

unesp

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

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

Gabriela de Sousa Martins

MESTRADO

PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA ANIMAL



Biologia
Estrutural



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Gabriela de Sousa Martins

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

São José do Rio Preto – SP
2018

Gabriela de Sousa Martins

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

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

Financiadora: CNPq - Processo 132013/2016-9

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini-Domingos

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo

São José do Rio Preto – SP
2018

Martins, Gabriela de Sousa.

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

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

82 f. : il.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Coorientador: Luiz Henrique Florindo

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

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

CDU – 598.1

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

Gabriela de Sousa Martins

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

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

Financiadora: CNPq - Processo 132013/2016-9

Comissão Examinadora

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

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

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

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

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

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

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

Dedico

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao CNPq e FAPERP pelo suporte financeiro.

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

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

Isaac Newton

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

Stephen Hawking

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS E QUADROS

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

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

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

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

SUMÁRIO

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

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

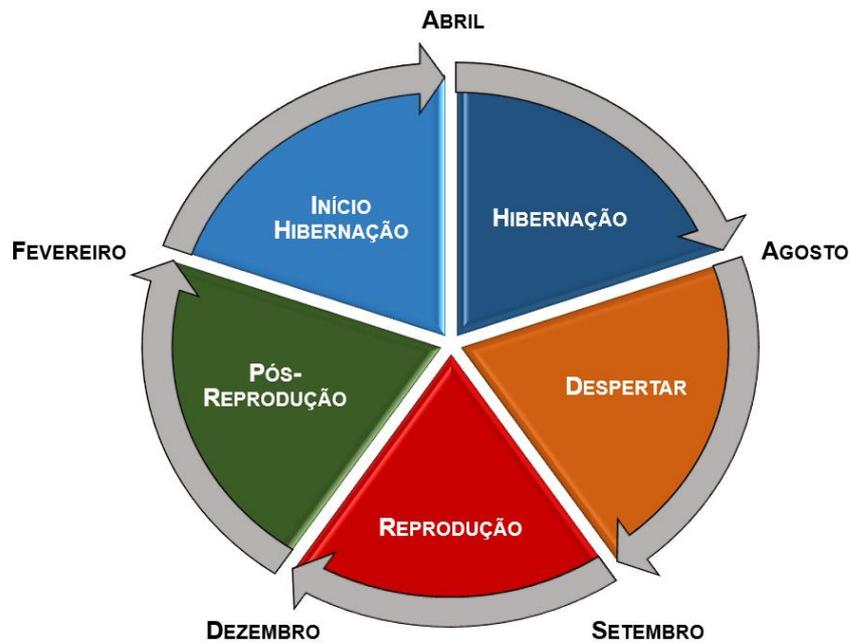


Fonte: Blog “Ray Cannon’s Nature Notes”.

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

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

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



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

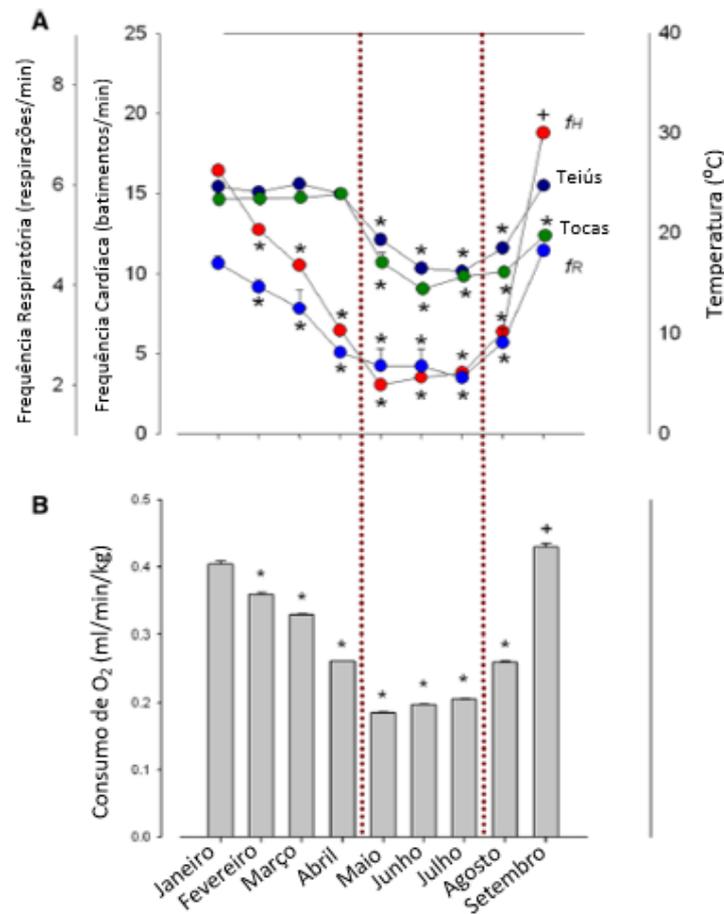
O período reprodutivo de *S. merianae* é caracterizado pelo investimento energético na corte, acasalamento, nidificação e postura de ovos, de forma que precisam se alimentar constantemente e recompor seus estoques energéticos para que a reprodução seja bem sucedida (ANDRADE et al., 2004a; MILSOM et al.,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

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

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

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

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

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

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

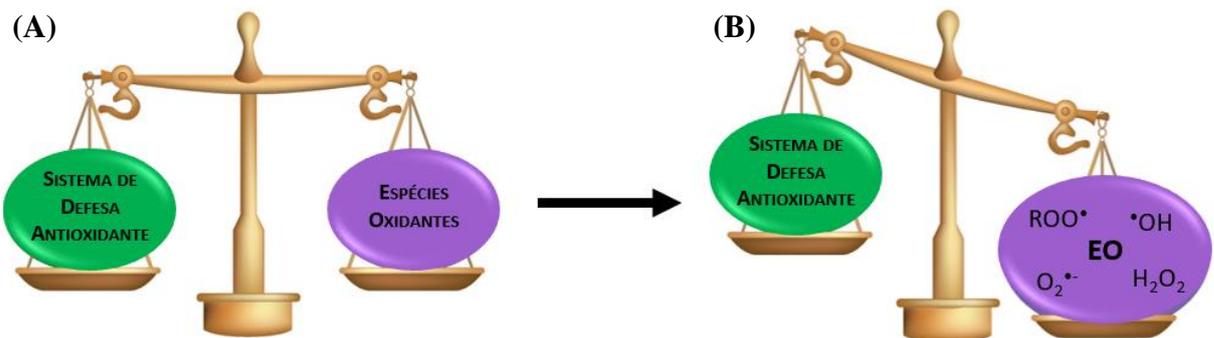
Em condições adequadas de oxigenação, cerca de 0,1-0,2% do oxigênio consumido é convertido nas chamadas espécies oxidantes (EO) (ou espécies reativas de oxigênio – ERO), devido à redução incompleta do O₂ na cadeia respiratória mitocondrial (ALMEIDA; MASCIO, 2011). As principais espécies oxidantes produzidas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

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

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

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

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

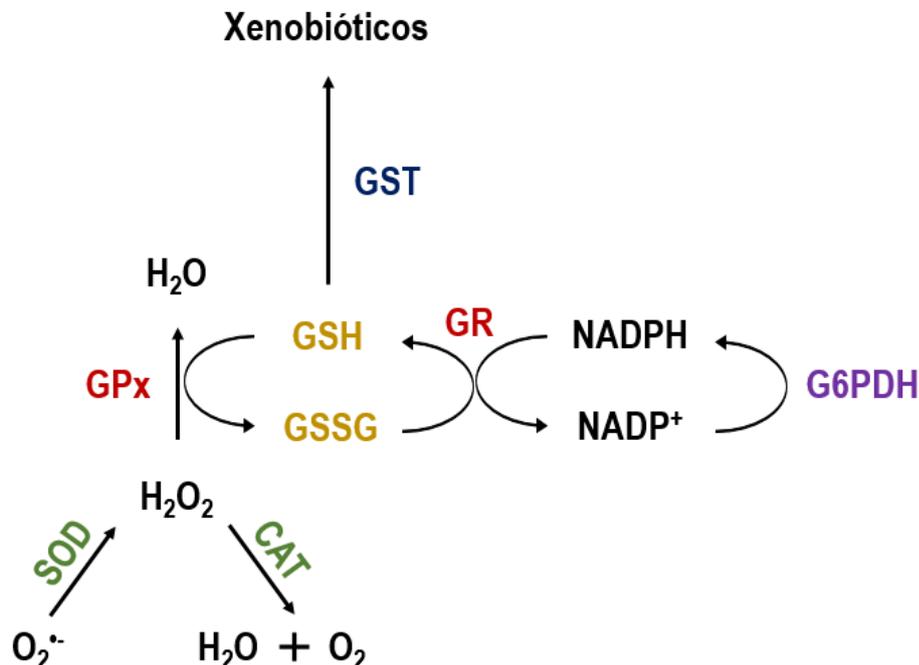


(A) Em condições naturais, os animais mantêm um equilíbrio entre geração de espécies oxidantes e sua neutralização por meio do sistema de defesa antioxidante. (B) Por outro lado, o desequilíbrio do metabolismo redox, seja por meio do excesso de espécies oxidantes ou por ineficácia/insuficiência das defesas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

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

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

Figura 5. Sistema de defesa antioxidante e metabolismo redox.



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar as alterações no metabolismo redox e do perfil hematológico no tecido sanguíneo de *Salvator merianae* durante seu ciclo fisiológico anual.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a massa corpórea e temperatura corporal de *S. merianae* de acordo com três períodos do seu ciclo anual: metabolismo padrão pré-hibernação; durante período de hibernação; e retorno ao metabolismo padrão pós-hibernação (despertar);
- Avaliar o metabolismo redox em tecido sanguíneo, por meio da quantificação de marcadores de capacidade antioxidante e dos níveis de biomoléculas oxidadas em três períodos do ciclo anual de *S. merianae*: pré-hibernação, hibernação, e despertar;
- Verificar se o perfil hematológico de *S. merianae* sofre alterações em três períodos do ciclo anual: pré-hibernação; hibernação; e despertar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COLETAS DE AMOSTRAS DE SANGUE

O ciclo anual de *S. merianae* avaliado refere-se ao ano de 2017, de forma que inicialmente o grupo amostral era composto por oito animais, porém dois deles vieram a óbito durante o período de hibernação, por causas desconhecidas. Assim, foram utilizados seis espécimes juvenis de teiús machos, disponibilizados pelo Laboratório de Zoofisiologia Comparativa dos Vertebrados da UNESP de São José do Rio Preto - SP. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP/IBILCE (nº. 149/2016).

Durante o período de pré-hibernação (janeiro a abril), os animais foram mantidos em recintos externos, em temperatura ambiente (entre 20 e 35°C, segundo o website *Accuweather* para São José do Rio Preto - SP), sendo alimentados três vezes por semana com carne bovina, pescoço de frango, e/ou ovos (SANDERS et al., 2015) (Figura 6A). Os animais foram monitorados diariamente, a fim de detectarmos o início do período de hibernação, observando principalmente o desinteresse em forragear e diminuição da atividade geral.

