



CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Avaliação hematológica e metabólica de *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) submetidos à hipóxia.

Camila Zucchini de Souza

MESTRADO



PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL

Biologia
Estrutural



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Camila Zucchini de Souza

Avaliação hematológica e metabólica de *Phrynops geoffroanus* (Testudines:
Chelidae) submetidos à hipóxia.

São José do Rio Preto - SP
2018

Camila Zucchini de Souza

Avaliação hematológica e metabólica de *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) submetidos à hipóxia.

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

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Yamakami Camilo

São José do Rio Preto - SP
2018

Souza, Camila Zucchini de.

Avaliação hematológica e metabólica de *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae) submetidos à hipóxia / Camila Zucchini de Souza. – São José do Rio Preto, 2018
76 f. : il., tabs.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Coorientador: Rodrigo Yamakami Camilo

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

1. Biologia de água doce. 2. Quelônio. 3. Hematologia. 4. Hipóxia. 5. Metabolismo energético. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 598.13

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

Camila Zucchini de Souza

Avaliação hematológica e metabólica de *Phrynops geoffroanus*
(Testudines: Chelidae) submetidos à hipóxia.

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

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Yamakami Camilo

Comissão Examinadora:

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

Prof^ª. Dr^ª. Maria Isabel Afonso da Silva
Universidade Federal do Acre (UFAC) - Campus Floresta

Prof. Dr. Eduardo de Almeida Alves
Fundação Universidade Regional de Blumenau

São José do Rio Preto – SP
27 de fevereiro de 2018

**Este trabalho foi desenvolvido junto ao Centro de Estudos de Quelônios (CEQ) /
Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH),
Departamento de Biologia, 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 FAPERP.**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Solange** e **Marquinho**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Solange e Marquinhos, por toda paciência e fé depositada em mim desde o período de graduação e que me ajudaram sem hesitar na realização dos meus sonhos profissionais.

Aos meus avós Maria e Marcos, por todo suporte, amor e confiança.

Às famílias Zucchini e Rotondo, tios e tias, primos e primas por todo auxílio e me fazer lembrar em todas as idas para Araraquara o verdadeiro significado da palavra família.

Ao meu namorado e melhor amigo, Bruno, pela paciência, companheirismo e amor em todas as situações, sejam elas boas, ruins ou até mesmo desafiadoras.

Aos meus amigos de Araraquara, em especial Ari, Ana, Gabi e Camilinha, por cada encontro acolhedor de risadas e desabafos.

As amigas da RepubiZoo que conviveram um ano comigo durante minha jornada em São José do Rio Preto, Ana Marina, Jessiquiane e Mari! Obrigada por cada choconhaque, festas, café e bolinhos de cenoura e limão.

Às minhas companheiras e parceiras, Gabi e Mini, que me aturaram desde o início do estágio no laboratório em 2011 até o fim do mestrado e hoje se tornaram mais do que parceiras de laboratório, são irmãs que posso contar em qualquer momento.

E um agradecimento em especial a Gabi, por cada desabafo e cada café filosófico que ocorria no Gil em um momento de crise, cada risada e cada ajuda em todo esse período que permaneci no CEQ.

Aos amigos e parceiros de laboratório do LHGDH/CEQ, em especial às capivaras Gabriela, Mugs, Letícia Orlandini, Letícia Sybuia, Nayara, Patrícia e Gabriel, obrigada por cada momento!

Agradeço também aos pesquisadores que se tornaram exemplos de profissionais e pessoas: Florindo, Queixo, Lari e Eduardo. Obrigada por todo o apoio, ensinamento, auxílio nas análises, conversas e cada discussão durante esse período, esses momentos foram primordiais para finalização do meu mestrado.

Ao meu orientador Rodrigo, que mais do que ninguém cultivou a paciência em me ensinar e me acompanhou e auxiliou desde o primeiro ano de graduação. Agradeço por compartilhar cada ensinamento e por me guiar quando tinha infinitas dúvidas.

A minha querida orientadora Claudia, por ter me aceitado desde 2011 em seu laboratório, por me ensinar muito do que sei e por depositar sua confiança em mim. Obrigada pelo apoio de sempre e principalmente na fase de reta final do mestrado, serei eternamente grata.

Agradeço a todos os profissionais que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional, em especial aos professores que me acompanharam durante a graduação no IF – Campus Barretos: Claudia Z., Rodrigo Yamakami, Alessandra, Anna Isabel, Marcão, Rodrigo Zieri e aos professores do IBILCE/UNESP que estiveram presentes em minha formação de mestre: Florindo, Bonilla, Classius, Lilian, Eliane, Eduardo.

À CAPES e à FAPERP pelo suporte financeiro durante o período.

E agradecer ao IBILCE/UNESP por me acolher de braços abertos e me permitir realizar o sonho de ser mestre!

Resumo

A espécie *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae), como outras espécies de quelônios dulcícolas, é considerada hipóxia-tolerante. Esses animais possuem diversos mecanismos que permitem tolerância a ambiente com pouca ou nenhuma oxigenação. O objetivo deste estudo consistiu em avaliar alterações na série vermelha e nas concentrações de intermediários energéticos em tecidos sanguíneo, hepático e muscular esquelético e cardíaco em hipóxia induzida. Os espécimes coletados em São José do Rio Preto-SP foram divididos em dois grupos: Normóxia, em que os animais tiveram acesso livre à superfície para respirarem e Hipóxia, no qual uma tela foi colocada abaixo do nível da água impedindo acesso dos indivíduos à superfície para respirarem, durante cinco horas. Houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos, no qual os valores de hematócrito, concentração de hemoglobina, VGM e HGM aumentaram em Hipóxia, o hematócrito possivelmente aumenta como consequência da desidratação ou aumento do VGM, a hemoglobina aumenta a fim de tornar o transporte de oxigênio mais efetivo aos tecidos, o VGM e HGM salientam a adaptação do animal por meio do aumento do volume celular e aumento de hemoglobina no eritrócito. Em relação ao metabolismo, houve diferença nas concentrações de glicose e lactato nos três tecidos, glicogênio muscular e aminoácidos plasmáticos, sendo as maiores concentrações na condição de hipóxia. A hipóxia reflete diretamente na baixa taxa de glicogênio e alta taxa de glicose na musculatura, realizando assim, glicogenólise, também é constatada altas concentrações de lactato, no qual devido à ausência do oxigênio, faz com que as células musculares realizem fermentação láctica para produção de ATP. Com o intuito de diminuir a acidose láctica, o alto teor de lactato é lançado no sangue, e este é direcionado às células hepáticas, sendo convertida em glicose pela gliconeogênese, lançada na corrente sanguínea para ser disponibilizada aos tecidos, constituindo o Ciclo de Cori. A alta concentração de aminoácidos plasmática pode ocorrer por hidrólise proteica, sendo utilizados como substrato de gliconeogênese ou lesão tecidual. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a espécie possui manutenção de reservas de combustíveis fermentáveis no organismo, para que seja possível realizar metabolismo anaeróbico e gliconeogênese, em privação de oxigênio.

PALAVRAS-CHAVE: hipóxia, hematologia, metabolismo energético, *Phrynops geoffroanus*.

Abstract

The species *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae), like other species of freshwater turtle, is considered hypoxia-tolerant. These animals have several mechanisms that allow tolerance to the environment with little or no oxygenation. The objective of this study was to evaluate alterations in the blood count and the concentrations of energetic intermediates in tissues blood, hepatic and skeletal and cardiac muscle induced hypoxia. The specimens collected in São José do Rio Preto-SP were divided into two groups: Normóxia, in which the animals had free access to the surface to breathe and Hypoxia, in which a screen was placed below the water level, preventing individuals from reaching the surface to breathe for five hours. There was a difference ($p < 0.05$) between the groups, in which hematocrit, hemoglobin, VGM and HGM levels increased in Hypoxia, hematocrit possibly increased as a consequence of dehydration or increase of VGM, hemoglobin increases in order to rendering oxygen transport more effective to tissues, VGM and HGM emphasize the adaptation of the animal by increasing cell volume and increasing erythrocyte hemoglobin. Regarding metabolism, there were differences in glucose and lactate concentrations in the three tissues, muscle glycogen and plasma amino acids, with the highest concentrations in the hypoxia condition. Hypoxia directly reflects the low glycogen ratio and high glucose rate in the muscles, thus, glycogenolysis is also observed. High concentrations of lactate are also observed, due to the absence of oxygen, causing the muscle cells to perform lactic fermentation for the production of ATP. In order to decrease lactic acidosis, the high lactate content is released into the blood and is directed to the liver cells. It is converted to glucose by gluconeogenesis, which is released into the bloodstream to be made available to the tissues, constituting the Cori cycle. The high concentration of plasma amino acids can occur by protein hydrolysis, being used as substrate of gluconeogenesis or tissue injury. Based on the results obtained, it is concluded that the species has maintenance of reserves of fermentable fuels in the body, so that it is possible to perform anaerobic metabolism and gluconeogenesis, in oxygen deprivation.

KEY WORDS: hypoxia, hematology, energetic metabolism, *Phrynops geoffroanus*.

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxo sanguíneo através do coração de répteis não crocodilianos, destacando o desvio D-E.	19
Figura 2: Ação da enzima Glicogênio Fosforilase, que remove resíduos de glicose da extremidade não redutora da cadeia de glicogênio, obtendo como produto glicose-1-fosfato.	21
Figura 3: Reação catalisada pela fosfoglicomutase, cujo produto final é a glicose-6-fosfato.	22
Figura 4: Resumo da via da glicogenólise, em que a Glicose6fosfato pode ser encaminhada para a glicólise, ocorrendo economia de um ATP.	22
Figura 5: Esquema do Ciclo de Cori.	24
Figura 6: Espécime <i>Phrynos geoffroanus</i>	25
Figura 7: Cinco animais do grupo em normóxia com acesso livre à superfície, respirando normalmente.	31
Figura 8: Cinco animais do grupo em hipóxia com tela abaixo do nível da água, impedindo o acesso dos animais à superfície.	31
Figura 9: Bombeamento de nitrogênio gasoso nos tanques com o intuito de garantir a diminuição da concentração de O ₂ dissolvido na água.	32
Figura 10: Fluxograma com a descrição dos experimentos que foram realizados com 10 espécimes de <i>P. geoffroanus</i> , demonstrando quantos animais foram utilizados em normóxia e hipóxia e o que foi avaliado.	33
Figura 11: Local de coleta da amostra biológica sanguínea.	34
Figura 12: Fórmulas para calcular os índices hematimétricos.	35
Figura 13: Ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) na conversão de piruvato a lactato ou o inverso conforme necessidades celulares.	46
Figura 14: Resumo do Ciclo Glicose-Alanina.	49
Figura 15: Resumo da via metabólica de <i>Phrynos geoffroanus</i> durante hipóxia induzida.	51
Figura 16: Cartão de referência microhematócrito.	63
Figura 17: Imagem macroscópica da câmara de Neubauer, onde é realizada a contagem de eritrócitos. A contagem é realizada pelo quadrante central nos cinco quadrados em destaque.	65

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores hematológicos da série vermelha de <i>P. geoffroanus</i> em condições de normóxia e hipóxia.	40
Tabela 2: Valores dos intermediários do metabolismo energético plasmático de <i>P. geoffroanus</i> em condições de normóxia e hipóxia.	42
Tabela 3: Valores dos intermediários do metabolismo energético plasmático de <i>P. geoffroanus</i> em condições de normóxia e hipóxia.	43

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATP	Adenosina Trifosfato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHGM	Concentração da Hemoglobina Globular Média
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
dL	Decilitro
DP	Desvio Padrão
D-E	Direita-Esquerda
FAPERP	Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
fL	Fentolitro
g	grama
H⁺	Íons de Hidrogênio
HGM	Hemoglobina Globular Média
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
KCl	Cloreto de potássio
kg	Kilograma
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
LDH	Lactato-desidrogenase
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmoL	Milimol
mM	MiliMolar
Nº	Número
nm	Nanômetro
O₂	Oxigênio molecular
pH	Potencial Hidrogeniônico
pG	Picograma
Ref.	Referência

rpm	Rotação Por Minuto
µg	Micrograma
µmol	Micromol
V	volts
VGM	Volume Globular Médio
x10³	Número em notação científica
®	Produto registrado
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
<	valor menor

Sumário

1	Introdução	17
1.1	Hipóxia	17
1.2	Fisiologia e a condição de hipóxia.....	18
1.3	Metabolismo em condição de hipóxia	20
1.4	O quelônio dulcícola <i>Phrynops geoffroanus</i>	24
2	Objetivos	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	Material e Métodos	30
3.1	Coleta e alocação dos animais	30
3.2	Experimentos em normóxia e hipóxia	30
3.3	Coleta de Sangue Periférico e Análise de Hemograma Completo.....	33
3.4	Coleta dos Tecidos e Avaliação da Atividade Metabólica	35
3.5	Análise Estatística.	38
4	Resultados e Discussão	40
4.1	Análises dos parâmetros hematológicos relacionados à série vermelha	40
4.2	Análise dos parâmetros metabólicos energéticos	42
5	Conclusões:.....	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
	APÊNDICES	62
	Apêndice A – Protocolos para análises hematológicas	63
	Apêndice B – Protocolos para análises metabólicas	67
	ANEXOS.....	75
	Anexo A – Autorização IBAMA/SISBIO para realização de atividade com finalidade científica	76
	Anexo B – Documento de aprovação para experimentação animal pela Comissão de Ética no Uso de Animais – IBILCE/UNESP.....	78

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Hipóxia

Variações na disponibilidade de oxigênio são comuns em diversos ambientes, incluindo os aquáticos (RICHARDS, 2011). Um ambiente aquático pode ser considerado normóxico quando os níveis de oxigênio encontram-se em torno de 80% (aproximadamente 6 mg de O₂ L⁻¹ a 25°C), e hipóxico quando os níveis atingem aproximadamente 30%, correspondendo a 2 mg L⁻¹ de O₂ (MUUSZE et al, 1998; WELKER et al., 2013), gerando uma situação de escassez de oxigênio que, como consequência, pode ocasionar hipóxia tecidual (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

Um exemplo de ambiente aquático que apresenta grande variação das concentrações de oxigênio é o rio Preto, que por receber grande quantidade de efluentes domésticos *in natura* das cidades de seu entorno é considerado um ambiente eutrofizado, apresentando elevados níveis de degradação. Estudos realizados nos corpos d'água deste rio, que pertence à Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande, demonstraram que a máxima concentração de oxigênio dissolvido foi igual a 1,7mg L⁻¹, sendo insuficiente para manter a qualidade da vida aquática (MELO; MOREIRA; BISINOTI, 2009; CAMPANHA, 2010).

