



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Departamento de Apoio à Pesquisa
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica



**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO EM TARTARUGAS
DE ÁGUA DOCE DO GÊNERO *Podocnemis* (TESTUDINES:
PODOCNEMIDIDAE)**

Bolsista: Eliza Maria Carvalho Coutinho Sena, CNPq

**Manaus
2014**



Universidade Federal do Amazonas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Departamento de Apoio à Pesquisa
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica



RELATÓRIO FINAL
PIB-B/0083/2013

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO EM TARTARUGAS
DE ÁGUA DOCE DO GÊNERO *Podocnemis* (TESTUDINES:
PODOCNEMIDIDAE)**

Bolsista: Eliza Maria Carvalho Coutinho Sena, CNPq
Colaboradores: Maria Isabel da Silva & Yago Vinícius Serra dos Santos

Orientador: **Professor Doutor Wallice Luiz Paxiúba Duncan**
Co-orientador: Professor Paulo César Machado Andrade (FCA,
Coordenador do Projeto Pé-de-Pincha)

**Manaus
2014**

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Laboratório de Morfologia Funcional e ao Projeto Pé-de-Pincha. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi executado no Laboratório de Morfologia Funcional (LMF/UFAM) e se caracteriza como sub projeto dos projetos financiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Programas Primeiros Projetos e Universal Amazonas) e PETROBRAS AMBIENTAL.

Resumo

O perfil metabólico de vários tecidos foi analisado em quelônios aquáticos recém-eclodidos: *Podocnemis expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata*. O potencial metabólico dessas espécies foi avaliado por meio das atividades absolutas das enzimas do metabolismo energético: com ênfase no metabolismo dos carboidratos, lipídios, aminoácidos e corpos cetônicos. Todas as espécies estudadas apresentaram alto potencial glicolítico em todos os tecidos analisados. Baseado nos baixos níveis da enzima hexoquinase, as reservas de glicogênio podem ser importantes substratos energéticos para estas espécies. A alta atividade da lactato desidrogenase no fígado pode indicar que este órgão desempenha um importante papel no metabolismo dos carboidratos, possivelmente relacionado com a resistência ao mergulho prolongado. O perfil metabólico de *P. sextuberculata* parece organizado para utilizar preferencialmente lipídios, aminoácidos e corpos cetônicos. Os dados das atividades máximas das enzimas 3-hidroxi-acil-Co A desidrogenase, malato desidrogenase e succinil-Co A ceto-transferase, especialmente no músculo branco e no fígado dessa espécie corroboram esta hipótese. Por outro lado, os carboidratos e os lipídios parecem ser os principais substratos metabólicos de *P. expansa* e *P. unifilis*, muito embora, os corpos cetônicos e aminoácidos sejam importantes metabólitos para sustentar o potencial oxidativo nessas espécies. Os dados enzimáticos parecem estar correlacionados com o hábito alimentar e o estilo de vida dos quelônios de água doce da Amazônia. O perfil metabólico sugere que os recém-eclodidos de *P. unifilis* e *P. expansa* são predominantemente herbívoros, enquanto que *P. sextuberculata* pode depender de uma dieta mista de material vegetal e proteína animal.

Palavras-chave: Tartarugas de água doce, Quelônios, Metabolismo, Bioquímica adaptativa

Abstract

The metabolic profiles of selected tissues were analyzed in hatchlings of the Amazonian freshwater turtles *Podocnemis expansa*, *P. unifilis* and *P. sextuberculata*. Metabolic design in these species was judged based on the key enzymes of energy metabolism, with special emphasis on carbohydrate, lipid, amino acid and ketone body metabolism. All species showed a high glycolytic potential in all sampled tissues. Based on low levels of hexokinase, glycogen may be an important fuel for these species. The high lactate dehydrogenase activity in the liver may play a significant role in carbohydrate catabolism, possibly during diving. Oxidative metabolism in *P. sextuberculata* appears to be designed for the use of lipids, amino acids and ketone bodies. The maximal activities of 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, malate dehydrogenase, glutamine dehydrogenase, alanine aminotransferase and succinyl-CoA keto transferase display high aerobic potential, especially in muscle and liver tissues of this species. Although amino acids and ketone bodies may be important fuels for the oxidative metabolism, carbohydrate and lipid are the major fuels used by *P. expansa* and *P. unifilis*. Our results are consistent with food habits and the life-style of Amazonian freshwater turtles. The metabolic design, based on enzyme activities, suggests that hatchlings of *P. unifilis* and *P. expansa* are predominately herbivorous, whereas *P. sextuberculata* rely on a mixed diet of animal matter and vegetation.