Durante a hibernação (maio a agosto), os animais permaneceram inativos e afáticos, sendo mantidos a temperatura ambiente (entre 15 e 25°C, segundo o website *Accuweather* para São José do Rio Preto - SP) em caixas plásticas individuais com orifícios na porção superior para constante oxigenação (ANDRADE et al., 2004b) (Figura 6B). Com três meses de hibernação os animais retornaram à atividade aos poucos e, devido à perda de peso aparente, somente após dez dias de alimentação e hidratação diária foi possível a coleta das amostras de sangue referentes ao período de despertar (agosto).

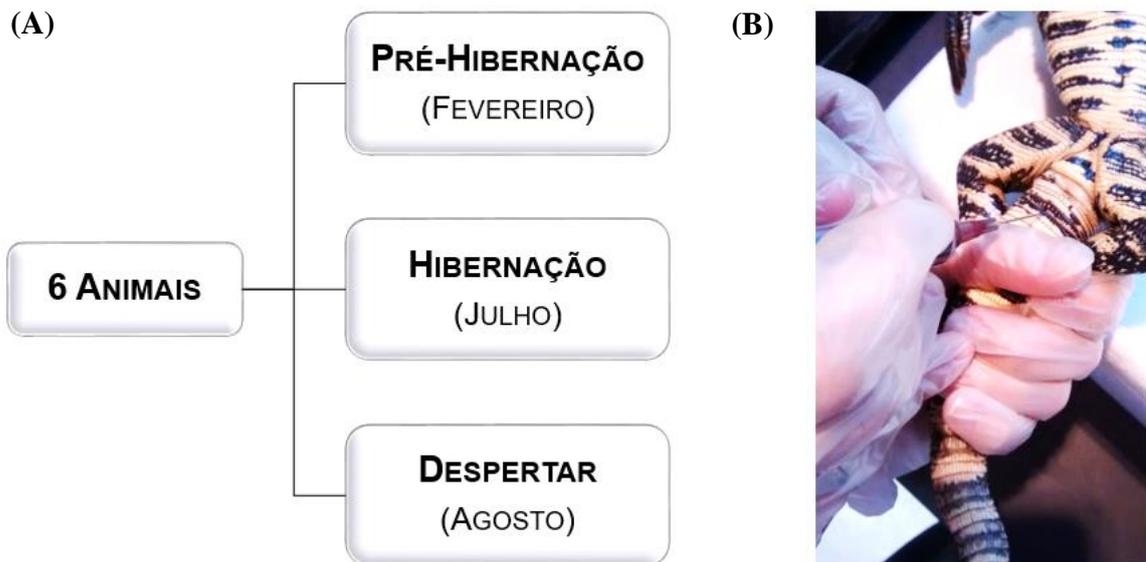
Figura 6. Espécimes de *Salvator merianae* em diferentes momentos do ciclo fisiológico.



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

Para a realização dos testes hematológicos e do metabolismo redox foram necessárias coletas de amostras de sangue em três períodos experimentais: pré-hibernação (fevereiro), hibernação (julho) e despertar (agosto) (Figura 7A). Os animais foram previamente pesados, a temperatura foi aferida com termômetro bucal e cerca de 2 mL de amostras de sangue periférico foram coletados da veia caudal (Figura 7B). As coletas de sangue foram realizadas no período da manhã, com agulhas descartáveis, após higienização do local da perfuração com álcool 70%, para evitar qualquer risco de contaminação. Em seguida, as amostras foram depositadas em tubos contendo anticoagulante heparina sódica, sendo imediatamente processadas, de forma que uma fração foi utilizada para análise do hemograma e outra, para preparo do hemolisado e obtenção do plasma (metabolismo redox).

Figura 7. Períodos experimentais e coleta das amostras de sangue de *Salvator merianae*.



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

3.2. METABOLISMO REDOX

Para avaliação das atividades enzimáticas, a partir de uma fração do sangue total, foram preparados hemolisados, diluindo as amostras em dez volumes de água destilada, a fim de avaliar o conteúdo enzimático intracelular. Posteriormente, a fração remanescente de cada amostra foi centrifugada a 850g por 20 minutos, e no plasma obtido (sobrenadante) foram quantificados os níveis de biomoléculas oxidadas (BO). As alíquotas de hemolisado e de plasma foram, imediatamente, armazenadas a -80°C até o momento das análises.

As atividades das enzimas catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), e glutaciona S-transferase (GST) foram quantificadas por espectrofotometria e os respectivos ensaios bioquímicos tiveram temperatura controlada conforme as temperaturas corporais médias de cada período experimental. Já os níveis de biomoléculas oxidadas (primordialmente lipídios e carboidratos) foram determinados por meio do produto formado com o ácido tiobarbitúrico, e posterior detecção por cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a um detector de fluorescência (HPLC-FD) (SILVA et al., 2017).

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

A atividade da CAT foi medida quantificando a taxa de decomposição do H₂O₂ pela enzima, por meio do decréscimo da absorbância em 240nm. O ensaio para a reação de CAT foi composto dos seguintes reagentes e respectivas concentrações finais: tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0, contendo 0,25mM de EDTA; e 10mM de H₂O₂. Foram testadas várias reações com volumes de amostras diferentes, a fim de identificar o volume ideal para que a reação ocorresse de maneira linear e decrescente. Para os três períodos experimentais foram utilizados 5µL de hemolisado diluído em dez volumes. Não há necessidade de utilizar o branco neste ensaio enzimático.

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

Este método baseia-se na medida do consumo de NADPH em absorbância de 340nm, promovido durante a redução da glutaciona oxidada (GSSG). O ensaio foi realizado com os seguintes reagentes e respectivas concentrações finais: tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,0, contendo 0,25mM de EDTA; 0,1U/mL de glutaciona redutase; GSH a 1mM; NADPH a 0,2mM; e tBOOH a 0,005mM. Foram testadas várias reações com volumes de amostras diferentes, a fim de identificar o volume ideal para que a reação ocorresse de maneira linear e decrescente. Para os três períodos experimentais foram utilizados 10µL de hemolisado. O branco utilizado consistiu em 495µL de meio de reação e 5µL de tBOOH.

- *Atividade enzimática da Glutaciona Redutase (GR)* (CARLBERG; MANNERVIK, 1985):

A atividade da GR foi avaliada com base no consumo do NADPH, que é estimado por meio da variação de absorbância acompanhada a 340nm, na presença do substrato GSSG. A metodologia consiste na redução da GSSG a GSH pela enzima. A reação foi conduzida com os

seguintes reagentes e respectivas concentrações finais: tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,5, contendo EDTA a 1mM; GSSG a 2,5mM; e NADPH a 0,12mM. Foram testadas várias reações com volumes de amostras diferentes, a fim de identificar o volume ideal para que a reação ocorresse de maneira linear e decrescente. Para os três períodos experimentais foram utilizados 30µL de hemolisado. O branco foi composto por 480µL de tampão, 10µL de GSSG e 10µL de solução de NADPH.

- *Atividade Enzimática de G6PDH (GLOCK; MCLEAN, 1953)*

A atividade da G6PDH foi medida quantificando a taxa de formação de NADPH, em comprimento de onda de 340nm. A reação foi constituída pelos seguintes reagentes e respectivas concentrações finais: tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,4; 4mM de MgCl₂; NADP a 0,135mM; e G6P a 1,5mM. Para cada animal avaliado, o ensaio foi composto de uma solução sem G6P e amostra (branco) e duas alíquotas de meio de reação contendo G6P e amostra. Foram testadas várias reações com volumes de amostras diferentes, a fim de identificar o volume ideal para que a reação ocorresse de maneira linear e crescente. Para os três períodos experimentais foram utilizados 30µL de hemolisado.

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

O ensaio enzimático baseou-se na quantificação da formação do produto CDNB-SG e a análise espectrofotométrica foi realizada com comprimento de onda de 340nm. A reação foi conduzida com os seguintes reagentes e respectivas concentrações finais: tampão fosfato de potássio 200mM, pH 6,5; GSH e CDNB a 2mM. Foram testadas várias reações com volumes de amostras diferentes, a fim de identificar o volume ideal para que a reação ocorresse de maneira linear e crescente. Para o período de pré-hibernação foram utilizados 40µL de hemolisado, enquanto os períodos de hibernação e despertar foram avaliados com 45µL de hemolisado. O branco foi utilizado para avaliar a hidrólise espontânea, consistindo na mistura de 490µL de tampão fosfato de potássio; 5µL de GSH; e 5µL de CDNB.

- *Avaliação dos níveis de biomoléculas oxidadas (BO)*

Como marcador de oxidação, medimos os adutos fluorescentes produzidos pela reação de biomoléculas oxidadas com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) nas amostras de plasma (FORMAN et al., 2015). Os adutos formados foram quantificados por um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a um detector de fluorescência (HPLC-FD)

(DOMIJAN et al., 2015). Os derivados foram separados em uma coluna C18 (250 x 4,6mm, 5µm) e fase móvel composta por solução de fosfato de potássio monobásico 50mM pH 6,8, com 40% de metanol, com fluxo isocrático de 1mL/min. A quantificação dos níveis de BO foi feita com base em uma curva de calibração previamente construída e preparada de acordo com o mesmo procedimento usado para as amostras, a partir de padrões autênticos de malondialdeído (MDA).

3.3. PERFIL HEMATOLÓGICO

O hemograma é o exame laboratorial que fornece dados quantitativos sobre os eritrócitos, leucócitos e hemoglobina, contidos em amostras de sangue total. Este exame foi efetuado manualmente, cujo protocolo inclui:

- *Hematócrito*: representa um modo simples para verificar a porcentagem de volume dos glóbulos vermelhos no sangue total, por meio da relação entre volume de eritrócitos e do volume de plasma.

- *Dosagem de Hemoglobina Circulante*: fornece a concentração de hemoglobina do sangue a partir do método de cianometahemoglobina. Assim, a hemoglobina e todos os seus derivados são transformados em cianometahemoglobina por um reativo especial a base de cianeto e, em seguida, é quantificada por espectrofotometria.

- *Contagem global de células (eritrócitos e leucócitos)*: permite calcular o número absoluto de células contidas em um determinado volume de sangue. Consiste em colocar uma amostra de sangue diluído com reativo apropriado em uma câmara de contagem de volume conhecido (Câmara de Neubauer). Em alguns minutos, os elementos depositam-se no fundo da câmara, a qual é quadriculada a fim de facilitar a contagem feita ao microscópio. Por fim, um cálculo que leva em consideração a diluição e o volume da célula fornece o número de elementos por µL de sangue total.

- *Cálculo dos índices hematimétricos*: representam cálculos matemáticos para obtenção do volume globular médio de eritrócitos (VGM), a partir da divisão do volume globular contido em um mm³ de sangue (hematócrito) pelo número de eritrócitos presentes no mesmo volume (contagem de eritrócitos); da concentração de hemoglobina globular média (CHGM) ou porcentagem média de hemoglobina por hemácia, cujo cálculo consiste em dividir

o resultado da dosagem de hemoglobina pelo hematócrito; e da hemoglobina globular média (HGM) ou quantidade total de hemoglobina, obtida relacionando-se o resultado da dosagem de hemoglobina ao número de eritrócitos existentes no mesmo volume.

