

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Efeitos da variação sazonal sobre o metabolismo intermediário e o *status*
oxidativo de *Tropidurus catalanensis* (Squamata, Tropiduridae)**

Maiara Rodriguez de Oliveira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429
Fone: (051) 3320-3500 - Fax: (051) 3339-1564
CEP 90619-900
Porto Alegre – RS – Brasil

2015

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Efeitos da variação sazonal sobre o metabolismo intermediário e o *status*
oxidativo de *Tropidurus catalanensis* (Squamata, Tropiduridae)**

Maiara Rodriguez de Oliveira

Orientador(a): Dra. Guendalina Turcato Oliveira

Co-orientador(a): Dra. Laura Verrastro Viñas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE – RS – BRASIL

2015

SUMÁRIO

Agradecimentos	5
Resumo	8
Abstract	10
Apresentação	12
Introdução Geral	14
CAPÍTULO I: “O custo da reprodução no metabolismo intermediário de <i>Tropidurus catalanensis</i> (Squamata, Tropiduridae)”	22
Resumo	24
Introdução	24
Materiais e Métodos	26
Resultados	30
Discussão	34
Apêndices	42
Referências	49
CAPÍTULO II: “Estudo das variações estacionais do <i>status</i> oxidativo em <i>Tropidurus catalanensis</i> (Squamata: Tropiduridae)”	54
Resumo	56
Introdução	56
Materiais e Métodos	58
Resultados	62

Discussão	65
Apêndices	72
Referências	77
Conclusões Gerais	81
Referências	82
Normas para Publicação	92

AGRADECIMENTOS

Ninguém conquista nada completamente só. Nos bastidores há sempre alguém a quem precisamos agradecer, e comigo não foi diferente.

Primeiramente, aos meus grandes exemplos: meus pais. Pessoas incríveis que sempre apoiaram minhas escolhas, me incentivando e encorajando a ir mais longe;

A minha orientadora Guendalina Oliveira, por diversos motivos que eu poderia listar aqui, mas os principais serão sempre os ensinamentos e “puxões de orelha” muitas vezes essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional;

A minha co-orientadora Laura Verrastro, que mesmo sem me conhecer confiou em mim e acolheu esta ideia, me introduzindo ao grupo dos mais incríveis répteis!

Ao Seu Vergínio, por deixar que acampássemos no seu “quintal”, pelas conversas cheias de sabedoria, pelos frutos colhidos das suas árvores, mas principalmente por nos acolher no coração;

A minha colega de campo - e sofrimento - Camila Rosa, pela parceria e paciência infinita na caçada destes seres muito mais ágeis (e espertos) que nós;

A minha colega de laboratório, meu presente trazido pelo mestrado, Ludimila Pinheiro. Pelo apoio mútuo, pelas “gordices” ao final das bancadas, pelas conversas intermináveis, por ser a melhor amiga que alguém pode ter em uma fase tão curta e conturbada;

A nossa super técnica Betânia Freitas, pela parceria, disponibilidade e boa vontade em auxiliar sempre!

Ao professor Léder Xavier, pelas ketaminas e heparinas disponibilizadas ao longo do projeto;

Aos integrantes do Laboratório: Fabiano Brito, pelas conversas e risadas; Camila Miguel, pelo “socorro” nos experimentos finais; Pedro Ximenes e Sarah Santos pelo companheirismo nos campos e bancadas intermináveis;

A todas as pessoas que nos deram apoio na busca por estes lagartos!

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia e ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa;

E por último, mas definitivamente não menos importante, ao meu parceiro, melhor amigo e namorado, Fernando Braghirolli, por manter minha sanidade mental durante estes dois anos e participar de cada etapa desta caminhada.

Gratidão!

“Don’t let your dreams

Be dreams...”

(Jack Johnson)

RESUMO

Ao longo do ciclo de vida dos organismos, a entrada de nutrientes se faz necessária para a manutenção e antecipação de eventos biológicos. Um dos eventos com maiores custos para o metabolismo é a reprodução. Marcadores do *status* oxidativo podem tornar-se ferramentas importantes na biologia da conservação para avaliar expectativas de sobrevivência e reprodução nos organismos, bem como elucidar os efeitos de impactos antrópicos em populações em ambiente natural. *Tropidurus catalanensis* é um lagarto encontrado em afloramentos de rocha, de porte médio e cor escura, com hábito diurno e comportamento territorialista. O período reprodutivo inicia-se em setembro e se encerra em janeiro, onde machos defendem seus haréns e fêmeas tornam-se residentes. O objetivo do presente estudo foi analisar as flutuações sazonais do metabolismo intermediário, de índices corporais e marcadores do *status* oxidativo de machos e fêmeas de uma população de *Tropidurus catalanensis*, que habita os campos do Pampa, bioma que abrange os países Argentina, Brasil e Uruguai. O estudo foi desenvolvido em uma área localizada em Alegrete, RS. Foram coletados 73 animais ao longo de um ano, através de busca ativa e captura manual. Houve o levantamento do comprimento rostro-cloacal (CRC), da massa corporal e foram retiradas amostras de sangue através de punção cardíaca com o auxílio de seringas heparinizadas. No plasma foram analisados os níveis de proteínas totais, ácido úrico, glicose, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol total e colesterol VLDL. No fígado foram analisados os níveis de proteínas totais, glicogênio, lipídeos totais e triglicerídeos. Nos tecidos hepático, renal e porção do músculo caudal foram analisados os níveis de lipoperoxidação (TBARS) e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST). Também foram levantados os índices

hepatossomático, gonadossomático e de gordura abdominal. Os resultados obtidos revelam que este sáurio apresenta um claro padrão de variação sazonal em seu metabolismo, dos marcadores de estresse oxidativo e nos índices corporais. Os meses de inverno parecem levar a um estado de hipometabolismo principalmente em machos, assim como o período reprodutivo parece ser o evento biológico que exige maior demanda energética, principalmente para as fêmeas. Estes custos ocasionados pela reprodução podem tornar a espécie mais vulnerável a alterações em seu meio ambiente. Sendo assim, o presente trabalho pode ser considerado importante na descrição e entendimento dos efeitos da sazonalidade no metabolismo intermediário e no *status* oxidativo de lagartos de vida livre, dando subsídios para a conservação da herpetofauna.

Palavras-chave: Lagartos, metabolismo intermediário, estresse oxidativo, variações sazonais, reprodução, fisiologia da conservação.

ABSTRACT

During the cycle of life of organisms, the food intake is crucial to maintenance and anticipation of biological events. One of the major events in terms of metabolic costs is reproduction. Indicators of oxidative status may become important tools in conservation biology, in order to evaluate survival and reproduction expectations on organisms, as well as to elucidate the effects of anthropic impacts among populations in their natural environment. *Tropidurus catalanensis* it is a dark-colored and medium size lizard that can be found in rocky outcrops, and has a day-light habit and territorial behavior. It's reproductive period goes to September from January, with males defending its harem and females tend to be more sedentary. The objective of the present study was to analyze seasonal variations of the intermediate metabolism, body index and biomarkers of the oxidative status of males and females from a population of *Tropidurus catalanensis* from Pampa biome, which occurs in Argentina, Brazil and Uruguay. The study was developed in a farm located in the city of Alegrete, RS. The study lasted one year, and it was collected 73 animals by active search and manual capture. It was measured the snout-vent-length (SVL), the body weight and it was taken blood samples by cardiac puncture with heparinized syringes. It was analyzed total proteins, uric acid, glucose, total lipids, triglycerides, total cholesterol and VLDL cholesterol of the blood plasma. On the liver, it was analyzed the levels of total proteins, glycogen, total lipids and triglycerides. On the liver, kidneys and muscle tissue from the lizard's tale it was analyzes the levels of lipid peroxidation (TBARS) and the activities of the following antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST). It was also measured the hepatosomatic and gonadosomatic index, as well as the abdominal fat. The present results indicate that this

lizard has a clear pattern of seasonal variation on its metabolism, its oxidative stress biomarkers and its body indexes. The winter period seems to induce a hypometabolic state mainly in males, and the reproductive period seems to be the biological event that requires the largest energetic demands, especially in females. These costs caused by reproduction may increase the vulnerability of the species to any environmental disturbance. Thus, the present study can be considered important on the description and understanding of the effects of the seasonality on the intermediate metabolism and oxidative status of free-living lizards, providing resources for the conservation of herpetofauna.

Keywords: lizards, intermediate metabolism, oxidative stress, seasonal variations, reproduction, conservation physiology.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação, intitulada como “Efeitos da variação sazonal sobre o metabolismo intermediário e o *status* oxidativo de *Tropidurus catalanensis* (Squamata, Tropiduridae)” é um dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Zoologia pelo Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Para a apresentação dos resultados obtidos, este trabalho é composto por dois capítulos redigidos em forma de artigos, o primeiro intitulado: “O custo da reprodução no metabolismo de *Tropidurus catalanensis* (Squamata, Tropiduridae)” e o segundo: “Estudo das variações estacionais do *status* oxidativo em *Tropidurus catalanensis* (Squamata, Tropiduridae)”. Os trabalhos supracitados deverão ser encaminhados para publicação na revista “*Journal of Comparative Physiology B*”.

Os artigos acercam-se sobre o estudo das flutuações sazonais do metabolismo intermediário e de marcadores de estresse oxidativo na espécie *Tropidurus catalanensis*; portanto, o presente trabalho apresentará uma introdução geral comum aos dois artigos. No artigo “O custo da reprodução no metabolismo de *Tropidurus catalanensis* (Squamata, Tropiduridae)”, será abordado a caracterização do metabolismo intermediário no plasma (proteínas totais, ácido úrico, glicose, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol total e colesterol VLDL) e no tecido hepático (proteínas totais, glicogênio, lipídeos totais e triglicerídeos), além dos índices corporais, dando enfoque aos custos que a reprodução exige desta espécie.

O artigo intitulado “Estudo das variações estacionais do *status* oxidativo em *Tropidurus catalanensis* (Squamata, Tropiduridae)”, tem por objetivo descrever a variação entre as estações do ano de marcadores básicos de estresse oxidativo, através

da determinação dos níveis de lipoperoxidação e atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase para a espécie.

INTRODUÇÃO GERAL

Espécies em todo o planeta têm sido seriamente ameaçadas por diversos tipos de perturbações como fragmentação e perda de habitat, sobre-exploração, espécies invasoras, doenças, químicos introduzidos no ambiente e mudanças climáticas (Carey, 2005; McNab, 2006; Brook et al. 2008). É estimado que até 2050, entre 15 a 37% das espécies de plantas e animais existentes em diferentes áreas geográficas se tornem extintas (Thomas et al. 2004) e a biodiversidade dos ecossistemas marinho e de água doce seja drasticamente reduzida (Jenkins, 2003). Os organismos podem responder às mudanças ambientais basicamente de três formas: (1) dispersão para um ambiente menos afetado; (2) a plasticidade fenotípica e fisiológica permitir tolerância à nova condição ou (3) a ocorrência de alterações genéticas via processo evolutivo que acarretará em adaptação (Hofmann e Todgham, 2010).

A fisiologia tem como foco os mecanismos envolvidos no sistema de funcionamento do organismo, incluindo anatomia e estrutura dos órgãos, aquisição de recursos, metabolismo e fluxo de energia, regulação e manutenção da homeostase, aclimação e tolerância às mudanças ambientais, desempenho (como crescimento, locomoção e fitness reprodutivo) e impactos no ecossistema (Cooke et al. 2013). A fisiologia, como ciência, também pode auxiliar na atenuação de perturbações ambientais, identificando aspectos chaves ou períodos de estresse nos organismos. É possível prever e antecipar adversidades através do conhecimento de características fisiológicas basais (Wikelski e Cooke, 2006), como por exemplo, verificado em iguanas marinhas de Galápagos. Estudo feito por Romero e Wikelski (2001) mostrou que estas iguanas apresentavam seus níveis de corticosterona (hormônio ligado ao estresse) aumentados como estratégia de sobrevivência para períodos de escassez alimentar

causado pelo fenômeno El Niño. Com a ocorrência de um derramamento de petróleo nas ilhas de Galápagos no mesmo ano, foi verificado que o estresse ambiental gerado conduziu a uma incapacidade destes animais em digerir algas marinhas, principal alimento para os iguanas. Apurou-se que os níveis de corticosterona destes animais estavam aumentados além do esperado para a época (Wikelski et al. 2001). O aumento deste glicocorticoide pode ocasionar uma alta mobilização dos recursos energéticos para manutenção da homeostase, levando a uma diminuição do *fitness* reprodutivo e imunossupressão (Romero, 2004; Wingfield, 2013). Outro exemplo preocupante é o declínio de populações de anfíbios. Nas últimas décadas, drásticas reduções no número de espécies e tamanho de populações têm sido documentadas. As razões são as mesmas já citadas anteriormente: destruição de habitat, introdução de espécies exóticas, doenças, poluição por metais pesados e uso indiscriminado de pesticidas (Linder et al. 2003; Carey, 2005; Dornelles e Oliveira, 2014). Pelo fato dos anfíbios estarem presentes tanto em ambiente aquático quanto terrestre em diferentes estágios do seu ciclo de vida e apresentar alta permeabilidade cutânea, estes organismos são considerados altamente sensíveis a xenobióticos (Alford e Richards, 1999). Trabalhos analisaram o metabolismo energético e estresse oxidativo em girinos de rã touro, e tiveram como resultado alterações metabólicas que podem estar ligadas ao desenvolvimento, metamorfose e sucesso reprodutivo (Dornelles, 2013); além da indução de espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequente estresse oxidativo (Costa et al. 2008).

Em geral, os organismos precisam lidar com variações naturais em seus ecossistemas, porém adicionalmente, os distúrbios causados por forças antrópicas têm lançado grandes desafios à sobrevivência dos mesmos (Carey, 2005). Em muitos casos, a dificuldade está em obter informações básicas da fisiologia dos organismos para entender seus períodos de susceptibilidade e prever como os mesmos responderão às

adversidades (Wikelski e Cooke, 2006). Para isto, a fisiologia tem sido empregada como ferramenta na biologia da conservação; uma área multidisciplinar dedicada ao estudo das causas no declínio de espécies e a recuperação daquelas que estão ameaçadas de extinção (Carey, 2005). A fisiologia da conservação é definida como “uma disciplina integrativa que visa compreender e prever como organismos, populações e ecossistemas responderão a mudanças ambientais e fatores de estresse” (Cooke et al., 2013). O conhecimento prévio do ciclo de vida dos organismos em ambiente natural permitirá compreender o impacto das alterações ambientais nos mesmos (McEwen e Wingfield, 2003).

Segundo McEwen e Wingfield (2003), homeostase é a estabilidade dos sistemas fisiológicos que mantém a vida. Todos os organismos necessitam ajustar sua morfologia, fisiologia e comportamento durante seu ciclo de vida. Em vertebrados, estes ajustes ocorrem em suas rotinas diárias e também sazonalmente (McEwen e Wingfield, 2010). Reprodução, migração, muda e hibernação são exemplos de eventos biológicos comuns durante a história de vida dos organismos (McEwen e Wingfield, 2003).

Variações sazonais nos fatores bióticos e abióticos apresentam grande influência no metabolismo energético de répteis (Bennett e Dawson, 1976). Por serem animais ectotérmicos, alterações de temperatura podem causar importantes efeitos na estrutura e função das enzimas metabólicas, modificando de maneira profunda os processos fisiológicos e padrões de atividade, principalmente no que se refere ao ciclo reprodutivo. Fatores como disponibilidade de alimento e fotoperíodo também contribuem para as diferenças sazonais do metabolismo (Bennett e Dawson, 1976; Huey, 1982; Somero, 2004; Southwood et al. 2006, Williard e Harden, 2011). Répteis podem manter atividade durante os meses de inverno através de uma combinação no comportamento de termorregulação e/ou compensação da capacidade metabólica

(Southwood et al. 2011). Esta estratégia somente será adotada se os benefícios energéticos superarem os gastos; o que pode não convir para espécies de répteis que enfrentam invernos rigorosos. Hipometabolismo e dormência são estratégias adotadas para algumas espécies de tartarugas (i.e. *Trachemys scripta*, *Chrysemys picta* e *Chelydra serpentina*), que permanecem submersas na água ou enterradas na lama enquanto as temperaturas estiverem baixas (Ultsch, 1989; Ultsch, 2006).

A reprodução em répteis de zonas temperadas parece funcionar de maneira sazonal, com picos de atividade reprodutiva separados por períodos de inatividade. Machos podem produzir espermatozoides ao longo de todo ano, porém fêmeas geralmente apresentam produção sazonal de gametas, que findam em ninhadas únicas ou múltiplas. Já espécies de zonas tropicais podem se reproduzir ao longo de todo ano. Em geral, a temperatura parece ser a maior reguladora do ciclo reprodutivo em répteis. Porém, outros fatores como fotoperíodo, regime de chuvas e disponibilidade de alimentos também podem influenciar neste evento biológico. A sincronização da reprodução aos fatores ambientais é fundamental para garantir o nascimento e a sobrevivência da prole. Em regiões temperadas, o ciclo de machos e fêmeas é ajustado para que os seguintes eventos ocorram na primavera na seguinte ordem: espermatogênese, vitelogênese, acasalamento e ovulação; e seguindo com o desenvolvimento embrionário e nascimento dos filhotes no verão (Callard e Kleis, 1987).

Diversos trabalhos abordam os custos da reprodução em répteis (e.g. Shine, 1980; Lacy et al. 2002; Angilletta e Sears, 2000; Van Dyke e Beaupre, 2011), principalmente do ponto de vista energético. Segundo Shine (1980), o esforço reprodutivo pode ser classificado em duas categorias: (1) diminuição da sobrevivência, que está associada às mudanças comportamentais resultantes da reprodução e; (2)

alocação energética, onde o custo pode ser maior principalmente em fêmeas que reduzem a ingesta alimentar durante o período reprodutivo. Pela demanda energética para produção de gametas ser muito alta, a energia disponível para outras funções como atividade, crescimento e manutenção da homeostase pode ficar limitada (Angilletta e Sears, 2000; Harshman e Zera, 2006; Van Dyke e Beaupre, 2011). Na literatura, é possível encontrar estudos que investigam o papel de diversos metabólitos como carboidratos, proteínas e principalmente de lipídeos na reprodução (Derickson, 1976; Lacy et al. 2002; Lourdais et al. 2013).

Diversos estudos têm mostrado que o *status* oxidativo pode gerar impactos significativos no desempenho dos organismos. Ele pode refletir não somente as condições ambientais ao qual o animal está exposto, mas também pode prever as futuras chances de reprodução e sobrevivência em seu habitat natural (Beaulieu e Costantini, 2014). Autores verificaram ao longo do ciclo de vida de diversas espécies de répteis, que eventos naturais podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), desencadeando estresse oxidativo, como no desenvolvimento de *Caiman yacare* (Furtado-Filho, et al. 2007), em situações de mergulho em *Chelonia mydas* (Valdivia et al. 2007), e anoxia e congelamento em *Thamnophis sirtalis parietalis* e *Lacerta vivipara* (Hermes-Lima e Storey, 1993; Voituron, et al. 2006).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes (Sies, 1991). Este desequilíbrio é conhecido por gerar danos em todo tipo de biomoléculas, como por exemplo, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge, 2008). As ERO incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, como exemplos, o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^0). Estas moléculas são elementos eletronicamente instáveis e por isto, altamente reativos; que

têm a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos, levando à lipoperoxidação, que acarreta em prejuízos à maquinaria celular (Ferreira e Matsubara, 1997; Costa et al. 2008; Andrade et al. 2010). O estresse crônico pode causar danos teciduais e disfunção metabólica, ocasionando na morte do organismo (Costantini, et al. 2009).