Keywords: Freshwater turtles, Chelonian, Metabolism, Adaptive biochemistry

Sumário

Introdução	1
Objetivos	3
Material e Métodos	3
Área de coleta	3
Processamento dos tecidos e ensaios enzimáticos	4
Razão baixa/alta da LDH e MDH/LDH	5
Análises estatísticas	6
Resultados	6
Discussão	12
Conclusão	15
Referências Bibliográficas	15

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Níveis das enzimas de lactato desidrogenase (LDH) no fígado e no cérebro em filhotes de três tartarugas de água doce da Amazônia. 7
- Tabela 2.** As atividades enzimáticas da malato desidrogenase (MDH), 3-hidroxiacil Coenzima-A desidrogenase (HOAD) e isocitrato desidrogenase (IDH) no fígado e no cérebro dos filhotes de tartarugas de água doce Podocnemididae. 9
- Tabela 3.** Potencial glicolítico com base na relação de baixa/alta da LDH e razão MDH/LDH no fígado e cérebro dos filhotes em três tartarugas de água doce. 11
- Tabela 4.** As atividades das enzimas (U/g) relacionadas ao metabolismo dos aminoácidos e corpos cetônicos em quatro tecidos de quelônios amazônicos. 11

Lista de Figuras

- Figura 1.** As atividades enzimáticas da lactato desidrogenase (LDH) e hexoquinase (HK) no músculo esquelético (barras sólidas) e no músculo cardíaco (barras abertas) de filhotes de três tartarugas de água doce da Amazônia. 6
- Figura 2.** Estimativa das atividades das enzimas-chave em várias vias metabólicas relacionadas ao metabolismo oxidativo nos músculos esqueléticos (barras sólidas) e cardíacos (barras abertas) em três quelônios amazônicos. 8
- Figura 3.** Potencial glicolítico com base em relação Baixo / Alto (LDH) e relação de MDH / LDH de esqueléticos (barras sólidas) e coração (barras abertas) músculos das três tartarugas de água doce. 10
- Figura 4.** Representação esquemática de uma tartaruga alimentando-se de macrófitas na floresta inundada. 14

Introdução

Tem sido proposto que as tartarugas de água doce *Podocnemis expansa* e *P. unifilis* são principalmente herbívoros (Alho et al., 1979; Best, 1984). Fachin-Teran et al. (1995) estudando as populações naturais de quelônios de água doce do Rio Guaporé (sudoeste da Amazônia) concluíram que adultos e juvenis de *P. expansa* e *P. unifilis* preferencialmente alimenta-se de material vegetal. Em contraste, poucos estudos têm sido realizados envolvendo os hábitos alimentares de *P. sextuberculata*. Além disso, algumas informações são conflitantes. Mittermeier & Wilson (1974) sugerem que esta espécie é herbívora, enquanto Fachin-Teran et al. (1995) propõe uma dieta carnívora.

Todas as três espécies de tartarugas são amplamente distribuídas na bacia amazônica. *P. sextuberculata* e *P. unifilis* são conhecidos localmente como "iaçá ou pitiú" e "tracajá", respectivamente. *P. sextuberculata* é uma espécie de pequeno porte. Em geral, esta espécie põe cerca de 18 ovos. No entanto, *P. unifilis* é maior que a iaçá. Durante a época de reprodução, as fêmeas de tracajá escolhem seu ninho na margem do rio (barrancos) e coloca cerca de 30 ovos (Soini, 1997). *P. expansa* (tartaruga-da-Amazônia), é a maior tartaruga de água doce do mundo. As fêmeas podem pesar mais de 60 kg, e podem colocar até 150 ovos durante a estação reprodutiva (Soini, 1997). Os recém-nascidos emergem da areia durante a baixos níveis de água (ou seja, durante a estação seca, entre setembro e dezembro). Após a emergência dos ninhos, as tartarugas pesam cerca de 20 g e reter gema residual internalizado que pode representar de 2-8% do peso corporal do animal (Duncan et al., 2012).