- *Contagem diferencial de leucócitos:* por meio da avaliação de esfregaços sanguíneos, permite identificar a variedade de leucócitos e estabelecer suas proporções relativas. Visa estabelecer o valor percentual de cada leucócito no sangue circulante, para depois, conhecendo-se o total de glóbulos brancos, definir o valor total de cada tipo leucocitário.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade pelos testes *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respectivamente. Para comparação das variáveis nas diferentes condições de estudo foram utilizados o teste ANOVA para medidas repetidas, complementado por *Tukey* (para dados paramétricos), ou teste de *Friedman* seguido por *Dunnnett* (para dados não paramétricos). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ e as análises estatísticas foram realizadas no software *Statistica*® 8.0 (StatSoft), enquanto que os gráficos foram feitos no *GraphPrad Prisma* versão 5.01 para Windows.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PESO E TEMPERATURA

Inicialmente os grupos foram caracterizados com relação ao peso (kg) e a temperatura corporal (°C). O peso corporal médio dos animais nos períodos de pré-hibernação, hibernação e despertar foram respectivamente 1,06 kg, 0,92 kg e 1,01 kg. Dessa forma, observou-se que, com dois meses de hibernação, os animais perderam aproximadamente 15% de massa corpórea. Além disso, com o retorno da alimentação e hidratação por dez dias consecutivos, os animais recuperaram quase que totalmente (95%) o peso perdido durante todo o período de hibernação (Figura 8A).

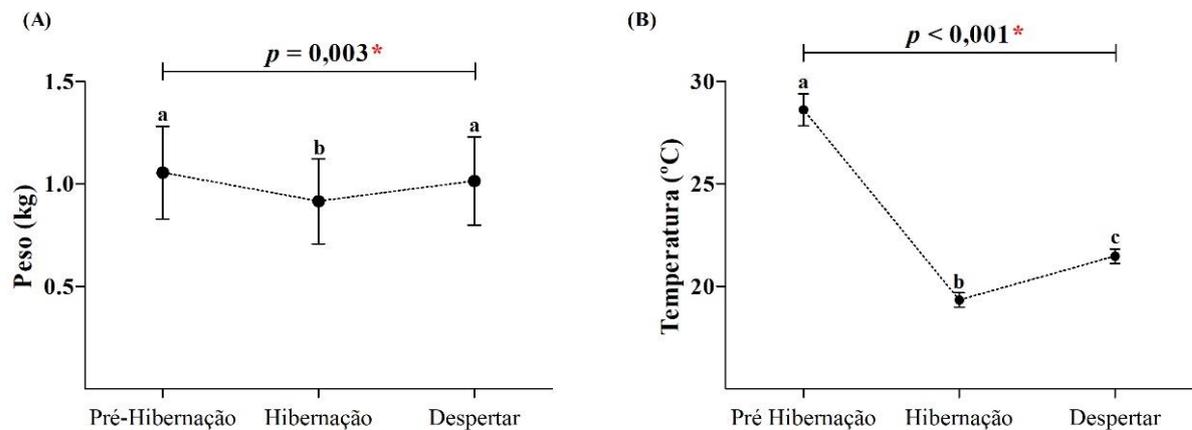
Souza e colaboradores (2004) avaliaram a massa corpórea de lagartos teiús recém-eclodidos ao longo de um ciclo anual, verificando também uma redução de 15% durante a dormência de inverno, em relação ao fim do outono. Além disso, estes mesmos autores observaram que aproximadamente 60% do peso corporal foi rapidamente recuperado após a ingestão de água nas primeiras 48 horas do despertar. Isso sugere que a variação na massa corpórea é, em grande parte, devido à perda de água evaporativa (SOUZA et al., 2004).

Com relação à temperatura corporal média dos animais no dia da coleta das amostras de sangue para os períodos de pré-hibernação, hibernação e despertar, obteve-se os valores de 28,6°C, 19,3°C e 21,5°C, respectivamente. A pré-hibernação coincidiu com o verão, o que pode ser destacado por temperaturas corporais mais altas neste período; já a hibernação e o despertar coincidiram com o inverno, no entanto evidenciou-se temperaturas mais baixas na condição hipometabólico (Figura 8B).

Estudos recentes indicaram uma variação de temperatura corporal semelhante também em espécimes de *S. merianae*. Durante as estações de verão e primavera (Setembro a Março), estes animais estão ativos e aquecem-se ao sol durante o dia, atingindo temperaturas corporais médias próximas a 30°C e máximas de 32°C a 35°C (TATTERSALL et al., 2016). Por outro lado, durante o outono e inverno (Abril a Setembro), os animais encontram-se inativos e dormentes em suas tocas, mantendo níveis mínimos de atividade durante todo o período hipometabólico, atingindo temperaturas corporais médias próximas a 20°C (TATTERSALL et al., 2016).

Dessa forma, foi possível caracterizar alterações referentes ao peso e temperatura corporais ao longo do ciclo anual de *S. merianae*, apresentando dados muito próximos aos de outros estudos com o mesmo modelo animal.

Figura 8. Variação da massa corpórea e temperatura corporal de *Salvator merianae* ao longo de seu ciclo fisiológico anual.



(A) Peso (kg); e (B) Temperatura (°C). Os pontos (média \pm erro-padrão) representam os valores correspondentes aos períodos de pré-hibernação, hibernação e despertar. *Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido de *post hoc* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

4.2. METABOLISMO REDOX

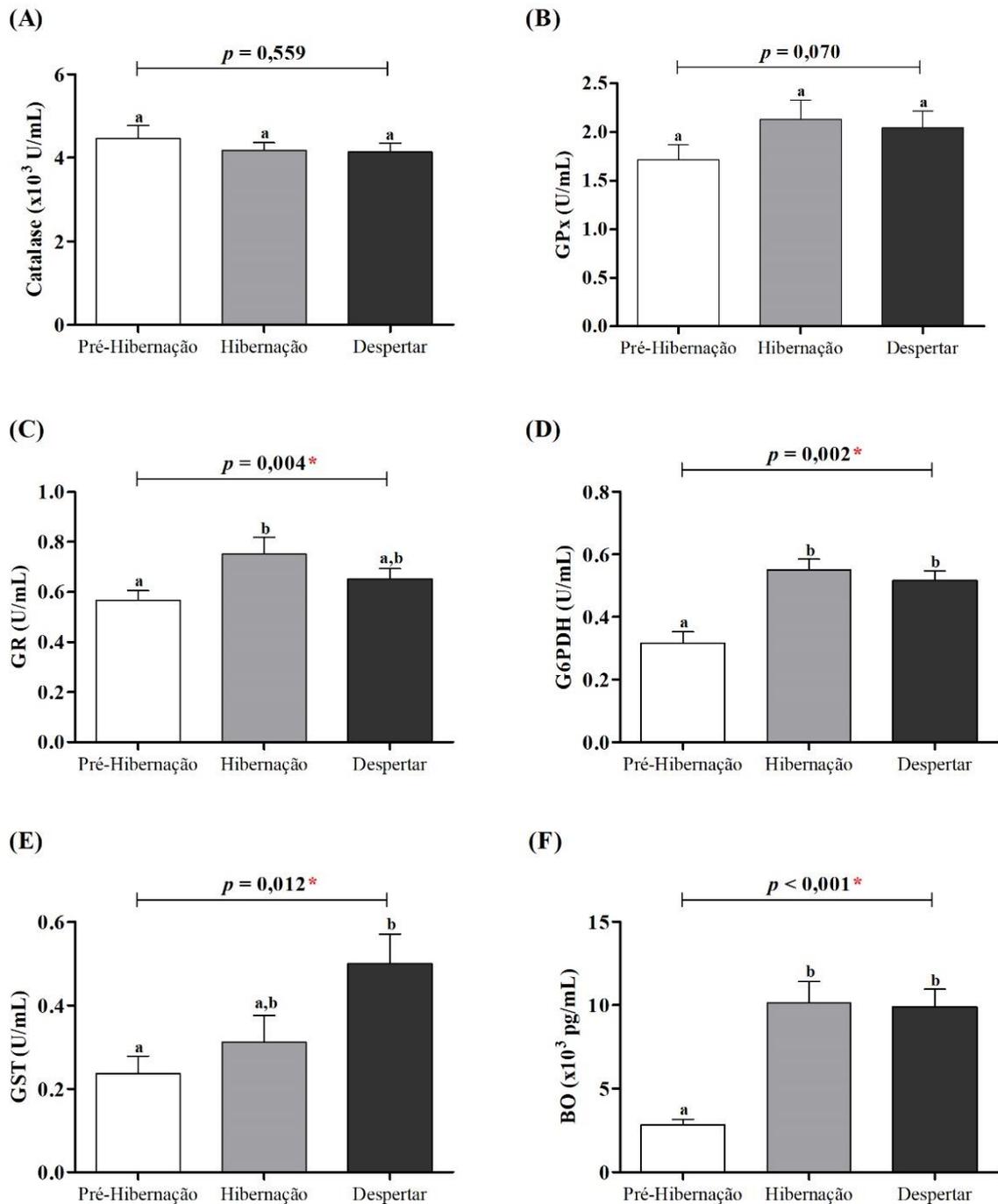
Os marcadores de capacidade antioxidante apresentaram um padrão de elevação da atividade das enzimas analisadas nos períodos de hibernação e despertar, exceto para a CAT (Figura 9A) e GPx (Figura 9B). As enzimas GR (Figura 9C) e G6PDH (Figura 9D) apresentaram atividades cerca de 30% e 70% maiores na hibernação comparadas à pré-hibernação, respectivamente.

Com relação ao período de despertar, observamos a manutenção dos altos níveis de G6PDH (Figura 9D) ocorridos na hibernação, e aumento considerável na atividade da GST (Figura 9E) em relação à pré-hibernação.

Já os níveis de biomoléculas oxidadas (Figura 9F) apresentaram-se cerca de cinco vezes maiores nos períodos de hibernação e despertar em relação à pré-hibernação, indicando um aumento significativo de danos oxidativos durante estes períodos.

Apesar de não expressar diferença estatística entre os grupos, a CAT foi a enzima com maior atividade, chegando ao máximo de 5.281,69U/mL e mínimo de 3.521,13U/mL de hemolisado. Enquanto isso, a GPx ocupou a segunda posição em termos de atividade enzimática, variando entre 2,61 e 1,29U/mL nos períodos avaliados. A CAT e a GPx atuam catalisando a redução do peróxido de hidrogênio em H₂O e O₂. No entanto, a GPx atua na degradação de baixas concentrações de H₂O₂, ao contrário da CAT, que degrada o peróxido de hidrogênio em altas concentrações no organismo (COSTA, 2016).

Figura 9. Variações dos níveis dos marcadores do metabolismo redox de *Salvator merianae* ao longo de seu ciclo fisiológico anual.



Atividade das enzimas (A) CAT; (B) GPx; (C) GR; (D) G6PDH; (E) GST; e (F) Biomoléculas Oxidadas. Barras: médias \pm erro-padrão. Todos os marcadores apresentaram dados paramétricos, com aplicação do teste ANOVA para medidas repetidas, seguido de *post hoc* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, devido à ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio consideravelmente reativo, porque participa da reação que produz o radical hidroxila ($\bullet OH$) (Reação de *Fenton e Haber-Weiss*), admitida como a EO mais reativa e danosa ao organismo (BARBOSA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2007). Considerando os riscos potenciais do radical $\bullet OH$ e o fato de não haver defesa enzimática especializada para essa espécie oxidante, a manutenção das enzimas antioxidantes a fim de preservar a integralidade celular, é de extrema importância (HERMES-LIMA, 2004).