Diversos animais estão sujeitos a diferentes estressores ambientais que intensificam a depleção de oxigênio, como congelamento de superfícies, desidratação, estivação e eutrofização (MOREIRA et al., 2017). A grande maioria dos animais é capaz de sobreviver a certo grau de hipóxia, no entanto, alguns apresentam maior resistência à ambientes com baixa concentração de oxigênio em comparação a outros (HOCHACHKA; LUTZ, 2001). Como exemplo de animais resistentes à depleção de oxigênio podemos citar os quelônios, que assim como outros vertebrados, são animais aeróbicos que dependem do gás oxigênio para preservar seu funcionamento celular, mas que em baixas concentrações de oxigênio, conseguem manter um nível mínimo de atividade metabólica (JACKSON, 2000). Isto é possível devido a mecanismos bioquímicos, hematológicos, fisiológicos e comportamentais que permitem sua

sobrevivência em situações de baixa pressão de oxigênio (MOREIRA et al., 2017; BICKLER; BUCK, 2007), tornando-os importantes organismos de estudo.

Há um conjunto de adaptações que tornam efetivas as estratégias de defesa à hipóxia, produzindo um estado profundo de hipometabolismo (HOCHACHKA; LUTZ, 2001), que reduz a demanda de energia e limita a utilização das reservas de substrato, bem como o acúmulo de metabólitos tóxicos (HICKS; WANG, 2004).

Um exemplo de estratégia consiste no aumento da afinidade da hemoglobina pelo O₂, elevada capacidade antioxidante e níveis elevados de reservas de glicogênio (FRASER et al., 2006; CHEN et al., 2013; LUTZ; MILTON, 2004; VENANCIO et al., 2009; 2010; 2013).

1.2 Fisiologia e a condição de hipóxia.

O hemograma é um método de estudo que possibilita avaliar condições específicas do animal, como anemia, doenças inflamatórias, parasitemias e distúrbios hematopoiéticos (FALCE, 2009).

Variações sazonais e fatores como temperatura, fotoperíodo e estressores ambientais, como a eutrofização, podem afetar vertebrados ectotérmicos, modificando sua fisiologia e afetando diretamente os parâmetros hematológicos (SOUZA, 2004; PITOL et al., 2008).

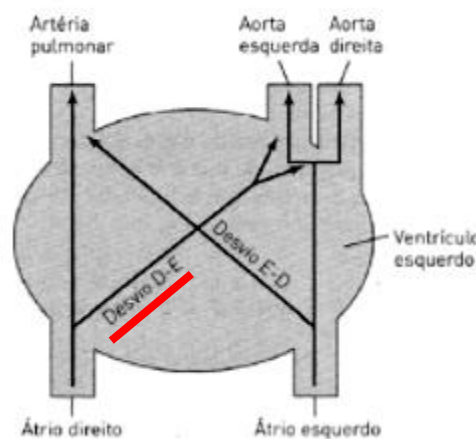
Segundo Moyes e Schulte (2010), o aumento do hematócrito e da hemoglobina elevam a concentração de oxigênio no sangue e auxiliam os espécimes a sobreviver em períodos críticos de privação de oxigênio. Vertebrados também utilizam ajustes cardiovasculares que contribuem na oxigenação adequada aos tecidos durante períodos de disponibilidade limitada de oxigênio, por meio da modulação de seu fornecimento aos tecidos (HOCHACHKA et al., 1996; HOCHACHKA; LUTZ, 2001).

Dentre os vertebrados, os répteis aquáticos comumente submetem-se à hipoxia e sofrem reduções na concentração de O₂ pulmonar e no sangue durante a respiração associada ao mergulho prolongado (HICKS; WANG, 2004). Sabe-se que, em tartarugas que mantêm suas atividades metabólicas sob condições anóxicas, a concentração de oxigênio disponível para sua sobrevivência é apenas a que se encontra dentro de seu organismo (FUSTER et al., 1997), caracterizando um estado de hipoxemia, condição

natural entre os quelônios, em que há menos oxigênio circulando na corrente sanguínea (HICKS; WANG, 1999).

Em quelônios, a hipoxemia ocorre em virtude de sua anatomia cardíaca, em que o ventrículo não dividido permite a mistura de sangue venoso sistêmico altamente regulado, denominado desvio D-E (direita para a esquerda) (Figura 1), no qual certa quantidade de sangue venoso, com pouco oxigênio, desvia da circulação pulmonar e entra novamente na circulação sistêmica, onde há sangue pouco oxigenado pelo corpo (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 2000; MOYES; SCHULTE, 2010). Assim, o sangue pobre em oxigênio desvia dos pulmões e, por conta disso, não se torna oxigenado, resultando em hipoxemia arterial e redução no fornecimento de oxigênio aos tecidos (HICKS; WANG, 2004). Esse desvio altera a concentração de O₂ arterial sem depender dos pulmões, desviando sangue do circuito pulmonar para o circuito sistêmico durante o mergulho, evitando a perfusão do pulmão inativo (MOYES; SCHULTE, 2010; HICKS; WANG, 2012). Esse mecanismo é importante por regular e tornar efetiva a distribuição de oxigênio aos tecidos, especialmente quando se necessita de elevadas quantidades de oxigênio (HICKS; WANG, 2012). Sendo assim, os mesmos regulam a distribuição de oxigênio de acordo com suas necessidades metabólicas (WANG; KROSNIUNASI; HICKS, 1997, 2001).

Figura 1: Fluxo sanguíneo através do coração de répteis não crocodilianos, destacando o desvio D-E.



Fonte: MOYES; SCHULTE, 2010.

Alguns autores acreditam que a respiração bimodal em peixes surgiu como auxílio para sobrevivência em condições de hipóxia aquática (JUNK et al., 1983; CARTER, 1957; JOHANSEN, 1970). A mesma hipótese pode ser considerada para os quelônios dulcícolas resistentes a hipóxia, como é o caso de *Phrynops geoffroanus*, que possui respiração prioritariamente pulmonar, entretanto podem utilizar estruturas extrapulmonares que absorvem o oxigênio do ambiente, como por exemplo, respiração cloacal, quando necessário.

1.3 Metabolismo em condição de hipóxia

Quando animais hipóxia-tolerantes são confrontados com grave privação de oxigênio, há duas respostas possíveis em suas vias metabólicas. Uma delas consiste em diminuir as atividades metabólicas, até que seja possível o retorno de oxigênio; a outra, consiste na situação em que o animal permanece ativo e seu metabolismo é sustentado por vias anaeróbicas de transformação de energia (LUTZ; NILSSON, 1997).

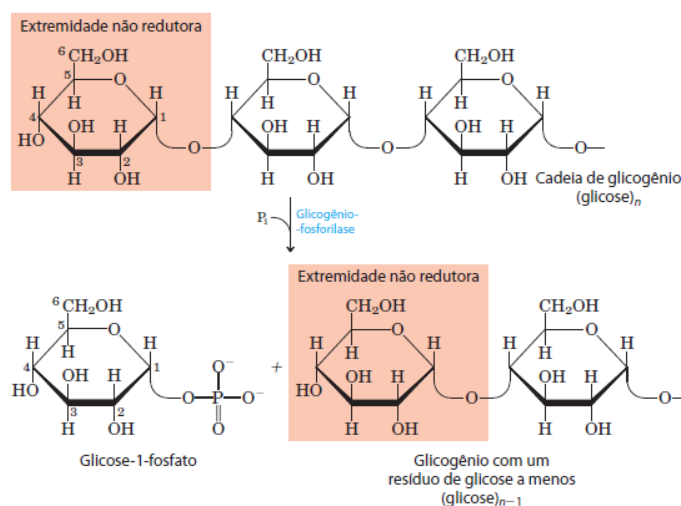
Diversas adaptações bioquímicas, como modificações epigenéticas e moleculares, alterações no metabolismo redox, hipometabolismo e utilização de vias anaeróbicas são conservadas entre animais que toleram baixa disponibilidade de oxigênio (BIGGAR; STOREY, 2015; STAPLES; BUCK, 2009; STOREY; STOREY, 2012). A utilização de vias anaeróbicas em organismos que se encontram em privação de oxigênio é uma importante estratégia, no qual os tecidos com elevada concentração de glicogênio, como os tecidos hepático, cardíaco e muscular esquelético, são utilizados como substrato para a glicólise anaeróbica (LUTZ, 1992; LUTZ; NILSSON; PRENTICE, 2003; LUTZ & MILTON, 2004).

O tecido muscular cardíaco, em condições ideais de oxigênio, oxida preferencialmente ácidos graxos e raras vezes carboidratos (DRIEDZIC; GESSER, 1994; STANLEY, et al. 2005). Entretanto, esse tecido possui alta plasticidade metabólica, e assim, utiliza o substrato metabólico para produção de ATP mais apropriado de acordo com a condição fisiológica que está submetido (TAEGTMEYER et al. 2005).

Duas importantes vias nessas condições são a glicólise e a glicogenólise. A glicólise é considerada uma via custosa de fornecimento de apenas duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) por molécula de glicose e pode ser utilizada em condições aeróbicas e anaeróbicas (NELSON; COX, 2011), enquanto que a via da glicogenólise degrada glicogênio permitindo rápida obtenção de unidades de glicose para produção de ATP por glicólise anaeróbica (LUTZ; MILTON, 2004; NELSON; COX, 2011).

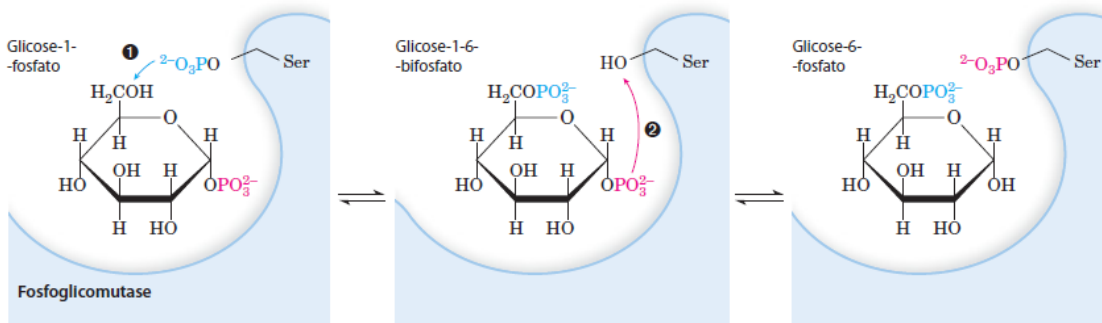
A enzima hexoquinase, pertencente à via glicolítica, necessita de uma molécula de ATP para converter glicose em glicose-6-fosfato. No entanto quando a molécula de glicose é proveniente da glicogenólise, ou seja, degradação de glicogênio tecidual, a enzima hexoquinase não é necessária, pois na glicogenólise a enzima glicogênio fosforilase remove resíduos de glicose da extremidade não redutora da cadeia de glicogênio, obtendo como produto glicose-1-fosfato (Figura 2), que posteriormente é convertida em glicose-6-fosfato pela fosfoglicomutase (Figura 3). A glicose-6-fosfato pode então ser direcionada para a via glicolítica (como ocorre no músculo) e poupar um ATP à via, ou ser convertida à glicose no fígado, caracterizando a gliconeogênese (NELSON; COX, 2014; VOET; VOET, 2006; MOYES; SCHULTE, 2010), para ser disponibilizadas para células de outros tecidos.

Figura 2: Ação da enzima Glicogênio Fosforilase, que remove resíduos de glicose da extremidade não redutora da cadeia de glicogênio, obtendo como produto glicose-1-fosfato.



Fonte: NELSON; COX, 2014.

Figura 3: Reação catalisada pela fosfoglicomutase, cujo produto final é a glicose-6-fosfato.



Fonte: Fonte: NELSON; COX, 2014.

Sendo assim, a glicose obtida a partir dos estoques de glicogênio produz três ATP, diferentemente da glicose obtida por outras vias que produz dois ATP por conta da ação da enzima hexoquinase que requer utilização de um ATP (Figura 4) (NELSON; COX, 2011; VOET; VOET, 2006; MOYES; SCHULTE, 2010).

Figura 4: Resumo da via da glicogenólise, em que a Glicose6fosfato pode ser encaminhada para a glicólise, ocorrendo economia de um ATP.