O vitelo residual contém os nutrientes necessários para sustentar o filhote durante várias semanas (Rowe et al., 1995; Thompson et al., 1999; Lance & Morafka, 2001). Os lipídeos são os principais componentes da gema residual, representando 30-50% da massa seca (Duncan et al., 2012). Os carboidratos representam menos de 1% do nutriente na gema total de tartarugas pleurodiras (Booth, 2003). Em contraste,

os triacilgliceróis compreendem a maioria dos lipídeos totais na gema residual (Rowe et al., 1995; Jones et al., 1998; Thompson et al., 1999). Portanto, lipídeos armazenados são utilizados principalmente para manter o consumo de energia durante as fases iniciais de desenvolvimento. De acordo com Nagle et al. (1998), as reservas de lipídeos representam uma proporção substancial de investimento parental kinosternídeos e os lipídios armazenados podem sustentar taxas metabólicas padrão de 0,06 ml O₂ g⁻¹ h⁻¹ por mais de 180 dias. No entanto, os lipídeos podem não ser único combustível utilizado para atender às necessidades energéticas de um animal. Thompson et al. (1999) sugerem que o catabolismo protéico pode sustentar uma proporção substancial do custo energético durante o desenvolvimento de uma tartaruga onívora australiana, *Emydura macquarii*. Resultados semelhantes foram encontrados na tartaruga *Chelydra serpentina* (outra espécie onívora) (Packard et al., 1984), e na própria iaçá, *Podocnemis sextuberculata* (Duncan & Marcon, 2009). Portanto, a oxidação de aminoácido pode desempenhar uma importante contribuição para a demanda de energia durante o desenvolvimento inicial de espécies onívoras ou carnívoras.

As medidas da atividade enzimática é um método comum investigação das vias metabólicas específicas nos tecidos (Driedzic & Almeida-Val, 1996; Moon & Mommsen, 1987). Normalmente, os pesquisadores analisam a atividade máxima *in vitro* das enzimas-chave do metabolismo como indicadores qualitativos da preferência por um dado combustível e sua relação com os hábitos alimentares. Por exemplo, o fluxo de carboidrato pode ser avaliado a partir das enzimas glicolíticas, tais como a hexoquinase, piruvato quinase e lactato desidrogenase. Da mesma forma, a atividade da enzima 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase e carnitil palmitoil-CoA transferase são bons indicadores do metabolismo lipídico. Algumas aminotransferases, como alanina e aspartato aminotransferase e a glutamato desidrogenase são enzimas-chave usadas para verificar os fluxos de aminoácidos durante a catabolismo protéico. Assim, a organização metabólica pode ser inferida por meio de ensaios de certas enzimas-chave do metabolismo energético.

Numa tentativa de fornecer informações para futuros trabalhos em conservação e manejo de espécies selvagens tartarugas de água doce da Amazônia, aqui nós fornecemos uma visão geral do perfil metabólico e da preferência metabólica de tartarugas de água doce recém-eclodidas. Os dados enzimáticos serão discutidos em função da dieta e de outros aspectos da história de vida desses animais.

Objetivo

Descrever a organização do metabolismo energético (aeróbico e anaeróbico) em três espécies de quelônios amazônicos selvagens: *Podocnemis expansa* (tartaruga-da-Amazônia), *P. unifilis* (tracajá) e *P. sextuberculata* (iaçá).

Objetivos específicos

- Estimar os níveis das enzimas glicolíticas, oxidativas, corpos cetônicos, aminoácidos e bombas iônicas;
- Quantificar os teores dos combustíveis metabólicos: glicogênio e triacilgliceróis no músculo e fígado (análises não realizadas devido à indisponibilidade de reagentes);
- Investigar o potencial metabólico das vias bioquímicas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos, lipídios, corpos cetônicos e aminoácidos e suas relações com a nutrição animal.

Material e Métodos

Área de coleta

Cerca de 20 animais para cada espécie de tartaruga (*Podocnemis expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata*) foram capturados logo após a emergência de seus ninhos na Reserva Extrativista (RESEX) do Médio Juruá (5°33'54" S, 67°42'47" W), no município de Carauari-AM. A licença ICMBio (SISBIO Nº 19.323/2011) para a coleta dos juvenis de quelônios na RESEX foi concedida ao Laboratório de Animais Silvestres (LAS/FCA/UFAM) ao Professor Paulo Machado Andrade (Coordenador do Projeto Pé-de-Pincha). Os animais foram transportados e mantidos nas instalações do LAS e Biologia Celular-2: Morfologia Funcional/DM/UFAM). Os animais foram rapidamente aclimatizados durante duas semanas e posteriormente eutanaziados à baixa temperatura. Os tecidos (músculo, fígado, encéfalo e fígado) foram rapidamente removidos e mantidos inicialmente em nitrogênio líquido (-190 °C), e posteriormente armazenados -80 °C para análise das enzimas. Alíquotas do tecido muscular e hepático foram armazenadas para futuras análises dos teores de glicogênio e triacilgliceróis. Essas análises não foram realizadas devido à indisponibilidade de reagentes necessários para os ensaios.