Os altos índices de atividade indicam que a CAT e a GPx detêm papéis importantes na gestão dos níveis de espécies oxidantes (WELKER; MOREIRA; HERMES-LIMA, 2016). Alguns animais submetidos à anóxia ou hipóxia não mostram ativação ou inibição da atividade da CAT, por exemplo, o gastrópode *Littorina littorea*, o peixe *Piaractus mesopotamicus*, e a salamandra *Proteus anguinus*, nestes casos, outros antioxidantes podem atuar para gerenciar os níveis de espécies oxidantes e radicais livres ou outras EO estejam sendo geradas. (WELKER; MOREIRA; HERMES-LIMA, 2016). Deve-se considerar também que, a supressão metabólica pode estar associada à diminuição da transcrição gênica, tradução proteica e outras funções (WELKER; MOREIRA; HERMES-LIMA, 2016). Assim, não só o aumento, mas também a manutenção das respostas antioxidantes, pode ser considerada um bom indicador de importância destas enzimas para a tolerância aos eventos hipometabólicos (HERMES-LIMA; ZENTENO-SAVÍN, 2002).

Sendo assim, como não houve variação nas atividades enzimáticas de CAT e GPx, pode-se supor que os níveis de H_2O_2 e outros hidroperóxidos orgânicos não se alteram de forma significativa no sangue de lagartos teiús durante seu ciclo anual, ou que a manutenção das enzimas em níveis elevados é suficiente para controlar possíveis oscilações na formação dessa EO e outros peróxidos.

As enzimas GR e G6PDH apresentaram atividades maiores na hibernação, quando comparadas à pré-hibernação. A GR é a enzima responsável pela regeneração de GSH por meio da redução da GSSG, com consumo concomitante de NADPH (ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2014). A G6PDH é responsável pela regeneração do NADPH, fazendo sentido então que essas duas enzimas tenham aumentado em conjunto na hibernação. Welker (2009) demonstrou uma correlação positiva entre as atividades enzimáticas da GR e G6PDH, indicando que esta última enzima garante um fornecimento de NADPH adequado à primeira, o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho para estes marcadores.

A GR é uma proteína flavonoide responsável por reduzir uma molécula de GSSG a duas de GSH, permitindo que a glutathiona reduzida possa ser utilizada pelas enzimas GPx e GST. A GSH desempenha funções essenciais como a manutenção do equilíbrio redox, detoxificação de xenobióticos, além de modular a proliferação celular, apoptose, função imune, e fibrinogênese (HUBER; ALMEIDA, 2008; LU, 2013). A atividade protetora da GSH ocorre devido a sua grande habilidade de doar elétrons a outros compostos, realizando então a redução de espécies oxidantes com sua concomitante oxidação (DA SILVEIRA, 2015; HUBER; ALMEIDA, 2008). Assim, baixas concentrações de GSH podem estar associadas à ocorrência de estresse oxidativo, o que, conseqüentemente, qualifica a GR como uma enzima essencial para manutenção do equilíbrio redox (VASCONCELOS et al., 2007).

Um estudo com a rã da floresta, *Rana sylvatica*, demonstrou que a atividade da GR é inversamente proporcional à temperatura, assim, em situações de congelamento há um aumento na atividade enzimática desses animais (HERMES-LIMA; STOREY; STOREY, 1998). Em *Trachemis scripta elegans* expostas a anóxia por cinco horas, também observou-se um aumento na atividade da GR no fígado e músculo (HERMES-LIMA et al., 2015). Em peixes da espécie *Salmo trutta* submetidos a 49 dias de jejum, foi observada elevação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR no fígado e brânquias (BAYIR et al., 2011). Dessa forma, o aumento observado na atividade da GR em teiús hibernantes parece ser uma resposta comumente encontrada em outros ectotérmicos durante condições hipometabólicas.

Apesar da G6PDH não ser efetivamente uma enzima antioxidante, possui um papel indispensável na manutenção dos sistemas glutathiona e tiorredoxina, uma vez que produz o NADPH, considerado o principal agente redutor nos eritrócitos e utilizado pela maioria dos sistemas de proteção (HERMES-LIMA et al., 2015; ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2014). Além disso, a falta de NADPH pode levar à perda da atividade da catalase, uma vez que essa enzima é protegida de possíveis inativações por meio de ligação com este agente redutor (ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2014).

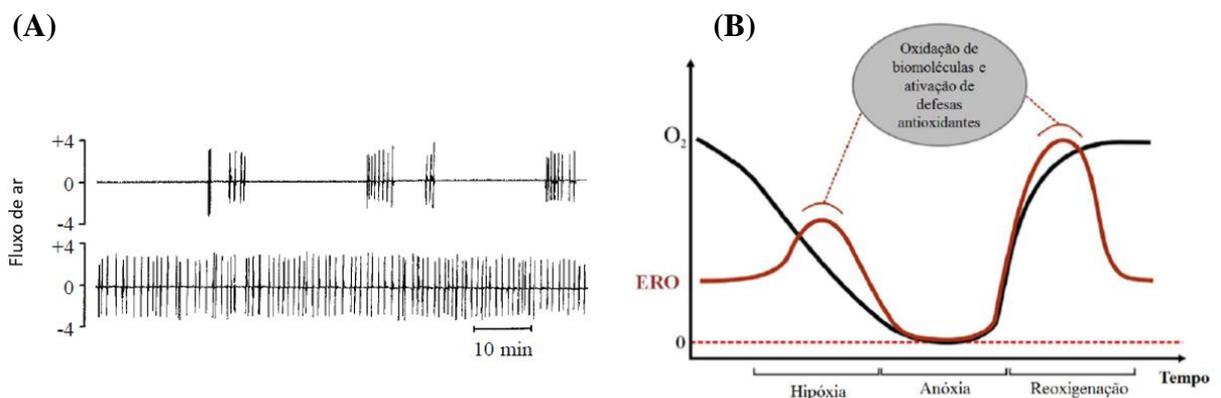
Estudos com invertebrados evidenciaram que a importância da manutenção antioxidante durante eventos de privação alimentar pode ser observada quando considera-se a atividade da G6PDH (ALMEIDA; MASCIO, 2011). Em condições de jejum, geralmente é esperada uma queda na atividade da G6PDH, pois a catálise de carboidratos e a biossíntese de ácidos graxos é reduzida, contudo, existem evidências de que essa enzima pode aumentar em condições hipometabólicas, a fim de garantir o fornecimento de NADPH (ALMEIDA; MASCIO, 2011). Em peixes da espécie *Sparus aurata*, por exemplo, os níveis de G6PDH no fígado aumentam entre 29% e 42% após seis horas de hipóxia (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2012). Em concordância

com este estudo, em *Carassius auratus* submetidos a 8 horas de anóxia foi observado um aumento na atividade da G6PDH cerebral (LUSHCHAK et al., 2001). Sendo assim, é possível supor que o aumento em 70% nos níveis de G6PDH durante o período hipometabólico de hibernação, provavelmente, foi necessário para o fornecimento adequado de NADPH, a fim de permitir a manutenção da homeostase redox durante o ciclo anual de *S. merianae*.

Outro ponto importante que deve ser considerado é que a hibernação em lagartos teiús é relacionada a um aumento na afinidade ao oxigênio que, apesar de ser importante para facilitar o transporte de O₂ dos alvéolos pulmonares para o sangue, também pode dificultar e diminuir as taxas de difusão de O₂ dos capilares sanguíneos para os tecidos, o que causaria uma possível hipóxia tecidual (ANDRADE et al., 2004b). Além disso, a hibernação de *S. merianae* é caracterizada por episódios de apneia com duração aproximada de 20 minutos, o que também poderia contribuir para um quadro de hipoxemia (Figura 10A) (ANDRADE; ABE, 1999).

Existem relatos na literatura que enfatizam a possibilidade de aumento de espécies oxidantes durante a hipóxia, por meio do escape de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, o que poderia causar a oxidação de biomoléculas e ativação das defesas antioxidantes (Figura 10B) (ALMEIDA; MASCIO, 2011; HERMES-LIMA et al., 2015). Dessa forma, considerando a possibilidade de ocorrência de hipóxia tecidual em teiús hibernantes, juntamente com aumento comprovado na atividade das enzimas GR e G6PDH, estas respostas podem indicar que durante a condição hipometabólica ocorre elevação nos níveis de espécies oxidantes, o que culminaria em altos níveis de BO.

Figura 10. Possível relação entre padrões ventilatórios e metabolismo redox em teiús.



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

A evidência de formação de EO durante a condição hipometabólica de hibernação em teiús pode ainda ser reforçada pelo resultado dos níveis de biomoléculas oxidadas, uma vez que o dano oxidado neste período aumentou cerca de cinco vezes em comparação com a pré-hibernação. Em caramujos terrestres *Helix aspersa* foi evidenciada a formação de espécies oxidantes e consequente estresse oxidativo durante a estivação, de forma que estes animais apresentaram aumento nos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no hepatopâncreas (HERMES-LIMA et al., 2015). Um estudo com outra espécie de caramujo (*Helix pomatia*) mostrou aumento na peroxidação lipídica no músculo e rim, durante o torpor de inverno, além do aumento na atividade de enzimas antioxidantes como a CAT e outras do ciclo da glutathione (exceto a GPx) (NOWAKOWSKA et al., 2009).

Além dos estudos com invertebrados, um trabalho com carpas expostas à hipóxia por 30 dias mostrou que seus eritrócitos apresentaram níveis similares de danos ao DNA, quando comparadas àquelas expostas a hiperóxia (MUSTAFA et al., 2011). Assim, nestes animais o estresse oxidativo pode ser resultado tanto do excesso, como também da falta de oxigênio nos tecidos (HERMES-LIMA et al., 2015). Outro exemplo é relacionado aos salmonídeos da espécie *Salmo trutta* que apresentam níveis de MDA elevados no fígado e nas brânquias quando em jejum de 49 dias (BAYIR et al., 2011). Em peixes da espécie *Dentex dentex* privados de alimentação por cinco semanas também evidenciou-se aumento significativo da peroxidação lipídica, e de algumas enzimas antioxidantes, mostrando que o jejum prolongado pode levar ao estresse oxidativo, mesmo quando as respostas antioxidantes são ativadas (MORALES et al., 2004).

O período de despertar foi caracterizado pela manutenção dos altos níveis de G6PDH ocorridos na hibernação, e o dobro de atividade da enzima GST em relação à pré-hibernação. Além disso, os níveis de biomoléculas oxidadas continuaram cerca cinco vezes maiores se comparados ao início do ciclo. O despertar após três meses de hibernação representa o retorno do animal ao estado ativo, no qual as frequências cardíaca e respiratória, temperatura corporal, e consumo oxigênio, aumentam repentinamente (SANDERS et al., 2015). Dessa forma, ao considerarmos a hibernação e a estivação como condições análogas à hipóxia, assumimos também que o evento seguinte seria fisiológica e bioquimicamente semelhante à reoxigenação/reperfusão (HERMES-LIMA; STOREY; STOREY, 1998).

Segundo a *POS*, a resposta antioxidante elevada durante eventos hipometabólicos ocorre como forma de preparar os animais para o suposto aumento na formação de EO na fase posterior de reoxigenação/despertar (HERMES-LIMA; STOREY; STOREY, 1998; HERMES-LIMA et al., 2015; MOREIRA et al., 2016). Com relação ao presente estudo, não podemos notar a

ocorrência de *POS* nos espécimes de *S. merianae*, uma vez que o aumento da resposta antioxidante na hibernação (GR e G6PDH) não preveniu ou minimizou os danos oxidativos do período subsequente de despertar. Dessa forma, pode-se considerar que a hibernação e o despertar são períodos igualmente danosos em termos oxidativos, no que diz respeito ao tecido sanguíneo dos teiús. Além disso, vale salientar que o intervalo de coleta entre o período de hibernação e despertar foi de apenas um mês, de forma que o organismo dos animais pode não ter tido tempo suficiente para reparar ou eliminar os danos provenientes do período de hibernação.