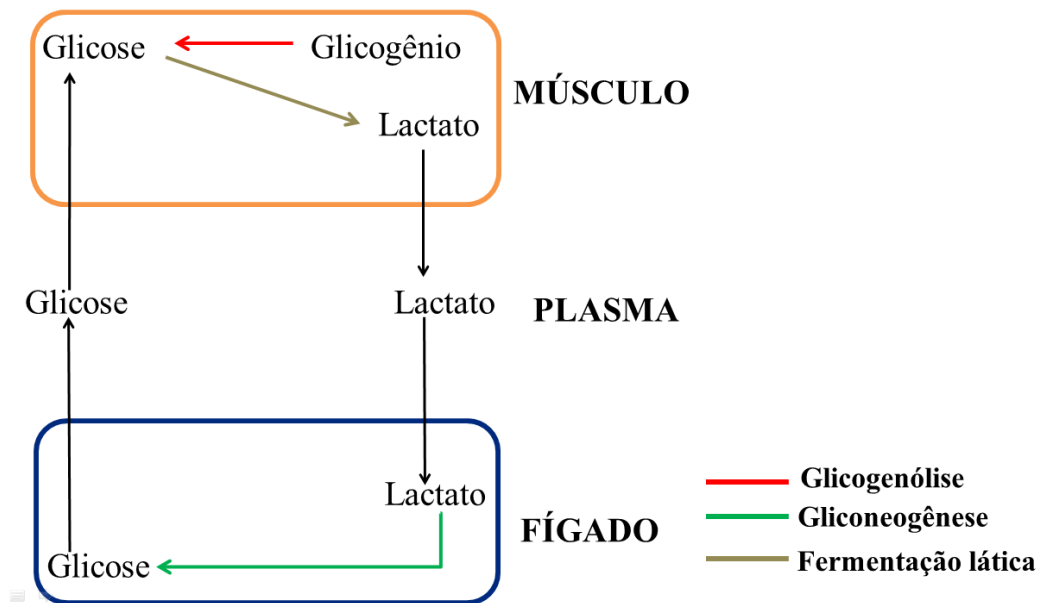
Fonte: adaptado de Benjamin Cummings.

Evidencia-se assim, que a enzima glicose-6-fosfatase, que converte glicose-6-fosfato em glicose na gliconeogênese, é exclusiva de fígado e rins, sendo tais órgãos responsáveis por suprir a glicose para os demais tecidos (NELSON; COX, 2011; VOET; VOET, 2006)

Tartarugas norte-americanas do gênero *Trachemys* são consideradas hipóxia-tolerantes, e as mesmas utilizam o emprego da glicólise como sendo a única fonte de energia quando enfrentam situações de anóxia (LUTZ; NILSSON, 1997). Para manter os níveis de ATP na ausência de oxigênio, aumentam a taxa de glicólise, utilizando a chamada estratégia glicolítica (LUTZ; NILSSON, 1997), a qual traz como consequências altas concentrações de acidose láctica nas células.

Assim, animais hipóxia-tolerantes também devem ser capazes de resistir ao acúmulo de lactato (NILSSON, 2001). A adaptação para controlar essa carga ácida elevada é um complexo existente entre o cálcio, presente no tecido esquelético, e o lactato, o qual funciona como mecanismo tamponador (JACKSON, 2000), sendo assim consegue diminuir a elevada taxa de lactato e permite que o tempo de hipóxia desses animais seja estendido (JACKSON, 2000). Além disto, uma parte do lactato produzido pelos diversos tecidos pode ser encaminhado até o fígado do animal para servirem como substrato para a produção de glicose novamente pela via da gliconeogênese, denominado Ciclo de Cori (NELSON; COX, 2011) (Figura 5).

Figura 5: Esquema do Ciclo de Cori.



Fonte: Elaborado pela autora.

Estudos realizados por Duncan e Marcon (2009) sugerem que a ativação da glicólise anaeróbica e as altas taxas de lactato desempenham importante papel no metabolismo de carboidratos, e podem estar relacionados à sobrevivência em apneia e resistência ao mergulho prolongado, situações em que há oscilação da concentração de oxigênio.

1.4 O quelônio dulcícola *Phrynops geoffroanus*.

A espécie *Phrynops geoffroanus* pertence à família de quelônios aquáticos Chelidae (Figura 6). Sua distribuição ocorre em regiões neotropicais, como Venezuela, Uruguai, Norte da Argentina e regiões Norte e Sul do Brasil (VIZOTTO; SILVA, 2017; McCORD; JOSEPH-OUNI; LAMAR, 2001), sendo facilmente encontrada na bacia hidrográfica do Turvo/Grande, que abrange a região Noroeste do estado de São Paulo, onde está localizado o município de São José do Rio Preto.

Figura 6: Espécime *Phrynops Geoffroanus*



Fonte: Rafael Valadão, ICMBIO.

A elevada quantidade desses quelônios no rio Preto pode ser atribuída à facilidade de forrageio, visto que a espécie usufrui de diversas fontes alimentícias, incluindo resíduos orgânicos encontrados no rio, bem como a escassez de outros organismos competidores diretos. Apesar de o ambiente ser considerado inóspito para diversos organismos, o mesmo é favorável para *P. Geoffroanus*, que cresce em densidade populacional (SOUZA; ABE, 2000).

Como muitas espécies de quelônios dulcícolas, *P. Geoffroanus* pode ser considerada uma espécie hipóxia-tolerante, devido à capacidade de sobreviver em ambientes com disponibilidade variável de oxigênio, assim como os rios poluídos, altamente eutrofizados, que intensificam a depleção de oxigênio (COELHO; GAMITO; PÉREZ-RUZAFÁ, 2007).

Devido a sua história de vida natural e adaptações bioquímicas e fisiológicas, *P. Geoffroanus* pode ser considerado um bom modelo animal para estudos de tolerância à hipóxia (VENANCIO et al., 2013), pois apresenta diversas características com alto valor adaptativo, como aumento da capacidade antioxidante e suporte ao dano oxidativo, resultantes de adaptações dos mesmos durante milhões de anos (VENANCIO et al., 2009; 2010; 2013).

Jackson (2000) defende que condições em que há diminuição na síntese e utilização de ATP em períodos críticos de privação de oxigênio em relação aos mecanismos metabólicos, ainda não são bem compreendidas. O conhecimento relacionado aos animais silvestres brasileiros é escasso, portanto, são necessárias pesquisas com finalidade de conhecer aspectos morfofuncionais do processo de transformação de energia destes animais (ARAUJO et al., 2015), contribuindo para maior entendimento a respeito da depleção de oxigênio em animais considerados hipóxia-tolerantes. Em razão dessas premissas, o presente trabalho contribui para a avaliação de aspectos hematológicos, bioquímicos energéticos de *P. geoffroanus* e para a ciência acerca dos ajustes fisiológicos desse quelônio à privação de oxigênio, assim como a influência dessa condição em sua fisiologia.

Enfatiza-se que há uma importante linha de pesquisa no Centro de Estudo de Quelônios referente a estudos bioquímicos e metabolismo oxidativo de quelônios dulcícolas. O grande interesse em *P. geoffroanus* ocorre devido à escassez de informações sobre sua história de vida e biologia. Nosso enfoque em suas adaptações hematológicas e compensações fermentativas, quando em privação de oxigênio, se deu pelo fato de que não há relatos na literatura.

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil metabólico energético e a série vermelha na espécie *P. geoffroanus* em condições de normóxia e hipóxia induzida.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a série vermelha (hematócrito, dosagem de hemoglobina circulante, contagem de eritrócitos e índices hematimétricos) de *P. geoffroanus* em estado de normóxia e hipóxia induzida;
- Avaliar o perfil dos intermediários do metabolismo energético (glicogênio, glicose, lactato, piruvato, triglicerídeos, aminoácidos livres, proteínas totais e ácido úrico) de *P. geoffroanus* em estado de normóxia e hipóxia induzida nos tecidos muscular esquelético, cardíaco, hepático e sanguíneo;
- Analisar se há discrepância na série vermelha e no perfil metabólico da espécie em hipóxia quando comparado com as condições em normóxia.

MATERIAL E MÉTODOS

3 Material e Métodos

3.1 Coleta e alocação dos animais

Para a realização do presente estudo foram utilizados 10 espécimes adultos de *P. geoffroanus* (SCHWEIGGER, 1892), sem distinção de sexo, com peso e tamanho semelhantes. Os espécimes foram coletados no Rio Preto, pertencente à Bacia Hidrográfica do Turvo/Grande, região Noroeste do estado de São Paulo, localizada no perímetro urbano da cidade de São José do Rio Preto - SP (20°48'31.86"S, 49°22'27.61"O).

Todos os animais foram mantidos em tanques de fibra de vidro de 1000L, com água sem cloro, em temperatura ambiente de aproximadamente 27°C, com acesso ao fundo do tanque e com plataforma seca para permitir o assoalhamento. A alimentação foi feita com carne bovina, peixe e ração durante o período de aclimação, que durou 120 dias. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP/IBILCE (Nº 070/2013) e pelo IBAMA/SISBIO (Nº 37360-1).

3.2 Experimentos em normóxia e hipóxia

Os experimentos de normóxia e hipóxia foram realizados durante o ano de 2015, em conjunto com o projeto de pós-doutoramento denominado “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”, de autoria da Dra. Larissa Paola Rodrigues Venancio (FAPESP/Processo 2012/14048-2) e do projeto de mestrado denominado “Mecanismos de ação antioxidante no estado de pós-hipóxia induzida em *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae)”, de autoria da Ma. Nathalia Rossigalli Alves Costa (FAPESP/Processo 2014/22398-9).

Após o período de aclimação, os 10 animais foram divididos em dois grupos denominados normóxia e hipóxia. Os cinco animais referentes ao grupo nas condições de normóxia tiveram acesso livre à superfície, respirando normalmente (Figura 7). O tanque com água limpa teve sua temperatura controlada a 27°C por aquecedores com termostatos (Atman®, 110V), durante sete dias. A temperatura foi monitorada por

termômetro líquido em vidro (Incoterm®, escala -10°C +250°C, 300mm) durante todo o experimento.

Figura 7: Cinco animais do grupo em normóxia com acesso livre à superfície, respirando normalmente.



Fonte: Autora.

Em relação aos cinco animais do grupo em hipóxia, foi colocada uma tela abaixo do nível da água, para impedir que os animais acessassem a superfície (Figura 8).

Figura 8: Cinco animais do grupo em hipóxia com tela abaixo do nível da água, impedindo o acesso dos animais à superfície.



Fonte: Autora.

Além disso, foi necessário o borbulhamento de nitrogênio gasoso na água (Figura 9), durante 40 minutos, com o intuito de garantir que os níveis de O_2 dissolvidos seriam abaixo de 30%, caracterizando um ambiente aquático hipóxico (WELKER, et

al., 2013) semelhantes aos encontrados no rio Preto (MELO; MOREIRA; BISINOTI, 2009; CAMPANHA, 2010). A quantidade de O₂ dissolvido na água foi medida com a ajuda de um oxímetro (Hanna® instruments). Tal processo é importante, pois *P. geoffroanus* é capaz de realizar trocas gasosas por seu tegumento cloacal, mesmo possuindo respiração prioritariamente pulmonar (GOULART, 2004). O experimento seguiu especificações realizadas por Willmore e Storey (1997), cuja experimentação foi realizada com espécimes da tartaruga norte americana tolerante à hipóxia *Trachemys scripta elegans*.

Figura 9: Bombeamento de nitrogênio gasoso nos tanques com o intuito de garantir a diminuição da concentração de O₂ dissolvido na água.

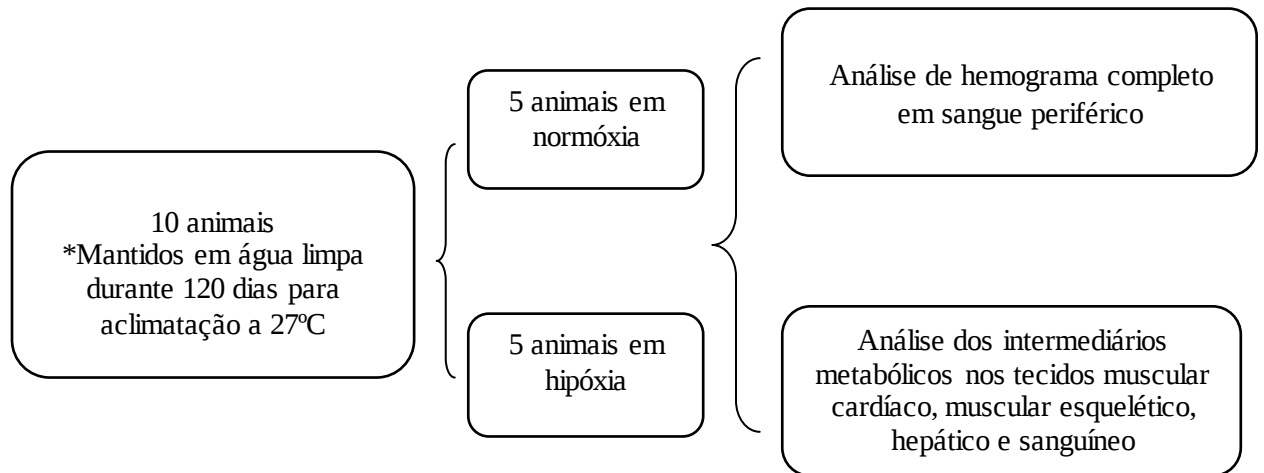


Fonte: Autora.

Vale salientar que como não há registros na literatura acerca do tempo exato de sobrevivência em situações de hipóxia para a espécie estudada, foi estipulado o tempo de 5h como o máximo de imposição à submersão, tempo mínimo relatado na literatura em estudos previamente realizados com *Trachemys scripta elegans* (KRIVORUCHKO; STOREY, 2010). Posterior ao período de cinco horas, foi realizado coleta de sangue e amostras teciduais dessa espécie, possibilitando a avaliação do hemograma e mecanismos de vias fermentativas em relação à ausência prolongada de O₂.