Para lidar com estas moléculas, organismos aeróbicos possuem em suas células um sistema de defesa antioxidante que incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a peroxirredoxinas (Prx), a glutathione (GSH), a glutathione redutase (GR) e a glutathione peroxidase (GPx) (Dowling e Simmons, 2009; Costa et al. 2008; Righetti et al. 2014). Estas enzimas são conhecidas como antioxidantes naturais e têm capacidade de neutralizar o excesso de ERO produzidas, prevenindo danos à estrutura celular. Existe ainda o sistema de defesa não enzimático, que é constituído por um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo a glutathione, o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido α -lipoico, zinco, taurinas, hipotaurinas, glutathiones, betacaroteno e caroteno. Esse sistema pode atuar de duas maneiras: como removedor do agente, antes que ele cause lesão, ou como reparador da lesão ocorrida (Andrade et al. 2010).

Dentro deste contexto, cabe destacar também as enzimas de detoxificação celular, que atuam em rotas de excreção de substâncias endo e xenobióticas; que protegem as células contra toxicidade química e estresse em diferentes tecidos, sendo importantes na manutenção da homeostase celular (Hermes-Lima e Storey, 1993). Dentre as enzimas detoxificantes mais estudadas estão as glutathione S-transferases (GSTs), pertencentes a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas. As GSTs desempenham vários papéis fisiológicos, como por exemplo, o sequestro e transporte de

compostos hidrofóbicos endógenos, os quais incluem hormônios esteróides, heme, bilirubinas, ácidos da bile e seus metabólitos (Freitas et al. 2008).

Lagartos desempenham papel fundamental nos ecossistemas; podendo auxiliar no controle de populações como predadores (Verrastro e Schossler, 2010), e também como presas de outros grupos taxonômicos (Vitt et al. 2008). Existem relatos de lagartos herbívoros que auxiliam na dispersão de sementes (Olesen e Valido, 2003) e relações de comensalismo, como a descrita por Rodrigues, (1987), entre *Tropidurus* e ácaros. Mais recentemente, foi assinalada uma inclinação deste grupo como possíveis bioindicadores da qualidade ambiental (Böhm et al. 2013).

Na área da toxicologia, os répteis são o grupo taxonômico menos estudado dentre os vertebrados, embora a sensibilidade dos mesmos diante de fatores de degradação ambiental já tenha sido comprovada. Lagartos são apontados como bioindicadores devido principalmente às suas características fisiológicas e história de vida (Campbell & Campbell, 2002). A distribuição destes animais em diversas regiões do planeta e em diferentes tipos de ecossistemas, a dieta insetívora combinada com a fidelidade relativa ao seu habitat e a maturidade sexual por vezes tardia, faz com que estes organismos sejam bons bioindicadores para estudos toxicológicos, uma vez que lagartos apresentam habilidade restrita para adaptarem-se a mudanças rápidas no ambiente, quando estas estão associadas à destruição de seu habitat, e também não possuem uma grande capacidade de emigrar para recolonizar uma nova área (Hopkins, 2000; Lambert, 2005). Ao longo do tempo, alguns trabalhos na área de toxicologia (e.g. Talent, 2005; Aguilera et al. 2012; Bicho et al. 2013) utilizando lagartos como bioindicadores têm sido desenvolvidos, avaliando efeitos principalmente de metais pesados e pesticidas nestes animais. Os resultados mostram ampla sensibilidade em

diferentes parâmetros, como ocorrência de bioacumulação e baixa capacidade de detoxificação dos poluentes aos quais foram expostos.

Tropidurus está representado por 21 espécies que se distribuem em áreas abertas da América do Sul cisandina, da Venezuela ao norte da Argentina e sul do Uruguai. No Brasil, uma vasta área do território é ocupada por estes animais (Rodrigues, 1987; Frost et al. 2001; Carvalho et al. 2013). São estrategistas senta-e-espera, com várias adaptações para este tipo de comportamento e dieta fundamentada em presas móveis, como formigas (Carvalho, 2007). Apresentam hábito diurno e comportamento territorialista (Wiederhecker et al. 2002; Vieira et al. 2011). *Tropidurus catalanensis* Gudynas & Skuk, 1983, foi revalidada por Kunz e Borges-Martins (2013), e era anteriormente conhecida como *Tropidurus torquatus*. São animais de porte médio, corpo e cauda curtos, escamas fortemente imbricadas e quilhadas na cauda e cor escura (Kunz e Borges-Martins, 2013). No Rio Grande do Sul, é possível encontra-los em afloramentos rochosos nos campos do bioma Pampa. Segundo Arruda et al. (2008), a abundância da espécie neste ambiente é explicada pela facilidade de termorregulação em períodos de frio. Sua ecologia reprodutiva foi estudada por Arruda (2009), que descreveu o ciclo reprodutivo como sazonal. Fêmeas atingem maturidade sexual com 74,8mm de comprimento rostro-cloacal (CRC), e machos com 65,3mm. O período reprodutivo de fêmeas ocorre de setembro a janeiro, com produção de ninhadas únicas e uma média de seis ovos. Já machos produzem espermatozoides continuamente, estando isto aliado à manutenção de comportamentos agressivos e de defesa de território, que se acentuam durante o período reprodutivo (Arruda, 2009). A espécie apresenta dimorfismo sexual marcado, onde machos desenvolvem manchas melânicas nas coxas, assim como visto por Pinto et al. (2005) para *Tropidurus torquatus*.

CAPÍTULO I:

“O custo da reprodução no metabolismo intermediário de *Tropidurus catalanensis*

(Squamata, Tropiduridae)”

**O custo da reprodução no metabolismo intermediário de
Tropidurus catalanensis (Squamata, Tropiduridae)**

Oliveira, M.R.¹; Braghirolli, F.M.¹; Verrastro, L.², Oliveira, G.T.¹

1. Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfofisiológicas - Laboratório de Fisiologia da Conservação.

2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Zoologia – Laboratório de Herpetologia.

Correspondência:

Dra. Guendalina Turcato Oliveira

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Faculdade de Biociências

Departamento de Ciências Morfofisiológicas

Laboratório de Fisiologia da Conservação

Avenida Ipiranga, 6681 Pd. 12, Bloco C, Sala 250

CP. 1429

Porto Alegre, RS 90619-900

Brasil

Telefone: 55-51-33203545 (ext. 8324)

Fax 55-51-3320-3612

E-mail: guendato@pucrs.br

G.T.Oliveira

Bolsista de Produtividade do CNPq, Brasília, Brasil (Processo: 307303/2012-8)

Resumo

Ao longo do ciclo de vida dos organismos, a entrada de nutrientes se faz necessária para a manutenção e antecipação de eventos biológicos. Um dos eventos com maiores custos energéticos é a reprodução. No presente estudo, foram analisadas as flutuações sazonais do metabolismo intermediário (proteínas totais, ácido úrico, glicose, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol total, colesterol VLDL e glicogênio) e índices corporais (fígado, gônadas e gordura abdominal) de machos e fêmeas de uma população de *Tropidurus catalanensis*, um lagarto que habita os campos do Pampa, bioma que abrange Argentina, Brasil e Uruguai. Os resultados obtidos revelam que este sáurio apresenta um claro padrão de variação sazonal em seu metabolismo e nos índices corporais. Os meses de inverno parecem levar a um estado de hipometabolismo em machos, assim como o período reprodutivo parece ser o evento biológico que exige maior demanda energética, principalmente em fêmeas. Machos também se tornam mais vulneráveis a predação neste período por conta da sua maior exposição ao ambiente. Estes custos ocasionados pela reprodução podem tornar a espécie mais vulnerável a conturbações em seu meio ambiente.

Palavras-chave Lagartos, metabolismo intermediário, reprodução, sazonalidade.

Introdução

Ao longo do ciclo de vida dos organismos, a entrada de nutrientes se faz necessária para a manutenção da atividade diária e também para antecipar diversos eventos biológicos, como muda, migração, hibernação e reprodução (McEwen e Wingfield 2003). O esforço reprodutivo é descrito como a quantidade de energia obtida ao longo de um espaço temporal que será alocada para reprodução (Hirshfield e Tinkle 1975; Van Dyke e Beaupre 2011). O uso de reservas energéticas no período reprodutivo

pode acarretar em uma redução nas taxas de sobrevivência via comprometimento do crescimento, das funções imunes e da estocagem de reservas para períodos de potencial estresse ambiental (Angilletta e Sears 2000; Harshman e Zera 2006).

Flutuações sazonais nos fatores bióticos e abióticos apresentam grande influência no metabolismo energético de répteis (Bennett e Dawson 1976). Por serem animais ectotérmicos, alterações de temperatura podem levar a modificações profundas nos processos fisiológicos e padrões de atividade, principalmente no que se refere ao ciclo reprodutivo. Fatores como disponibilidade de alimento e fotoperíodo também contribuem para as diferenças sazonais do metabolismo (Bennett e Dawson 1976; Huey 1982; Somero 2004; Southwood et al. 2006; Williard e Harden 2011).

A reprodução em répteis de áreas temperadas parece funcionar de maneira sazonal, com picos de atividade reprodutiva separados por períodos de inatividade. Já espécies de zonas tropicais podem se reproduzir ao longo de todo ano. Em geral, a temperatura parece ser a maior reguladora do ciclo reprodutivo em répteis. Porém, outros fatores como fotoperíodo, regime de chuvas e disponibilidade de alimentos também podem influenciar este evento biológico (Callard e Kleis 1986). Diversos trabalhos abordam os custos da reprodução em répteis (e.g. Shine, 1980; Lacy et al. 2002; Angilletta e Sears 2000; Van Dyke e Beaupre 2011), principalmente do ponto de vista energético.

Tropidurus catalanensis Gudynas & Skuk, 1983, é um sáurio de porte médio, corpo e cauda curtos, escamas fortemente imbricadas e quilhadas na cauda e cor escura (Kunz e Borges-Martins 2013). Apresentam hábito diurno e comportamento territorialista (Vieira et al. 2011). É possível encontrá-los em afloramentos rochosos nos campos do Pampa, bioma este que representa a maior extensão de pastagens naturais do mundo, abrangendo Argentina, Brasil e Uruguai (Bourscheit 2005). Apresenta ciclo

reprodutivo sazonal, típico de espécies de áreas temperadas (Callard e Kleis 1986). Fêmeas atingem maturidade sexual com 74,8mm de comprimento rostro-cloacal (CRC), e machos com 65,3mm (Arruda 2009). O período reprodutivo de fêmeas ocorre de setembro a janeiro, com a produção de ninhadas únicas e uma média de seis ovos; enquanto machos produzem espermatozoides continuamente, além de manterem comportamento agressivo e de defesa de território (Arruda, 2009). A espécie apresenta dimorfismo sexual demarcado, onde machos desenvolvem manchas melânicas nas coxas, assim como visto por Pinto et al. (2005) para *Tropidurus torquatus*.

O presente estudo teve como objetivo compreender as flutuações sazonais das vias metabólicas e índices corporais de *Tropidurus catalanensis*, incrementando assim o conhecimento do custo da reprodução para a fisiologia dos indivíduos desta espécie. Este é o primeiro estudo que abrange o acompanhamento sazonal de machos e fêmeas da mesma população em lagartos, e que descreve como estes animais utilizam seus recursos energéticos para a manutenção da homeostase e o cumprimento dos eventos do seu ciclo de vida.

Materiais e métodos

Todas as expedições para captura, coleta de sangue e transporte ao laboratório foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob licença nº 41203-2. Os protocolos de pesquisa utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sob registro nº 13/00358. Os animais deste estudo foram depositados como material testemunho na coleção científica

do Laboratório de Herpetologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Captura e área de estudo

Indivíduos de *Tropidurus catalanensis* foram capturados mensalmente de setembro de 2013 a setembro de 2014. A procura foi feita em sete afloramentos de rocha, através de busca ativa e captura manual, localizados em uma propriedade rural no município de Alegrete, RS, Brasil (55°41'79" W e 29°97'10"S). O município está inserido no bioma Pampa, que apresenta clima temperado quente e estações bem definidas. Em suas paisagens são encontradas duas formações vegetais: estepe gramíneo-lenhoso (campo nativo) e floresta estacional decidual aluvial (mata ciliar) (Boldrini 1997).

Foi feito o levantamento do sexo, massa corporal (com uso de dinamômetro Pesola®) e comprimento rostro-cloacal (CRC) com auxílio de paquímetro digital (precisão de 0,01). Amostras de sangue foram obtidas através de punção cardíaca utilizando-se seringas heparinizadas, a eutanásia foi feita com anestésico Ketamin (cloridrato de dextrocetamina) e após, os animais foram congelados para em seguida serem transportados em banho de gelo até o Laboratório de Fisiologia da Conservação na PUCRS. O sangue foi deixado refrigerado em repouso e posteriormente coletado o plasma com auxílio de pipetas Pasteur individualizadas. Em laboratório, houve a extração do fígado, que foi pesado em balança analítica (Bel Engineering, precisão de 0,001g) e imediatamente congelado por imersão em nitrogênio líquido; as gônadas e a gordura abdominal também foram retiradas e pesadas em balança analítica para determinação dos respectivos índices. Todo material foi mantido congelado em temperatura de -20°C até as análises bioquímicas.

Análises bioquímicas

As determinações dos metabólitos no plasma (proteínas totais, ácido úrico, glicose, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol total e colesterol VLDL) e no tecido hepático (proteínas totais, glicogênio, lipídeos totais e triglicerídeos) foram feitas através de espectrofotometria em duplicata; as proteínas totais plasmáticas foram expressas em mg/mL enquanto os demais metabólitos foram expressos em mg/dL. No tecido hepático, os metabólitos foram expressos em mg/g.

Plasma

As proteínas totais foram determinadas com auxílio do kit comercial de Proteínas Totais (Ref.: 99) da Labtest, através do método de biureto, que consiste numa reação com as ligações peptídicas das proteínas séricas, formando uma coloração púrpura que é proporcional à concentração de proteínas encontradas na alíquota da amostra. Os níveis de ácido úrico foram quantificados com auxílio de kit comercial de Ácido Úrico-PP (Ref.:451) da Analisa, que tem por princípio a metodologia enzimática-colorimétrica de oxidação do ácido úrico pela uricase (UOD) em alantoína, CO_2 e H_2O_2 . Os níveis de glicose foram determinados com uso de kit comercial Glicose PAP (Ref.: 84) da Labtest, através do método da glicose oxidase, que catalisa a oxidação da glicose formando cor vermelha proporcional à concentração de glicose na amostra.

Os lipídeos totais foram quantificados pelo método da sulfosfosvanilina (Frings e Dunn 1970), que consiste na oxidação dos lipídios celulares a pequenos fragmentos após a digestão química com ácido sulfúrico concentrado quente. Após a adição da solução de vanilina, um complexo vermelho é formado, onde a intensidade da cor é proporcional à concentração de lipídios na amostra. Os triglicerídeos foram quantificados com uso de kit comercial Triglicérides (GPO-ANA) (Ref.:87) da Labtest,

onde a lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos liberando glicerol, que é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato. Este será oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Após, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina. O colesterol VLDL foi determinado por relação matemática a partir dos resultados obtidos para os triglicerídeos. Os níveis de colesterol total foram quantificados com auxílio de kit comercial de Colesterol Total (Ref.:76) da Labtest, onde os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol-esterase em colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre sofre oxidação pela colesterol-oxidase, tendo como produto a colesterol-4-em-ona e peróxido de hidrogênio; o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina. A intensidade de cor formada na reação final é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

Fígado

Para a extração do glicogênio foi utilizado o método de Van Handel (1965), sendo este quantificado como glicose após hidrólise ácida (HCl) e neutralização (Na₂CO₃), utilizando-se o kit de Glicose Oxidase (Labtest). Os níveis de proteínas totais foram quantificados com o auxílio de kit comercial (Labtest), utilizando-se uma alíquota do meio de extração do glicogênio.

Para a extração dos lipídeos totais e triglicerídeos, foi utilizado o método de Folch et al.(1957) com uso de uma mistura de clorofórmio: metanol na proporção de 2:1 (V:V). Os lipídeos foram determinados por uso do método da sulfofosfovanilina (Frings e Dunn 1970), e os triglicerídeos por emprego de kit comercial da Labtest (triglicerídeos GPO-ANA).

Índices corporais

Os índices hepatossomático, gonadossomático e de gordura abdominal foram determinados para cada um dos indivíduos capturados através da relação matemática: peso do tecido (em gramas), dividido pelo peso do animal (em gramas), multiplicado por 100. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos com média \pm erro padrão, testados quanto a sua distribuição através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a homogeneidade analisada pelo teste de Levene. Para dados paramétricos foi feita análise de variância de uma via (ANOVA), com correção de Bonferroni quando $p > 0,05$ e Games-Howell quando $p < 0,05$. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis no programa Bioestat (versão 5.3), com teste complementar de Dunn. Os resultados obtidos para os diferentes sexos foram comparados através de análise de variância de duas vias. Foi adotado o nível de significância de 5% para as análises estatísticas realizadas com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows (Zar 1996).

Resultados

Um total de 73 indivíduos de *Tropidurus catalanensis* foi coletado ao longo deste estudo, com uma média de comprimento rostro-cloacal (CRC) de $102,07 \pm 2,69$ para os machos e $86,47 \pm 1,34$ para as fêmeas. Deu-se preferência pela captura de animais adultos, visto que estes atingem a maturidade sexual com um CRC de 65,3mm para machos, e 74,8mm para fêmeas (Arruda 2009). O número de organismos coletados em cada estação encontra-se na Tabela 1.

Plasma

Os níveis de proteínas totais (Fig.1) circulante em machos foram significativamente menores que em fêmeas (26,27%, $p=0,043$) ao longo de todo o ano. Maiores níveis foram encontrados tanto para os machos como para as fêmeas no inverno ($\bar{x}=58,97$ e $\bar{x}=81,96\text{mg/mL}$, respectivamente); em machos, houve um aumento dos níveis da primavera para o inverno de 60,34% ($p=0,015$); padrão semelhante ocorreu em fêmeas, com um aumento de 66,66% ($p=0,029$) nos níveis de proteínas totais circulantes da primavera para o inverno.

Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de ácido úrico (Fig.1) entre os sexos ou estações do ano.

Os níveis de glicose (Fig.1) não apresentaram diferenças significativas para os machos, enquanto para as fêmeas foi constatado um aumento da glicose de quase 2,5 vezes da primavera em relação ao inverno ($p<0,05$). Não houve diferença significativa no comportamento glicêmico entre machos e fêmeas ao longo de um ciclo sazonal e nem entre as estações do ano.

Não houve diferença significativa para os níveis de lipídeos totais (Fig.2) em machos ($p>0,05$) entre estações, enquanto em fêmeas houve diferença significativa entre a primavera e demais estações do ano (verão $p=0,002$, outono $p=0,014$ e inverno $p<0,001$) e, entre o verão e o inverno ($p=0,013$). Há um aumento de 82% nos níveis de lipídeos circulantes, com os menores níveis de lipídeos encontrados na primavera ($\bar{x}=114,55\text{mg/dL}$) e maiores no inverno ($\bar{x}=623,09\text{mg/dL}$).