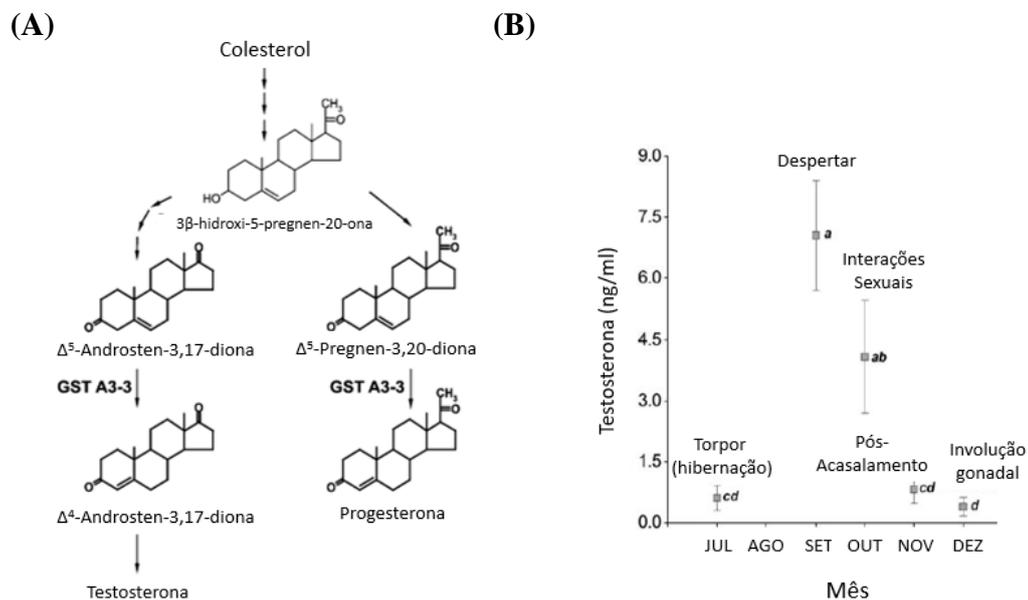
Esse tipo de resposta também foi evidenciada em outros animais. Em caramujos *H. aspersa*, a razão GSSG/GSH aumenta no hepatopâncreas durante os primeiros momentos de despertar, após 20 dias de estivação, indicando que o despertar pode causar um desequilíbrio redox (RAMOS-VASCONCELOS; HERMES-LIMA, 2003). Em peixes *Sparus aurata* sob três e seis horas de hipóxia os níveis de danos oxidativos no fígado aumentam, e permanecem elevados quando retornam à normóxia, indicando que a baixa disponibilidade de O₂ leva ao estresse oxidativo nestes animais, com danos que permanecem durante a reoxigenação (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2012).

Um estudo com peixes da espécie *Salmo trutta*, cujo objetivo foi pautado na avaliação do metabolismo redox em fígado e brânquias, evidenciou que a peroxidação lipídica aumenta durante o jejum e não retorna aos valores do grupo controle mesmo após 21 dias de realimentação (BAYIR et al., 2011). Para outras duas espécies de peixes sob jejum, *Acipenser naccarii* e *Oncorhynchus mykiss*, os marcadores possuem respostas similares, pois a lipoperoxidação eleva-se no fígado e nos eritrócitos, de forma que os respectivos danos permanecem mesmo após 60 dias de realimentação (FURNÉ et al., 2009). Assim, é possível destacar que privação alimentar induz o estresse oxidativo em peixes, de forma que os efeitos do jejum não são eliminados mesmo após um período de realimentação (BAYIR et al., 2011; FURNÉ et al., 2009). Considerando que a atividade de G6PDH e os níveis de BO foram mantidos em níveis elevados no período de despertar dos teiús, podemos supor que, nesta condição, provavelmente também houve intensa formação de EO. Além disso, o estresse e danos oxidativos ocorridos na hibernação de *S. merianae* provavelmente se mantêm mesmo após dez dias de despertar.

Além de estar envolvida na detoxificação de xenobióticos, a GST também pode estar relacionada com outras funções biológicas, incluindo a síntese de testosterona e progesterona (Figura 11A) (HUBER; ALMEIDA, 2008; JOHANSSON; MANNERVIK, 2001). Considerando que todos os espécimes do trabalho eram machos e que os níveis de testosterona

são significativamente maiores quando os animais retornam da condição hipometabólica (Figura 11B) (CHAMUT et al., 2012), os altos níveis de GST no período de despertar podem estar relacionados com a intensa síntese de testosterona, uma vez que a prioridade biológica do período é se preparar para a reprodução. Neste ponto, vale salientar que os animais foram mantidos sob condições controladas durante todo o período experimental, assim, descarta-se a possibilidade da GST responder à exposição a xenobióticos.

Figura 11. Biossíntese de hormônios sexuais com atuação da GST e níveis de testosterona observados ao longo do ciclo anual de *Salvator merianae*.



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

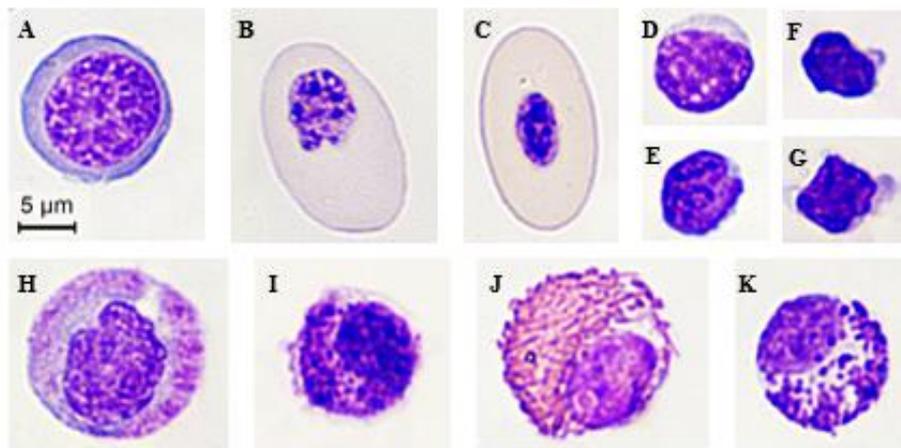
É incontestável que inúmeras espécies são capazes de suportar uma ampla variação na produção de EO frente a variações na disponibilidade de O₂. Sendo assim, é possível identificar três principais estratégias: 1) manutenção das enzimas antioxidantes com atividades suficientemente elevadas, lidando de forma eficaz com quaisquer oscilações na formação de EO durante condições de estresse; 2) a preparação para o estresse oxidativo – POS, em que a resposta antioxidante aumenta durante a supressão metabólica a fim de prevenir os possíveis danos do período subsequente de reoxigenação; e 3) suportar, em certo grau, o acúmulo de dano oxidativo e empregar mecanismos que descartem rapidamente os produtos danificados pelas EO (STOREY, 1996).

Portanto, durante o ciclo fisiológico anual de *S. merianae* verifica-se três possíveis respostas do metabolismo redox: i) as atividades constantes de CAT e GPx sugerem que os níveis de H₂O₂ e outros hidroperóxidos orgânicos não se alteram de forma significativa, ou que a manutenção das enzimas em níveis elevados é suficiente para controlar possíveis oscilações na formação destas EO; ii) a GR e G6PDH podem aumentar sua atividade mediante situações de maior formação de EO, como a hibernação e o despertar; iii) estes animais suportam elevados níveis de danos oxidativos, tanto em condições hipometabólicas, como também na fase de reoxigenação seguinte.

4.3. PERFIL HEMATOLÓGICO

Os principais tipos celulares de répteis são eritrócitos (glóbulos vermelhos) e leucócitos (glóbulos brancos), sendo estes últimos subdivididos em dois grupos: agranulócitos (linfócitos e monócitos) e granulócitos (azurófilos, basófilos, heterófilos, e eosinófilos) (Figura 12) (MARTINS et al., 2016; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013; STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011; SYKES IV; KLAPHAKE, 2008; ZHANG; GU; LI, 2011).

Figura 12. Células sanguíneas de *Salvator merianae* coradas com Panótico®.



A e B – Policromatófilos em diferentes estágios de maturação, **C** – Eritrócito Maduro, **D** – Linfócito, **E** – Monócito, **F e G** – Azurófilos, **H** – Monócito reativo, **I** – Basófilo, **J** – Heterófilo, **K** – Eosinófilo. Barra = 5 µm. Fonte: Elaborado pela autora.

Os eritrócitos foram observados na forma imatura, denominados policromatófilos (Figura 12A e B), e madura (Figura 12C). Os policromatófilos encontravam-se em diferentes estágios de maturação (Figura 12A e B). Estas células são mais arredondadas e basofílicas, com núcleo maior (redondo, oval ou irregular) e com maior relação núcleo/citoplasma quando comparadas aos eritrócitos maduros, assim como descrito para outros répteis (MARTINS et al.,

2016; STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011). São relativamente menores que os policromatófilos de mamíferos, e aumentam gradualmente de tamanho conforme o estágio de maturação (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011). Os eritrócitos maduros dos lagartos são nucleados, com formato elíptico e com núcleo posicionado no centro da célula e, apesar de serem morfologicamente diferentes dos eritrócitos de mamíferos, principalmente pela presença do núcleo, essas células sanguíneas possuem a mesma função básica de trocas gasosas (NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013; SYKES IV; KLAPHAKE, 2008).

Os linfócitos (Figura 12D) são células arredondadas, com núcleo também arredondado e citoplasma escasso (ZHANG; GU; LI, 2011). Apresentam taxas bastante variáveis na circulação sanguínea e podem estar relacionados a inúmeros fatores como, por exemplo, sazonalidade, nutrição, sexo e período reprodutivo. Dessa forma, a quantidade de linfócitos no tecido sanguíneo de répteis pode oscilar em uma faixa de 15-90% do total de leucócitos (MARTINS et al., 2016; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013).

Os monócitos (Figura 12E) apresentaram formato redondo ou oval, com núcleo em formato reniforme ou de bastonete, que ocupa a maior porção da área celular (citoplasma escasso). Em répteis são pouco abundantes e apresentam cerca de 0-10% do total de leucócitos, podendo chegar até 20% em algumas espécies (SYKES IV; KLAPHAKE, 2008). As altas taxas de monócitos na circulação periférica estão relacionadas a inflamações crônicas e infecções bacterianas e parasitárias, de forma que para a efetiva resposta imune necessitam diferenciar-se em macrófagos (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011).

Também foi possível observar azurófilos nos esfregaços de sangue dos teiús (Figura 12F e G), sendo caracterizados por terem formato irregular e núcleo com heterocromatina periférica (MARTINS et al., 2016). De acordo com Stacy, Alleman e Sayler (2011), os azurófilos são exclusivos de répteis, sendo mais comumente encontrados em lagartos e crocodilos e menos frequentes em quelônios, de forma que o aumento ou diminuição acentuada nas taxas de azurófilos podem representar casos de inflamação e doenças infecciosas.

