 797–800, 2003.

MADSEN, J.G.; WANG, T.; BEEDHOLM, K.; MADSEN, P. T. Detecting spring after a long winter: coma or slow vigilance in cold, hypoxic turtles? **Biol. Lett.** v 9, p 1-5, 2013.

MELO, C.A.; MOREIRA, A.B.; BISINOTI, M.C. Perfil espacial e temporal de poluentes nas águas da represa municipal de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1436 - 1441, 2009.

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

MONAGHAN, P., METCALFE, N.B., TORRES, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. **Ecol. Lett.** 12, 75–92. 2009.

MUUSZE, B., MARCON, J., VAN DEN THILLART, G., ALMEIDA-VAL, V. Hypoxia tolerance of Amazon fish. Respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. **Comp. Biochem. Physiol. A** 120, 151–156, 1998

NELSON, D. L.; COX, M. C. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª. Ed. – Porto Alegre : Artmed. p.740 – 741. 2014.

NILSSON, G.E., LUTZ, P.L. Anoxia tolerant brains. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 24, 475–486, 2004.

NILSSON, G.E., ÖSTLUND-NILSSON, S. Hypoxia in paradise: widespread hypoxia tolerance in coral reef fishes. **Proc. R. Soc. B.** 271, S30–S33, 2004.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.11, p.1287–1312, 2001.

PAMENTER, M.E. et al. Endogenous GABAA and GABAB receptor-mediated electrical suppression is critical to neuronal anoxia tolerance. **PNAS**, v.108, n.27, p.11274- 11279, 2011.

RICHARDS, J.G. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. **J. Exp. Biol.** 214, 191–199, 2011.

SIES, H. et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Lett.**, v.103, p.287- 290, 1979.

SILVA, M. I. A. **Alterações hematológicas e bioquímicas em uma população de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) em resposta a estressores ambientais.** Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Jose do Rio Preto, 2011.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.29, p.1715- 1733, 1997.

STOREY, K.B. Reptile freeze tolerance: metabolism and gene expression. **Cryobiology** 52:1–16, 2006.

STOREY, K.B. Anoxia tolerance in turtles: metabolic regulation and gene expression. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.147A, p.263 - 276, 2007.

URSINI, F. et al. Diversity of glutathione peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.252, p.38-53, 1995.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxic. and Pharm.**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAQUER-SUNYER, R., DUARTE, C.M. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**.105, 15452–15457, 2008.

VENANCIO, L.P.R. et al. Assessment of condition factor and hepatosomatic index in *Phrynops geoffroanus* of the urban and controlled area. In: 1stIbero-American Meeting on Toxicology and Environmental Health, 2009.

VENANCIO, L.P.R. et al. Assessment of phase I and II of xenobiotic detoxification and somatic index associated with environmental interferences in *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) in the northwest region of Sao Paulo state, Brazil. In: **XI Congreso Luso-Español de Herpetología /XV Congreso Español de Herpetología**, v.1., p.184 -184, 2010.

VENANCIO, L.P.R. et al., Pollution-induced metabolic responses in hypoxia-tolerant freshwater turtles. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 2013.

VETTERLEIN, F., SCHRADER, C., VOLKMANN, R., NECKEL, M., OCHS, M., SCHMIDT, G., HELBIGE, G. Extent of damage in ischemic, non reperfused, and reperfused myocardium of anesthetized rats. **Am. J. Physiol.** 285, H755–H765, 2003.

VINAGRE, C. et al. Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the rock goby, *Gobius paganellus*. **Marine Environmental Research**, v.97, p.10-14, 2014.

VOGT, R. C. **Tartarugas da Amazônia**. 1ª Edição, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). 2008.

WALSHE, T.E., D'AMORE, P.A. The role of hypoxia in vascular injury and repair. **Annu. Rev. Pathol.** 3, 615–643, 2008.

WELKER, A.F. MOREIRA, D.C., CAMPOS, E.G., HERMES-LIMA, M. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. 165, 384–404, 2013.

WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. Glutathione systems and anoxia tolerance in turtles. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, v.273, p.219 - 225, 1997.

WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. Purification and properties of the glutathione S-transferase from the anoxia - tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. **FEBS Journal** , v.272, p.3602 - 3614, 2005.

ZWEIER, J.L., FLAHERTY, J.T., WEISFELDT, M.L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 84, 1404–1407, 1987.