Para os níveis de triglicerídeos (Fig.2), não foram encontradas diferenças significativas quando comparadas as respostas sazonais entre os sexos. Machos apresentaram níveis de triglicerídeos (Fig.2) 40,36% ($p<0,05$) menores que as fêmeas;

sendo encontrado um pico de níveis circulantes de proteínas no plasma em fêmeas (\bar{x} = 158,15mg/dL) nos meses de inverno.

Os níveis de colesterol total (Fig.2) não apresentaram diferença significativa para os sexos entre as estações do ano e nem entre os sexos na curva obtida ao longo do ano. Para o colesterol VLDL (Fig.2), não houve diferença significativa para ambos os sexos entre as estações do ano (machos $p=0,730$; fêmeas $p=0,340$). Contudo, houve diferença significativa no comportamento da curva obtida ao longo do ano entre machos e fêmeas, onde fêmeas apresentaram em média níveis 174,17% maiores que machos ($p<0,05$).

Fígado

Para a concentração de proteínas totais do fígado (Fig.3) não houve diferença significativa para os machos entre as estações do ano. Já para as fêmeas, houve diferença significativa entre os meses da primavera e do verão ($p<0,05$), onde os níveis de proteínas estocadas foram duas vezes maiores no verão em relação à primavera (\bar{x} primavera = 430,95mg/g; \bar{x} verão = 912,65mg/g). As fêmeas apresentaram níveis 31,32% em média maiores que machos ($p<0,05$). Quando comparamos machos e fêmeas, houve diferença significativa entre as estações do ano ($p<0,05$), com os maiores níveis sendo encontrados no verão para fêmeas e, no outono para machos. Houve diferença significativa também nos níveis protéicos de machos e fêmeas no verão ($p=0,019$), onde fêmeas apresentaram valores mais altos (\bar{x} = 387,91mg/g para machos; \bar{x} = 912,65mg/g para fêmeas).

Nos níveis de glicogênio (Fig.3) foi observada uma diferença significativa para os machos no inverno, quando comparado com os valores da primavera e do outono ($p=0,006$), com os meses de inverno apresentando níveis 85,54% maiores que aqueles

observados no verão e 82,57% maiores que os do outono. Não houve diferença significativa para fêmeas entre estações. Quando comparado os sexos, machos apresentam níveis 33,1% maiores que as fêmeas ($p < 0,05$). No inverno, os níveis deste polissacárido foram 52,21% maiores nos machos que nas fêmeas ($p = 0,019$).

Os lipídeos totais (Fig.4) de machos apresentaram diferença da primavera e verão onde são encontrados os maiores níveis em relação ao inverno ($p = 0,024$). Para fêmeas, houve diferença entre a o verão em relação à primavera e o inverno ($p = 0,004$), onde o verão apresenta os maiores valores ($\bar{x} = 176,99\text{mg/g}$). Fêmeas apresentaram níveis de lipídeos quase duas vezes maiores que machos ($\bar{x} = 112,66\text{mg/g}$; $\bar{x} = 60,35\text{mg/g}$, respectivamente) ($p = 0,001$). Os triglicerídeos (Fig.4) de machos tiveram diferença significativa entre os meses de verão e inverno ($p = 0,045$), com o verão apresentando níveis 90,54% maiores que no inverno. Não houve diferença significativa entre as estações para fêmeas. Fêmeas apresentaram níveis quase duas vezes maiores de triglicerídeos hepáticos que machos ($\bar{x} = 10,25\text{mg/g}$ fêmeas; $\bar{x} = 5,85\text{mg/g}$ machos) ($p = 0,012$).

Índices corporais

O índice hepatossomático (IH) (Fig.5) apresentou diferença significativa para machos entre verão e inverno ($p = 0,010$), onde o tecido hepático representou 2,37% do peso do animal no verão e 1,72% no inverno. As fêmeas também apresentaram diferença neste índice nos meses da primavera, onde o órgão representou 8,87% do peso total (maior proporção) e no outono verificamos a menor proporção, com o IH de apenas 3,13% ($p < 0,001$) do peso corpóreo. Fêmeas tiveram o índice hepatossomático até duas vezes maiores que machos, $\bar{x} = 4,38\%$ e $\bar{x} = 2,03\%$, respectivamente ($P < 0,001$), sendo a maior diferença entre os sexos observada na primavera ($p < 0,001$).

No índice de gordura abdominal (IGA) (Fig.5), houve diferença significativa para machos quando comparada a primavera com o verão e o outono ($p < 0,001$), onde a menor porcentagem de gordura abdominal é encontrada na primavera ($\bar{x} = 0,046\%$). Para fêmeas, houve diferença significativa quando comparada a primavera com o outono e o inverno ($p < 0,001$), onde a menor porcentagem de gordura abdominal também é encontrada na primavera ($\bar{x} = 0,23\%$). Houve diferença entre os sexos ($p < 0,001$), onde a porcentagem de gordura armazenada na cavidade abdominal por fêmeas ($\bar{x} = 3,12\%$) foi até 69,88% maior que em machos ($\bar{x} = 0,94\%$). Fêmeas também apresentaram porcentagem de gordura abdominal maior que a dos machos em todas as estações do ano ($p = 0,001$).

Houve diferença significativa no índice gonadossomático (IG) (Fig.5) de machos e fêmeas quando se comparou a primavera com o verão e o outono ($p < 0,05$); na primavera são encontradas gônadas proporcionalmente maiores para ambos os sexos. As fêmeas apresentaram gônadas quase quatro vezes maiores que as dos machos ($p < 0,001$), representando até 4% do seu peso total; com as fêmeas exibindo gônadas maiores que a dos machos ($p < 0,05$) nos meses da primavera, cerca de 79,76% e do inverno 74,01% maiores, respectivamente.

Discussão

Estudo feito por Vieira (2009) demonstrou relação positiva entre a atividade da espécie e variações de temperatura e vento. Visto que lagartos são organismos ectotérmicos, o baixo número de animais obtidos neste estudo durante o inverno provavelmente está associado às condições climáticas, onde baixas temperaturas combinadas com maior intensidade dos ventos fazem com que estes animais apresentem uma redução da atividade exploratória aliada a uma redução do metabolismo. O período

reprodutivo da espécie *Tropidurus catalanensis* é descrito de setembro a janeiro (Arruda 2009). Durante a primavera, machos estão mais expostos pela necessidade da busca por fêmeas e pela defesa de território, enquanto fêmeas tendem a apresentar um comportamento social residente (Arruda 2009, Vieira 2009), o que pode determinar o maior número de machos no ambiente. Tais fatores parecem ter sido decisivos para a obtenção de um número de animais desigual entre as estações do ano.

Na primavera, (pico reprodutivo da espécie) foram verificados os menores níveis de proteínas circulantes em ambos os sexos, o que pode ser determinado por uma diminuição do forrageio ocasionado pelo comportamento social de machos e fêmeas (Arruda 2009), como também pela alta demanda energética para a sustentação dos eventos reprodutivos, principalmente em fêmeas, onde os nutrientes são alocados para a produção de gametas, vitelogenese e/ou para a prole (Clutton Brock 1991). Segundo Lourdaís et al. (2004), para algumas espécies não somente as reservas lipídicas são mobilizadas na reprodução, mas também aminoácidos essenciais são requeridos no desenvolvimento da prole, e terão procedência da ingestão alimentar ou do catabolismo proteico. Além disto, espécies que tendem a ter uma restrição alimentar durante o período reprodutivo, terão seus lipídeos e proteínas utilizados também na manutenção do metabolismo energético (Cherel et al. 1992; Crocker et al. 1998).

Após o período reprodutivo, machos e fêmeas manifestaram um padrão semelhante de resposta, sendo apurado um aumento gradual dos níveis circulantes de proteínas atingindo valores significativamente mais elevados no inverno. Este padrão pode estar associado a uma recuperação após o término do período reprodutivo. Não se pode descartar a hipótese de uma alocação de proteínas do tecido hepático, visto que há uma diminuição destas a partir do outono, atingindo valores significativamente baixos no inverno principalmente em fêmeas; nos machos foi verificado um padrão

semelhante, contudo esta diferença não foi significativa. As fêmeas sempre apresentaram níveis mais altos de proteínas circulantes que os machos ao longo de todo o ciclo sazonal estudado, o que pode estar associado a uma maior demanda energética das fêmeas para a reprodução, como sugerido por Clutton Brock (1991) e Lourdais, et al. (2004).

O ácido úrico é o principal produto da excreta nitrogenada do catabolismo proteico em répteis (Maixner et al.1987) sendo também, o produto final da degradação dos ácidos nucléicos presentes na dieta (Lourdais et al. 2004; Champe 2006); neste estudo não foi observado, em ambos os sexos, uma variação significativa dos níveis de ácido úrico circulantes, o que pode sugerir um aporte proteico constante oriundo da degradação de proteínas no tecido hepático no inverno, principalmente, e da dieta nos demais meses do ano. Estudos de Arruda et al. (2007), apontaram *Tropidurus catalanensis* como uma espécie generalista oportunista, que se alimenta dos componentes mais abundantes no meio e tem como principais itens alimentares presas móveis como aracnídeos, himenópteros, coleópteros, e também fibra vegetal. O consumo destes itens corrobora com a hipótese descrita acima.

Os níveis glicêmicos desses animais apresentaram, assim como as proteínas do plasma, uma clara tendência de aumento da concentração circulante a partir dos meses de verão, pós-reprodução, até atingirem um pico no inverno. Isto provavelmente se deve a um aumento da ingesta alimentar após o período reprodutivo da espécie, nos meses do verão e do outono. Estudo feito por Gist (1972) com lagartos da espécie *Anolis carolinensis* submetidos ao jejum, demonstrou aumento significativo nas concentrações de glicose após realimentação. O pico de glicose verificada nos meses de inverno, em ambos os sexos, aliado a uma diminuição da concentração de proteínas hepáticas permite sugerir um aumento do uso dos aminoácidos liberados pelo catabolismo

proteico para a síntese de glicose a partir da gliconeogênese (Lourdais et al. 2004). Estudos demonstram (Lowell et al. 1986; Cherel et al. 1992; Pilkis e Granner 1992) que a gliconeogênese hepática é fundamental para a manutenção da glicemia em períodos de jejum, como pode ocorrer nos meses de inverno na espécie em estudo. A hipótese é reforçada também pelo aumento dos níveis de glicogênio hepático dos machos no inverno e manutenção deste polissacarídeo nas fêmeas na mesma estação do ano.

Os níveis de proteínas totais encontrados no fígado indicam que a diminuição observada entre as estações de outono e inverno é ocasionada pela captação do tecido hepático, para que estas proteínas sejam convertidas em carboidratos ou lipídeos, utilizadas assim para a síntese de glicose e/ou glicogênio ou obtenção de energia (Norris 2007).

Os níveis de glicogênio hepático não apresentaram flutuações ao longo do ano até o inverno, período em que esses níveis aumentaram em ambos os sexos. A principal função do glicogênio hepático é manter os níveis de glicose circulante, principalmente em períodos de jejum (Champe 2006). É provável que durante o ano o glicogênio esteja auxiliando na manutenção dos níveis glicêmicos destes animais; porém no inverno é possível que possa estar ocorrendo síntese deste polissacarídeo a partir de parte da glicose formada pela gliconeogênese aliada também, a uma redução da taxa metabólica em função das baixas temperaturas ambientais. Nesta região, a temperatura média no inverno é de 14°C (Vieira et al. 2011). Contrariamente ao observado em *Tropidurus catalanensis*, Raheem et al. (1989) demonstraram em serpentes da espécie *Eryx colubrinus* e em lagartos da espécie *Eumeces schneideri*, que durante a hibernação é visto uma depleção do glicogênio; este período de declínio da atividade e da demanda energética em ambas as espécies causa a inativação/diminuição da glicogênese, pois será utilizado o glicogênio hepático para manutenção da glicemia. Porém, estudo feito

por Haddad (2007), sugere que os animais podem apresentar ajustes fisiológicos em períodos de dormência e jejum prolongado, para que haja a utilização de lipídeos como fonte energética e ocorra uma contribuição reduzida de carboidratos na manutenção da homeostase.

Os níveis de lipídeos totais também tiveram uma tendência de aumento acentuado, principalmente para fêmeas, após o término da reprodução. Lipídeos são fontes importantes de estoque de energia, sendo utilizados em distintos eventos como: desenvolvimento, manutenção da homeostase e reprodução (Derickson 1976; Champe 2006). No caso da espécie *T.catalanensis*, é possível perceber que o principal uso se dá no período reprodutivo, com maior intensidade em fêmeas. A síntese de hormônios sexuais e gametogênese em ambos os sexos, e a síntese de vitelogenina, (principal glicolipoproteína) pelo fígado (Gavaud 1986) em fêmeas, determinaria o uso mais intenso das reservas lipídicas neste sexo. Tal padrão de resposta é corroborado pela intensa regressão do índice de gordura abdominal em ambos os sexos, e aumento dos índices gonadossomático e hepatossomático em fêmeas, todos verificados na primavera. Diferentes estudos em lagartos e serpentes (Gavaud 1986; Lacy et al. 2002; Van Dyke e Beaupre 2011), indicam que o investimento energético feito para a vitelogênese é considerado um grande esforço reprodutivo para fêmeas.

Os triglicerídeos são uma importante fonte de estocagem de lipídeos (Champe 2006); sendo os níveis circulantes deste metabólito mantidos constantes em machos e fêmeas ao longo do ano. Contudo, em fêmeas foi verificada uma tendência de aumento no plasma nas estações outono e inverno, portanto, fora do período reprodutivo; indicando que o tecido hepático pode estar alocando esta reserva energética para outros tecidos, principalmente para o tecido adiposo abdominal, onde haverá um maior armazenamento de gordura (Norris 2007). É provável que sua alocação esteja ligada à

recuperação pelo gasto energético ocasionado pela vitelogênese e também estocagem para uso no próximo período reprodutivo, resultado encontrado por Lacy et al.(2002) em lagartos da espécie *Urosaurus ornatos*. Esta tendência não é verificada em machos.

O colesterol é um componente estrutural das membranas celulares, sendo importante na produção de vários hormônios, vitamina D e ácidos biliares (Harper et al. 2002; Champe, 2006). Neste estudo não foi observado variação significativa nos níveis de colesterol circulante em ambos os sexos; apesar de constatararmos uma clara tendência de aumento destes níveis em machos na primavera, o que pode estar ligado à produção de testosterona, importante para a gametogênese e para a sustentação do comportamento reprodutivo, que envolve defesa de território, interações agonísticas e cópula (Moore 1988). Nas fêmeas também observamos uma tendência de aumento do colesterol circulante, só que verificada nas estações mais frias, podendo indicar assim como triglicerídeos, estocagem de gordura para vitelogênese (Gillet e Cruz 1981).

O colesterol VLDL é uma lipoproteína plasmática, que promove o transporte de lipídeos entre os tecidos (Champe 2006); níveis mais altos deste metabólito podem indicar picos de alimentação, ocasionando conseqüentemente em um maior aporte de gordura para tecidos periféricos, com objetivo de estocagem para uso posterior. Contudo, não foi verificada diferença significativa dos níveis de VLDL circulantes ao longo do ano em ambos os sexos; é possível observar apenas uma tendência de valores mais elevados no outono e no inverno. Cabe ressaltar que fêmeas sempre mantiveram em todas as estações do ano níveis mais altos desta lipoproteína em relação aos machos, o que talvez possa ser explicado pela alta demanda energética relacionada à vitelogênese em fêmeas, como indicado no estudo de Van Dyke e Beupre (2011).

Os níveis de lipídeos totais hepáticos apresentam perfil inversamente proporcional aos níveis de glicogênio, o que corrobora com a hipótese de gliconeogênese, pois os lipídeos podem estar sendo alocados a outros tecidos e/ou utilizados na síntese de corpos cetônicos (Williamson 1981; Storey 2002), uma fonte de substrato alternativo importante em situações de diminuição do metabolismo, fato que pode estar ocorrendo nos meses de inverno. Os mesmos resultados foram obtidos em um estudo de dormência sazonal em lagartos teiús jovens (Haddad 2007). Para ambos os sexos, os lipídeos totais hepáticos se mantêm constantes ao longo das estações, exceto para os machos, onde há uma queda acentuada ($p < 0,05$) no inverno.

O padrão encontrado para as reservas do fígado de machos e fêmeas pode indicar um possível jejum no inverno, neste caso não pela falta de alimentos, já que esta é uma espécie generalista, mas sim pelas baixas temperaturas que restringiria a saída dos animais para forrageio. Deve-se ressaltar que estudos futuros a cerca do grau e índices de repleção gástrico devem ser desenvolvidos para comprovar tal hipótese.

Os índices corporais também apresentaram um claro padrão de variação estacional, estando este fortemente correlacionado à reprodução em *Tropidurus catalanensis*. Machos não apresentaram variação significativa no índice hepatossomático e também apresentaram estoques menores de reserva energética (glicogênio e triglicerídeos) neste tecido. Já em fêmeas, durante a primavera o tecido hepático chega a representar até 8% do peso total, este índice cai para 1% no verão; é possível que fêmeas utilizem as reservas estocadas (carboidratos e lipídeos) no fígado para a vitelogênese, o que explicaria a sua diminuição no verão. Segundo Van Dyke e Beaupre (2011), algumas espécies de répteis apresentam aumento expressivo do fígado pela proliferação de precursores envolvidos no processo de vitelogênese.

O índice de gordura abdominal revela um dimorfismo sexual: machos parecem utilizar a gordura abdominal principalmente na manutenção da homeostase ao longo dos meses de inverno; enquanto fêmeas mantêm seu estoque de gordura intacto priorizando a sua alocação para a reprodução na primavera. Este mesmo padrão foi evidenciado por Lancy et al. 2002, em lagartos da espécie *Urosaurus ornatos*. Durante o inverno, o número de fêmeas encontradas no ambiente foi maior que o de machos (observação pessoal), o que pode indicar que machos se mantenham inativos durante épocas mais frias, utilizando seus estoques de gordura, enquanto fêmeas mantêm o forrageio mesmo em condições não favoráveis. Derickson (1974) evidenciou que lagartos da espécie *Sceloporus graciosus* utilizam suas reservas de lipídeos, principalmente os corpos de gordura, para a manutenção da homeostase durante os meses mais frios, e os lipídeos remanescentes para reprodução. Este padrão é o mesmo encontrado para os machos da espécie *Tropidurus catalanensis*.

O índice gonadossomático apresentou resultado inversamente proporcional ao da gordura abdominal, principalmente em fêmeas durante o período reprodutivo (primavera). Hahn (1967) evidenciou em lagartos da espécie *Uta stansburiana* uma associação entre a indução da vitelogênese pelo hormônio estradiol e a consequente mobilização de gordura corporal para as gônadas.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam que *Tropidurus catalanensis* apresenta um claro padrão de variação sazonal em seu metabolismo, refletido principalmente nos níveis de proteínas totais plasmáticas, glicogênio, lipídios totais e triglicerídeos do fígado de machos e fêmeas, e na glicemia, lipemia e proteínas hepáticas de fêmeas. Cabe ressaltar que todos os índices corporais estudados (fígado, gônadas e gordura abdominal) apresentaram variações ao longo do ano. Os meses de inverno parecem levar a uma redução do metabolismo corporal, sendo esta mais intensa

em machos; assim como o período reprodutivo parece ser o evento biológico que exige maior demanda e alocação de reservas energéticas em fêmeas, onde a ingesta alimentar pode estar reduzida pelos eventos reprodutivos. Machos também se tornam mais susceptíveis à predação por sua maior exposição no ambiente para busca por parceiras, defesa de território e corte (Angilletta e Sears 2000). Estes custos ocasionados principalmente pela reprodução podem tornar a espécie mais vulnerável, neste período do ano, a possíveis conturbações ambientais, como fragmentação e perda de habitat, introdução de espécies exóticas, doenças e exposição à xenobióticos.