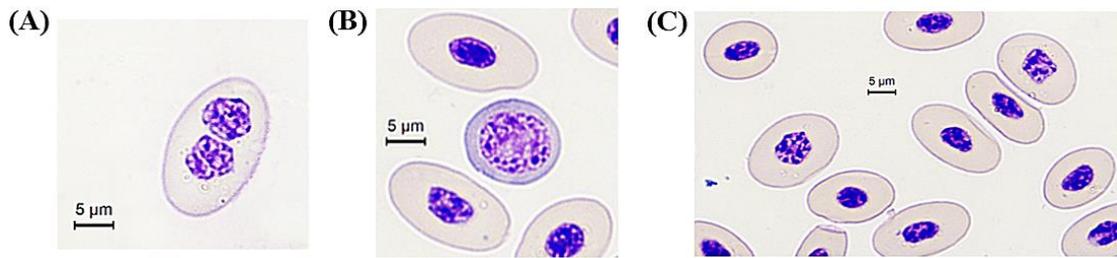
Os basófilos são células arredondadas e podem ser caracterizadas pela intensa presença de grânulos citoplasmáticos (Figura 12I). Em *S. merianae*, os basófilos foram caracterizados por possuírem metacromasia dos grânulos citoplasmáticos quando corados com azul de toluidina (CARVALHO et al., 2006). Na maioria dos répteis, o aumento de basófilos na corrente sanguínea pode ter associação com a presença de hemoparasitos e infecções virais (NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013; STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011; SYKES IV; KLAPHAKE, 2008).

Os heterófilos apresentaram núcleo periférico roxo e o citoplasma repleto de grânulos alongados e fusiformes de coloração rósea (Figura 12J). Em répteis, a porcentagem de heterófilos pode variar entre 30-45% do total de leucócitos, mas algumas espécies de quelônios e crocodilos podem apresentar mais de 50% deste tipo celular (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011). Estas altas porcentagens podem indicar infecções bacterianas (MARTINS et al., 2016).

Os eosinófilos (Figura 12K) são semelhantes em tamanho e formato celular aos heterófilos, com os quais são facilmente confundidos, mas diferenciam-se, principalmente, pela forma e coloração dos grânulos citoplasmáticos, pois os eosinófilos apresentam grânulos arredondados e de coloração roxa escura (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011). Em répteis saudáveis, os eosinófilos costumam representar de 7-20% dos leucócitos totais, sendo menos frequentes em lagartos e mais frequentes em quelônios (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011). O aumento nas taxas deste tipo celular pode estar intimamente associado a parasitoses (NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013).

Além da caracterização dos tipos celulares, foi realizada uma avaliação da morfologia eritrocitária nos esfregaços sanguíneos. Nos animais em hibernação observou-se uma grande quantidade de eritrócitos binucleados (Figura 13A). Essa característica evidencia uma possível resposta regenerativa, pois devido ao baixo metabolismo no respectivo período, a replicação de eritrócitos pré-existentes pode representar um gasto energético menor em comparação à produção de novas linhagens celulares por meio da eritropoiese na medula óssea.

Já a pré-hibernação foi caracterizada por uma expressiva quantidade de policromatófilos (Figura 13B) e eritrócitos com formatos e tamanhos variáveis (Figura 13C), indicando também uma possível resposta regenerativa, porém associada à eritropoiese. Sabe-se que ocorrência de poiquilocitose e anisocitose leves é considerada normal para muitas espécies de répteis; contudo, frequências moderadas e graves destas anormalidades podem ser indicativas de anemia regenerativa (CAMPBELL, 2015; GOULART, 2004; NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013).

Figura 13. Alterações eritrocitárias encontradas durante o ciclo anual de *Salvator merianae*.

(A) Eritrócito binucleado; (B) Policromatófilo; (C) Poiquilocitose e Anisocitose. Barra = 5 µm. Fonte: Elaborado pela autora.

Nos resultados do eritrograma de *S. merianae* (Tabela 1), observou-se redução na contagem de eritrócitos e na CHGM durante a hibernação em relação ao período anterior (pré-hibernação). Já o VGM e HGM foram maiores nos períodos de hibernação e despertar.

Durante a pré-hibernação destaca-se um elevado número de eritrócitos, porém menos volumosos (VGM baixo) e com menor quantidade de hemoglobina (HGM baixo). Essas características, juntamente com a intensa quantidade de policromatófilos observados microscopicamente, sugere que estes animais investem energeticamente na eritropoiese. Andrade, et al. (2004) observaram que, no verão, o sangue de *S. merianae* exibiu valores mais altos de hematócrito, apresentando, assim, maior eficácia no transporte de oxigênio, em comparação com período de hibernação. Essa comprovação possui uma interpretação funcional evidente, pois durante o verão os animais encontram-se ativos, o que requer mais células para transportar grandes quantidades de oxigênio para atender à alta taxa metabólica (ANDRADE et al., 2004b).

Tabela 1. Comparação das variáveis da série vermelha de *Salvator merianae* entre os períodos experimentais avaliados.

Série Vermelha	Pré Hibernação (média ± EP)	Hibernação (média ± EP)	Despertar (média ± EP)	<i>p</i> *
Hematócrito (%)	34,83 ± 2,57 ^a	35,67 ± 1,80 ^a	32,83 ± 2,47 ^a	0,326
Hemoglobina (g/dL)	10,65 ± 0,60 ^a	10,17 ± 0,08 ^a	9,63 ± 0,73 ^a	0,280
Eritrócitos (x10 ⁵ /µL)	19,63 ± 2,02 ^a	11,27 ± 1,77 ^b	10,04 ± 0,46 ^b	0,003
VGM (fL)	184,57 ± 17,71 ^a	346,91 ± 40,91 ^b	328,76 ± 25,10 ^b	0,003
CHGM (%)	30,81 ± 0,98 ^a	26,94 ± 0,85 ^b	29,33 ± 0,51 ^{a,b}	0,023
HGM (pg)	56,63 ± 5,18 ^a	92,80 ± 10,01 ^b	96,37 ± 7,32 ^b	0,011

EP: erro-padrão. *Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido de *post hoc* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

Por outro lado, a hibernação apresentou redução em 40% do número de eritrócitos. No entanto, apesar da quantidade menor de células vermelhas, estas apresentaram-se maiores (VGM alto) e com mais Hb (HGM alto). Estas alterações hematológicas ocorridas durante a condição hipometabólica permaneceram no período subsequente de despertar. Como mencionado anteriormente, nas lâminas de esfregaço sanguíneo foi bastante comum a presença de eritrócitos binucleados, indicando que possivelmente os animais em condições hipometabólicas investem energia na duplicação de células pré-existentes (células mais volumosas) e síntese de hemoglobina.

Em outros estudos com lagartos da espécie *S. merianae*, os autores observaram o mesmo perfil de redução na contagem de eritrócitos durante a hibernação (MAFFEI; HEUBEL; SILVA, 2007). Estudos com marsupiais demonstraram que o torpor induz uma redução drástica no hematócrito, contagem de eritrócitos e outros parâmetros hematológicos, provocando anemia aguda (FRANCO; CONTRERAS; NESPOLO, 2013). É necessário salientar que o fato da quantidade de eritrócitos reduzida não ter sido acompanhada por um hematócrito baixo, durante a hibernação dos teiús desse trabalho, sugere a ocorrência de desidratação nos animais (NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013; TROIANO; GOULD; GOULD, 2008). Troiano e colaboradores (2008), evidenciaram um aumento nas variáveis hematológicas da série vermelha (inclusive do VGM e HGM) durante o período de inverno em teiús, sendo esta alteração atribuída à perda de eletrólitos e água (hemoconcentração).

Para a série branca de *S. merianae*, observou-se maior quantidade de leucócitos na pré-hibernação em relação aos demais grupos. Na hibernação observamos a menor porcentagem de azurófilos entre os períodos. Já o despertar foi caracterizado por maior porcentagem de monócitos e redução em 70% do número de heterófilos, quando comparado aos demais períodos experimentais (Tabela 2).

A pré-hibernação pode então ser caracterizada por elevada quantidade de leucócitos totais quando comparada aos demais grupos. Isso pode ser explicado baseando-se no aumento da temperatura corporal e maior atividade dos animais. Pois diante dessas condições, o tempo necessário para se formarem diferentes antígenos é menor, resultando em nº de leucócitos elevados, como observado em estudos anteriores com o mesmo modelo animal (TROIANO; GOULD; GOULD, 2008).

Tabela 2. Comparação das variáveis da série branca de *Salvator merianae* entre os períodos experimentais avaliados.

Série Branca	Pré Hibernação (média ± EP)	Hibernação (média ± EP)	Despertar (média ± EP)	<i>p</i>
Leucócitos (x10 ³ /μL)	329,83 ± 26,18 ^a	192,17 ± 34,42 ^b	112,67 ± 13,70 ^b	0,009 ²
Eosinófilos (%)	1,17 ± 0,31 ^a	2,17 ± 0,60 ^a	1,33 ± 0,42 ^a	0,330 ¹
Heterófilos (%)	25,50 ± 4,74 ^a	25,33 ± 4,54 ^a	7,67 ± 2,65 ^b	0,024 ¹
Azurófilos (%)	10,67 ± 1,09 ^a	5,33 ± 1,28 ^b	19,50 ± 3,59 ^a	0,002 ¹
Basófilos (%)	1,17 ± 0,79 ^a	0,67 ± 0,33 ^a	1,67 ± 0,56 ^a	0,584 ²
Linfócitos (%)	52,17 ± 3,62 ^a	59,33 ± 3,13 ^a	57,17 ± 2,75 ^a	0,430 ¹
Monócitos (%)	9,33 ± 1,23 ^{a,b}	7,17 ± 1,35 ^a	12,67 ± 1,05 ^b	0,013 ¹

EP: erro-padrão. ¹Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido de *post hoc* de Tukey. ²Teste de Friedman, complementado por *Dunnnett*. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos.

Por outro lado, a concentração de leucócitos reduz em 40% no período de hibernação, o que também foi observado no estudo de Troiano e colaboradores (2008). Essa leucopenia e depressão imune em condições hipometabólicas parece ser frequente também em mamíferos hibernantes, os quais reduzem o número de leucócitos em aproximadamente 90% durante o torpor (BOUMA; CAREY; KROESE, 2010; FRANCO; CONTRERAS; NESPOLO, 2013).

Além disso, a hibernação foi caracterizada por redução no número de azurófilos, cuja função relaciona-se à defesa contra possíveis inflamações e doenças infecciosas, similarmente aos neutrófilos em outras espécies (STACY; ALLEMAN; SAYLER, 2011). Assim, considerando que durante o período de hibernação os animais permanecem inativos e afágicos, a menor expressividade dos azurófilos pode estar relacionada ao fato de que neste período os animais estão menos susceptíveis a contrair inflamações e infecções. Em mamíferos hibernantes é comum a queda no número de neutrófilos circulantes, o que ocorre provavelmente devido à apoptose ou retenção deste tipo celular em locais específicos, como os pulmões, fígado e baço, onde o número de leucócitos é aumentado durante torpor (BOUMA; CAREY; KROESE, 2010).