Na figura 10 está especificada a quantidade de animais utilizados e as análises realizadas com os espécimes.

Figura 10: Fluxograma com a descrição dos experimentos que foram realizados com 10 espécimes de *P. geoffroanus*, demonstrando quantos animais foram utilizados em normóxia e hipóxia e o que foi avaliado.



3.3 Coleta de Sangue Periférico e Análise de Hemograma Completo

Estressores ambientais, como a eutrofização, podem afetar vertebrados ectotérmicos, modificando sua fisiologia e influenciando diretamente nos parâmetros hematológicos (SOUZA, 2004; PITOL et al., 2008), por conta disso o hemograma é um importante parâmetro para avaliação das condições do animal quando em hipóxia.

Subsequente à exposição a hipóxia, os espécimes foram higienizados com água destilada e esterilizados com álcool 70% com o auxílio de algodão. Posteriormente, o sangue foi coletado por punção da veia occipital (Figura 11), segundo metodologia de Silva e colaboradores (2012).

Após a coleta, as amostras de sangue foram imediatamente acondicionadas em tubos com anticoagulante heparina e analisadas rapidamente, para utilização do sangue fresco. Cinco mL da amostra sanguínea foram centrifugados a 1500 rpm, obtendo-se o plasma para análise dos intermediários metabólicos, o qual foi acondicionado em freezer -80°C.

Figura 11: Local de coleta da amostra biológica sanguínea.



Fonte: Autora

Os parâmetros da série vermelha analisados foram: hematócrito, dosagem da hemoglobina circulante, contagem de eritrócitos e índices hematimétricos (Volume Globular Médio (VGM), Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM) e Hemoglobina Globular Média (HGM)).

- *Hematócrito*: Após o sangue total ser homogeneizado, uma amostra deste foi utilizada para preencher $\frac{3}{4}$ do tubo capilar do microhematócrito. Depois de se fechar uma das extremidades do tubo capilar, ele foi centrifugado por cinco minutos a 13.000 rpm. Terminada a centrifugação, faz-se a leitura utilizando-se um cartão de referência padronizado, cujos valores são dados em percentuais do volume de eritrócitos em relação ao total de sangue.

- *Dosagem da hemoglobina circulante*: O método utilizado para a quantificação da hemoglobina total circulante, constitui na oxidação do átomo de Ferro (Ferro II) da molécula de Hemoglobina pelo Ferricianeto de Potássio em pH fracamente alcalino, formando a Metahemoglobina, que é convertida em Cianometahemoglobina após a reação com o Cianeto de Potássio, contidos na solução de Drabkin (1948).

Após a reação, a leitura da absorbância da solução é feita em espectrofotômetro micronal “B 395” em um comprimento de onda de 540 nm, para se obter a concentração da hemoglobina total.

- *Contagem de eritrócitos*: A contagem dos eritrócitos foi realizada segundo o método de FRYE (1991), que consiste na contagem direta, em câmara de Neubauer, de eritrócitos de amostra de sangue total diluído em uma solução de Natt and Herick 1:100. O valor total da contagem é multiplicado por 5000, resultando no valor estimado de eritrócitos por microlitro de sangue.

- *Cálculo dos índices hematimétricos* (Figura 12): representam o volume médio de eritrócitos (VGM), concentração de hemoglobina dos eritrócitos (CHGM) e peso da hemoglobina dentro dos eritrócitos (HGM); valores importantes na análise sanguínea por sofrerem grandes variações nos estudos patológicos e fisiológicos.

Figura 12: Fórmulas para calcular os índices hematimétricos.

Volume Globular Médio (VGM) $\text{VGM(fL)} = \frac{\text{Hematócrito \%} \times 10}{\text{Número de Eritrócitos}}$
Hemoglobina Globular Média (HGM) $\text{HGM(pg)} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 10}{\text{Número de eritrócitos}}$
Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM) $\text{CHGM(\%)} = \frac{\text{Hemoglobina} \times 100}{\text{Hematócrito}}$

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4 Coleta dos Tecidos e Avaliação da Atividade Metabólica

Posterior à retirada do sangue, os espécimes foram eutanasiados por superdose do anestésico Thiopentax® (60 a 100mg/Kg) conforme diretrizes do CONCEA. Essa etapa garante que o processo seja indolor ao animal, que é seguido por aplicação de 1 a 2mmol/Kg de cloreto de potássio (KCl), um íon cardiotóxico que produz fibrilação

ventricular cardíaca e morte instantânea, garantindo que o animal estivesse completamente sem sinais vitais para realização da coleta dos tecidos.

Subsequente à eutanásia foi feita a abertura do plastrão com auxílio de serra elétrica oscilatória utilizada para corte de gesso (modelo 18018, Nevoni®), para coleta dos tecidos hepático, muscular esquelético e cardíaco, para realização das análises do metabolismo energético. Os tecidos foram analisados quanto às concentrações de glicogênio, glicose, lactato, triglicerídeos, aminoácidos livres, proteínas totais e ácido úrico por meio de método colorimétrico em espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 30.

Pelo fato de o glicogênio pertencer à estrutura de armazenamento em determinados tecidos, sua concentração não foi analisada no plasma. Em relação ao ácido úrico, o mesmo foi analisado apenas em fígado e plasma, pois este é produzido no fígado e encaminhado para os rins pelo sangue, sem necessidade de análise nos demais tecidos (NELSON, COX; 2014). Os tecidos coletados foram acondicionados em freezer a -80°C, para posterior análise.

A análise dos intermediários energéticos pode refletir com precisão o estado metabólico do organismo, (DUNCAN; MARCON, 2009, MOON & MOMMSEN; 1987) principalmente quando a avaliação é realizada em tecido-específicos. Entretanto, a avaliação do perfil plasmático torna-se relevante, pois reflete o papel do sangue como transportador dos diversos intermediários e como integrador entre os diferentes tecidos (VIEIRA; INOUE; MORAES, 2005), obtendo-se assim uma resposta metabólica sistêmica.

- *Glicogênio*: A extração do glicogênio tecidual foi realizado segundo metodologia de Bidinotto e colaboradores (1997). O método consiste na precipitação alcoólica do glicogênio seguida pela determinação direta de açúcares redutores totais após hidrólise ácida (DUBOIS et al., 1956). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 480 nm.

- *Homogeneização dos tecidos*: Aliquotas de fígado, músculo e coração foram diluídas em água destilada para quantificação de glicose, lactato, proteínas, aminoácidos, triglicerídeos e ácido úrico. Os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador mecânico sob banho de gelo. Após a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 12.000 rpm durante três minutos, e os sobrenadantes foram utilizados como extratos celulares.

- *Glicose*: A quantificação da concentração de glicose foi realizada com o Kit Labtest de Glicose Liquiform (Ref. 133), cujo princípio é a oxidação enzimática da glicose. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, por meio de uma reação oxidativa de acoplamento que resulta na formação de antipirilquinonímia vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra analisada, em 525 nm, em espectrofotômetro.

- *Lactato*: A determinação da concentração de lactato total foi realizada com o Kit LabTest de Lactato Enzimático (Ref. 138). Neste método, na presença de oxigênio, a lactato oxidase catalisa a oxidação do ácido láctico, promovendo a formação de piruvato e peróxido de hidrogênio. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio e 4-aminoantipirina catalisada pela peroxidase, produzindo quinoeimina. A intensidade da cor do produto da reação é diretamente proporcional à concentração de lactato nas amostras analisadas, em 550 nm, em espectrofotômetro.

- *Proteínas totais*: A quantificação da concentração de proteínas totais foi feita com o Kit LabTest de Proteínas Totais (Ref. 99), por meio do método de Biureto, que reage com as ligações peptídicas das proteínas séricas, formando cor púrpura, proporcional à concentração das proteínas na amostra analisada, em 545 nm, em espectrofotômetro.

- *Aminoácidos livres*: O teor de aminoácidos livres foi determinado segundo Copley (1941). Uma alíquota de plasma total foi adicionada a 2,0mL de solução de ninhidrina 0,1% em álcool isopropílico. Os tubos de reação foram vedados e então colocados em banho-maria a 40°C, por 40 minutos. Após este período, a leitura óptica foi realizada em

espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm, contra um padrão de ácido α -aminoacético 1mM.

- *Triglicerídeos*: A concentração de triglicerídeos foi obtida por meio do Kit LabTest de Triglicérides Liquiform (Ref. 87), no qual a lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos liberando glicerol, que é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato. Este será oxidado a dihidrooxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Após essa reação, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4- aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo quinoneimina, a leitura é realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 505 nm.

- *Ácido úrico*: A concentração de ácido úrico foi obtida por meio do Kit LabTest de Ácido Úrico Liquiform (Ref. 140), no qual o ácido úrico é oxidado pela úricase e alantoina e peróxido de hidrogênio, que na presença da peroxidase, reage com o DHBS e a 4-aminoantipirina, formando o cromogênio antipirilquinonimina, observado em 520 nm no espectrofotômetro.

3.5 Análise Estatística: Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade pelos testes Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente e os *outliers* foram retirados quando necessário. Para análise dos parâmetros nos diferentes tratamentos, foi utilizado teste *t de Student* e *Mann-Whitney*, para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. Os testes foram realizados pelo *software* Statistica 8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 Resultados e Discussão

4.1 Análises dos parâmetros hematológicos relacionados à série vermelha

A análise dos parâmetros da série vermelha em relação ao hematócrito, dosagem da hemoglobina circulante, contagem de eritrócitos e índices hematimétricos Volume Globular Médio (VGM), Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM) e Hemoglobina Globular Média (HGM) em normóxia e hipóxia encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Valores hematológicos da série vermelha de *P. geoffroanus* em condições de normóxia e hipóxia.

Parâmetros Hematológicos Série Vermelha	Normóxia	Hipóxia	p
	Média ± DP	Média ± DP	
Hematócrito (%)	18 ± 2	24 ± 0,5	0,02 ^{*2}
Hemoglobina (g/dL)	4 ± 0,4	7 ± 0,9	0,01 ^{*2}
Eritrócitos (x10 ³)	636 ± 171	513 ± 52	0,48 ²
VGM (fL)	280 ± 54	438 ± 19	<0,01 ^{*1}
CHGM (%)	26 ± 3	30 ± 1,6	0,07 ¹
HGM (pg)	69 ± 30	132 ± 5	0,01 ^{*1}

Valor de significância (p<0,05), * indicam resultado estatisticamente significativo seguido dos números ¹ para testes paramétricos (*t de Student*) e ² para não paramétricos (*Mann Whitney*).

Houve aumento nos índices observados para valores de hematócrito, dosagem de hemoglobina, VGM e HGM, nos animais submetidos à condição de hipóxia. No que se refere ao número de eritrócitos e o CHGM, os mesmos demonstraram estabilidade, não ocorrendo diferença entre os tratamentos.

O aumento do hematócrito nos animais na condição de privação de oxigênio pode ser resultado de desidratação durante a hipóxia induzida, pois cágados dulcícolas possuem respiração prioritariamente pulmonar, sendo assim não poderiam subir à superfície para respirar e consequentemente não conseguem se hidratar (MOYES; SCHULTE, 2010), também pode ter ocorrido pelo aumento do VGM, pois as hemácias estariam em estado de hemoconcentração, caracterizada pelo aumento de sua viscosidade e número de eritrócitos por unidade de volume (CIESLA, 2007).

A hemoglobina circulante se mostrou mais elevada em hipóxia, possivelmente para tornar eficiente a distribuição e captação de oxigênio aos tecidos, evitando danos teciduais. Em estudos realizados com embriões do cágado *Pseudemys nelsoni*, pesquisadores sugerem que a hipóxia normalmente provoca um aumento da capacidade de transporte de oxigênio do sangue, aumentando, conseqüentemente, a concentração de hemoglobina (KAM, 1993). Em estudos com outros répteis, como o lagarto teiú *Salvator merianae*, diversos autores relatam aumento nos valores de hematócrito e hemoglobina no período de inverno, quando o animal entra em estado hipometabólico, resultando em hibernação e hipóxia (TROIANO; GOULD; GOULD, 2008; BANERJE E BANERJE 1969; DESSER 1978; HAGGAG et al, 1966; ULTSCH, 1988). Sendo assim, o aumento do hematócrito e da concentração de hemoglobina circulante refletem a necessidade de adequar o transporte de oxigênio à condição em que está submetido (MOYES; SCHULTE, 2010), auxiliando a sobrevivência dos espécimes em períodos críticos de privação de oxigênio.

Em vários vertebrados, a exposição à hipóxia estimula a liberação e/ou a produção de eritrócitos, além da manutenção da quantidade hemoglobina no sangue (MOYES, SCHULTE, 2010). Uma resposta primária a essa condição é a contração do baço, local de armazenamento de eritrócitos: tais contrações expulsam células vermelhas para a circulação, aumentando conseqüentemente os valores de hematócrito, o que resulta no aumento da capacidade de transporte de oxigênio no sangue (MOYES, SCHULTE, 2010).

Estudos realizados com larvas de *zebra-fish*, *Danio rerio*, submetidos à hipóxia, obtiveram resultados semelhantes aos obtidos nesse estudo, em que a concentração de eritrócitos no sangue permaneceu constante nas condições de normóxia e também de hipóxia (SCHWERTE; ÜBERBACHER; PELSTER, 2003). Além disso, acredita-se que a concentração de eritrócitos constante em tartarugas é compensada pela alta saturação de hemoglobina nas hemácias (TIUNOV, 1981), como ocorrido nos animais hipóxicos do estudo em questão.