Agradecimentos

Agradecemos ao dono da Fazenda São Francisco, Sr. Vergíneo, localizada em Alegrete, Brasil, pelo suporte de infraestrutura em todas as campanhas para a coleta dos animais utilizados neste estudo. Este trabalho teve o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, através da concessão de uma bolsa de mestrado.

Apêndices

Figura 1. Níveis plasmáticos de proteínas totais, ácido úrico e glicose ao longo do ano em *Tropidurus catalanensis*. As barras representam as médias \pm erro padrão, as barras pretas representam os machos e as brancas as fêmeas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. Asterisco (*) indica diferença na curva de resposta de machos e fêmeas ao longo do ano

Figura 2. Níveis plasmáticos de lipídios totais, triglicerídeos, colesterol total e colesterol VLDL ao longo do ano em *Tropidurus catalanensis*. As barras representam as médias \pm erro padrão, as barras pretas representam os machos e as brancas as fêmeas.

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. Asterisco (*) indica diferença na curva de resposta de machos e fêmeas ao longo do ano

Figura 3. Níveis hepáticos de proteínas totais e glicogênio ao longo do ano em *Tropidurus catalanensis*. As barras representam as médias \pm erro padrão, as barras pretas representam os machos e as brancas as fêmeas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. Asterisco (*) indica diferença na curva de resposta de machos e fêmeas ao longo do ano

Figura 4. Níveis hepáticos de lipídios totais e triglicerídeos detectados ao longo do ano em *Tropidurus catalanensis*. As barras representam as médias \pm erro padrão, as barras pretas representam os machos e as brancas as fêmeas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. Asterisco (*) indica diferença na curva de resposta de machos e fêmeas ao longo do ano

Figura 5. Índice hepatossomático, de gordura abdominal e gonadossomático obtidos ao longo do ano para *Tropidurus catalanensis*. As barras representam as médias \pm erro padrão, as barras pretas representam os machos e as brancas as fêmeas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. Asterisco (*) indica diferença na curva de resposta de machos e fêmeas ao longo do ano

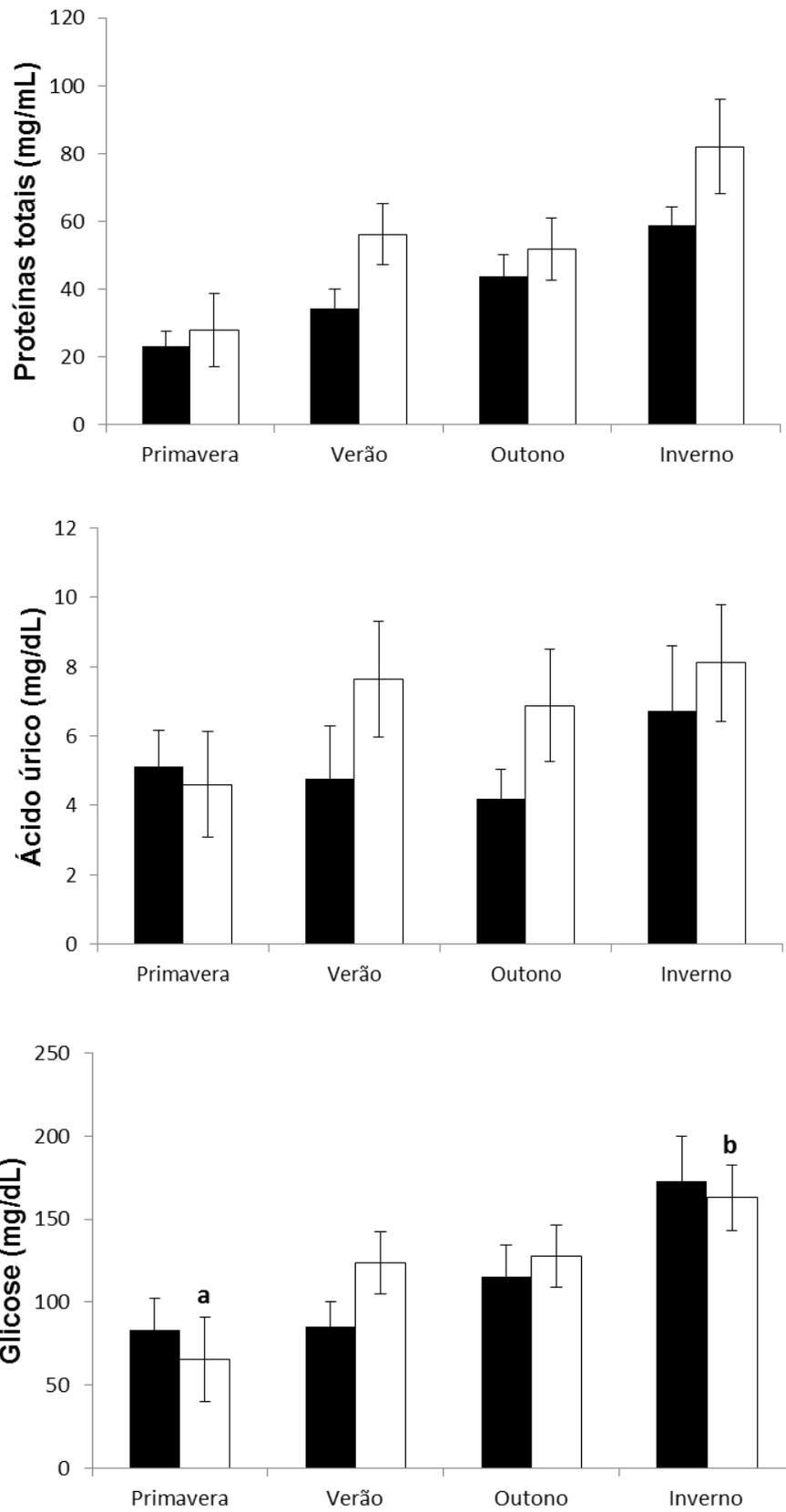


Figura 1

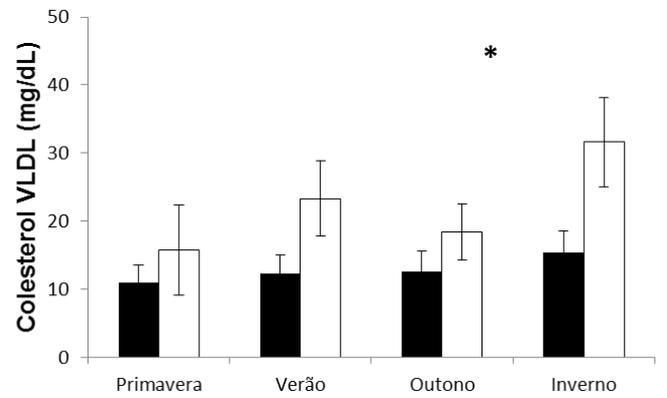
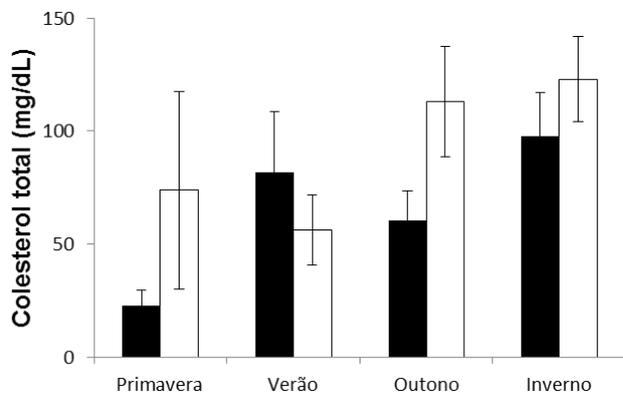
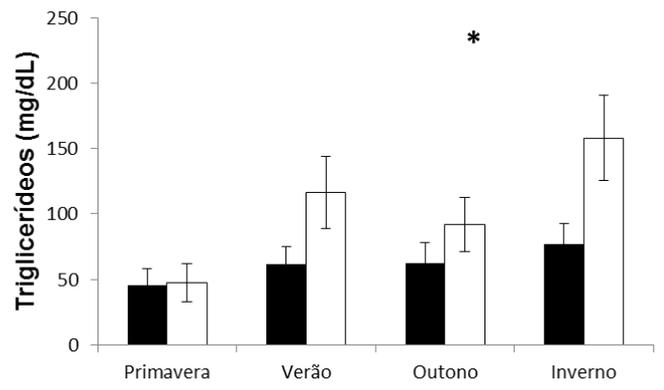
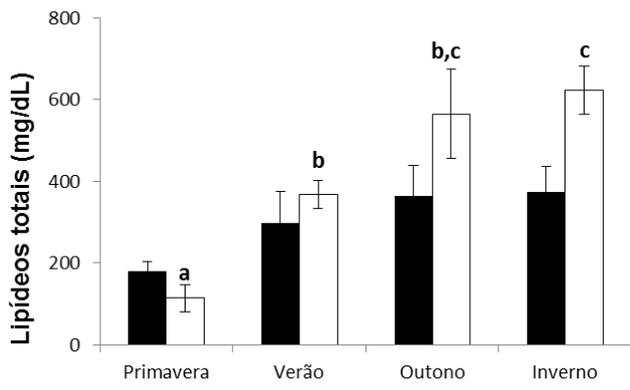


Figura 2

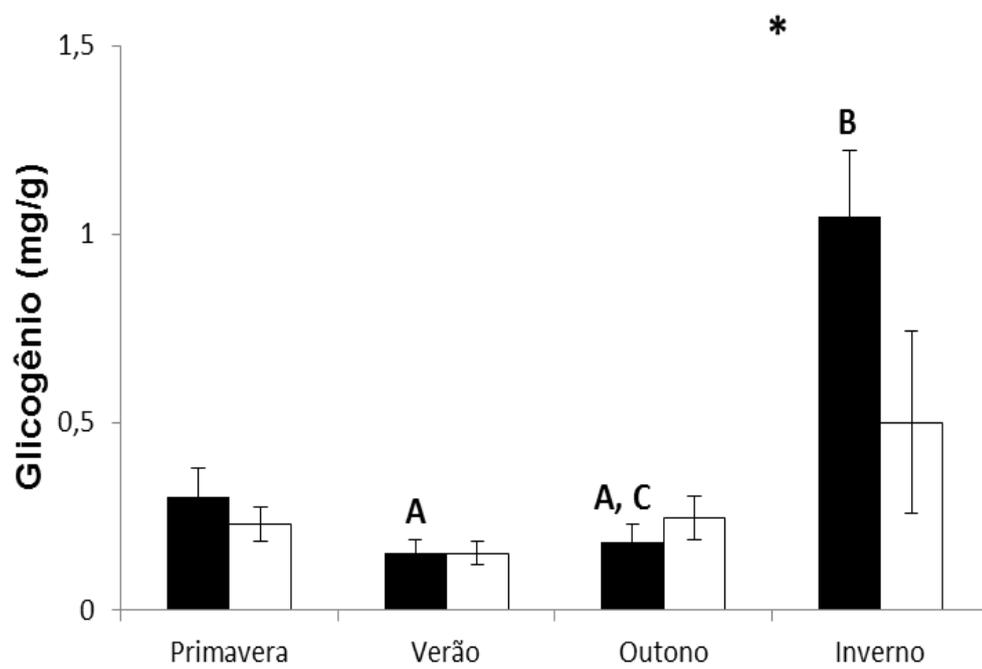
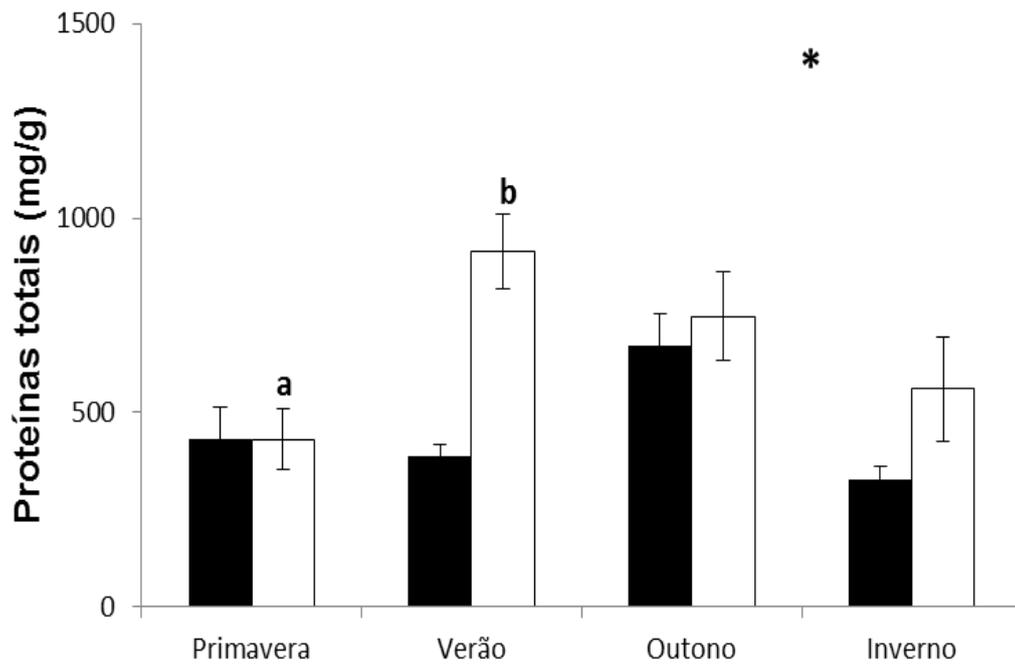


Figura 3

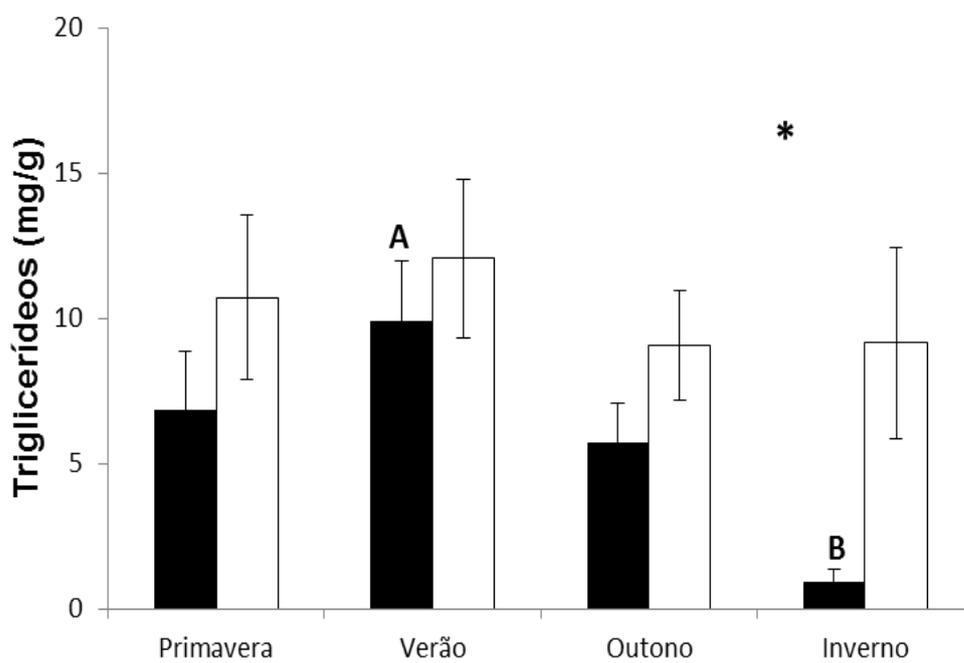
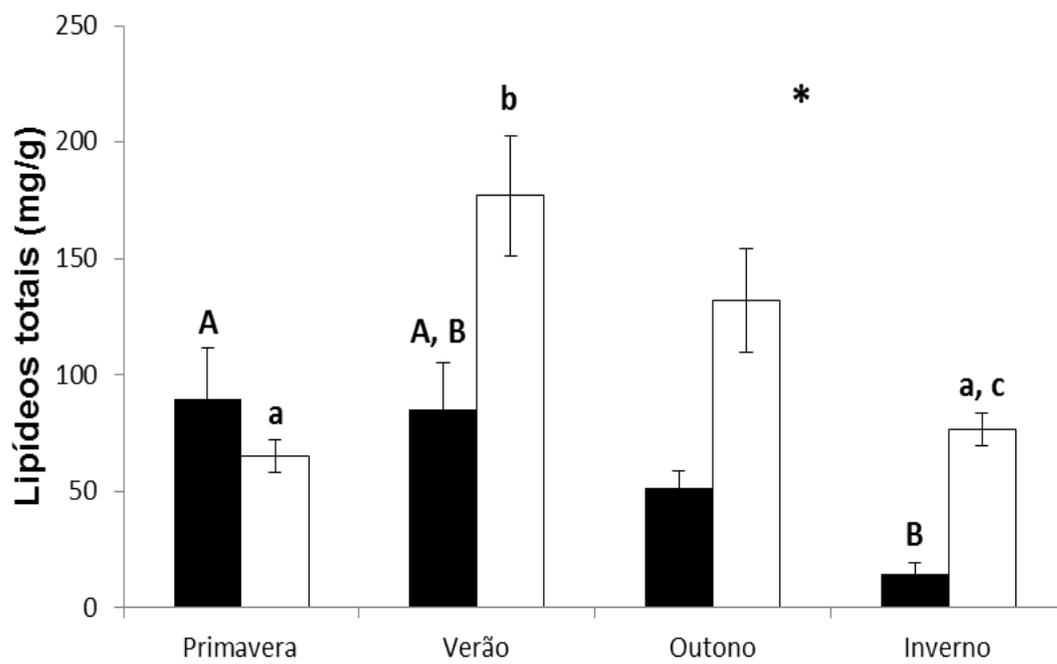