O despertar, por sua vez, demonstrou aumento nos monócitos e redução dos heterófilos. Os monócitos são tipos celulares relacionados a inflamações crônicas ou infecções bacterianas e parasitárias (NARDINI; LEOPARDI; BIELLI, 2013). Assim, o aumento desse tipo celular após a retomada do metabolismo padrão, provavelmente representa o aumento das respostas de defesa contra possíveis patógenos que o animal possa adquirir com o retorno da alimentação e atividade. Em mamíferos, durante o despertar, o número de neutrófilos e monócitos aumenta rapidamente e retorna aos níveis encontrados no verão (BOUMA; CAREY; KROESE, 2010;

FRANCO; CONTRERAS; NESPOLO, 2013). Com relação aos heterófilos, estes tipos celulares são relacionados ao combate de infecções bacterianas (MARTINS et al., 2016). Considerando que os monócitos também desempenham função contra infecções bacterianas, os animais provavelmente investem energeticamente em um tipo leucocitário com funções imunes mais abrangentes durante o despertar.

Sendo assim, fica evidente que a relação dos tipos leucocitários se altera possivelmente conforme as prioridades imunológicas de cada período. Além disso, é importante ressaltar que as consequências das alterações na função imune durante a hibernação não são claras, embora a imunossupressão durante o torpor provavelmente seja benéfica em termos de conservação de energia (BOUMA; CAREY; KROESE, 2010). Ao mesmo tempo, a depressão do sistema imune também pode levar a um aumento na susceptibilidade de contrair infecções, como nos casos de alta mortalidade de morcegos hibernantes que desenvolveram fungos (BOUMA; CAREY; KROESE, 2010; FRANCO; CONTRERAS; NESPOLO, 2013).

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

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

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

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-BADRY, K. S.; EL-DEIB, S.; NUZHAY, S. Haematological changes correlated with the hibernation cycle in the Egyptian cobra (*Naja haje haje*). **Journal of Thermal Biology**, v. 17, n. 2, p. 107–109, 1992.
- ALMEIDA, E. A. DE; MASCIO, P. DI. Hypometabolism and antioxidative defense systems in marine invertebrates. In: **Hypometabolism: Strategies of Survival in Vertebrates and Invertebrates**. [s.l.: s.n.]. p. 39–55, 2011.
- ANDRADE, D. V. DE; ABE, A. S. Gas exchange and ventilation during dormancy in the tegu lizard *Tupinambis merianae*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 3677–3685, 1999.
- ANDRADE, D. V. et al. Overwintering in Tegu Lizards. **Life in the cold: evolution, mechanisms, adaptation, and application. Twelfth International Hibernation Symposium.**, p. 339–348, 2004a.
- ANDRADE, D. V. et al. Seasonal changes in blood oxygen transport and acid-base status in the tegu lizard, *Tupinambis merianae*. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 140, p. 197–208, 2004b.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BAYIR, A. et al. Metabolic responses to prolonged starvation, food restriction, and refeeding in the brown trout, *Salmo trutta*: Oxidative stress and antioxidant defenses. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 159, p. 191–196, 2011.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: A manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, 1975.
- BIBRON, G.; DUMÉRIL, A. *Erpétologie Générale ou Histoire Naturelle Complète des Reptiles*. **Smithsonian**, p. 822, 1854.
- BOUMA, H. R. et al. Blood cell dynamics during hibernation in the European Ground Squirrel. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, p. 319–323, 2010.
- BOUMA, H. R.; CAREY, H. V.; KROESE, F. G. M. Hibernation: the immune system at rest? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 4, p. 619–624, 2010.
- BOYER, B. B.; BARNES, B. M. Molecular and metabolic aspects of mammalian hibernation. **BioScience**, v. 49, n. 9, p. 713–724, 1999.
- CARLBERG, I.; MANNERVICK, B. Glutathione reductase. **Method. Enzymol.** v.113, p.484-490, 1985.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICE A – Protocolos para ensaios bioquímicos

Ensaio espectrofotométrico para CAT

Tampão para Catalase: pesar os seguintes sais juntos, adicionar os respectivos volumes de água ultrapura e regular o pH para 8,0 (usar HCl ou NaOH).

1) Tris HCl 1M:

121,1g para vol. total de 1L

30,27g para vol. total de 250mL

6,055g para vol. total de 50mL

2) EDTA 5mM:

1,461 em vol. total de 1L

0,365g em vol. total de 250mL

0,07305g em vol. total de 50mL

Meio de Reação:

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

ENSAIO	
Reativos	
Meio de Reação	(500 – X) μ L
Amostra	X μ L

Referência: 500 μ L de água ultrapura.

Leitura no espectrofotômetro: 240nm.

Ensaio espectrofotométrico para GPx

Tampão PO₄⁻ 0,1M; pH 7,0: pesar os sais, adicionar os respectivos volumes de água ultrapura e regular o pH para 7,0 (usar HCl ou NaOH).

1) Monobásico (KH₂PO₄)

6,805g para vol. total de 1L

3,4g para vol. total de 500mL

2) Dibásico (K₂HPO₄)

8,71g para vol. total de 1L

4,35g para vol. total de 500mL

EDTA 0,005M; pH 7,0:

Pesar 1,461g de EDTA e diluir em 1L de água ultrapura.

Meio de Reação:

- Tampão PO₄⁻ ----- 25mL
- EDTA ----- 10mL
- GR ----- 11µL
- GSH ----- 16mg
- NADPH ----- 8,6mg
- H₂O ----- 15mL

Preparo do tBOOH (Peróxido de terbutila 0,5mM): diluir 128µL em 10mL de tampão.

ENSAIO		
Reativos	Hidrólise	Reação
Meio de Reação	495µL	(495 – X) µL
tBOOH	5µL	5µL
Amostra	-----	X µL

Referência: 500µL de tampão PO₄⁻.

Leitura no espectrofotômetro: 340nm.

*A hidrólise representa o branco da reação.

Ensaio espectrofotométrico para GR

Tampão PO₄⁻ 0,1M; pH 7,5: pesar os sais, adicionar os respectivos volumes de água ultrapura e regular o pH para 7,5 (usar HCl ou NaOH).

1) Monobásico (KH₂PO₄)

6,805g para vol. total de 1L

3,4g para vol. total de 500mL

2) Dibásico (K₂HPO₄)

8,71g para vol. total de 1L

4,35g para vol. total de 500mL

3) EDTA 1mM

1,86g para vol. total de 1L

GSSG 125mM:

Se o peso molecular for igual a 612,6, dissolve-se 76,58mg/mL no tampão PO₄⁻.

Se o peso molecular for igual a 656,6, dissolve-se 82,08mg/mL no tampão PO₄⁻.

NADPH 6mM:

Se o peso molecular for igual a 833,4, dissolve-se 5mg/mL em NaHCO₃ a 0,1%.

ENSAIO

Reativos	Hidrólise	Reação
Tampão PO ₄ ⁻ ; EDTA 1mM	480µL	(480 – X) µL
GSSG	10µL	10µL
NADPH	10µL	10µL
Amostra	-----	X µL

Referência: 500µL de tampão PO₄⁻.

Leitura no espectrofotômetro: 340nm.

*A hidrólise representa o branco da reação.

Ensaio espectrofotométrico para G6PDH

Tampão Tris HCl 0,1M; pH 7,4: pesar o Tris, adicionar o volume de água ultrapura correspondente e regular o pH para 7,4 com adição de HCl.

12,114g de Tris para vol. total de 1L

6,057g de Tris para vol. total de 500mL

MgCl₂ 0,2M:

40,66g para vol. total de 1L

20,33g para vol. total de 500mL

Meio de Reação:

- 1) Em um erlenmeyer adicionar 50mL do tampão Tris HCl; 1,8mL de MgCl₂, 10mg de NADP e 48mL de água ultra pura;
- 2) Retirar 50mL dessa mistura e transferir para outro erlenmeyer (solução sem G6P)
- 3) Adicionar 21,25mg de G6P ao erlenmeyer inicial (solução com G6P).

ENSAIO

Reativos	Hidrólise	Reação
Solução sem G6P	(500 – X) µL	-----
Solução com G6P	-----	(500 – X) µL
Amostra	X µL	X µL

Referência: 500µL de solução sem G6P.

Leitura no espectrofotômetro: 340nm.

*A hidrólise representa o branco da reação (fazer para cada amostra).

Ensaio espectrofotométrico para GST

Tampão PO₄⁻ 0,2M; pH 6,5: pesar os sais, adicionar os respectivos volumes de água ultrapura e regular o pH para 6,5 (usar HCl ou NaOH).

1) Monobásico (KH₂PO₄)

13,665g para vol. total de 1L

6,832g para vol. total de 500mL

2) Dibásico (K₂HPO₄)

17,42g para vol. total de 1L

8,71g para vol. total de 500mL

GSH 200mM:

Pesar 61,46mg de GSH e adicionar 1mL de tampão PO₄⁻ 0,2M; pH 6,5.

CDNB 200mM:

Pesar 40,61mg de CDNB e adicionar 1mL de etanol absoluto.

ENSAIO

Reativos	Hidrólise	Reação
Tampão PO ₄ ⁻ 0,2M; pH 6,5	490µL	(490 – X) µL
GSH	5µL	5µL
CDNB	5µL	5µL
Amostra	-----	X µL

Referência: 500µL de tampão PO₄⁻.

Leitura no espectrofotômetro: 340nm.

*A hidrólise representa o branco da reação.

Análise de Biomoléculas Oxidadas por Fluorescência

Preparo da Curva Analítica:

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

Concentração (ng/mL)	Solução estoque TMP (µL)	H ₂ O (µL)	Volume final (µL)
0	0	600	600
60	1	599	600
120	2	598	600
180	3	597	600
240	4	596	600
300	5	595	600

Preparo das Amostras:

- 1) Preparar ácido fosfórico (0,1%):
Diluir 118µL de ácido fosfórico 85% em 1mL de água ultrapura (utiliza-se 400µL da solução final por amostra);
- 2) Preparar TBA (0,6%):
Pesar 6mg de ácido tiobarbitúrico e diluir em 1mL de água ultrapura (utiliza-se 100µL da solução final por amostra);
- 3) Preparar as amostras:
Em tubos *ependorf* de 1,5 mL, adicionar 50µL de água (branco); 50µL de cada ponto da curva analítica; e 50µL de plasma; 400µL de ácido fosfórico 0,1% e 100µL de TBA 0,6%. Homogeneizar e incubar por 30 minutos a 90°C. Em seguida, parar a reação colocando as amostras no gelo, filtrar e injetar no HPLC.