Nos animais em hipóxia, o valor observado nos índices hemátimétricos, VGM e HGM, sugere a ocorrência de aumento do volume celular e do peso da hemoglobina dentro dos eritrócitos, o que possivelmente auxilia a oxigenação dos tecidos durante o

período de hipóxia (CIESLA, 2007). Esta pode ser considerada uma adaptação do animal, que permite que o transporte de oxigênio para os tecidos seja mais eficaz em situação de baixa disponibilidade de oxigenação.

4.2 Análise dos parâmetros metabólicos energéticos

A concentração dos intermediários energéticos de glicose, lactato, proteínas, aminoácidos, triglicerídeos e ácido úrico foram analisados no plasma nas condições de normóxia e hipóxia, os resultados obtidos encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Valores dos intermediários do metabolismo energético plasmático de *P. geoffroanus* em condições de normóxia e hipóxia.

Intermediários Metabólicos Plasmáticos	Normóxia	Hipóxia	<i>p</i>
	Média ± DP	Média ± DP	
Glicose (mg/mL)	0,30 ± 0,02	0,81 ± 0,53	0,01 ^{*2}
Lactato (mg/mL)	0,61 ± 0,10	2,40 ± 0,60	<0,01 ^{*1}
Proteínas (mg/mL)	48.288 ± 9.973	50.976 ± 5.038	0,60 ¹
Aminoácidos (mol/mL)	27,37 ± 4,8	48,88 ± 11,56	<0,01 ^{*2}
Triglicerídeos (mg/mL)	1,30 ± 0,95	1,12 ± 0,29	0,62 ²
Ácido Úrico (µg/mL)	3,68 ± 1,15	15,50 ± 7,06	<0,01 ^{*2}

Valor de significância ($p < 0,05$), * indicam resultado estaticamente significativo seguido dos números ¹ para testes paramétricos (*t de Student*) e ² para não paramétricos (*Mann Whitney*). Os outliers foram retirados quando necessário.

Como pode ser observado, houve diferença em relação às concentrações de glicose, lactato, aminoácidos e ácido úrico, cujos valores foram maiores na condição de hipóxia em comparação com a condição normóxica. No que se refere à concentração de proteínas e triglicerídeos os mesmos demonstraram estabilidade nas duas condições.

Em relação aos intermediários energéticos nos tecidos muscular cardíaco, hepático e muscular esquelético, foram analisadas as concentrações de glicogênio, glicose, lactato, proteínas, aminoácidos e triglicerídeos, enquanto a concentração de ácido úrico foi analisada apenas no fígado. A concentração dos intermediários metabólicos teciduais nas condições de normóxia e hipóxia se encontra na Tabela 3.

Tabela 3: Valores dos intermediários do metabolismo energético plasmático de *P. geoffroanus* em condições de normóxia e hipóxia.

Intermediários metabólicos teciduais	Músculo Cardíaco (Média ± DP)		<i>p</i>	Fígado (Média ± DP)		<i>p</i>	Músculo Esquelético (Média ± DP)		<i>p</i>
	Normóxia	Hipóxia		Normóxia	Hipóxia		Normóxia	Hipóxia	
Glicogênio (μmol/mg)	0,11 ± 0,03	Não detectado	-	767,05 ± 31,24	739,66 ± 119,67	0,71 ¹	454,40 ± 253,30	241,63 ± 59,80	0,01 ^{*1}
Glicose (μg/mg)	1,5 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,53 ¹	5,5 ± 2,2	4,6 ± 2,6	0,60 ¹	0,6 ± 0,3	1,7 ± 0,3	0,01 ^{*2}
Lactato (μg/mg)	1,3 ± 0,3	2,4 ± 0,9	0,03 ^{*1}	1,0 ± 0,3	1,8 ± 0,7	0,04 ^{*1}	3,1 ± 0,5	2,2 ± 0,6	0,04 ^{*1}
Proteínas (μg/mg)	15,0 ± 5,1	13,5 ± 4,0	0,50 ¹	177,4 ± 110,0	193,5 ± 107,3	0,82 ¹	11,8 ± 1,4	16,25 ± 5,8	0,18 ¹
Aminoácidos (mmol/mg)	0,4 ± 0,07	0,4 ± 0,2	0,53 ¹	1,56 ± 0,6	1,7 ± 0,3	0,63 ¹	0,2 ± 0,06	0,17 ± 0,01	0,7
Triglicerídeos (μg/mg)	1,8 ± 0,5	2,4 ± 0,2	0,15 ¹	23,0 ± 4,4	22,4 ± 8,0	0,90 ¹	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,06	1,0 ²
Ácido Úrico (μg/mg)	-	-		0,30 ± 0,09	0,29 ± 0,27	0,97 ¹	-	-	

Valor de significância ($p > 0,05$), * indicam resultado estaticamente significativo seguido dos números ¹ para testes paramétricos (*t de Student*) e ² para não paramétricos (*Mann Whitney*). Os outliers foram retirados quando necessário.

No tecido muscular cardíaco houve uma tendência à diminuição na concentração de glicose e nas concentrações de glicogênio. No caso do glicogênio, é importante salientar que possivelmente o método não foi suficientemente sensível para detectar as baixas concentrações de glicogênio no tecido cardíaco em condição de hipóxia. Houve diferença na concentração de lactato no tecido muscular cardíaco, aumentando duas vezes na condição de hipóxia. As concentrações de proteínas, aminoácidos e triglicerídeos não apresentaram diferenças significativas entre as duas condições.

No tecido hepático dos animais em hipóxia houve uma tendência à diminuição de glicose, e o lactato aumentou quase o dobro quando comparado com a condição normóxica. Também houve diferença na concentração de lactato, porém as concentrações de glicogênio, proteínas, aminoácidos, triglicerídeos e ácido úrico mantiveram-se estáveis e não apresentaram diferenças significativas entre as duas condições experimentais.

Em relação ao tecido muscular esquelético, houve diminuição de 1,8 vezes na concentração de glicogênio e aumento de mais que o dobro na concentração de glicose em hipóxia, no entanto; a concentração de lactato diminuiu quando em privação de oxigênio. Sendo assim, houve diferença nas concentrações de glicogênio, glicose e

lactato neste tecido, e as concentrações de proteínas, aminoácidos e triglicerídeos mantiveram-se estáveis nas duas condições.

Importantes mecanismos são ativados quando animais enfrentam a condição de privação de oxigênio. Um desses mecanismos inclui a redução da taxa metabólica para o estado de hipometabolismo, condição fisiológica que reduz a demanda de energia e limita a utilização das reservas energéticas, bem como a acumulação de metabólitos tóxicos, possibilitando que o animal sobreviva por longos períodos apesar da hipóxia (HICKS; WANG, 2004). A indução do hipometabolismo por hipóxia não é bem compreendida, mas alguns autores acreditam que ocorra por conta da acidose tecidual (MOYES; SCHULTE, 2010).

Outro importante mecanismo é o redirecionamento do fluxo de esqueletos carbônicos para vias de conversão de energia fermentativa (STOREY, 1996; NELSON; COX, 2014). Vias importantes nessas condições são a glicólise, a glicogenólise e a gliconeogênese. A glicólise é considerada uma via custosa de fornecimento de apenas dois ATP por molécula de glicose, e pode ser utilizada em condições aeróbicas e anaeróbicas e, mesmo dispendiosa, é uma via de ação rápida e essencial (NELSON; COX, 2011; MOYES; SCHULTE, 2010). A glicogenólise degrada glicogênio permitindo rápida obtenção de unidades de glicose para produção de ATP por glicólise anaeróbica, fornecendo três ATP por molécula de glicose oxidada (LUTZ; MILTON, 2004; NELSON; COX, 2011). A gliconeogênese consiste na conversão de lactato e outros compostos não glicolíticos em glicose, que chega ao sangue e vai suprir outros tecidos, e, apesar de também ser dispendiosa, se torna extremamente essencial, pois é capaz de converter compostos não glicolíticos em glicose (NELSON; COX, 2011).

Segundo Nelson e Cox (2011), o armazenamento de glicogênio - um polissacarídeo de alta massa molecular - em tecidos específicos é uma importante forma de armazenamento de energia, pois, quando a demanda de energia aumenta, a via da glicogenólise libera glicose, utilizada para produzir ATP.

Alguns autores sugerem que a sobrevivência em períodos críticos de baixa disponibilidade de oxigênio está associada ao armazenamento de glicogênio cardíaco, Mott (1961) alega que a sobrevivência do tecido cardíaco nessas condições críticas depende das reservas de glicogênio, principalmente nas primeiras horas de hipóxia

(DAW, WENGER, BERNE, 1967). Enfatiza-se que a morte por anóxia ocorre quando as concentrações de glicogênio e glicose tornam-se indisponíveis para os tecidos vitais que dependem unicamente da glicólise anaeróbica nessas condições. Sendo assim, durante a anóxia há uma rápida e marcante diminuição do glicogênio cardíaco, bem como a diminuição mais lenta deste no músculo esquelético e hepático, pois a glicose hepática é utilizada em última instância, concomitante com elevada glicemia corpórea plasmática (LUTZ et al., 1989; DAW, WENGER, BERNE, 1967).

A elevada glicemia ocorre por conta da glicólise anaeróbica, que proporciona a oxidação de glicogênio ou glicose a lactato. O seu rendimento energético é de dois ATP por molécula de glicose, enquanto que em condições aeróbicas obtêm-se 30 ou 32 ATP por molécula de glicose (NELSON; COX, 2011). Por isso, em condições anaeróbicas é necessário consumir muito mais glicose e a velocidade e quantidade total dessa molécula são maiores em condições anaeróbicas quando comparadas às condições aeróbicas (NELSON; COX, 2011). Em estudos realizados com *Oreochromis niloticus*, em condições de normóxia e hipóxia induzida, os valores de glicose no sangue foram elevados nos animais em hipóxia (DE MELO, 2008), o que é concordante com os resultados obtidos no presente estudo, pois possivelmente ambas as espécies utilizaram a glicose como fonte principal de energia durante a privação de oxigênio, com intuito de manter os níveis glicêmicos do animal.

Resultados análogos com os obtidos nesse estudo com *P. geoffroanus* também foram observados no quelônio dulcícola norteamericano *Chrysemis picta belli*, concluindo assim que a rápida e alta glicemia em quelônios anóxicos explica o fato de que esses animais sobrevivem por meio da glicólise anaeróbica (DAW, WENGER, BERNE, 1967).

Sendo assim, a glicólise e a transcrição de genes das enzimas glicolíticas podem ser positivamente reguladas e induzidas pela hipóxia e estão como isoformas específicas nos tecidos, ocorrendo simultaneamente com a repressão de enzimas de vias aeróbicas (WEBSTER et al., 1990; MURPHY et al., 1984). Keitzmann e colaboradores (1992, 1993), alegam que a transdução para vias anaeróbicas alternativas quando em baixas concentrações de oxigênio, modula negativamente os efeitos do glucagon sobre as enzimas gluconeogênicas, ou seja, o organismo esforça-se para manter a homeostase

quando há hiperglicemia, como no caso de *P. geoffroanus* na condição de hipóxia induzida.

A glicose-6-fosfato é um importante intermediário para diversas vias metabólicas, e pode ser utilizada como combustível pelo metabolismo anaeróbico, sendo convertida em glicose no fígado e posteriormente liberada para o sangue de modo a manter a glicemia corpórea. Também pode ser processada pela via das pentoses para gerar NADPH, ou formar compostos de importância metabólica, dependendo da condição em que o organismo se encontra (DA SILVEIRA; LOGATO; DA CONCEIÇÃO PONTES, 2009).

O piruvato, produto formado na glicólise, pode ser destinado para conversão em lactato em situações anaeróbicas necessárias para continuar a glicólise. Também pode ser convertido em oxaloacetato para realizar gliconeogênese, ou alanina para síntese de aminoácidos, de acordo com as necessidades da célula (NELSON; COX, 2011; DA SILVEIRA; LOGATO, 2009). Em situação de hipóxia, quando em glicólise anaeróbica, a conversão de piruvato em lactato pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Figura 13) é denominada fermentação láctica (DA SILVEIRA; LOGATO, 2009). Vale ressaltar que fermentação é o termo geral para o processo em que se obtém energia como ATP sem consumo de oxigênio (NELSON; COX, 2011).

Figura 13: Ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) na conversão de piruvato a lactato ou o inverso conforme necessidades celulares.



Fonte: Elaborado pela autora.

O aumento do lactato nos animais em hipóxia deve-se a necessidade de obter glicose a partir da gliconeogênese, especialmente quando os estoques de glicogênio estão esgotados (NELSON; COX, 2011), entretanto, o alto fluxo glicolítico anaeróbico resulta em acidose metabólica, propiciando um aumento na concentração total de íons H^+ produzidos pelas células, o que pode gerar consequências, uma vez que o organismo e diversas enzimas são altamente sensíveis ao pH corpóreo, atuando nesse caso, como um alerta para o hipometabolismo (MOYES; SCHULTE, 2010).

Da Silva-Castiglioni e colaboradores (2012) e vários outros estudos demonstram que animais mais tolerantes a anaerobiose apresentam maiores concentrações de lactato durante períodos de hipóxia/anóxia, e a pressão de seleção sobre os quelônios para suprimir seu metabolismo deve ser muito forte, para lidar com cargas enormes de lactato, por conta da dependência da glicólise (LUTZ; NILSSON, 1997; HOCHACHKA, 1998; HOCHACHKA; GUPPY, 1987).

A adaptação para controlar essa carga ácida elevada é devida a um complexo entre o cálcio presente na carapaça, o esqueleto e o lactato. Estes funcionam como um tipo de mecanismo tamponador incomum, com altos níveis de bicarbonato plasmático e pH sanguíneo elevado (DAW, WENGER, BERNE, 1967; JACKSON, 2000), sequestrando o lactato quando ocorre a acidose láctica durante períodos críticos.