Figura 4

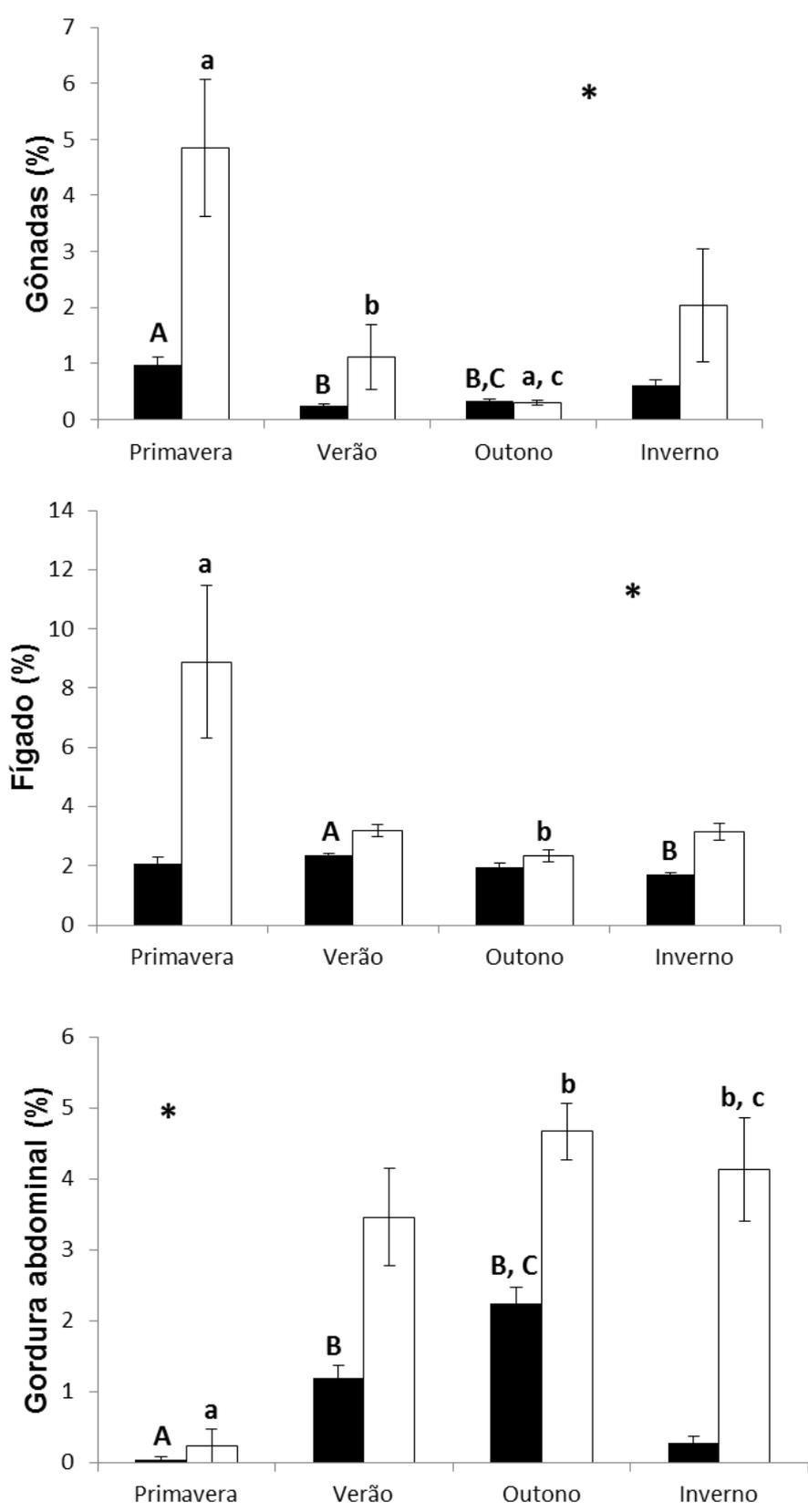


Figura 5

Tabela 1. Número de machos e fêmeas capturados ao longo das estações

	Primavera	Verão	Outono	Inverno
M	13	10	11	4
F	7	10	10	8

Referências

Angilletta Jr MJ, Sears MW (2000) The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Funct. Ecol.* 14:39-45

Arruda DA, Arruda JLS, Aued AW, Cechin STZ (2007) A dieta de *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) reflete a disponibilidade de presas do meio? Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu. Disponível em <http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/830.pdf>

Arruda JLS (2009) Ecologia de *Tropidurus torquatus* (Squamata:Tropiduridae) no bioma Pampa, extremo sul do Brasil. 77 p. (Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal) (Universidade Federal de Santa Maria): Santa Maria, RS

Bennett, AF, Dawson, WR (1976) Metabolism. In: Gans C, Dawson, WR (Eds.), *The Biology of Reptilia*. Academic Press, New York, pp. 127-223

Boldrini I (1997) Campos do Rio Grande do Sul: Caracterização Fisionômica e Problemática Ocupacional. *Boletim do Instituto de Biociências*. n° 56, p. 1-39

Bourscheit A (2005) O rico e desconhecido Pampa. In: *Revista do IBAMA*. Ano I n° 0. Brasília: Edições IBAMA

Callard IP, Kleis SM (1987) Reproduction in Reptiles. In: Kime DE, Chester-Jones I, Ingleton PM, Phillips JG. *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology*. Springer, US. Pp. 187-205

Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR (2006) *Bioquímica Ilustrada*. Artmed

- Cherel Y, Robin JP, Heitz A, Calgari C, Le Maho Y (1992) Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J. Comp. Physiol. Part B* 162:305–313
- Clutton-Brock TH (1991) The evolution of parental care. Princeton University Press, Princeton, New Jersey
- Crocker DE, Webb PM, Costa DP, Le Boeuf BJ (1998) Protein catabolism and renal function in lactating northern elephant seals. *Physiol. Zool.* 71:485-491
- Derickson WK (1976) Lipid Storage and Utilization in Reptiles. *Amer. Zool.*, 16:711-723
- Derickson WK (1973) Lipid deposition and utilization in the sagebrush lizard, *Sceloporus graciosus*: its significance for reproduction and maintenance. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 49A, pp. 267-272
- Folch J, Less M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226:497-509
- Frings C, Dunn R (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology* 53: 89-91
- Gavaud J (1986) Vitellogenesis in the lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. II. Vitellogenin synthesis during the reproductive cycle and its control by ovarian steroids. *General and Comparative Endocrinology* 63:11–23
- Gillet MPT, Cruz MEM (1981) Seasonal variation in plasma and hepatic lipids in relation to nutritional status and vitellogenesis in male and female lizards, *Ameiva ameiva* (Teiidae). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 70B. pp. 313-315
- Gist DH (1972) The effects of starvation and refeeding on carbohydrate and lipids reserves of *Anolis carolinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 43:771-780
- Haddad LS (2007) O papel dos lipídios na reorganização metabólica associada à dormência sazonal no lagarto teiú *Tupinambis merianae* (Sauria, Teiidae). Tese de doutorado USP

- Harper (2002) Bioquímica. Editora Atheneu. 9ª edição. São Paulo
- Harshman LG, Zera A (2006) The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol. Evol.* 22:80–86
- Hirshfield MF, Tinkle DW (1975) Natural selection and the evolution of reproductive effort. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72:2227-2231
- Huey, R (1982) Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. In: Gans C, Pough FH (Eds.), *The Biology of Reptilia*. Academic Press, New York, pp. 25–91
- Kunz TS, Borges-Martins M (2013) A new microendemic species of *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae) from southern Brazil and revalidation of *Tropidurus catalanensis* Gudynas & Skuk, 1983. *Zootaxa* 3681(4): 413–439 (doi: 10.11646/zootaxa.3681.4.6)
- Lacy EL, Sheridan MA, Moore MC (2002) Sex differences in lipid metabolism during reproduction in free-living tree lizards (*Urosaurus ornatus*). *General and Comparative Endocrinology* 128:180-192
- Lema T (2002) Os répteis do Rio Grande do Sul: atuais e fósseis – biogeografia – ofidismo. Porto Alegre, EDIPUCRS
- Lourdais O, Brischoux F, DeNardo DF, Shine (2004) Protein catabolism in pregnant snakes (*Epicrates cenchria maurus* Boidae) compromises musculature and performance after reproduction. *Journal of Comparative Physiology Part B* 174:383–391
- Lowell BB, Ruderman NB, Goodman, NM (1986) Regulation of myofibrillar protein degradation in rat skeletal muscle during brief and prolonged starvation. *Metabolism* 35:1121-1127
- Maixner JM, Ramsey EC, Arp LH (1987) Effects of Feeding on Serum Uric Acid in Captive Reptiles. *The Journal of Zoo Animal Medicin* 18:62-65
- McEwen BS, Wingfield JC (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* 43(1):2-15
- Moore MC (1986) Elevated testosterone levels during non-breeding season territoriality in a fall-breeding lizard, *Scleroporos jarrovi*. *J. Comp. Physiol.* 158:159-63

- Norris DO (2006) *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press, New York
- Pilkis SJ, Granner DK (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 54:885-909
- Pinto ACS, Wiederhecker HC, Colli G (2005) Sexual dimorphism in the Neotropical lizard, *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae). *Amphibia-Reptilia*, 26(2005):127-137
- Raheem KA, Okasha A, El-Deib, S (1989) Hibernation in reptiles 3. Carbohydrate metabolism in *Eryx colubrinus* and *Eumeces schneideri* *J Therm Biol*, 14 pp. 133–137
- Shine R (1980) “Costs” of reproduction in reptiles. *Oecologia* 46.1: 92-100
- Somero GN (2004) Temperature adaptation of proteins: searching for basic “strategies”. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 139:321-333
- Southwood AL, Reina RD, Jones VS, Speakman JR, Jones DR (2006) Seasonal metabolism of juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) at Heron Island, Australia. *Can. J. Zool.* 84:125-135
- Storey KB (2002) Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 133:733-754
- Van Dyke JU, Beaupre SJ (2011) Bioenergetic components of reproductive effort of viviparous snakes: Costs of vitellogenesis exceed costs of pregnancy. *Comp. Bio. Phys.*, Part A 160:504-513
- Vieira RC, Felappi JF, Caruccio R, Verrastro L (2011) Population Dynamics of *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (Squamata, Tropiduridae) in Southern Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 6(3), 215-222
- Williamson DH (1981) Utilization of ketone bodies by mammalian tissues. *Biochem Soc Trans.* 4:346-7
- Williard AS, Harden LA (2011) Seasonal changes in thermal environment and metabolic enzyme activity in the diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(4), 477-484

CAPÍTULO II:

“Estudo das variações estacionais do *status* oxidativo em *Tropidurus catalanensis*

(Squamata: Tropiduridae)”

**Estudo das variações estacionais do *status* oxidativo em
Tropidurus catalanensis (Squamata, Tropiduridae)**

Oliveira, M.R.¹; Braghirolli, F.M.¹; Verrastro, L.², Oliveira, G.T.¹

1. Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfofisiológicas - Laboratório de Fisiologia da Conservação.

2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Zoologia – Laboratório de Herpetologia.

Correspondência:

Dra. Guendalina Turcato Oliveira

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Faculdade de Biociências

Departamento de Ciências Morfofisiológicas

Laboratório de Fisiologia da Conservação

Avenida Ipiranga, 6681 Pd. 12, Bloco C, Sala 250

CP. 1429

Porto Alegre, RS 90619-900

Brazil

Phone: 55-51-33203545 (ext. 8324)

Fax 55-51-3320-3612

E-mail: guendato@puhrs.br

G.T.Oliveira

Bolsista de Produtividade do CNPq, Brasília, Brasil (Processo: 307303/2012-8)

Resumo

Marcadores do *status* oxidativo podem tornar-se ferramentas importantes na biologia da conservação para avaliar expectativas de sobrevivência e reprodução nos organismos, bem como elucidar os efeitos de impactos antrópicos em populações em ambiente natural. O objetivo do presente estudo foi avaliar as variações estacionais do *status* oxidativo de uma população de *Tropidurus catalanensis* através da análise das medidas de lipoperoxidação e a quantificação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase no fígado, rins e músculo caudal. Os resultados obtidos sugerem que esta espécie apresenta um sistema antioxidante bastante eficiente, mantendo os níveis de lipoperoxidação baixos em todos os tecidos, mesmo durante a reprodução, evento biológico de alta demanda energética. O presente trabalho pode ser considerado importante na descrição e no entendimento dos efeitos da sazonalidade no *status* oxidativo de lagartos de vida livre, dando subsídios para a conservação da herpetofauna.

Palavras-chave Lagartos, estresse oxidativo, variações sazonais, fisiologia da conservação, distúrbios antrópicos.

Introdução

É notório que o *status* oxidativo pode gerar impactos significativos no desempenho dos organismos. Ele pode refletir não somente as condições ambientais ao qual o animal está exposto, mas também pode prever as futuras chances de reprodução e sobrevivência em seu habitat natural (Beaulieu e Costantini 2014). Diferentes estudos verificaram ao longo do ciclo de vida de diversas espécies de répteis, que eventos naturais podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e desencadear estresse oxidativo; como no desenvolvimento de *Caiman yacare* (Furtado-

Filho et al. 2007), em situações de mergulho em *Chelonia mydas* (Valdivia et al. 2007), e anoxia e congelamento em *Thamnophis sirtalis parietalis* e *Lacerta vivipara* (Hermes-Lima e Storey 1993; Voituron et al. 2006).

Porém, além de lidar com as variações naturais do seu ciclo de vida, a sobrevivência de diversas espécies em todo o planeta tem sido drasticamente ameaçada por diversos tipos de perturbações como fragmentação e perda de habitat, sobre-exploração, espécies invasoras, doenças, químicos introduzidos no ambiente e mudanças climáticas (Carey 2005; McNab 2006; Brook et al. 2008). Estes distúrbios alteram a homeostase dos organismos, gerando estresse.

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes (Sies 1991). Este desequilíbrio é conhecido por gerar danos em todo tipo de biomoléculas, como por exemplo, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Halliwell e Gutteridge 2008). O estresse crônico pode causar danos teciduais e disfunção metabólica, ocasionando na morte do organismo (Costantini et al. 2009). Para lidar com as ERO, organismos aeróbicos possuem em suas células um sistema de defesa antioxidante, que incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), as peroxirredoxinas (Prx), a glutathiona (GSH), a glutathiona redutase (GR) e a glutathiona peroxidase (GPx), que apresentam capacidade de neutralizar o excesso de ERO produzidas, prevenindo danos à estrutura celular (Costa et al. 2008; Dowling e Simmons 2009; Righetti et al. 2014). Estudos sobre estresse oxidativo têm maior foco em mamíferos e aves, com menor atenção para répteis, embora a sensibilidade deste grupo diante de fatores de degradação ambiental já tenha sido comprovada. (Campbell e Campbell 2002; Costantini et al. 2009).

A espécie utilizada neste estudo, *Tropidurus catalanensis*, é um sáurio que

pertence à Tropiduridae, tendo ocorrência em áreas continentais abertas, com populações em grande número onde são encontradas (Kunz e Borges-Martins 2013). Estão presentes em afloramentos de rocha nos campos do bioma Pampa e segundo Carvalho et al. (2013) a incidência da espécie neste ambiente pode ser explicada pela sua capacidade de dispersão e plasticidade ecológica. São primariamente insetívoros, de hábito diurno e territorialistas (Arruda et al. 2007, Arruda 2009; Vieira et al. 2011). O período reprodutivo da espécie inicia em setembro e se encerra em janeiro (Arruda 2009).

O entendimento do funcionamento do sistema antioxidante de répteis em ambiente natural é de excepcional importância para dar subsídios à conservação da herpetofauna; com isto, o presente estudo teve como objetivo compreender as variações estacionais do *status* oxidativo de uma população de *Tropidurus catalanensis* através da análise das medidas de lipoperoxidação (LPO) e a quantificação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST) no fígado, rins e músculo caudal.

Materiais e métodos

Captura e área de estudo

Indivíduos de *Tropidurus catalanensis* foram capturados mensalmente de setembro de 2013 a setembro de 2014. A procura foi feita em sete afloramentos de rocha, através de busca ativa e captura manual, localizados em uma propriedade rural no município de Alegrete, RS, Brasil (55°41'79"W e 29°97'10"S). Este município está inserido na zona temperada do bioma Pampa, onde as estações do ano são bem definidas. Neste bioma são encontrados campos nativos e mata ciliar (Boldrini 1997).

Todas as expedições para captura e transporte dos indivíduos da espécie foram

autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) sob licença nº 41203-2, com os protocolos de pesquisa utilizados tendo sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sob registro nº 13/00358. Os animais deste estudo foram depositados como material testemunho na coleção científica do Laboratório de Herpetologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Todos os indivíduos coletados foram medidos com auxílio de paquímetro digital, sexados, eutanasiados com auxílio de cloridrato de dextrocetamina (Ketamina) e então congelados. Ao final da coleta, os animais foram transportados em cooler contendo gelo até o laboratório de Fisiologia da Conservação (PUCRS), onde ocorreu a extração dos tecidos hepático, renal e parte do músculo caudal, que foram pesados em balança analítica (Bel Engineering), com precisão de 0,001g e após, imediatamente congelados por imersão em nitrogênio líquido. Todo material foi mantido em temperatura de 20°C negativos até as análises bioquímicas. Todos os reagentes químicos utilizados neste estudo foram obtidos junto à Merck e Sigma-Aldrich.

Homogeneização dos tecidos

Para a análise dos níveis de lipoperoxidação e das enzimas antioxidantes, os tecidos foram previamente homogeneizados utilizando o seguinte protocolo: em uma proporção de 1grama de tecido para cada 5mL de uma solução de *buffer* fosfato (acrescida de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100mM (inibidor de proteases) em uma proporção de 1mL de solução para cada 10µL de PMSF), os tecidos foram homogeneizados em banho de gelo com auxílio de Ultra-Turrax (IKA-WERK). Após, foi feita a centrifugação do homogeneizado em centrífuga

refrigerada a 3000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e aliqotado em quatro tubos de plástico, que foram estocados em temperatura de -20°C para posterior análise.

Lipoperoxidação

Os níveis de lipoperoxidação foram determinados através do método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica consiste no aquecimento da amostra na presença do ácido tiobarbitúrico em um meio ácido (Buege & Aust, 1978), gerando um produto corado. Em tubos de ensaio, foram adicionados na seguinte ordem: 300µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, 200µL de ácido tiobarbitúrico 0,67%, 100µL de água destilada e 100µL da amostra, tendo como volume final 700µL. Os tubos foram agitados e aquecidos a 100°C durante 15 minutos, resfriados em gelo durante 10 minutos e foi adicionado 600µL de álcool n-butílico para a extração do produto corado da solução aquosa. Os tubos foram agitados novamente e centrifugados a 3000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda 535nm. A concentração de TBARS foi expressa em nmoles de TBARS. mg de proteínas⁻¹.

Dosagem de Proteínas

A concentração de proteínas encontradas no homogeneizado foi quantificada com auxílio de kit comercial da Labtest para Proteínas Totais (Ref.: 99), que tem como princípio o método de bioureto, que em contato com a amostra forma um líquido de cor púrpura com absorbância máxima a 545nm.

Enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas foi determinada através de espectrofotometria em triplicata para o fígado, os rins e uma porção do músculo caudal, através dos métodos descritos abaixo.

Superóxido Dismutase (SOD)

A técnica para determinação desta enzima é baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina, onde a enzima compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Como não é possível determinar a concentração da enzima, nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo (minutos), utiliza-se a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de redução do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto corado, o adrenocromo, detectado em comprimento de onda 480nm. O meio de reação empregado consiste de glicina-NaOH (50mM, pH 10,5) e adrenalina (1mM) (Boveris *et al.*, 1982). A concentração de SOD foi expressa em U de SOD por mg de proteínas⁻¹.

Catalase

A atividade da enzima catalase é quantificada através do consumo do peróxido de hidrogênio. *Buffer* fosfato (50mM) foi pipetado em cubeta de quartzo, que já estava inserida no espectrofotômetro, adicionou-se 5µl de homogeneizado e por fim, adicionou-se 17,5µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O comportamento de cinética enzimática é determinado pela inclinação negativa (diminuição da absorbância) em um comprimento de onda de 240nm durante 84 segundos, com leituras registradas a cada 7segundos. Os resultados obtidos para catalase foram expressos em nmoles de peróxido de hidrogênio consumido por min⁻¹ por mg de proteínas⁻¹.