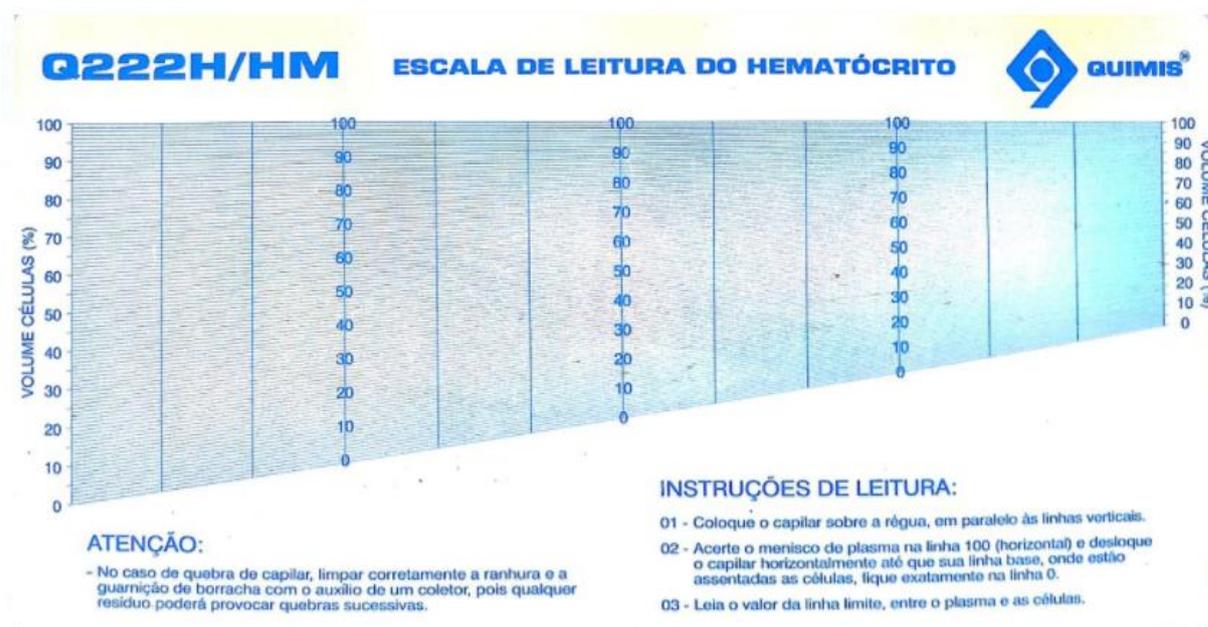
APÊNDICE B – Protocolos para análise hematológica

Hematócrito

O hematócrito representa um modo simples de verificar o volume globular através da relação entre os glóbulos vermelhos e o volume de plasma, ou seja, a porcentagem (%) de eritrócitos no sangue. Consiste dos seguintes passos:

- 1) Homogeneizar a amostra com delicadeza, em seguida, preencher $\frac{3}{4}$ do tubo capilar de microhematócrito com sangue;
- 2) Fechar uma das extremidades do tubo e colocá-lo na centrífuga própria por cerca de 5 minutos a 13.000 rpm;
- 3) Realizar a leitura no cartão de referência, cujos valores são dados em percentuais de volume celular em relação ao total (Figura 14).

Figura 14. Cartão de referência para leitura do hematócrito.



Fonte: Quimis®.

Dosagem de hemoglobina circulante

A dosagem de hemoglobina circulante fornece a concentração de hemoglobina total do sangue a partir do método de cianometahemoglobina. Assim, a hemoglobina e todos os seus derivados são transformados em cianometahemoglobina por um reativo especial a base de cianeto e, em seguida, é quantificada por espectrofotometria. Sua realização consiste nos seguintes etapas:

- 1) Adicionar 20 μ L de amostra de sangue em 5mL de solução *Drabkin*;

Solução *Drabkin*:

- 0,20g de ferricianeto de potássio;
- 0,20g de cianeto de potássio;
- 1.000mL de água destilada q.s.p.

Branco: somente a solução *Drabkin*.

- 2) Medir em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm;
- 3) O resultado da leitura da absorbância é multiplicado por um fator de correção (FC), cujo cálculo ocorre a partir da divisão entre a concentração e absorbância (C/A) de uma amostra padrão. No presente estudo, utilizamos uma amostra padrão de hemoglobinas com concentração de 10g/dL e a absorbância de 0,31nm e, dessa forma, todos os valores obtidos na leitura de absorbâncias no espectrofotômetro foram multiplicados por um fator de correção de 32,26, a fim de obtermos a dosagem de hemoglobina circulante em g/dL.

Contagem de Eritrócitos

A contagem de eritrócitos contabiliza o número absoluto de eritrócitos existentes em um determinado volume de sangue. É feita a partir dos seguintes passos:

1) Com a pipeta de Thomas, aspirar sangue até a graduação de 1 e completar com a solução *Natt & Herrick* (1952) até a marca 101;

Solução de *Natt & Herrick*:

- 3,88g de cloreto de sódio (NaCl)
- 2,50g de sulfato de sódio (Na₂SO₄)
- 0,25g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄)
- 2,91g de fosfato de sódio dibásico (K₂HPO₄)
- 7,50mL de formalina (37%)
- 0,1g metil violeta 2B
- 1000mL de água destilada q.s.p.

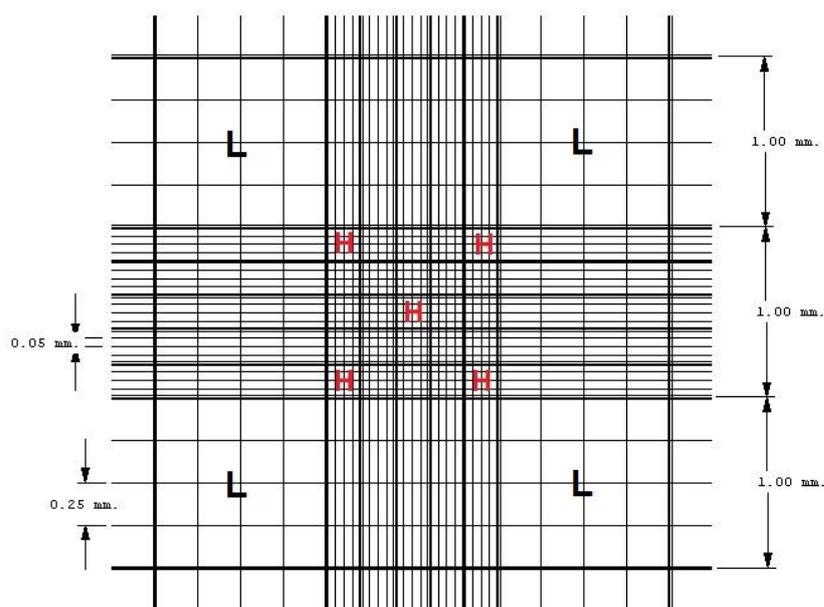
A solução é mantida *overnight* e filtrada antes do uso.

2) Agitar a pipeta e depositar a amostra na abertura da Câmara de Neubauer, até preenchê-la com o líquido, que penetra por capilaridade entre a câmara e a lamínula;

3) Deixar a câmara em ambiente úmido (placa de petri com algodão molhado) por cinco minutos, para a perfeita sedimentação dos eritrócitos;

4) Realiza-se a contagem em microscópio com objetiva de 40x (Figura 15). O valor obtido (n) deve ser multiplicado por 5000, resultando no nº de eritrócitos por µL de sangue.

Figura 15. Cartão de referência para leitura do hematócrito.



Área de contagem na Câmara de Neubauer. Os quadrantes representados pela letra "L" são destinados à contagem de leucócitos, enquanto os cinco quadrantes centrais designados com a letra "H" são utilizados para contagem dos eritrócitos. Fonte: Modificado de CriaCAC, 2011.

Cálculo dos Índices Hematimétricos

Os índices representam o volume médio de eritrócitos, o teor de hemoglobina das hemácias e a quantidade total de hemoglobina. São obtidos por meio dos cálculos (Figura 16):

- Volume Globular Médio (VGM): indica o volume médio de eritrócitos expresso em fentolitros (fL). É obtido a partir da divisão do volume globular contido em um mm³ de sangue (hematócrito) pelo nº de eritrócitos no mesmo volume (contagem de eritrócitos);
- Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM): designa o índice médio da porcentagem de hemoglobina por hemácia. O cálculo consiste em dividir o resultado da dosagem de hemoglobina pelo hematócrito;
- Hemoglobina Globular Média (HGM): indica peso total de hemoglobina. É obtida relacionando-se o resultado da dosagem de hemoglobina ao número de eritrócitos existentes no mesmo volume. Os índices utilizados são obtidos a partir de valores de hemoglobina, hematócrito e contagem de células, representados pelas seguintes abreviações:

Ht = valor do hematócrito;

E = número de eritrócitos/ µL de sangue;

Hb = hemoglobina.

Figura 16. Fórmulas matemáticas para o cálculo dos índices hematimétricos.

$$\text{VGM (fL)} = \frac{\text{Ht (\%)} \times 10}{\text{E (milhões/}\mu\text{L)}}$$

$$\text{CHGM (g/dL ou \%)} = \frac{\text{Hb (g/dL)} \times 100}{\text{Ht (\%)}}$$

$$\text{HGM (pg)} = \frac{\text{Hb (g/dL)} \times 10}{\text{E (milhões/}\mu\text{L)}}$$

Fonte: Elaborado pela autora.

Contagem de Leucócitos

A contagem de leucócitos contabiliza o número absoluto de leucócitos existentes em um determinado volume de sangue. É feita a partir dos seguintes passos:

1) Com a pipeta de Thomas, aspirar sangue até a graduação de 1 e completar com a solução *Natt & Herrick* (1952) até a marca 11;

Solução de Natt & Herrick:

- 3,88g de cloreto de sódio (NaCl)
- 2,50g de sulfato de sódio (Na₂SO₄)
- 0,25g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄)
- 2,91g de fosfato de sódio dibásico (K₂HPO₄)
- 7,50mL de formalina (37%)
- 0,1g metil violeta 2B
- 1000mL de água destilada q.s.p.

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

2) Agitar a pipeta e depositar a amostra na abertura da Câmara de Neubauer, até preenchê-la com o líquido, que penetra por capilaridade entre a câmara e a lamínula;

3) Deixar a câmara em ambiente úmido (placa de petri com algodão molhado) por cinco minutos, para a perfeita sedimentação dos eritrócitos;

4) Realiza-se a contagem em microscópio com objetiva de 40x (Figura 15). O valor obtido (n) deve ser multiplicado por 1000, resultando no n° de leucócitos por µL de sangue.

Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos, por meio de esfregaços sanguíneos, permite identificar a variedade de leucócitos e estabelecer suas proporções relativas. Visa obter o valor percentual de cada tipo de leucócito no sangue circulante, para depois, conhecendo-se o total de leucócitos, definir o total de cada tipo celular. Dessa forma, consiste na realização dos seguintes procedimentos:

- 1) Utiliza-se o esfregaço sanguíneo, feito com uma gota de sangue, que é estendida sobre uma lâmina de vidro com auxílio de uma segunda lâmina e, posteriormente, é corado com Panótico (Hematocor-Biológica®);
- 2) O esfregaço é observado ao microscópio com objetiva de imersão a óleo (100x) e contam-se 100 leucócitos, anotando cada tipo diferencial (linfócito, monócito, azurófilo, basófilo, heterófilo ou eosinófilo);
- 3) Ao final da contagem, obtêm-se os valores percentuais de cada tipo celular.

**ANEXO A – 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

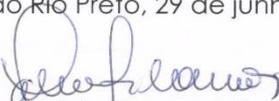
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – IBILCE/UNESP-CSJRP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da variação metabólica sazonal sobre a hematologia e sistema bioquímico antioxidante de *Salvator merianae* (Squamata: Teiidae)", registrada com o n.º. 149/2016 - CEUA, sob a responsabilidade da Professora Doutora Cláudia Regina Bonini Domingos, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou de ensino), encontra-se de acordo com os Preceitos da Lei n.º 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), do IBILCE/UNESP, em reunião de 29 de junho de 2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	30 de junho de 2016 a 28 de fevereiro de 2018
Espécie/linhagem/Raça	Réptil (<i>Salvator merianae</i>)
Nº de animais	10 (dez)
Peso/Idade	500g/ 03 anos
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP – São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto, 29 de junho de 2016.


Prof. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior
Vice-Presidente da CEUA