APÊNDICES

Apêndice A – Protocolos para ensaios enzimáticos

Homogeneização de amostras teciduais

- 1) Pesar 150mg de amostra tecidual em eppendorf de 2mL
- 2) Pesar 0,00523g de PMSF e diluir em 1mL de etanol 100%
- 3) Adicionar 100 μ L de PMSF e etanol em 30mL de tampão Tris-HCl 0,2mM (pH7,5)
- 4) Homogeneizar com auxílio de um mixer as 150g de tecido e 600 μ L do tampão Tris-HCl 0,2mM (pH7,5) + PMSF
- 5) Centrifugar durante 20 minutos em 9000rcf, a 2°C
- 6) Separar sobrenadante em eppendorfs próprios para uso em centrífuga
- 7) Centrifugar por 1 hora em 50000rcf a 1°C
- 8) Separar o sobrenadante em alíquotas

Obs: Caso seja necessário diluir as amostras para os ensaios enzimáticos, fazê-lo adicionando tampão Tris-HCl 0,2mM (pH 7,5).

Ensaio espectrofotométrico para CAT

Tampão para Catalase: Pesar os seguintes sais juntos, adicionar os respectivos volumes de água ultrapura e regular o pH para 8,0.

Tris HCl 1M:

121,1g para vol. total de 1L

30,27g para vol. total de 250mL

6,055g para vol. total de 50mL

EDTA 5mM:

1M = 292,2g

5mM:

1,461 em vol. total de 1L

0,365g em vol. total de 250mL

0,07305g em vol. total de 50mL

Meio de Reação:

- 1) Adicionar 100 μ L de H₂O₂ (concentração 30%) em 100mL de água ultrapura, de modo que a molaridade seja igual a 10mM
- 2) Desta solução de H₂O₂ 10mM, retirar 10mL, para novamente ajustar a molaridade.
- 3) Adicionar 5mL de tampão de catalase aos 90mL restantes
- 4) Adicionar 4mL de água ultrapura

Ensaio	
Reativos	
Meio de reação	(990 – X) μ L
Amostra	X μ L

Leitura no espectrofotômetro: 240nm

Ensaio espectrofotométrico para GR

Reagentes:

Tampão PO_4^- 0,1M (pH7,0)

EDTA 1mM

GSSG 125mM

NADPH 6mM

Preparo dos Reagentes

Preparo do tampão PO_4^- 0,1M (pH7,0):

Monobásico (KH_2PO_4):

1M = 136,09g/L; precisa-se de 0,1M, portanto, 13,09g/L. Usa-se 6,804g desse composto no preparo de 1L de solução.

Dibásico (K_2PO_4):

1M = 174,2g/L; precisa-se de 0,1M, portanto, 17,42g/L. Usa-se 8,71g desse composto no preparo de 1L de solução.

Mistura-se os dois sais em um béquer com água ultrapura (aproximadamente 800mL). Ajusta-se a solução para pH7,0, e completando com água ultrapura até 1L.

EDTA 1mM:

Ajustar molaridade para 1mM. Se 1M de EDTA for igual a 372,24g/L, deve-se dividir esse valor pela metade, resultando em 0,186g para vol. total de 500mL.

GSSG 125mM:

Se o peso molecular for igual a 612,6, dissolve-se 76,58mg/mL no tampão PO_4^- .

Se o peso molecular for igual a 656,6, dissolve-se 82,08mg/mL no tampão PO_4^- .

NADPH 6mM:

Se o peso molecular for igual a 833,4, dissolve-se 5mg/mL em NaHCO_3 a 0,1%.

Ensaio	
Reativos	
Tampão PO_4^- + EDTA	(960 – X) μL
Amostra	X μL
GSSG	20 μL
NADPH	20 μL

Branco: 960 μL tampão PO_4^- + 20 μL de GSSG + 20 μL de NADPH

Leitura no espectrofotômetro: 340nm

Ensaio espectrofotométrico para GST

Reagentes:

Solução tampão fosfato de potássio 0,2M (pH 6,5)

GSH 200mM

CDNB 200mM

Solução tampão fosfato de potássio:

Para preparar 1L de tampão fosfato de potássio 0,2mol.L⁻¹ pH6,5, são necessários 13,605g de tampão fosfato monobásico + 17,42g de fosfato de potássio dibásico. Corrigir o pH e completar a solução para o volume final de 1L.

GSH:

Pesar 61,46mg e adicionar 1,0mL de solução tampão fosfato de potássio 0,2mol.L⁻¹ pH6,5.

CDNB:

Pesar 40,51mg e adicionar 1,0mL de etanol absoluto.

Ensaio	
Reativos	
Solução tampão fosfato de potássio	(980 – X)μL
Amostra	XμL
CDNB	10μL
GSH	10μL

Obs: Necessariamente nessa ordem.