Glutathione S-transferase

Para quantificação da atividade da enzima foi utilizado o método descrito por Boyland e Chasseaud (1969); que consiste na medida da conjugação do 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida (GSH). A atividade é medida através do aumento dos valores de absorvância, com comprimento de onda 340nm. A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (Habig e Jakoby 1981). Desta atividade é descontada a reação basal obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDBN, sem a presença da amostra. O ensaio enzimático foi realizado por 120 segundos, com intervalo de leitura de 10 segundos em tampão fosfato de potássio (KPi) 100 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 contendo 1 mM GSH e 1 mM de CDBN; onde a absorvância basal foi descontada a partir da leitura da reação do ensaio na ausência da amostra. Como agente iniciador da reação usou-se 10 ou 25µL de amostra do homogeneizado. A atividade da enzima é expressa como nmol de conjugado CDBN por min^{-1} por mg de proteínas⁻¹.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos com média \pm erro padrão, testados quanto a sua distribuição através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a homogeneidade analisada pelo teste de Levene. Para dados paramétricos foi feita análise de variância de uma via (ANOVA), com correção de Bonferroni quando $p > 0,05$ e Games-Howell quando $p < 0,05$. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis no programa Bioestat (versão 5.3), com teste complementar de Dunn. Os resultados obtidos para os diferentes sexos foram comparados através de análise de variância de duas vias. Foi adotado o nível de significância de 5% para as análises estatísticas

realizadas com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows (Zar, 1996).

Resultados

Um total de 73 indivíduos de *T.catalanensis* foi coletado ao longo das estações, de setembro de 2013 a setembro de 2014, sendo 38 machos e 35 fêmeas. Com uma média de comprimento rostro-cloacal (CRC) de $102,07 \pm 2,69$ para machos e $86,47 \pm 1,34$ para fêmeas, deu-se preferência pela coleta de animais considerados adultos, a partir do CRC de 65,3mm para machos, e 74,8mm para fêmeas, conforme Arruda (2009).

Lipoperoxidação (TBARS)

Para os tecidos hepático e muscular caudal de machos e fêmeas não foram encontradas diferenças significativas quanto aos níveis de lipoperoxidação ($p > 0,05$), apesar de verificarmos uma clara tendência de aumento destes níveis na primavera. Foi encontrada diferença ($p < 0,05$) apenas no tecido renal de machos, onde os níveis de lipoperoxidação na primavera foram 78,09% mais altos que no inverno. No músculo caudal de machos a técnica empregada neste estudo não foi capaz de detectar níveis de TBARS para os meses de inverno, sendo a análise estatística realizada apenas entre as demais estações do ano (primavera, outono e inverno) neste tecido e sexo (Fig.3).

Superóxido dismutase

Não foi detectada atividade para esta enzima em parte das amostras deste estudo, sendo assim, nas amostras onde foi registrada atividade, houve diferença significativa na SOD do tecido hepático de machos ($p < 0,05$), onde o verão apresentou níveis de atividade 60,24% maiores que o outono e 80,38% maiores o que inverno. Não houve

diferença significativa ($p > 0,05$) da atividade desta enzima em nenhuma das estações no tecido hepático de fêmeas (Fig.1). Para o tecido renal de machos, houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas estações primavera e verão, que apresentaram menor atividade enzimática ($\bar{x} = 2,50$ e $\bar{x} = 2,44$, respectivamente) e as estações outono e inverno, onde a atividade é mais alta ($\bar{x} = 5,16$ e $5,17$, respectivamente). Assim como no fígado, não houve diferença significativa na atividade de SOD renal das fêmeas ($p > 0,05$) (Fig.2). Houve diferença significativa quando comparado os sexos, onde machos apresentaram atividade 31,57% mais alta que fêmeas. No tecido muscular (Fig.3), machos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as estações primavera e outono, onde houve um aumento de atividade de 68,31% da primavera para o outono. Não foi detectada atividade enzimática neste tecido no verão. Embora não tenha sido apontada diferença estatística, a atividade da SOD muscular em fêmeas na primavera é 3,5 vezes maior que as outras estações do ano. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os sexos nas estações, onde machos apresentaram atividade 76,96% mais alta que fêmeas no outono e 74,73% mais alta que fêmeas no inverno. Já fêmeas apresentaram atividade da SOD muscular 62,67% mais alta que machos durante a primavera.

Catalase

Houve diferença significativa entre machos e fêmeas quando comparadas as médias dos meses que compõem a primavera e inverno ($p < 0,05$) no fígado (Fig.1), onde na primavera verificamos uma atividade enzimática 93,73% mais alta para os machos e 71,04% mais alta para as fêmeas em relação ao inverno. Houve diferença significativa entre os sexos ($p = 0,043$), onde os machos apresentaram atividade até 59,07% mais alta que a observada em fêmeas. Para a atividade da CAT nos rins (Fig.2), machos mostraram diferença significativa entre as estações do ano, sendo esta diferença

observada entre o verão e o inverno ($p < 0,05$), com os meses de inverno apresentando valores 77,01% mais altos que no verão. Para fêmeas, houve diferença significativa entre o inverno e os meses de verão e de outono; onde o inverno apresentou maior atividade ($\bar{x} = 36,88$) e o outono a menor ($\bar{x} = 9,02$). Houve diferença significativa entre as estações do ano ($p = 0,010$) quando comparamos os valores encontrados para os machos e as fêmeas, onde a maior atividade foi apresentada para ambos os sexos no inverno, e a menor no verão para machos ($\bar{x} = 8,25$) e no outono para fêmeas ($\bar{x} = 9,02$). Machos não apresentaram diferença significativa em nenhuma das estações do ano para a atividade da CAT muscular, porém fêmeas apresentaram diferenças entre o inverno e as estações verão e outono (Fig.3), onde no inverno é observada uma atividade 79,53% mais alta que no verão e 80,94% mais alta que no outono. Houve diferença significativa entre machos e fêmeas no inverno ($p < 0,05$), com fêmeas apresentando atividade 60,27% mais alta da enzima que machos.

Glutathione S-transferase

Não houve diferença significativa entre a atividade da GST no fígado (Fig.1) para machos ($p > 0,05$) ao longo de um ciclo sazonal. Em fêmeas, houve diferença significativa entre os meses de primavera e verão, onde a atividade foi 79,29% mais alta no verão. Houve diferença entre machos e fêmeas ($p < 0,01$), com as fêmeas apresentando uma atividade 60,14% mais alta (\bar{x} machos=11,12; \bar{x} fêmeas=27,9). A maior diferença entre os sexos foi notada no verão, onde a atividade da CAT foi 79,7% mais alta em fêmeas. A atividade da GST nos rins (Fig.2) não apresentou diferença significativa ao longo do ano. No músculo caudal (Fig.3), não houve diferença significativa para atividade da GST em machos ($p > 0,05$); já em fêmeas houve diferença significativa entre o outono e os meses de verão e inverno, com o outono apresentando

uma atividade 58,41% mais alta que aquela verificada no verão e 70,95% mais alta que no inverno. Não houve diferença significativa entre os sexos nas estações.

Discussão

Os níveis de lipoperoxidação (que indicam dano causado pelas ERO) (Ferreira e Matsubara 1997) foram mantidos constantes em ambos os sexos no tecido hepático e muscular para todas as estações do ano; inclusive durante o período reprodutivo (setembro-janeiro) (Arruda 2009), embora exista uma tendência ($p > 0,05$) de maiores valores para este período no tecido hepático e também no muscular de machos, o que pode estar ligado ao comportamento reprodutivo. Já no tecido renal de machos foi observado um claro incremento dos níveis de LPO nos rins durante a primavera em relação às demais estações do ano.

É conhecido da literatura que durante a estação reprodutiva, fêmeas tendem a tornarem-se residentes, enquanto machos apresentam maior atividade exploratória do habitat devido à busca por fêmeas e ao comportamento de defesa de território e de seus haréns (Rodrigues 1987; Arruda 2009). Segundo Arruda (2009), os machos desta espécie produzem espermatozoides ao longo de todo ano e este fato pode estar ligado à produção contínua de testosterona para a manutenção do comportamento agressivo e defesa de território como proposto por Wiederhecker et al.(2002) para *Tropidurus torquatus*.

Em machos de vertebrados, a reprodução conduz a modificações morfológicas, comportamentais e fisiológicas, e o sucesso reprodutivo incorre em custo metabólico aliado a um incremento do estresse oxidativo (Alabarse et al. 2011). Além disto, Costantini et al. (2009) ressaltam que os hormônios sexuais como a testosterona e o estradiol apresentam atividade antioxidante, e também induzem à produção de ERO, o

que pode gerar estresse oxidativo. Alabarse et al. (2011) mostram que o tecido renal de ratos machos apresentam um aumento do dano oxidativo e de modificações no sistema de defesa antioxidante, sendo isto associado a alterações no metabolismo e ao aumento da testosterona na reprodução, visto que menores níveis deste hormônio são necessários para a manutenção do *status* antioxidante e, o aumento leva a um desequilíbrio deste sistema, determinando estresse. É evidenciado por trabalhos de Marler e Moore (1988) e Tokarz et al. (1997), que níveis altos de testosterona podem reduzir a sobrevivência em machos. Assim, o aumento dos níveis de lipoperoxidação verificados no tecido renal de machos de *Tropidurus catalanensis* pode estar relacionado com um possível aumento da secreção de testosterona durante o período reprodutivo da espécie (setembro-janeiro).

Cabe ressaltar que no tecido muscular foi possível detectar valores de peroxidação lipídica nos meses de primavera, verão e outono, não sendo detectados tais níveis no inverno; sugerindo uma redução da atividade exploratória do animal durante o inverno, o que conduziria a uma diminuição do gasto energético (depressão metabólica) e conseqüentemente, uma diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio e assim, da lipoperoxidação. Sabe-se que a fosforilação oxidativa é um dos principais pontos de síntese de tais moléculas (ERO) (Downling e Simmons 2009).

Na região onde a espécie foi coletada, o inverno se caracteriza como a estação de mais baixa temperatura (média de 14°C), acompanhada da diminuição do período de insolação (Vieira et al. 2011), o que pode induzir uma restrição da atividade exploratória destes animais, resultando em hipometabolismo.

A hibernação ou hipometabolismo em répteis e anfíbios é conhecida também como brumação. Este evento ocorre geralmente nos meses mais frios, mas é possível observá-lo em períodos onde variáveis ambientais (como temperatura e disponibilidade

de alimentos) não estão alteradas (Rismiller e Heldmaier 1982). Este fato foi verificado no lagarto *Lacerta viridis*, que apresenta inatividade e depressão metabólica apesar da oferta de alimentos e manutenção da temperatura em 23°C, sendo tal resposta determinada pelo fotoperíodo (Rismiller e Heldmaier 1982). Sábrios da espécie *Tupinambis merianae* apresentam grande porte, com taxa metabólica de repouso relativamente alta, exibindo uma diminuição gradual da mesma e do tempo gasto em atividade a partir dos meses de outono, até atingirem inatividade e jejum nos meses de inverno (de Souza et al. 2004), sendo estes mecanismos induzidos por baixas temperaturas e diminuição da insolação (Milsom et al. 2008).

Os resultados obtidos neste trabalho para a medida de dano oxidativo são menores que aqueles encontrados para outros répteis (Valdivia et al. 2007; Furtado-Filho et al. 2007; Reguera et al. 2014) (Tabela 1), o que permite sugerir uma alta capacidade do sistema antioxidante deste animal frente às variações das condições ambientais e de seu próprio ciclo de vida. Animais tolerantes a condições extremas apresentam um sistema de defesa antioxidante eficiente contra flutuações no consumo de oxigênio (Welker 2009), reforçando a hipótese apresentada anteriormente de um período anual de hipometabolismo. Destacam-se entre estas adaptações, já descritas em outros répteis, a presença de altas concentrações de moléculas antioxidantes, sendo necessários maiores investigações sobre estes aspectos em *Tropidurus catalanensis*.

A enzima superóxido dismutase tem por função metabolizar o ânion radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma molécula que apresenta menor capacidade de oxidação (Ferreira e Matsubara 1997). Não foi possível detectar atividade enzimática com a técnica empregada em parte das amostras (140 amostras). As que obtiveram registro de atividade (79 amostras), esta se apresentou muito baixa. O tecido hepático de machos apresentou atividade de SOD mais alta no verão, combinada a um

maior nível de lipoperoxidação, enquanto fêmeas não obtiveram diferença significativa ($p > 0,05$) para ambos os parâmetros. Este resultado pode estar ligado ao aumento da atividade exploratória no ambiente. Segundo Olsson et al. (2012), machos da espécie *Ctenophorus pictus* apresentam atividade da SOD significativamente maior que fêmeas no período reprodutivo, sendo sugerido pelos autores que tal padrão está ligado a maior atividade do sexo, envolvendo longas horas de patrulha do território e competição por oportunidade de acasalamento. O mesmo comportamento é observado na espécie *Tropidurus catalanensis*.

Nos rins, a atividade da SOD apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) apenas em machos, onde as estações mais frias (outono e inverno) apresentaram maior atividade enzimática. Fêmeas não tiveram flutuações na atividade desta enzima no tecido renal, o que pode estar ligado à produção de estrógeno. Um estudo feito em ratos concluiu que este hormônio auxilia na proteção dos rins, atenuando danos induzidos pela produção do radical superóxido (Ji et al. 2007).

Assim como visto no tecido renal, o tecido muscular apresentou diferença significativa em machos, mais uma vez registrando atividade de SOD mais alta em estações de baixas temperaturas. Este mesmo resultado foi visto em lagartos da espécie *Lacerta vivipara*, submetidos ao resfriamento e congelamento. Neste estudo, a atividade da SOD aumentou nas situações supracitadas, indicando a ocorrência de uma ativação do sistema antioxidante destes animais como estratégia de sobrevivência em baixas temperaturas, tendo a SOD um papel importante neste evento, protegendo os tecidos renal e muscular contra dano oxidativo. Após descongelamento, os animais apresentaram diminuição da atividade desta enzima (Voituron et al. 2006).

A enzima catalase é uma heme proteína que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Ferreira e Matsubara 2000; Righetti et al. 2014). O maior incremento de atividade de CAT no fígado de machos e de fêmeas foi encontrado durante o período reprodutivo. Segundo Costa et al. (2008), o aumento da atividade de enzimas como SOD e CAT no tecido hepático é uma resposta ao aumento das ERO. Como há uma tendência de maiores níveis de lipoperoxidação ($p > 0,05$) durante a primavera e o verão, este aumento da atividade enzimática pode ser considerado como uma resposta do tecido hepático aos eventos reprodutivos, permitindo assim um acréscimo da demanda metabólica deste tecido, sem que ocorra estresse oxidativo.

Nos rins a maior atividade da CAT ocorre nos meses de inverno, tanto em machos como em fêmeas. Também foi possível verificar alto nível desta enzima no músculo de fêmeas durante o inverno. O aumento da atividade das enzimas antioxidantes durante o hipometabolismo parece ser uma adaptação de animais resistentes a grandes flutuações no consumo de oxigênio, sendo esta resposta tecido dependente (Welker 2009). Tal padrão foi verificado em *T.catalensis*, principalmente para machos; e pode ser considerado importante no preparo destes organismos para o enfrentamento da demanda energética ocorrente nas estações subsequentes (primavera-verão) para sustentar a reprodução. A maior facilidade de coleta das fêmeas mesmo em baixas temperaturas permite sugerir que elas mantêm o forrageio nesta estação do ano como uma preparação para o próximo período reprodutivo. Este padrão de comportamento pode também influenciar no incremento da atividade da catalase muscular, pois a atividade física induz ao aumento de enzimas antioxidantes, entre elas, a catalase (Córdova e Navas 2000).

A enzima glutatona S-transferase tem função antioxidante secundária de remoção de produtos tóxicos oriundos da lipoperoxidação, estando envolvida na

metabolização de endo e xenobióticos (Hermes-Lima e Storey 1993). O tecido hepático de fêmeas apresenta alta atividade de GST ao longo do ano (verão, outono e inverno), excluindo o período reprodutivo (primavera) onde esta se apresenta diminuída. Padrão de resposta semelhante foi verificado em *Tupinambis merianae*, que apresentou uma diminuição da GST após o período de hipometabolismo (inverno) com a atividade desta enzima retornando aos valores normais após 40 dias do despertar (Welker 2009).

Os resultados de aumento da atividade da GST durante verão, outono e inverno principalmente em fêmeas, pode estar associado à recuperação da reprodução, ao preparo para um novo ciclo reprodutivo e também à dieta, respectivamente. Sendo *T. catalanensis* uma espécie primariamente insetívora que tem como estratégia o forrageio ativo, Arruda et al (2007) elucida que um dos táxons mais ocorrentes nos estômagos da espécie e com maior disponibilidade no ambiente são himenópteros formicídeos. Em *Tropidurus torquatus* foi constatado uma frequência de ocorrência de Formicidae de cerca de 64 e 57% e de 87 e 73% nas fêmeas e nos machos, na estação seca e chuvosa, respectivamente (Gomides et al. 2013). Estes organismos produzem ácido fórmico com finalidade de defesa (Hefetz e Blum 1978). A alta atividade da GST no fígado do verão ao inverno pode estar ligada com a metabolização desta substância; como é sugerido por Welker (2009) em sua tese desenvolvida com *Tupinambis merianae*, onde foi verificado um aumento da atividade da GST após o jejum e reintrodução do alimento. Experimentos futuros que analisem o conteúdo estomacal, bem como o grau de repleção gástrico ao longo do ano se fazem necessários para um melhor entendimento destas relações.

Os resultados encontrados para a glutathione S-transferase no tecido muscular caudal são semelhantes aos encontrados por Aguilera et al. (2012) em lagartos *Sceloporus* spp coletados em áreas protegidas, indicando que estes animais não parecem

estar expostos a qualquer fonte de poluição, diferentemente do que foi encontrado pelos mesmos autores para sáurios coletados em área industrial.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem uma alta eficiência do sistema antioxidante destes animais, mantendo a lipoperoxidação em baixos níveis para todos os tecidos estudados. O sistema de defesa antioxidante enzimático aqui estudado (SOD, CAT e GST) apresenta uma responsividade tecido-específica, sendo modulado possivelmente por fatores ambientais como temperatura, fotoperíodo e insolação. Tal perfil indica que estes animais conseguem manter a homeostase mesmo em períodos de alta demanda energética, como a reprodução. Andrade et al.(2010) salientam que o potencial reprodutivo dos animais é diretamente influenciado pelos danos causados pelo estresse oxidativo. O presente trabalho pode ser considerado importante na descrição e entendimento dos efeitos das flutuações sazonais no *status* oxidativo de lagartos de vida livre.

Agradecimentos

Agradecemos ao dono da Fazenda São Francisco, Sr. Vergíneo, localizada em Alegrete, Brasil, pelo suporte de infraestrutura em todas as campanhas para a coleta dos animais utilizados neste estudo. Este trabalho teve o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil, pela concessão de uma bolsa de mestrado.