Processamento dos tecidos e ensaios enzimáticos

O preparo dos homogeneizados para ensaio das enzimas foi realizado conforme os procedimentos estabelecidos por Duncan & Marcon (2009), com poucas modificações. As atividades enzimáticas estão expressas em μ moles de substrato convertido/mg de tecido/min. Todos os tecidos foram pesados e homogeneizado em 75 mM Tris-HCl, 1% de Triton X-100 em pH 7,4. Os homogeneizados foram centrifugados a 4 °C durante 30 minutos a 20.000 rpm numa centrífuga refrigerada Sigma RC15K. As frações de sobrenadante foram utilizadas para realizar os ensaios das enzimas. Infelizmente, não foi possível analisar os teores de glicogênio e triacilgliceróis (triglicérides) nos tecidos, bem como as bombas iônicas (Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺-v-H⁺-ATPase e bafilomicina-sensível, ortovanadato-sensível e amiloride-sensível v-H⁺-ATPase nos tecidos das espécies estudadas.

Para os ensaios enzimáticos, estudos preliminares foram realizados para assegurar que o pH, cofatores e as concentrações de substrato fossem adequadas (Driedzic & Almeida-Val, 1996; Duncan & Marcon, 2009). A atividade enzimática foi estimada por meio da variação da densidade óptica da oxidação do NADH ou NADPH em 340 nm (coeficiente de extinção milimolar = 6,22). Para a enzima succinil Co-A ceto-transferase (SKT) foram avaliadas em 310nm (coeficiente de extinção milimolar = 11,9). Todas as reações de ensaio enzima foi medida em um espectrofotômetro UV-Visível Spectrum a 25 °C. As atividades enzimáticas estão expressas em μ moles/mg proteína/min. As condições para cada ensaio seguem como:

- 1) Lactato desidrogenase (LDH, EC 1.1.1.27): 50 mM de imidazol; pH 7,2; NADH 0,2 mM; KCN 1 mM; 1 mM de piruvato (baixa concentração) e 10 mM (concentração elevada);
- 2) Malato desidrogenase (MDH, EC 1.1.1.37): 50 mM de imidazol; pH 7,2; NADH 0,2 mM; 0,5 mM de oxaloacetato;
- 3) Hexoquinase (HK; EC 2.7.1.1): 75 mM de TRIS-HCl; pH 7,2; MgCl₂ 5 mM; EDTA 1 mM; KCl 1 mM; 0,5 mM de NADP⁺; NADP⁺ 0,2 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase em excesso, 1 mM de glicose;
- 4) Hidroxiacil Coenzima-A-desidrogenase (HOAD; CE 1.1.1.35): 50 mM de imidazol; pH 8,0; NADH 0,2 mM; KCN 1 mM; 0,1 mM de acetoacetyl-CoA;
- 5) hidroxibutirato desidrogenase (3-HBDH; CE 1.1.1.30): 50 mM de imidazol; pH 8,0; NADH 0,1 mM; 2 mM de acetoacetato;
- 6) Succinil-coenzima A ketotransferase (SKT; EC 2.8.3.2): 50 mM de imidazol; pH 8,0; 5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de acetoacetyl-CoA;
- 7) isocitrato desidrogenase (IDH; CE 1.1.1.41): 75 mM de TRIS-HCl; pH 7,4; 0,4 mM de NADP⁺. A reação foi iniciada com a adição de 0,6 mM de L-treo isocitrato;
- 8) glutamato desidrogenase (GDH; EC 1.4.1.3): 50 mM de imidazol; pH 7,2, 250 mM de acetato de amônio; EDTA 0,1 mM; ADP 1 mM; 0,1 mM NADH; 10 mM de 2-oxoglutarato;

9) Alanina aminotransferase (AlaAT; EC 2.6.1.2): 50 mM de imidazol; pH 7,2, 200 mM de L-alanina; NADH 0,2 mM; 0,05 mM de piridoxal fosfato, excesso de lactato desidrogenase; 10 mM de 2-oxoglutarato.

Razão baixa/alta da LDH e MDH/LDH

Os valores de B/A (baixa/alta) da LDH foi calculada de forma a obter os valores da inibição da lactato desidrogenase. Os ensaios foram realizados para uma baixa concentração de piruvato 1 mM e para uma elevada concentração de piruvato de 10 mM. Proporções B/A maiores que 1,0 indicam metabolismo aeróbio (LDH inibição da enzima) e proporções B/A inferior a 1,0 indicam metabolismo anaeróbico (ativação da enzima LDH). A razão MDH/LDH para valores elevados indicam ativação do metabolismo oxidativo, enquanto que baixos valores indicam uma regulação para baixo da capacidade oxidativa.