Branco: Solução tampão fosfato de potássio 980μL + GSH 10μL + CDNB 10μL

Leitura no espectrofotômetro: 340nm

Ensaio espectrofotométrico para GPx

Reagentes:

Tampão PO_4^- 0,1M (pH7,0)

EDTA 0,005M (pH 7,0)

NADPH – 1,72mg em 10mL do meio de reação

Glutathione Redutase (GR) – 0,1U/ml em meio de reação

GSH – 3,2mg em 10mL do meio de reação

tBOOH

Preparo do Meio de Reação:

Tampão PO_4^- – 25mL

EDTA – 10mL

GR – 11 μ L

GSH – 0,016g

H_2O – 15mL

NADPH – 0,0086g

Preparo do tBOOH

(Peróxido de terbutila 0,5mM):

128 μ L em 10mL do tampão

Ensaio	
Reativos	
Meio de reação	(990 – X) μ L
Amostra	X μ L
tBOOH	10 μ L

Branco: 990 μ L de meio de reação + 10 μ L tBOOH

Leitura no espectrofotômetro: 340nm

Determinação Proteica (BRADFORD, 1976)

O reagente de Bradford pode ser utilizado para determinar a concentração de proteínas em soluções biológicas. O procedimento é baseado na formação de um complexo entre o corante e as proteínas da solução. O complexo proteína-corante provoca uma mudança no máximo de absorção do corante de 465nm para 595nm, quando a ligação à proteína ocorre. A quantidade de absorção é proporcional à quantidade da proteína presente, e essas interações estabilizam a forma aniônica do corante, provocando uma mudança de cor visível (marrom para azul). O reagente de Bradford não exige diluição e é apropriado para ensaios padrões.

Para estabelecer a curva padrão da dosagem utilizam-se cinco concentrações de Bradford com BSA (albumina bovina):

- 1: 995 μ L do Reagente Bradford com 5 μ L de BSA.
- 2: 990 μ L do Reagente Bradford com 10 μ L de BSA.
- 3: 985 μ L do Reagente Bradford com 15 μ L de BSA.
- 4: 980 μ L do Reagente Bradford com 20 μ L de BSA.
- 5: 975 μ L do Reagente Bradford com 25 μ L de BSA.

Processo:

- 1) Adicionar 990 μ L do Reagente Bradford + 10 μ L de amostra
- 2) Homogeneizar para começar a reação entre o corante e as proteínas, então, deixar aproximadamente 20 minutos no escuro
- 3) Após este período é realizada a leitura no espectofotômetro a 595 nm.

A partir da curva padrão de absorbância determinada, são estabelecidas as quantificações proteicas das amostras, em quantidade de proteína/amostra, considerando no cálculo o fator de diluição. Posteriormente, a taxa de variação da absorbância analisada nos ensaios de cada enzima (CAT, GR, GST e GPx), é relacionada com a quantificação protéica, resultando no valor da atividade enzimática.

Preparo das amostras para MDA

Preparo do TBA:

Dissolver 0,04g de ácido tiobarbitúrico em 10mL de HCl 0,2M

Preparo da Curva de Calibração:

- Adicionar 1,65µL de tetrametoxipropano (TMP) em 1mL de água ultrapura e agitar bem utilizando vórtex
- Diluir 10µL dessa solução em 990µL de água ultrapura e agitar novamente
- Diluir essa solução final seguindo as seguintes concentrações:

Concentração (nmol/ml)	Volume de solução (µL)	Volume de tampão (µL)	Volume de sol. TBA (µL)
0,5	5	295	300
1,0	10	290	300
1,5	15	285	300
2,0	20	280	300
2,5	25	275	300

Preparo da amostra:

- Pesar cerca de 100mg de tecido
- Adicionar 300µL de tampão Tris HCl 0,1M (pH8,0)
- Homogeneizar utilizando mixer
- Acrescentar 300µL da solução de TBA
- Deixar as amostras e as soluções da curva de calibração em banho-maria por 40 minutos 90°C
- Após as amostras e as soluções da curva de calibração resfriarem um pouco (podem ser colocadas no gelo por alguns minutos), adicionar 1mL de álcool n-butílico e agitar utilizando vórtex
- Centrifugar durante 5 minutos a 5000rpm, em temperatura de 4°C.