Apêndices

Figura 1. Níveis de lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes no tecido hepático de *Tropidurus catalanensis* detectados ao longo do ano. As barras representam as médias \pm erro padrão, as barras pretas representam os machos e as brancas fêmeas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas

usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. Asterisco (*) indica diferença na curva de resposta de machos e fêmeas ao longo do ano

Figura 2. Níveis de lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes no tecido renal de *Tropidurus catalanensis* detectados ao longo do ano. As barras representam as médias \pm erro padrão, as barras pretas representam os machos e as brancas fêmeas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. Asterisco (*) indica diferença na curva de resposta de machos e fêmeas ao longo do ano

Figura 3. Níveis de lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes no tecido muscular caudal de *Tropidurus catalanensis* detectados ao longo do ano. As barras representam as médias \pm erro padrão, as barras pretas representam os machos e as brancas fêmeas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. Asterisco (*) indica diferença na curva de resposta de machos e fêmeas ao longo do ano

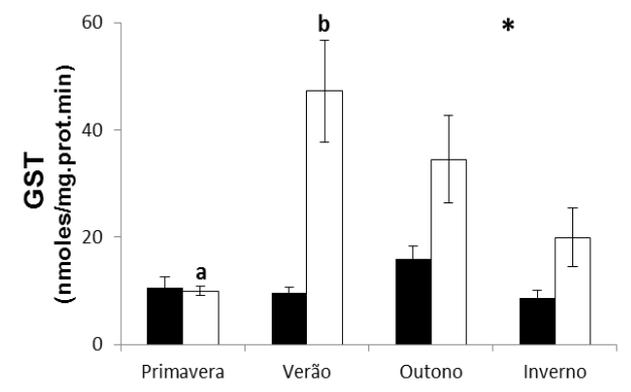
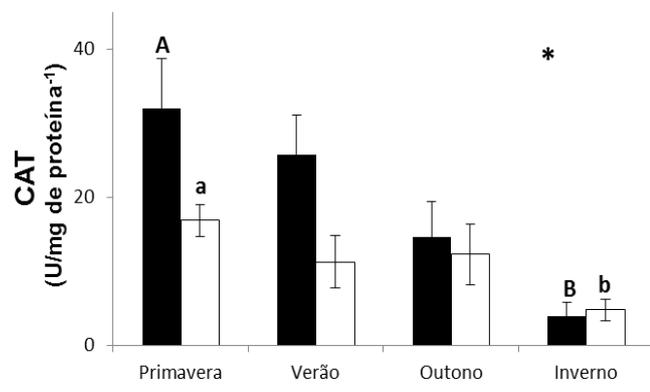
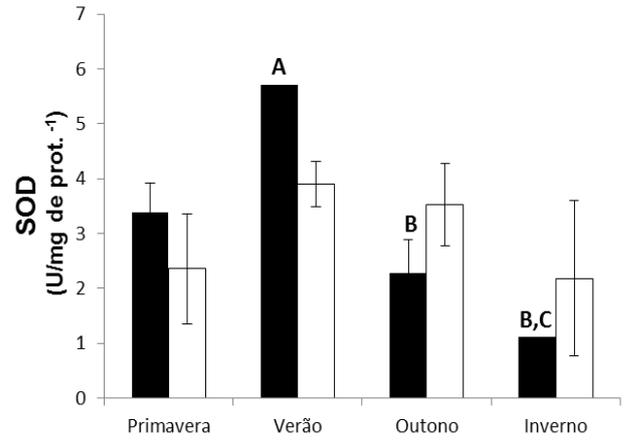
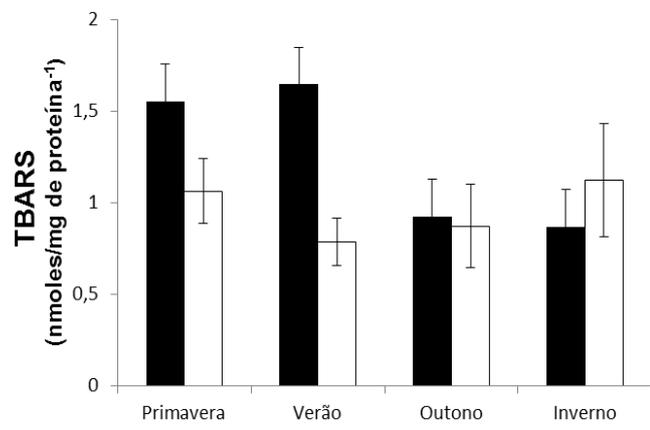


Figura 1

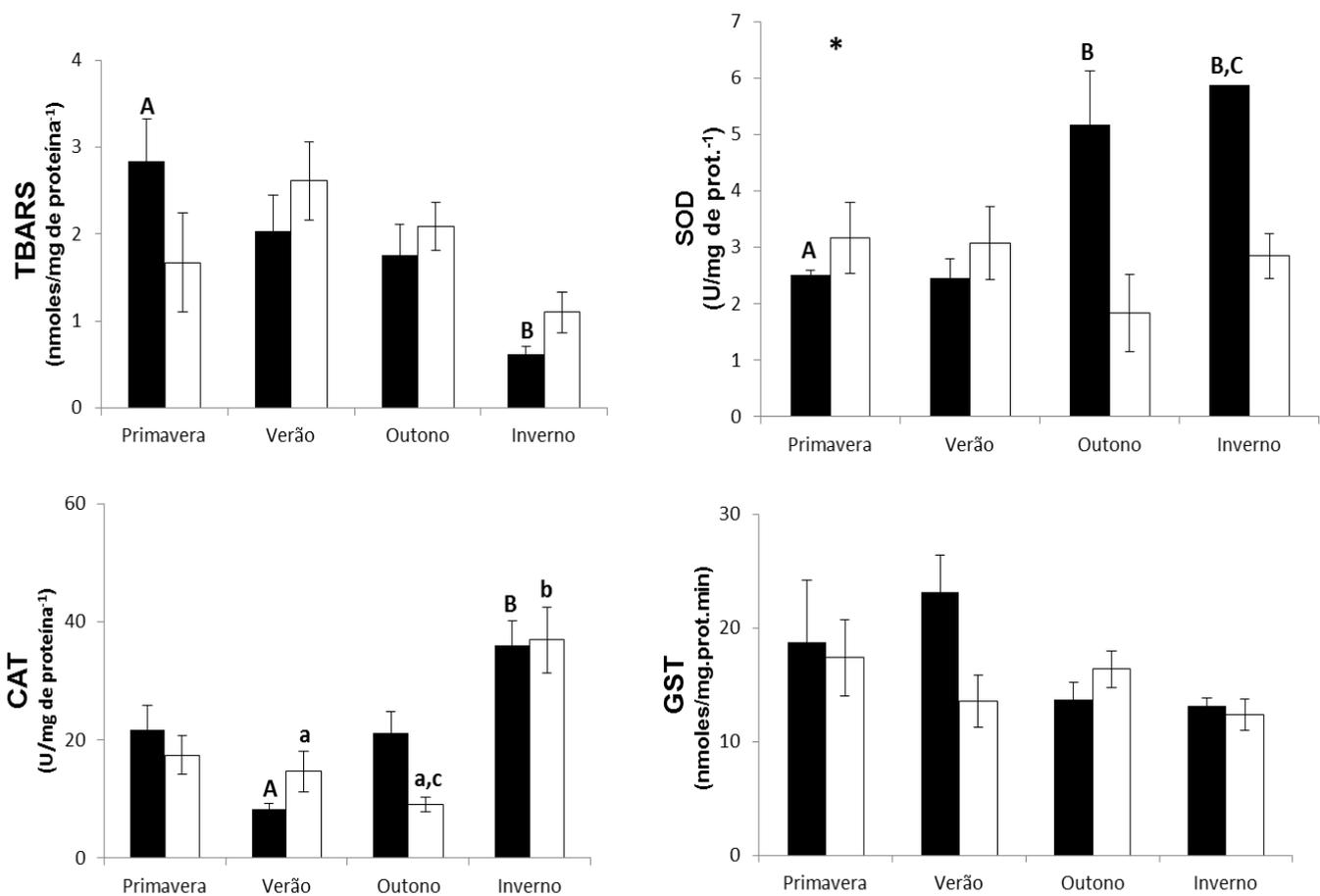


Figura 2

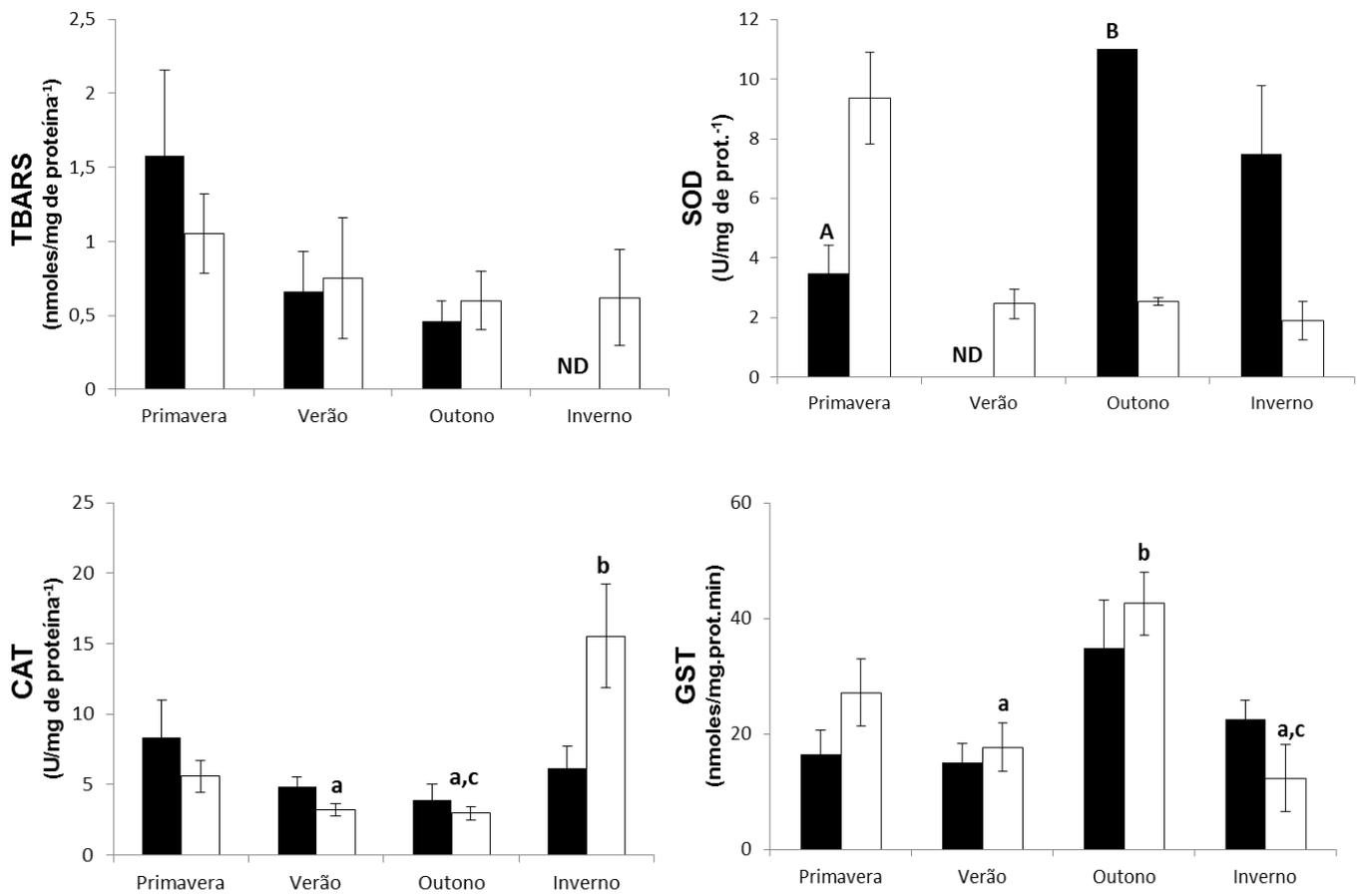


Figura 3

Tabela 1 Níveis de lipoperoxidação (TBARS) em diferentes órgãos de espécies de répteis: jacaré-do-pantanal (*Caiman yacare*), tartaruga-verde (*Chelonia mydas agassizii*) e lagartixa-do-mato (*Psaummodromus algirus*). Resultados estão representados por média \pm erro padrão

Espécie	Tecido	TBARS	Referência
<i>Caiman yacare</i>	Fígado	81.1 \pm 9.8 (nmol/g)	Furtado-Filho et al. (2007)
	Rins	55.0 \pm 5.1	
	Músculo	10.6 \pm 2.2	
<i>C. mydas agassizii</i>	Fígado	121.3 \pm 20.8 (nmol/g)	Valdivia et al. (2007)
	Rins	51.9 \pm 11.2	
	Músculo	63.7 \pm 7.4	
<i>Psammmodromus algirus</i>	Fígado	-	Reguera et al. (2014)
	Rins	-	
	Músculo	140.96 \pm 50.74 (nmol/g)	

Referências

Alabarse PVG, Salomon TB, Medeiros TM, Hackenhaar FS, Schüller AK, Ehrenbrink G, Benfato MS (2011) Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging. *Experimental Gerontology* 46; 773–780

Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieril AA (2010) Consequências da produção de espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Ver.Bras.Reprod.Anim.*, Belo Horizonte, v.34, n.2, pp. 79-85

Arruda DA, Arruda JLS, Aued AW, Cechin STZ (2007) A dieta de *Tropidurus torquatus* (*Squamata: Tropiduridae*) reflete a disponibilidade de presas do meio? Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu. Disponível em <http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/830.pdf>

Beaulieu M, Costantini D (2014) Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. *Conserv Physiol* 2: doi:10.1093/ conphys/cou014

Boveris A., Cadenas E (1982) In: *Superoxide Dismutase*, OBERLEY, L. W. (ed.), v. II, c. 2, p. 15

- Brook BW, Sodhi NS, Bradshaw CJA (2008) Synergies among extinction drivers under global change. *Trends Ecol. Evol.* 23: 453-460
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipids peroxidation. *Methods Enzymology* 52: 302-310
- Boyland E, Chasseaud LF (1969) The role of glutathione and glutathione S transferases in mercututric acid biosynthesis. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 32: 173-219
- Campbell KR, Campbell TS (2002) A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: A review of available data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 21, No. 5, pp. 894–89
- Carey C (2005) How physiological methods and concepts can be useful in conservation biology. *Integr. Comp. Biol.* 45: 4-11
- Carvalho ALG, de Britto MR, Fernandes DS (2013) Biogeography of the Lizard Genus *Tropidurus* Wied-Neuwied, 1825 (Squamata: Tropiduridae): Distribution, Endemism, and Area Relationships in South America. *PLoS ONE* 8(3):e59736
- Córdova A, Navas FJ (2000) Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. *Rev Bras Med Esporte* Vol. 6, Nº 5
- Costa MJ, Monteiro DA, Oliveira-Neto AL, Rantin FT, Kalinin AL (2008) Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology*, 17: 153-163
- Costantini D, Dell’Omo G, De Filippis SP, Cruz M, Snell HL, Snell HM, Tapia W, Brambilla, Gentile G (2009) Temporal and Spatial Covariation of Gender and Oxidative Stress in the Galápagos Land Iguana *Conolophus subcristatu*. *Physiological and Biochemical Zoology*, Vol. 82, No. 5. Pp. 430-437
- Ferreira ALA, Matsubara LS (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*; 43(1): 61-8
- de Souza SCR, de Carvalho JE, Abe AS, Bicudo, JEP, Bianconcini MS (2004) Seasonal metabolic depression, substrate utilisation and changes in scaling patterns during the

first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis merianae*). *Journal of Experimental Biology*, 207(2), 307-318

Dowling DK, Simmons LW (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc R Soc Lond B*, v.276, pp. 1737-1745.

Furtado-Filho OV, Polcheira C, Machado DP, Mourão G, Hermes-Lima M (2007) Selected oxidative stress markers in a South American crocodylian species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146 pp. 241–254

Halliwell B, Gutteridge JMC (2008) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press

Gomides SC, Ribeiro LB, Peters VM, Sousa BM (2013) Feeding and reproduction ecology of the lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) in a rock outcrop area in southeastern Brazil. *Revista Chilena de Historia Natural* 86: 137-151

Hefetz A, Blum MS (1978) Biosynthesis of formic acid by the poison glands of formicine ants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 543: 484-496

Hermes-Lima M, Storey KB. *In vitro* oxidative inactivation of glutathione Stransferase from a freeze tolerant reptile. *Molecular and Cellular Biochemistry* 124:149-158

Ji H, Zheng W, Menini S, Pesce C, Kim MS, Wu X, Mukrone SE, Sandberg K (2007) Female protection in progressive renal disease is associated with estradiol attenuation of superoxide production. *Gender Med* 4:56–71

Kunz TS, Borges-Martins M (2013) A new microendemic species of *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae) from southern Brazil and revalidation of *Tropidurus catalanensis* Gudynas & Skuk, 1983. *Zootaxa* 3681(4): 413–439 (doi: 10.11646/zootaxa.3681.4.6)

McNab BK (2006) The energetics of reproduction in endotherms and its implication for their conservation. *Integrative and Comparative Biology* 46: 1159-1168

Milsom WK, Andrade DV, Brito SP, Toledo LF, Wang T, Abe AS (2008) Seasonal changes in daily metabolic patterns of tegu lizards (*Tupinambis merianae*) placed in the cold (17 C) and dark. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(2), 165-175

- Olsson M, Healey M, Perrin C, Wilson M, Tobler M (2012) Sex-specific SOD levels and DNA damage in painted dragon lizards (*Ctenophorus pictus*). *Oecologia* 170:917–924
- Righetti BPH, Simões-Lopes PC, Uhart MM, Wilhelm Filho, D (2014) Relating diving behavior and antioxidant status: Insights from oxidative stress biomarkers in the blood of two distinct divers, *Mirounga leonine* and *Arctocephalus australis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 173:1–6
- Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91:31-38
- Rismiller PD, Heldmaier G (1982) The effect of photoperiod on temperature selection in the European green lizard, *Lacerta-viridis*. *Oecologia*, v.53, p. 222-226
- Tokarz RR, McMann S, Seitz L, John-Alder H (1998) Plasma Corticosterone and Testosterone Levels during the Annual Reproductive Cycle of Male Brown Anoles (*Anolis sagrei*). *Physiological Zoology* 71(2):139-146
- Valdivia PA, Zenteno-Savín T, Gardner SC, Aguirre A (2007) Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146 pp. 111–117
- Voituron Y, Servais S, Romestaing C, Douki T, Barre H (2006) Oxidative DNA damage and antioxidant defenses in the European common lizard (*Lacerta vivipara*) in supercooled and frozen states. *Cryobiology* 52:74–82
- Welker AF (2009) Efeito da disponibilidade de oxigênio e da privação de alimentar sobre o metabolismo de radicais livres. (Tese de Doutorado) (Universidade de São Paulo): São Paulo
- Wiederhecker HC, Pinto ACS, Colli GR (2002) Reproductive ecology of *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) in the highly seasonal Cerrado biome of central Brazil. *Journal of Herpetology* 36:82-91
- Zar JH (1996) *Biostatistical Analysis*. 3. Ed. Prentice-Hall, Londres

CONCLUSÕES GERAIS

Com o presente trabalho, conclui-se que a reprodução é o evento biológico que tem o maior custo metabólico para a espécie em estudo. Foi visto um claro padrão de flutuação sazonal nos níveis de proteínas totais plasmáticas, glicogênio, lipídeos totais e triglicerídeos do fígado de machos e fêmeas; e nos níveis de glicose, lipídeos totais e proteínas totais hepáticas de fêmeas. É possível sugerir que o período reprodutivo seja uma época de maior susceptibilidade para a espécie, principalmente em fêmeas, por estas alocarem grande parte de suas reservas energéticas para garantir o sucesso reprodutivo.