Penney (1974), em estudos com reperusão em *Trachemys scripta elegans*, observou que houve um aumento de cerca de 37 vezes na concentração de ácido láctico, e um aumento de cinco vezes na taxa de glicose sanguínea quando comparados os animais em normóxia e depois com submersão de 24 horas. Em estudos realizados com animais submetidos ao estresse, o nível de lactato mostrou-se elevado (CONTARTEZE et al., 2007; BRANDÃO, DE CARVALHO GOMES; CHAGAS 2006). Esse aumento na concentração de lactato pode ser considerado para os cágados dulcícolas do estudo em questão pela condição de estresse por hipóxia induzida e incapacidade de subir para superfície para respirar em que foram submetidos.

Os triglicerídeos são a principal forma de armazenamento de energia na maioria dos organismos, são estocados para serem utilizados como combustíveis, liberando mais que o dobro de energia quando comparado com a oxidação de carboidratos (NELSON; COX, 2011). A oxidação dos triglicerídeos resulta em três ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos sofrem remoção oxidativa de sucessivas unidades de dois carbonos na forma de acetilcoenzima A (acetil-CoA), que são então oxidados no Ciclo de Krebs. O glicerol livre pela ação da enzima glicerol-cinase é convertido em glicerol-3-fosfato e então oxidado a diidroxiacetona-fosfato, convertendo-se em gliceraldeído-3-fosfato, sendo oxidado na glicólise (NELSON; COX, 2011).

Ainda que os triglicerídeos sejam a principal e mais eficiente forma de energia estocada no organismo, os espécimes avaliados não a utilizaram como principal fonte de

energia, pois seria necessário oxigênio para manutenção da via de oxidação de ácidos graxos. Sendo assim, a taxa de triglicerídeos permaneceu constante nas duas condições.

Em estudos realizados com *Oreochromis niloticus* por Silva e colaboradores (2012), nos grupos controle e estressados em condições de privação de oxigênio, foram semelhantes aos resultados obtidos no estudo em questão, em que os valores de proteínas mantiveram-se constantes nas condições de normóxia e hipóxia.

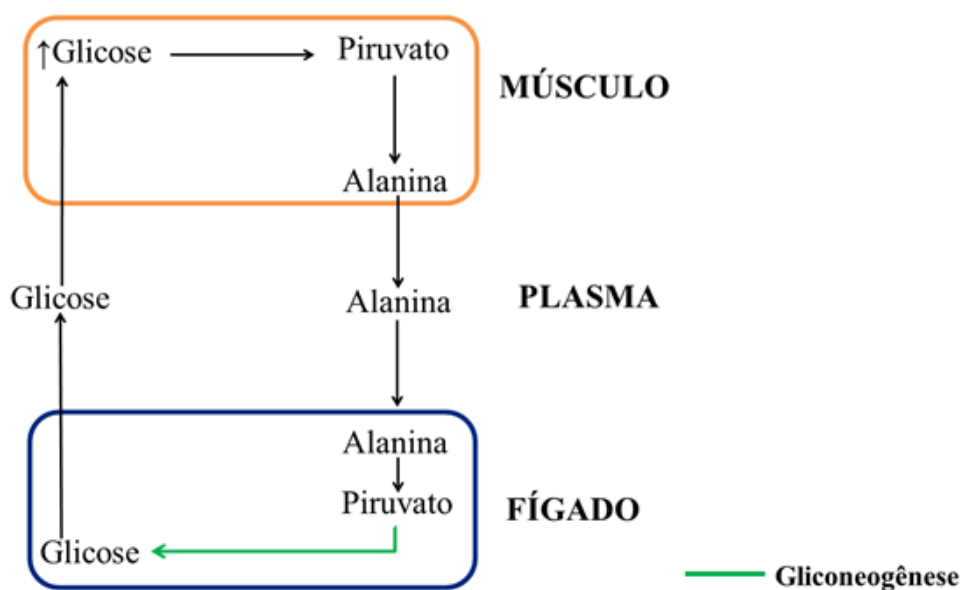
Os aminoácidos são utilizados para sintetizar proteínas hepáticas e plasmáticas, ou seus esqueletos carbônicos podem ser convertidos em glicose e glicogênio para gliconeogênese. Segundo Nelson e Cox (2011), as vias do catabolismo dos aminoácidos juntas, representam cerca de 10 a 15% da produção de ATP do organismo humano, e são bem menos ativas que a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos, por exemplo. Suas vias catabólicas formam produtos finais que podem entrar no Ciclo de Krebs, enquanto que alguns esqueletos carbonados podem ser convertidos em parte ou totalmente em piruvato, e tomar vias distintas, podendo ser direcionados para a gliconeogênese para obtenção de mais glicose (NELSON; COX, 2011).

Outro exemplo de economia metabólica em relação aos aminoácidos deve-se ao Ciclo da Glicose-Alanina (Figura 14). A alanina passa para circulação sanguínea e é encaminhada para o fígado, onde a enzima alanina-aminotransferase transfere o grupo amino da alanina para o α -cetoglutarato, formando como produto o piruvato e glutamato. Nesse caso, o piruvato é convertido à glicose por meio da gliconeogênese, a qual vai para a circulação sanguínea e pode retornar ao músculo para realizar glicólise e continuar o ciclo, e a amônia é então convertida em ureia para excreção. Portanto, a alanina funciona como transportadora de amônia e do piruvato, encaminhando ambos do músculo esquelético até o fígado. Assim a amônia tóxica pode ser excretada e o piruvato é então utilizado para produzir glicose, que é posteriormente devolvida ao músculo (NELSON; COX, 2011). Neste caso, os aminoácidos oriundos da proteólise tecidual na musculatura esquelética podem ser utilizados como combustível para as células.

O ácido úrico é o produto final de excreção do catabolismo das purinas em alguns animais, como os répteis (MOYES; SCHULTE, 2010). Os aminoácidos são provenientes de proteínas da dieta ou de proteólise tecidual e são derivados da maioria

dos grupos amino. A maior parte dos aminoácidos é metabolizada no tecido hepático, e a amônia gerada pode ser reutilizada em diversas vias metabólicas; quando em excesso, o nitrogênio amínico é convertido em ácido úrico nos répteis para posterior excreção (NELSON; COX, 2011; VOET & VOET, 2006). Vale ressaltar que durante a acidose metabólica ocorre elevação da concentração de glutamina pelos rins, situação em que o NH_4 forma sais que facilitam sua excreção, com isso, o bicarbonato produzido pela descarboxilação do a-cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico também pode funcionar como tampão no plasma sanguíneo. Tomados em conjunto, esses efeitos do metabolismo da glutamina no rim tendem a contrabalancear a acidose (NELSON; COX, 2011; VOET & VOET, 2006).

Figura 14: Resumo do Ciclo Glicose-Alanina.



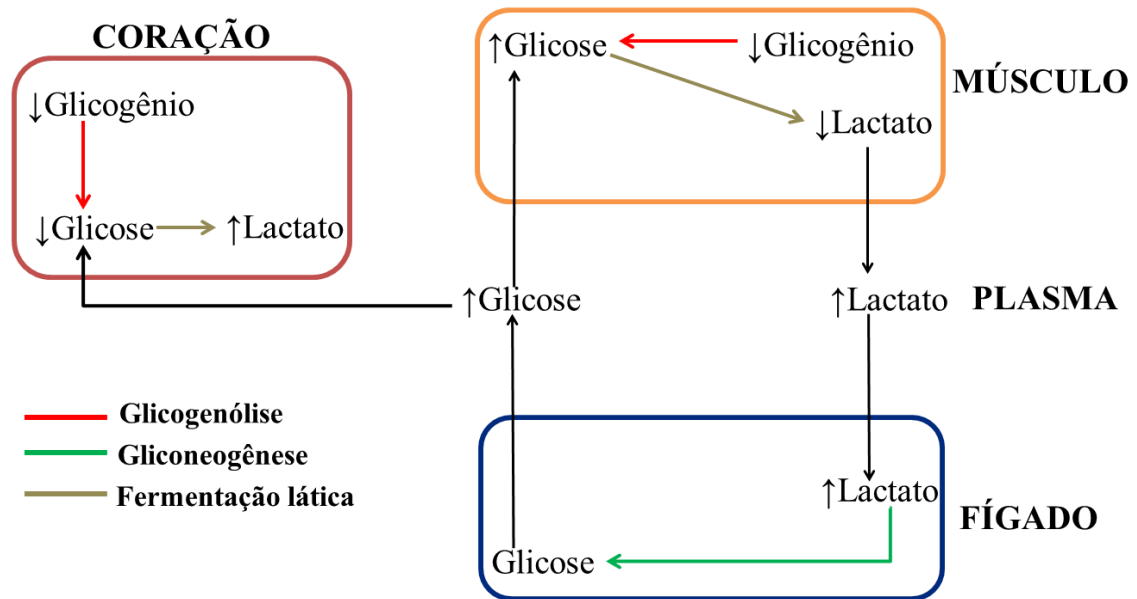
Fonte: Elaborado pela autora.

Portanto, acredita-se que a alta taxa de aminoácidos observada nos resultados obtidos no plasma de *P. geoffroanus*, ocorreu por proteólise tecidual, resultando no fornecimento de esqueletos carbônicos que possibilitam a conversão de aminoácidos em mais glicose, o que está de acordo com resultados obtidos em outros estudos com répteis em condição de hipometabolismo no período de hibernação, no qual observou-se

que o aumento na concentração de ácido úrico ocorre pela influência do catabolismo proteico, cujo produto final é o ácido úrico (AL-BADRY; NUZHY, 1983). Entretanto, a concentração de proteínas teciduais se manteve constante no estudo em questão e por conta disso acredita-se que a degradação não foi tão alta a ponto de ser detectada nas análises. Outra possível causa da alta taxa de aminoácidos indica que os mesmos estão sendo convertidos em ácido úrico para excreção. Entretanto, mesmo que quelônios utilizem o ácido úrico como principal produto para a excreção dos compostos nitrogenados, durante o hipometabolismo, a excreção de compostos nitrogenados é interrompida devido à alta utilização de ATP nessa via, resultando assim no aumento das concentrações plasmáticas de ácido úrico (JACKSON, 2000).

No estudo em questão, o cágado dulcícola *P. geoffroanus* provavelmente realizou glicogenólise no tecido muscular cardíaco e esquelético, o que pode ter resultado no fornecimento de glicose para os demais tecidos, mantendo a glicemia corpórea mesmo nessa condição crítica. Além disso, nos dois tecidos musculares, a glicose proveniente da glicogenólise serviu como substrato para fermentação láctica, e o lactato resultante da fermentação foi encaminhado para o fígado pela circulação sanguínea para realização da gliconeogênese, obtendo glicose e irrigando os tecidos necessários. Como já mencionado anteriormente, o fígado é considerado um tecido gliconeogênico por ser o único que possui a enzima glicose-6-fosfatase, possibilitando o retorno da glicose aos músculos pelo ciclo de Cori, comum nos vertebrados (Figura 15).

Figura 15: Resumo da via metabólica de *Phrynops geoffroanus* durante hipóxia induzida.



Fonte: Elaborado pela autora.

O Ciclo de Cori é resultado de uma cooperação metabólica entre o músculo esquelético e o fígado, extremamente importantes para os vertebrados. No caso de *P. geoffroanus*, este ciclo aparentemente foi importante, a ponto de possivelmente garantir sua sobrevivência na situação em que foi submetido.

Estudos acerca da regulação metabólica em quelônios dulcícolas focam em suas adaptações para sobreviver em períodos críticos associados ao clima temperado, cenário em que quelônios dulcícolas de clima tropical não são compreendidos e estudados, como é o caso de *P. geoffroanus*. Alguns estudos com espécimes de tartarugas de água doce da Amazônia, *Podocnemis expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata* foram realizados por Duncan e Marcon em 2009, alegando que tais organismos demonstram uma elevada capacidade metabólica para suportar e sobreviver em situações anaeróbicas, demonstrando assim que podem reduzir sua taxa metabólica em qualquer temperatura (HICKS; WANG, 2004). Conclui-se que a espécie *P. geoffroanus* possui ajustes que permitem a sobrevivência do animal por determinado período de tempo quando em situação crítica de privação de oxigênio, porém são necessários mais estudos para concluir se a espécie não sofre nenhum tipo de dano tecidual.

As diferenças demonstradas entre os intermediários metabólicos do trabalho em questão, quando comparadas com outros autores acima citados, devem-se, provavelmente, às diferentes espécies estudadas e seus diferentes habitats, alimentação, idade, estresse em que foram submetidos, diferente manipulação e manejo dos animais, temperaturas, entre outros fatores. Fatos esses que podem influenciar diretamente no metabolismo das espécies. Sendo assim, pode-se assumir que *P. geoffroanus* possui diversos mecanismos metabólicos para suportar a condição de hipóxia. Esses mecanismos incluem a manutenção de reservas de combustíveis fermentáveis no organismo, para que seja possível realizar o metabolismo anaeróbico quando em privação de oxigênio.