Anexo A – Autorização IBAMA/SISBIO para realização de atividade com finalidade científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 37360-1	Data da Emissão: 10/09/2013 19:02	Data para Revalidação*: 10/10/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Larissa Paola Rodrigues Venancio	CPF: 326.516.068-80
Título do Projeto: Caracterização molecular e bioquímica de sistemas de biotransformação e defesas antioxidantes associados ao suporte à hipóxia e sua relação com a adaptação a ambientes contaminados	
Nome da Instituição : UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO	CNPJ: 48.031.918/0011-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Desenho de oligonucleotídeos iniciadores degenerados	05/2013	09/2013
2	Coleta de animais para piloto - 5 animais	09/2013	10/2013
3	Amplificação rápida de cDNAs	10/2013	12/2013
4	Clonagem e sequenciamento de cDNAs	10/2013	03/2014
5	Estipulação do tempo de submersão - piloto	11/2013	11/2013
6	Coleta de animais, experimentos e coleta de tecidos	11/2013	01/2014
7	Extração de RNA e síntese de cDNA	01/2014	02/2014
8	Análise bioquímica para avaliação da atividade de detoxificação, capacidade antioxidante, peroxidase	03/2014	10/2014
9	Expressão de mRNA	06/2014	07/2014
10	Análise de bioinformática - modelagem proteica	07/2014	10/2014
11	Análise estatística dos dados	07/2014	10/2014
12	Entrega relatório para agência de fomento - FAPESP	11/2014	12/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Claudia Regina Bonini Domingos	Docente responsável - pesquisador	042.642.068-39	7609225 SSP-SP	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 32171922



Página 1/4

Anexo A – Autorização IBAMA/SISBIO para realização de atividade com finalidade científica

		Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO	
Autorização para atividades com finalidade científica			
Número: 37360-1	Data da Emissão: 10/09/2013 19:02	Data para Revalidação*: 10/10/2014	
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.			
Dados do titular			
Nome: Larissa Paola Rodrigues Venancio		CPF: 326.516.068-80	
Título do Projeto: Caracterização molecular e bioquímica de sistemas de biotransformação e defesas antioxidantes associados ao suporte à hipóxia e sua relação com a adaptação a ambientes contaminados			
Nome da Instituição : UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO		CNPJ: 48.031.918/0011-04	
2	Vinicius Augusto Gobbe Mochetta	Boisista técnico - pesquisador	368.971.228-90
3	Tiago Lucena da Silva	Doutorando - pesquisador	329.812.378-10
4	Nathalia Rossigalli Alves Costa	graduanda em ciências biológicas - pesquisador	411.003.468-05
5	Jéssica Basilio Bacchi	aluna de graduação em química ambiental - pesquisador	386.195.948-85
6	Maria Isabei Afonso da Silva	Doutoranda - pesquisador	074.584.676-90
7	Vanessa Leiko Oikawa Cardoso	graduanda em ciências biológicas - pesquisadora	381.122.298-80
Locais onde as atividades de campo serão executadas			
#	Município	UF	Descrição do local
1	SAO JOSE DO RIO PRETO	SP	no Preto, córrego Piedade, córrego Felicidade
Atividades X Táxons			
#	Atividade	Táxons	
1	Captura de animais silvestres in situ	Phrynos geoffroanus	
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Phrynos geoffroanus	
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Phrynos geoffroanus (*Qtde: 40)	
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Phrynos geoffroanus	
* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.			
Material e métodos			
1	Amostras biológicas (Répteis)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão	
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas ("Box Trap/Tomahawk/Sherman"), Puçã	
Destino do material biológico coletado			
#	Nome local destino	Tipo Destino	
1	UNESP CAMPUS S.J. R. PRETO		
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).			
Código de autenticação: 32171922			
		Página 2/4	

Anexo B – Documento de aprovação para experimentação animal pela Comissão de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

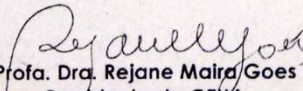
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Caracterização molecular e bioquímica de sistemas de biotransformação e defesas antioxidantes associados ao suporte à hipóxia e sua relação com a adaptação a ambientes contaminados**" (protocolo nº. 070/2013 - CEUA), sob responsabilidade da Professora Doutora Claudia Regina Bonini Domingos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais deste Instituto, em reunião de 19 de fevereiro de 2013.

CERTIFICATE

We certify that the research project entitled "**Molecular characterization and biochemical systems biotransformation and antioxidant defenses associated with support to hypoxia and its relation to adaptation to environments contaminated**" (protocol no. 070/2013 - CEUA), under the responsibility of Professor Claudia R. Bonini Sundays, conforms to the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Ethics Committee on Animal Use of this Institute, at a meeting of February 19, 2013.

São José do Rio Preto, 19 de fevereiro de 2013.


Prof. Dra. Rejane Maira Goes
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – STAEPE
Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth
CEP 15054-000 São José do Rio Preto - SP - Brasil
Tel 17 3221 2545 fax 17 3221 2500
E-mail: soratafr@ibilce.unesp.br e ceua@ibilce.unesp.br

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 18/03/2016.

Assinatura do autor