Foi observado também que o sistema antioxidante destes animais é altamente eficiente, e que apresenta uma resposta tecido-específica, sendo modulada principalmente por fatores ambientais, como temperatura, fotoperíodo e insolação. Mesmo períodos de grande demanda energética como a reprodução não foi capaz de perturbar a homeostase destes animais, em termos oxidativos.

A elucidação dos efeitos da sazonalidade no metabolismo intermediário e no *status* oxidativo de uma população de *Tropidurus catalanensis* em seu ambiente natural pode auxiliar no entendimento do impacto de ações antrópicas em seu ecossistema, e dar subsídios para a conservação desta espécie no Bioma Pampa.

REFERÊNCIAS

- Abdul-Raheem K, Okasha S, El-Deib S, et al. (1989) Hibernation in reptiles 3. Carbohydrate metabolism in *Eryx colubrinus* and *Eumeces schneideri*. J. Therm. Biol. 14:133–137
- Alabarse PVG, Salomon TB, Medeiros TM, Hackenhaar FS, Schüller AK, Ehrenbrink G, Benfato MS (2011) Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging. Experimental Gerontology 46; 773–780
- Alford RA, Richards SJ (1999) Global amphibian declines: A problem in applied ecology. Annu. Rev. Ecol. Syst. 30:133–65
- Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieril AA (2010) Consequências da produção de espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. Ver.Bras.Reprod.Anim., Belo Horizonte, v.34, n.2, pp. 79-85
- Angilletta Jr MJ, Sears MW (2000) The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. Funct. Ecol. 14:39-45
- Arruda JLS., Arruda D, Cechin SZ (2008) Reptilia, Squamata, Tropiduridae, *Tropidurus torquatus*: Distribution extension. Check List, v.4, n.3, p.269-271.
- Arruda DA, Arruda JLS, Aued AW e Cechin STZ (2007) A dieta de *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) reflete a disponibilidade de presas do meio? Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu. Disponível em <http://www.seb-ecologia.org.br/viiiiceb/pdf/830.pdf>
- Arruda JLS (2009) Ecologia de *Tropidurus torquatus* (Squamata:Tropiduridae) no bioma Pampa, extremo sul do Brasil. 77 p. (Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal) (Universidade Federal de Santa Maria): Santa Maria, RS
- Beaulieu M, Costantini D (2014) Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. *Conserv Physiol* 2: doi:10.1093/ conphys/cou014
- Bennett, AF, Dawson, WR (1976) Metabolism. In: Gans C, Dawson, WR (Eds.), The Biology of Reptilia. Academic Press, New York, pp. 127-223

- Boldrini I (1997) Campos do Rio Grande do Sul: Caracterização Fisionômica e Problemática Ocupacional. Boletim do Instituto de Biociências. 56:1-39
- Brook BW, Sodhi NS, Bradshaw CJA (2008) Synergies among extinction drivers under global change. Trends Ecol. Evol. 23: 453-460
- Bourscheit A (2005) O rico e desconhecido Pampa. In: Revista do IBAMA. Ano I nº 0. Brasília: Edições IBAMA
- Boveris A., Cadenas E (1982) In: *Superoxide Dismutase*, OBERLEY, L. W. (ed.), v. II, c. 2, p. 15
- Boyland E, Chasseaud LF (1969) The role of glutathione and glutathione S transferases in mercututric acid biosynthesis. Advances in enzymology and related areas of molecular biology 32: 173-219
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipids peroxidation. Methods Enzymology 52: 302-310
- Callard IP, Kleis SM (1987) Reproduction in Reptiles. In: Kime DE, Chester-Jones I, Ingleton PM, Phillips JG. Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology. Springer, US. Pp. 187-205
- Campbell KR e Campbell TS (2002) A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: A review of available data. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 21, No. 5, pp. 894–89
- Carvalho ALG, de Britto MR, Fernandes DS (2013) Biogeography of the Lizard Genus *Tropidurus* Wied-Neuwied, 1825 (Squamata: Tropiduridae): Distribution, Endemism, and Area Relationships in South America. PLoS ONE 8(3):e59736
- Carey C (2005) How physiological methods and concepts can be useful in conservation biology. Integr. Comp. Biol. 45: 4-11
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR (2006) Bioquímica Ilustrada. Artmed.
- Cherel Y, Robin JP, Heitz A, Calgari C, Le Maho Y (1992) Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. J. Comp. Physiol. Part B 162:305-313

Clutton-Brock TH (1991) The evolution of parental care. Princeton University Press, Princeton, New Jersey

Cooke SJ, Sack L, Franklin CE, Farrell AP, Beardall J, Wikelski M, Chown SL (2013) What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conserv Physiol* 1: 1–23

Córdova A, Navas FJ (2000) Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. *Rev Bras Med Esporte* Vol. 6, Nº 5

Crocker DE, Webb PM, Costa DP, Le Boeuf BJ (1998) Protein catabolism and renal function in lactating northern elephant seals. *Physiol. Zool.* 71:485-491

Costa MJ, Monteiro DA, Oliveira-Neto AL, Rantin FT e Kalinin AL (2008) Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology*, 17: 153-163

Costantini D, Dell’Omo G, De Filippis SP, Cruz M, Snell HL, Snell HM, Tapia W, Brambilla e Gentile G (2009) Temporal and Spatial Covariation of Gender and Oxidative Stress in the Galápagos Land Iguana *Conolophus subcristatu*. *Physiological and Biochemical Zoology*, Vol. 82, No. 5. Pp. 430-437

de Souza SCR, de Carvalho JE, Abe AS, Bicudo, JEP e Bianconcini MS (2004) Seasonal metabolic depression, substrate utilisation and changes in scaling patterns during the first year cycle of tegu lizards (*Tupinambis merianae*). *Journal of Experimental Biology*, 207(2), 307-318

Divers SJ, Cooper JE (2000) Reptile hepatic lipidosis. *Semin Avian Exotic Pet Med.* 9: 153-164

Dornelles MF, Oliveira GT (2014) Effect of Atrazine, Glyphosate and Quinclorac on Biochemical Parameters, Lipid Peroxidation and Survival in Bullfrog Tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66:415-429

Dornelles MF (2013) Efeito dos herbicidas atrazina, glifosato e quinclorac sobre a composição bioquímica, a peroxidação lipídica e a sobrevivência de girinos de

Lithobates catesbeianus (Shaw, 1802). (Dissertação de Mestrado) (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul): Porto Alegre.

Dowling DK, Simmons LW (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc R Soc Lond B*, v.276, pp. 1737-1745

Ferreira ALA, Matsubara LS (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*; 43(1): 61-8

Frost DR (1992) Phylogenetic analysis and taxonomy of the *Tropidurus* group of lizards (Iguania: Tropiduridae). *Amer. Mus. Novit.* 3033:1-68

Frost DR, Rodrigues MT, Grant T, Titus TA (2001) Phylogenetics of the lizard Genus *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae: Tropidurinae): Direct Optimization, Descriptive efficiency, and Sensitivity Analysis of Congruence Between Molecular data and Morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21(3):352-371

Folch J, Less M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226:497-509

Frings C, Dunn R (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology* 53: 89-91

Furtado-Filho OV, Polcheira C, Machado DP, Mourão G, Hermes-Lima M (2007) Selected oxidative stress markers in a South American crocodilian species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146 pp. 241–254

Gavaud J (1986) Vitellogenesis in the lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. II. Vitellogenin synthesis during the reproductive cycle and its control by ovarian steroids. *General and Comparative Endocrinology* 63:11–23

Gist DH (1972) The effects of starvation and refeeding on carbohydrate and lipids reserves of *Anolis carolinensis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 43:771-780

Gillet MPT, Cruz MEM (1981) Seasonal variation in plasma and hepatic lipids in relation to nutritional status and vitellogenesis in male and female lizards, *Ameiva ameiva* (Teiidae). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 70B. pp. 313-315

Gomides SC, Ribeiro LB, Peters VM, Sousa BM (2013) Feeding and reproduction ecology of the lizard *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) in a rock outcrop area in southeastern Brazil. *Revista Chilena de Historia Natural* 86: 137-151

Haddad LS (2007) O papel dos lipídios na reorganização metabólica associada à dormência sazonal no lagarto teiú *Tupinambis merianae* (Sauria, Teiidae). Tese de doutorado USP

Halliwell B, Gutteridge JMC (2008) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press

Harper (2002) *Bioquímica*. Editora Atheneu. 9ª edição. São Paulo.

Harshman LG, Zera A (2006) The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol. Evol.* 22:80–86

Hefetz A, Blum MS (1978) Biosynthesis of formic acid by the poison glands of formicine ants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 543: 484-496

Hermes-Lima M e Storey KB. *In vitro* oxidative inactivation of glutathione Stransferase from a freeze tolerant reptile. *Molecular and Cellular Biochemistry* 124:149-158

Hirshfield MF, Tinkle DW (1975) Natural selection and the evolution of reproductive effort. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72:2227-2231

Hofmann GE, Todgham AE (2010) Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annu. Rev. Physiol.* 72:127-145

Huey, R (1982) Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. In: Gans C, Pough FH (Eds.), *The Biology of Reptilia*. Academic Press, New York, pp. 25–91

Jenkins M (2003) Prospects for biodiversity. *Science* 302:1175-1177

Ji H, Zheng W, Menini S, Pesce C, Kim MS, Wu X, Mukrone SE, Sandberg K (2007) Female protection in progressive renal disease is associated with estradiol attenuation of superoxide production. *Gender Med* 4:56–71

Kunz TS, Borges-Martins M (2013) A new microendemic species of *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae) from southern Brazil and revalidation of *Tropidurus catalanensis* Gudynas & Skuk, 1983. *Zootaxa* 3681(4): 413–439 (doi: 10.11646/zootaxa.3681.4.6)

Lacy EL, Sheridan MA, Moore MC (2002) Sex differences in lipid metabolism during reproduction in free-living tree lizards (*Urosaurus ornatus*). *General and Comparative Endocrinology* 128:180-192

Lema T (2002) Os répteis do Rio Grande do Sul: atuais e fósseis – biogeografia – ofidismo. Porto Alegre, EDIPUCRS

Linder G, Krest SK, Sparling DW (2003) Amphibian Declines: An integrated analysis of multiple stressor effects. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Boca Raton, Florida

Lourdais O, Brischoux F, DeNardo DF, Shine (2004) Protein catabolism in pregnant snakes (*Epicrates cenchria maurus* Boidae) compromises musculature and performance after reproduction. *Journal of Comparative Physiology Part B* 174:383–391

Lourdais O, Hoffman T, DeNardo DF (2007) Maternal brooding in the Children's Python (*Antaresia childreni*) promotes egg water balance. *Journal of Comparative Physiology Part B* 177:569-577

Lowell BB, Ruderman NB, Goodman, NM (1986) Regulation of myofibrillar protein degradation in rat skeletal muscle during brief and prolonged starvation. *Metabolism* 35:1121-1127

Maixner JM, Ramsey EC, Arp LH (1987) Effects of Feeding on Serum Uric Acid in Captive Reptiles. *The Journal of Zoo Animal Medicin* 18:62-65

McEwen BS, Wingfield JC (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* 43(1):2-15

- McEwen BS, Wingfield JC (2010) What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Horm. Behav.* 57:105-111
- McNab BK (2006) The energetics of reproduction in endotherms and its implication for their conservation. *Integrative and Comparative Biology* 46: 1159-1168
- Milsom WK, Andrade DV, Brito SP, Toledo LF, Wang T e Abe AS (2008) Seasonal changes in daily metabolic patterns of tegu lizards (*Tupinambis merianae*) placed in the cold (17 C) and dark. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(2), 165-175
- Moore MC (1986) Elevated testosterone levels during non-breeding season territoriality in a fall-breeding lizard, *Sclerophorus jarrovi*. *J. Comp. Physiol.* 158:159-63
- Norris DO (2006) *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press, New York
- Olesen JM, Valido A (2003) Lizards as pollinators and seed dispersers: an island phenomenon. *Trends in Ecology & Evolution* 18:177-181
- Olsson M, Healey M, Perrin C, Wilson M, Tobler M (2012) Sex-specific SOD levels and DNA damage in painted dragon lizards (*Ctenophorus pictus*). *Oecologia* 170:917–924
- Peterson AT, Phillips OL, Williams SE (2004) Extinction risk from climate change. *Nature* 427:145-148
- Pilkis SJ, Granner DK (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* 54:885-909
- Pinto ACS, Wiederhecker HC e Colli G (2005) Sexual dimorphism in the Neotropical lizard, *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae). *Amphibia-Reptilia*, 26(2005):127-137
- Raheem KA, Okasha A, El-Deib, S, et al. (1989) Hibernation in reptiles 3. Carbohydrate metabolism in *Eryx colubrinus* and *Eumeces schneideri* *J Therm Biol*, 14 pp. 133–137
- Righetti BPH, Simões-Lopes PC, Uhart MM e Wilhelm Filho, D (2014) Relating diving behavior and antioxidant status: Insights from oxidative stress biomarkers in the blood

of two distinct divers, *Mirounga leonine* and *Arctocephalus australis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 173:1–6

Rismiller PD, Heldmaier G (1982) The effect of photoperiod on temperature selection in the European green lizard, *Lacerta-viridis*. *Oecologia*, v.53, p. 222-226

Rodrigues MT (1987) Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo *Torquatus* ao sul do rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). *Arquivos de Zoologia* 31(3):105-230

Romero LM (2004) Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.* 19:249-255

Romero LM, Wikelski M. (2001) Corticosterone levels predict survival probabilities of Galapagos marine iguanas during El Nino events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7366–7370

Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91:31-38

Somero GN (2004) Temperature adaptation of proteins: searching for basic “strategies”. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 139:321-333

Southwood AL, Reina RD, Jones VS, Speakman JR, Jones DR (2006) Seasonal metabolism of juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) at Heron Island, Australia. *Can. J. Zool.* 84:125-135

Southwood AL, Williard LAH (2011) Seasonal changes in thermal environment and metabolic enzyme activity in the diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 158:477-484

Storey KB (2002) Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 133:733-754

Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Baumont LJ, Collingham YC, Erasmus BFN, Ferreira de Siequeira M, Grainger A, Hannah L, Hughes L, Huntley B, van Jaarsveld AS, Midfley GF, Miles L, Ortega-Huera MA, Peterson AT, Phillips OL, Williams SE (2004) Extinction risk from climate change. *Nature* 427:145-148

- Tokarz RR, McMann S, Seitz L, John-Alder H (1998) Plasma Corticosterone and Testosterone Levels during the Annual Reproductive Cycle of Male Brown Anoles (*Anolis sagrei*). *Physiological Zoology* 71(2):139-146
- Ultsch G (1989) Ecology and physiology of hibernation and overwintering among freshwater fishes, turtles, and snakes. *Biol. Revs.* 64, 435-516
- Ultsch G (2006) The ecology of overwintering among turtles: where turtles overwinter and its consequences. *Biol. Rev.* 81:339–367
- Valdivia PA, Zenteno-Savín T, Gardner SC, Aguirre A (2007) Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific green turtles (*Chelonia mydas agassizii*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146 pp. 111–117
- Van Dyke JU, Beaupre SJ (2011) Bioenergetic components of reproductive effort of viviparous snakes: Costs of vitellogenesis exceed costs of pregnancy. *Comp. Bio. Phys., Part A* 160:504-513
- Van Handel E (1965) Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Analytical Biochemistry* 11:256-265
- Vieira RC (2009) Ritmo de Atividade e Dinâmica Populacional de *Tropidurus torquatus* (Wied,1820) (Sauria, Tropiduridae) no Rio Grande do Sul, Brasil. (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) (Universidade Federal do Rio Grande do Sul): Porto Alegre
- Vieira RC, Felappi JF, Caruccio R e Verrastro L (2011) Population Dynamics of *Tropidurus torquatus* (Wied, 1820) (Squamata, Tropiduridae) in Southern Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 6(3), 215-222
- Voituron Y, Servais S, Romestaing C, Douki C, Barre H (2006) Oxidative DNA damage and antioxidant defenses in the European common lizard (*Lacerta vivipara*) in supercooled and frozen states. *Cryobiology* 52:74-82
- Waldock MJ (1979) The fatty acid composition of the triacylglycerols of oysters, mussels and barnacles. (Ph.D. thesis) University College of North Wales

Welker AF (2009) Efeito da disponibilidade de oxigênio e da privação de alimentar sobre o metabolismo de radicais livres. (Tese de Doutorado) (Universidade de São Paulo): São Paulo

Wiederhecker HC, Pinto ACS, Colli GR (2002) Reproductive ecology of *Tropidurus torquatus* (Squamata: Tropiduridae) in the highly seasonal Cerrado biome of central Brazil. *Journal of Herpetology* 36:82-91

Wikelski M, Cooke SJ (2006) Conservation physiology. *Trends Ecol. Evol.* 21:38-46

Wikelski M, et al. (2001) Marine iguanas oiled in Galápagos. *Science* 292, 437–438

Williamson DH (1981) Utilization of ketone bodies by mammalian tissues. *Biochem Soc Trans.* 9(4):346-7

Williard AS e Harden LA (2011) Seasonal changes in thermal environment and metabolic enzyme activity in the diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(4), 477-484

Wingfield JC (2013) The comparative biology of environmental stress: behavioural endocrinology and variation in ability to cope with novel, changing environments. *Anim Behav* 85: 1127–1133

Zar JH (1996) *Biostatistical Analysis*. 3. Ed. Prentice-Hall, Londres

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY B

Instructions for Authors

ISSN: 1432-136X

DESCRIPTION

The Journal of Comparative Physiology B publishes peer-reviewed original articles and reviews on the comparative physiology of invertebrate and vertebrate animals. Special emphasis is placed on integrative studies that elucidate mechanisms at the whole-animal, organ, tissue, cellular and/or molecular levels. Review papers report on the current state of knowledge in an area of comparative physiology, and directions in which future research is needed.

Aspects of particular interest include: molecular and endocrine control of metabolism; membrane transport and nutrient absorption; respiration and gas exchange; circulation and body fluids; energy and temperature relations; muscle and exercise physiology; energetics and endocrinology of reproduction; evolutionary aspects of physiology, and more.

Related subjects: Animal Sciences - Biochemistry & Biophysics - Biomedical Sciences - Human Physiology

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication

times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Language

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to ask a native speaker to help you or arrange for your manuscript to be checked by a professional language editor prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

Title Page

- The title page should include:
- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific Style

Units, symbols, abbreviations

SI units and the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) are recommended; except for thermodynamics, the Celsius temperature scale should be used. Abbreviations must be kept to a minimum; ad hoc abbreviations should be avoided. Except for standard physiological and biochemical abbreviations (R.Q., e.p.s.p., STDP, ATP, NAD, EDTA, etc.), all abbreviations must be explained in a footnote on the title page.

Genus and species names should be in italics.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished

works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one

another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,
- "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that:

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1