CONCLUSÕES

5 Conclusões:

- O hematócrito possivelmente aumenta como consequência da desidratação e perda de volume plasmático, uma vez que o animal não se hidrata durante a hipóxia ou pela hemoconcentração. A concentração de hemoglobina aumenta durante a hipóxia a fim de provavelmente tornar o transporte de oxigênio mais efetivo aos tecidos, evitando possíveis lesões teciduais. Além disso, o VGM e HGM salientam a adaptação do animal por meio do aumento do volume celular e aumento do peso da hemoglobina no eritrócito, indicando que durante a hipóxia os animais investem na produção de hemoglobina. Sendo assim, o organismo possui adaptações que tornam o transporte de oxigênio para os tecidos mais eficazes quando submetidos a condições de depleção de oxigênio;
- A preferência energética do glicogênio está relacionada ao fornecimento de compostos glicosídicos que são utilizados para a via da glicólise anaeróbica, uma vez que o organismo realiza glicogenólise e gliconeogênese constantemente com intuito de manter a glicemia do animal. Altas concentrações de lactato são observadas devido à ausência do oxigênio, demonstrando que o organismo realiza fermentação láctica para a produção de ATP. Sendo assim, possui manutenção de reservas de combustíveis fermentáveis no organismo, possibilitando o metabolismo anaeróbico e gliconeogênese em condições de privação de oxigênio.
- Conclui-se que a espécie altera sua fisiologia quando em condição de hipóxia, demonstrando que possui ajustes para sobreviver por determinado período nessa condição crítica de privação de oxigênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-BADRY, K. S.; NUZHY, S. Hematological and biochemical parameters in active and hibernating sand vipers. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 74, n. 1, p. 137-141, 1983.
- ARAÚJO, J. C. et al. Lipoproteínas de répteis: estrutura, metabolismo e aspectos comparativos. **Artigo em periódico indexado (ALICE)**. Embrapa Amapá, 2015.
- BANERJE, V.; BANERJE, M. Seasonal variations of erythrocyte number and hemoglobin content in a common Indian lizard (*Varanus monitor*). **Zool Anz**, v. 182, p. 203-207, 1969.
- BICKLER, P.E.; BUCK, L.T. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. **Annu. Rev. Physiol**, v.69, p.145-170, 2007.
- BIDINOTTO, P. M. et al. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. **Bol. Tec. Cepta**, v. 1, p. 53-60, 1997.
- BIGGAR, K. K.; STOREY, K. B. Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 9, p. 1281-1289, 2015.
- BRANDÃO, F. R.; DE CARVALHO GOMES, L.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 349, 2006.
- CAMPANHA, M. B. et al. Variabilidade espacial e temporal de parâmetros físico-químicos nos rios Turvo, Preto e Grande no estado de São Paulo, Brasil. **Química Nova**, p. 1831-1836, 2010.
- CARTER, G.S. Air breathing. In: Brown, M. (ed) **Physiology of fishes**. New York: Academic Press, 1957. p 65-79.
- CHEN, K.; COLE, R.B.; REES, B.B. Hypoxia-induced changes in the zebrafish (*Danio rerio*) skeletal muscle proteome. **J. Proteomics**. v. 78, p. 477-485, 2013.
- CIESLA, B. **Hematology in practice**. 1 ed. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2007.
- COELHO, S.; GAMITO, S.; PÉREZ-RUZAFÁ, A. Trophic state of Foz de Almargem coastal lagoon (Algarve, South Portugal) based on the water quality and the phytoplankton community. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 71, p. 218-231, 2007.
- CONTARTEZE, R. V. L. et al. Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato. **Rev Bras Med Esporte**, v. 13, n. 3, p. 169-74, 2007.
- COPLEY, N. G. Alloxan and ninhydrin test. **Analyst**, v. 66, p. 492-493, 1941.
- SILVA, R. D. da et al. Parâmetros hematológicos e bioquímicos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) sob estresse por exposição ao ar. 2010.

- DA SILVA-CASTIGLIONI, D. et al. Adaptações metabólicas dos crustáceos ao déficit de oxigênio ambiental. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 1, p. 114, 2012.
- DA SILVEIRA, U. S.; LOGATO, P. V. R.; DA CONCEIÇÃO PONTES, E. Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 1, p. 817-836, 2009.
- DAW, J. C.; WENGER, D. P.; BERNE, Robert M. Relationship between cardiac glycogen and tolerance to anoxia in the western painted turtle, *Chrysemys picta bellii*. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 22, n. 1, p. 69-73, 1967.
- DRABKIN, D. The standardization of hemoglobin measurement. **American Journal Medical Science**. v. 215, n. 1, p. 110,-111, 1948.
- DESSER, S. S. Morphological, cytochemical, and biochemical observations on the blood of the tuatara, *Sphenodon punctatus*. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 5, n. 3, p. 503-508, 1978.
- DRIEDZIC, W. R.; GESSER, H. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis, and low temperatures. **Physiological Reviews**, v. 74, n.1, p.221-258, 1994;
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-358, 1956.
- DUNCAN, W. P.; MARCON, J. L. Enzymes of energy metabolism in hatchlings of amazonian freshwater turtles (Testudines, Podocnemididae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2. p. 319-325, 2009.
- FALCE, M.C.L.B. **Hematologia de répteis - revisão bibliográfica**. Monografia de conclusão do curso de Clínica Médica e Cirúrgica de Animais Selvagens e Exóticos. Universidade Castelo Branco. Instituto Quallitas de pós graduação. Campinas, 2009.
- FUSTER, J. F.; PAGES, T.; PALACIOS, L. Effect of temperature on oxygen stores during aerobic diving in the freshwater turtle *Mauremys caspica leprosa*. **Physiological zoology**, p. 7-18, 1997.
- FRASER, J.; MELLO, L.V.; WARD, D.; REES, H.H.; WILLIAMS, D.R.; FANG,Y.; BRASS, A.; GRACEY, A.Y.; CROSSINS, A.R. Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 103, n. 8, p. 2977-2981, 2006.
- FRYE, F. L. **Reptile Care: an Atlas of Diseases and Treatments**. Neptune City: T. F. H. Publications, v. 1, p. 209-224, 1991.
- 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
- HAGGAG, G.; RAHEEM, K. A.; KHALIL, F. Hibernation in reptiles—II. Changes in blood cell glucose, haemoglobin, red blood cell count, protein and non-protein nitrogen. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 17, n. 1, p. 335-339, 1966.

HICKS, J. W.; WANG, T. The functional significance of the reptilian heart: new insights into an old question. **Ontogeny and Phylogeny of the Vertebrate Heart**. p. 207-227, 2012.

_____. Hypometabolism in reptiles: behavioural and physiological mechanisms that reduce aerobic demands. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 141, n. 3, p. 261-271, 2004.

_____. Hypoxic hypometabolism in the anesthetized turtle, *Trachemys scripta*. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 277, n. 1, p. R18-R23, 1999.

HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. **Fisiologia Animal**. 2. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2012.

HOCHACHKA, P. W. Oxygen—a key regulatory metabolite in metabolic defense against hypoxia. **American zoologist**, v. 37, n. 6, p. 595-603, 1998.

HOCHACHKA, P. W. et al. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 93, n. 18, p. 9493-9498, 1996.

HOCHACHKA, P. W.; GUPPY, M. **Metabolic arrest and the control of biological time**. Harvard University Press, 1987.

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. Living without oxygen: lessons from the freshwater turtle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 125, n. 3, p. 299-315, 2000.

_____. How a turtle's shell helps it survive prolonged anoxic acidosis. **Physiology**, v. 15, n. 4, p. 181-185, 2000.

JOHANSEN, K.; Air breathing in fishes. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J. (eds). **Fish Physiology**. vol IV. San Diego: Academic Press, 1970. p.361- 411.

JUNK, W.J.; SOARES, G.M.; CARVALHO, F.M. Distribution of fish species in a lake of the Amazon river floodplain near Manaus (lago do Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. **Amazoniana**. v. 7, p. 397, 1983.

KAM, Y. Physiological effects of hypoxia on metabolism and growth of turtle embryos. **Respiration physiology**, v. 92, n. 2, p. 127-138, 1993.

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.

LUTZ, P. L. Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain. **Annual Review of Physiology**, v. 54, n. 1, p. 601-618, 1992.

- LUTZ, P. L. et al. Relationships between aerobic and anaerobic energy production in turtle brain in situ. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 247, n. 4, p. R740-R744, 1984.
- LUTZ, P. L.; MILTON, S. L. Negotiating brain anoxia survival in the turtle. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 18, p. 3141-3147, 2004.
- LUTZ, P. L.; NILSSON, G. E. Contrasting strategies for anoxic brain survival-glycolysis up or down. **Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. 2, p. 411-419, 1997.
- LUTZ, P. L.; NILSSON, G. E.; PRENTICE, H. The brain without oxygen: Causes of failure molecular and physiological mechanisms for survival. **Kluwer Academic Press, Dordrecht, Netherlands**, 2003.
- MCCORD, W. P.; JOSEPH-OUNI, M.; LAMAR, W. W. A taxonomic reevaluation of *Phrynops* (Testudines Chelidae) with the description of two new genera and a new species of Batrachemys. **Revista de Biología Tropical**, v. 49, n. 2, 715-764, 2001.
- 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**, p. 1436-1441, 2009.
- MOON, T. W.; MOMMSEN, T. P. Enzymes of intermediary metabolism in tissue of the little skate, *Raja erinacea*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 244, n. 1, p. 9-15, 1987.
- MOREIRA, D. C. et al. Current Trends and Research Challenges Regarding “Preparation for Oxidative Stress”. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 702, 2017.
- MOTT, J. C. The ability of young mammals to withstand total oxygen lack. **British medical bulletin**, v. 17, n. 2, p. 144-147, 1961.
- MOYES, C. D; SCHULTE, P. M. **Princípios de Fisiologia Animal**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MURPHY, B. J. et al. Hypoxic coordinate regulation of mitochondrial enzymes in mammalian cells. **Science**, v. 223, p. 707-710, 1984.
- MUUSZE, B., et al. Hypoxia tolerance of Amazon fish. Respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v.120, p. 151–156, 1998
- NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2014.
- _____. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- NILSSON, G. E. Surviving anoxia with the brain turned on. **Physiology**, v. 16, n. 5, p. 217-221, 2001.
- PENNEY, D. G. Effects of prolonged diving anoxia on the turtle, *Pseudemys scripta elegans*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 47, n. 3, p. 933-941, 1974.

- PITOL, D.L. et al., Radioautographic study of the seasonal distribution of leukocytes in turtles *Phrynopshilarii* (CheloniaChelidae). **Micron**, v. 39, n. 8, p. 1381-1386, 2008.
- RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia Animal - Mecanismos e Adaptações**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 448-550.
- RICHARDS, J.G. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. **J. Exp. Biol**, v. 214, p. 191–199, 2011.
- SCHWERTE, T.; ÜBERBACHER, D.; PELSTER, B. Non-invasive imaging of blood cell concentration and blood distribution in zebrafish *Danio rerio* incubated in hypoxic conditions in vivo. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 8, p. 1299-1307, 2003.
- SILVA, T.L. et al. Blood sampling in Testudinidae and Chelidae. **Herpetological Review**, v.43, p. 64-65, 2012.
- SOUZA, F. L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, v. 3, n. 1, p. 15-27, 2004.
- SOUZA, F. L.; ABE, A. S. Feeding ecology, density and biomass of the freshwater turtle, *Phrynops geoffroanus*, inhabiting a polluted urban river in south-eastern Brazil. **Journal of Zoology**, v. 252, n. 04, p. 437-446, 2000.
- STANLEY, W. C., RECCHIA, F. A.; LOPASCHUK, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and falling heat. **Physiological Reviews**, v. 85, p.1093-1129, 2005.
- STAPLES, J. F.; BUCK, L. T. Matching cellular metabolic supply and demand in energy-stressed animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 153, n. 2, p. 95-105, 2009.
- STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1715-1733, 1996.
- STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Aestivation: signaling and hypometabolism. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 9, p. 1425-1433, 2012.
- TAEGTMEYER, H.; WILSON C. R; RAZEGHI, P.; SHARMA, S. Metabolic energetics and genetics in the heart. **The New York Academy of Sciences**, v. 1047, p.208-218, 2005.
- TIUNOV, L. A. et al. Correlation between hematologic and biochemical parameters in *Testudo horsfieldi*. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 92, n. 1, p. 910-912, 1981.
- TROIANO, J. C.; GOULD, E. G.; GOULD, I. Hematological reference intervals in argentine lizard *Tupinambis merianae* (Sauria—Teiidae). **Comparative Clinical Pathology**, v. 17, n. 2, p. 93, 2008.
- ULTSCH, G. R. Blood gases, hematocrit, plasma ion concentrations, and acid-base status of musk turtles (*Sternotherus odoratus*) during simulated hibernation. **Physiological zoology**, v. 61, n. 1, p. 78-94, 1988.

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

_____. 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 Congresso Luso-Espanol de Herpetologia/ XV Congreso Español de Herpetologia**, v.1, p.184-184, 2010.

_____. Assessment of condition factor and hepatosomatic index in *Phrynops geoffroanus* of the urban and controlled area. In: 1st Ibero-American Meeting on Toxicology and Environmental Health, 2009.

VIEIRA, V. P.; INOUE, L. A. K.; MORAES, G. Metabolic responses of matrinxã (*Bryconcephalus*) to dietary protein level. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 140, n. 3, p. 337-342, 2005.

VIZOTTO, L. D.; SILVA, T. L. ***Phrynops geoffroanus*: Quelônios no Brasil**. São José do Rio Preto: HN Editora, 2017.

VOET, D; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

WANG, T.; KROSNIUNASI, E. H.; HICKS, J. W. Vagal control of heart rate and cardiac shunts in reptiles: relation to metabolic state. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 6, p. 777-784, 2001.

_____. The role of cardiac shunts in the regulation of arterial blood gases. **American zoologist**, v. 37, n. 1, p. 12-22, 1997.

WEBSTER, K. A. et al. Coordinate reciprocal trends in glycolytic and mitochondrial transcript accumulations during the in vitro differentiation of human myoblasts. **Journal of cellular physiology**, v. 142, n. 3, p. 566-573, 1990.

WELKER, A.F. et al. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 165, p. 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.

APÊNDICES

Apêndice A – Protocolos para análises hematológicas

Hematócrito

Homogeneiza-se com delicadeza a amostra, preencher $\frac{3}{4}$ do tubo capilar de microhematócrito com sangue e fechar uma das extremidades do tubo e colocá-lo na centrífuga própria por cerca de 5 minutos a 13.000 rpm.

Realizar a leitura no cartão de referência, cujos valores são dados em porcentagem de volume celular em relação ao total.

Figura 16: Cartão de referência microhematócrito.



Fonte: Autora.

Hemoglobina circulante

Adiciona-se 20µL da amostra em 5 mL de solução Drabkin, posteriormente é colocado em espectrofotômetro micronal com comprimento de onda de 540nm.

O resultado da leitura da absorbância é multiplicado por 32,6 como fator de correção, tendo a concentração de hemoglobina em mM.

Branco: solução de Drabkin.

Solução Drabkin:

0,20g de ferricianeto de potássio,

0,20g de cianeto de potássio

1000 mL de água destilada q.s.p.

Contagem de eritrócitos

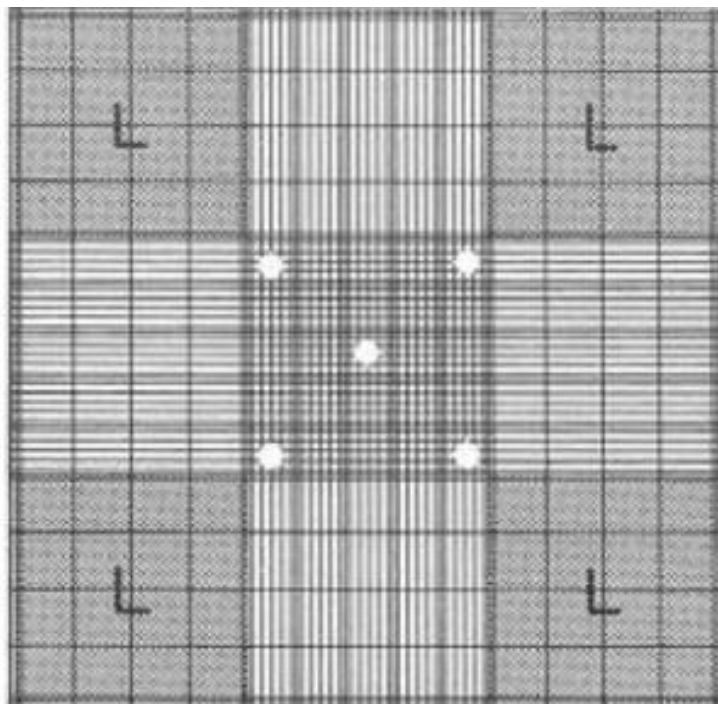
Posteriormente à homogeneização da amostra, aspirar sangue com a pipeta de Thomas total até a graduação 1, e completar com a solução de Natt & Herrick (1952) até a marca 101, agitar a pipeta em movimentos circulares durante um a dois minutos.

Colocar a lamínula na câmara, desprezar as primeiras gotas e colocar a pipeta na abertura da câmara de Neubauer, formando com ela um ângulo de 45°, na qual a mesma é preenchida por capilaridade. Deixar a câmara em ambiente úmido (placa de petri com algodão e água destilada) por 5 minutos, para a perfeita sedimentação dos eritrócitos.

Posterior a essas etapas, inicia-se a contagem total de eritrócitos nos 5 pequenos quadrantes (4 das extremidades e o central), na área do grande quadro central da câmara de Neubauer (Figura 16).

Realiza-se a contagem em microscópio com objetiva de 40x. O valor total dessa contagem (n) deve ser multiplicado por 5000, valor que considera a diluição, a altura da câmara e área contada, resultando no valor estimado de eritrócitos por microlitro de sangue.

Figura 17: Imagem macroscópica da câmara de Neubauer, onde é realizada a contagem de eritrócitos. A contagem é realizada pelo quadrante central nos cinco quadrados em destaque.



Fonte: Autora.

Solução de Natt and Herrick:

Cloreto de sódio (NaCl) – 3,88g

Sulfato de sódio (Na₂ SO₄) – 2,50 g

Fosfato de sódio dibásico (Na₂ HPO₄: 12H₂O) – 2,91 g

Fosfato de potássio monobásico (KH₂ PO₄)– 0,25 g

Formalina (37%) – 7,50 mL

Metil violeta 2B – 0,10 g

1000 mL de água destilada q.s.p.

A solução é mantida *overnight* e filtrada antes do uso.

Apêndice B – Protocolos para análises metabólicas

Homogeneização de amostras teciduais

Pesar 100 mg de tecido e adicionar 1mL de água destilada em eppendorf de 2mL, homogeneizar com auxílio de um mixer. Posterior a homogeneização colocar o eppendorf em centrífuga durante três minutos a 12.000 rpm.

Descartar o pellet e realocar sobrenadante em alíquotas e armazená-los em freezer - 80°C.

Obs: Caso seja necessário diluir as amostras adicionar maior volume de água destilada ou se for necessário concentrar as amostras, adicionar mais tecido.

Ensaio espectrofotométrico para Glicogênio

Pesar tecido 50 a 100mg e adicionar 1000 μ L de Hidróxido de potássio (KOH) 6N em eppendorf de 2mL, colocar eppendorf em água fervente a 100°C durante três minutos.

Posterior ao banho em água fervente, adicionar em tubo de ensaio em duplicata 250 μ L da solução e adicionar 100 μ L de Sulfato de potássio (K₂SO₄) 10% e 3mL de Álcool etílico e centrifugar o tubo de ensaio durante três minutos a 10.000 rpm.

Subsequente à centrifugação, jogar sobrenadante fora e deixar pellet, adicionar 1000 μ L de água destilada e colocar no vortex para homogeneizar.

Realizar então a leitura das amostras:

Ensaio			
	Reação	Padrão	Branco
Amostra	X μ L	-	-
Água	(500-X) μ L	(500-Y) μ L	500 μ L
Fenol (4,1%)	500 μ L	500 μ L	500 μ L
Ácido Sulfúrico	2mL	2mL	2mL
Glicose (10mmol)	-	Y μ L	-

Realizar o procedimento em tubos de ensaio em duplicata com leitura em espectrofotômetro em 480nm

Observação: Adicionar ácido sulfúrico e fenol na capela.

Ensaio espectrofotométrico para Glicose

Kit para Glicose Liquiform Centerkit – Ref.: 133

Reagentes:

Reagente 1: Tampão fosfato 30 mmol/L, pH 7,5; fenol 1 mmol/L; glicose oxidase 12500 U/L; peroxidase 800 U/L; 4-aminoantipirina ≥ 290 mol/L; azida sódica 7,5 mmol/L; e surfactantes.

Padrão: Glicose 100 mg/dL e biocida não tóxico.

Adicionar em tubo de ensaio em duplicata as seguintes proporções:

Ensaio			
	Reação	Padrão	Branco
Reagente 1	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L
Água	(1000-X) μ L	(1000-Y) μ L	1000 μ L
Padrão	-	Y μ L	-
Amostra	X μ L	-	-

Colocar em banho-maria a 37°C durante 10 minutos, e realizar a leitura das amostras em espectrofotômetro em 520nm.

Ensaio espectrofotométrico para Lactato

Kit para Lactato Enzimático Centerkit – Ref.: 138

Reagentes:

Reagente 1: Tampão 50 mmol/L pH 7,2; 4-aminoantipirina 0,05 mmol/L; peroxidase 1000 U/L e conservante.

Reagente 2: Tampão 50 mmol/L pH 7,2; lactato oxidase 1000 U/L; N-ethylN-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline (TOOS) 1,5 mmol/L e conservante.

Padrão (40 mg/dl): Contém lactato de lítio e azida sódica 0,09%.

O conjunto de um frasco de Reagente 1 e um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho, deve-se transferir o conteúdo de um frasco de Reagente 2 para um frasco de Reagente 1 e homogeneizar suavemente. Opcionalmente, pode-se preparar menor volume do Reagente de Trabalho utilizando a proporção 4 volumes do Reagente 1 e 1 volume do Reagente 2.

Adicionar em tubo de ensaio em duplicata as seguintes proporções:

	Ensaio		
	Reação	Padrão	Branco
Reagente de Trabalho	1000µL	1000µL	1000µL
Água	(1000-X)µL	(1000-Y)µL	1000µL
Padrão	-	YµL	-
Amostra	XµL	-	-

Colocar em banho-maria a 37°C durante 10 minutos, e realizar a leitura das amostras em espectrofotômetro em 550nm.

Ensaio espectrofotométrico para Proteínas

Kit para Proteínas Totais Centerkit – Ref.: 99

Reagentes

Reagente de Biureto: Hidróxido de sódio 600 mmol/L, sulfato de cobre 12 mmol/L, estabilizador e antioxidante.

Padrão: Albumina bovina (4 g/dL) e azida sódica 14,6 mmol/L.

Adicionar em tubo de ensaio em duplicata as seguintes proporções:

	Ensaio		
	Reação	Padrão	Branco
Reagente de Biureto	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L
Água	(1000-X) μ L	(1000-Y) μ L	1000 μ L
Padrão	-	Y μ L	-
Amostra	X μ L	-	-

Colocar em banho-maria a 37°C durante 10 minutos, e realizar a leitura das amostras em espectrofotômetro em 545nm.

Ensaio espectrofotométrico para Aminoácidos

Solução estoque (fazer solução no dia em que for utilizar):

Nihidrina 0,1% em 100mL de álcool isopropílico

Padrão:

Glicina (10mM) em 50 mL de água destilada

Adicionar em tubo de ensaio em duplicata as seguintes proporções:

Ensaio			
	Reação	Padrão	Branco
Solução estoque	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L
Água	(1000-X) μ L	(1000-Y) μ L	1000 μ L
Glicina (1mM)	-	Y μ L	-
Amostra	X μ L	-	-

Colocar em banho-maria a 40°C durante 40 minutos, e realizar a leitura das amostras em espectrofotômetro em 570nm.

Ensaio espectrofotométrico para Triglicerídeos

Kit para Triglicérides Liquiform Centerkit – Ref.: 87

Reagentes:

Reagente 1: Tampão 50 mmol/L, pH 7,0; íons magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 2,70 mmol/L; 4-aminoantipirina 300 mol/L; ATP 1,8 mmol/L; lipoproteína lipase 1400 U/L; glicerolquinase 1000 U/L; glicerolfosfato oxidase 1500 U/L; peroxidase 900 U/L e azida sódica 0,095%.

Padrão: Triglicérides (200 mg/dL) e azida.

Adicionar em tubo de ensaio em duplicata as seguintes proporções:

	Ensaio		
	Reação	Padrão	Branco
Reagente 1	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L
Água	(1000-X) μ L	(1000-Y) μ L	1000 μ L
Padrão	-	Y μ L	-
Amostra	X μ L	-	-

Colocar em banho-maria a 37°C durante 10 minutos, e realizar a leitura das amostras em espectrofotômetro em 520nm.

Ensaio espectrofotométrico para Ácido Úrico

Kit para Ácido Úrico Liquiform Centerkit – Ref.: 140

Reagentes:

Reagente 1: Tampão 155 mM, 4-aminoantipirina 0,1 mM, peroxidase 1000 U/L, azida sódica 0,02% e surfactantes.

Reagente 2: Tampão 155 mM, DHBS 2,5 mM, uricase 300 U/L, azida sódica 0,02% e surfactantes.

Padrão: Ácido úrico 6,0 mg/dL.

O conjunto de um frasco de Reagente 1 e um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho, deve-se transferir o conteúdo de um frasco de Reagente 2 para um frasco de Reagente 1 e homogeneizar suavemente. Opcionalmente, pode-se preparar menor volume do Reagente de Trabalho utilizando a proporção 4 volumes do Reagente 1 e 1 volume do Reagente 2.

Adicionar em tubo de ensaio em duplicata as seguintes proporções:

	Ensaio		
	Reação	Padrão	Branco
Reagente de Trabalho	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L
Água	(1000-X) μ L	(1000-Y) μ L	1000 μ L
Padrão	-	Y μ L	-
Amostra	X μ L	-	-

Colocar em banho-maria a 37°C durante 10 minutos, e realizar a leitura das amostras em espectrofotômetro em 520nm.

ANEXOS

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, peroxidação	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 exige 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 nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 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	Bolsista técnico - pesquisador	368.971.228-90	46916448-7 -	Brasileira
3	Tiago Lucena da Silva	Doutorando - pesquisador	329.812.378-10	433137782 SSP-SP	Brasileira
4	Nathalia Rossigalli Alves Costa	graduanda em ciências biológicas - pesquisador	411.003.468-05	484743739 ssp-SP	Brasileira
5	Jéssica Basilio Bacchi	aluna de graduação em química ambiental - pesquisador	386.195.948-85	454015112 sspsp-SP	Brasileira
6	Maria Isabel Afonso da Silva	Doutoranda - pesquisador	074.584.676-90	8.836.693 SSPMG-MG	Brasileira
7	Vanessa Leiko Oikawa Cardoso	graduanda em ciências biológicas - pesquisadora	381.122.298-80	353422939 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO JOSE DO RIO PRETO	SP	rio Preto, córrego Piedade, córrego Felicidade	Fora de UC Federal

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"), Puçá

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

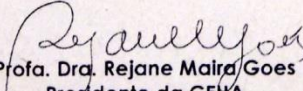
CERTIFICADO

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: sorajaf@ibilce.unesp.br e ceua@ibilce.unesp.br