Análises estatísticas

A análise de regressão multivariada foi realizada para testar as relações entre os níveis de enzimas em diferentes tecidos. Correlações entre as atividades das diferentes enzimas podem indicar a direção do fluxo para uma via metabólica particular. O nível de significância aceito foi de 5% ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatísticos PAST. O valor de probabilidade aceito foi $p < 0,05$.

Resultados

As atividades máximas das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e hexoquinase (HK) para os músculos cardíacos e esqueléticos nas três espécies tartarugas de água doce são mostradas na Figura 1.

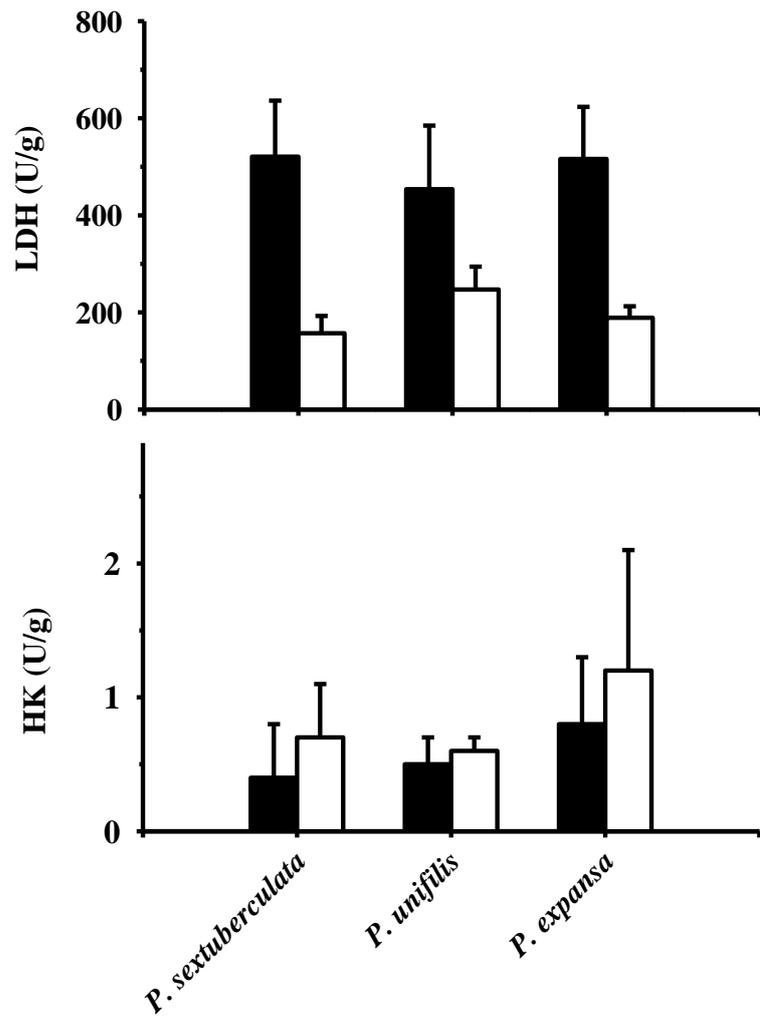


FIGURA 1 - As atividades enzimáticas da lactato desidrogenase (LDH) e hexoquinase (HK) no músculo esquelético (barras sólidas) e no músculo cardíaco (barras abertas) de filhotes de três tartarugas de água doce da Amazônia.

Um resumo das atividades da LDH e HK para tecidos do fígado e do cérebro é apresentado na Tabela 1. Os níveis das enzimas do metabolismo oxidativo para os músculos cardíacos e esqueléticos estão mostrados na Figura 2.

TABELA 1. Níveis das enzimas de lactato desidrogenase (LDH) no fígado e no cérebro em filhotes de três tartarugas de água doce da Amazônia.

	Atividade da LDH (U/g)	
	Fígado	Cérebro
<i>P. sextuberculata</i>	149,1 ± 36,5	58,3 ± 7,7
<i>P. unifilis</i>	163,8 ± 21,0	59,3 ± 7,4
<i>P. expansa</i>	143,8 ± 51,3	55,1 ± 8,2

Um sumário dos níveis enzimáticos nos tecidos do fígado e do cérebro é apresentado na Tabela 2. O potencial glicolítico com base na razão baixa/alta da LDH e razão MDH/LDH (malato desidrogenase/lactato desidrogenase) nos músculos cardíacos e esquelético é mostrado na Figura 3, enquanto o mesmo perfil para o fígado e cérebro está apresentado na Tabela 3. As atividades das enzimas do metabolismo dos aminoácidos e corpos cetônicos estão mostrados na Tabela 4.

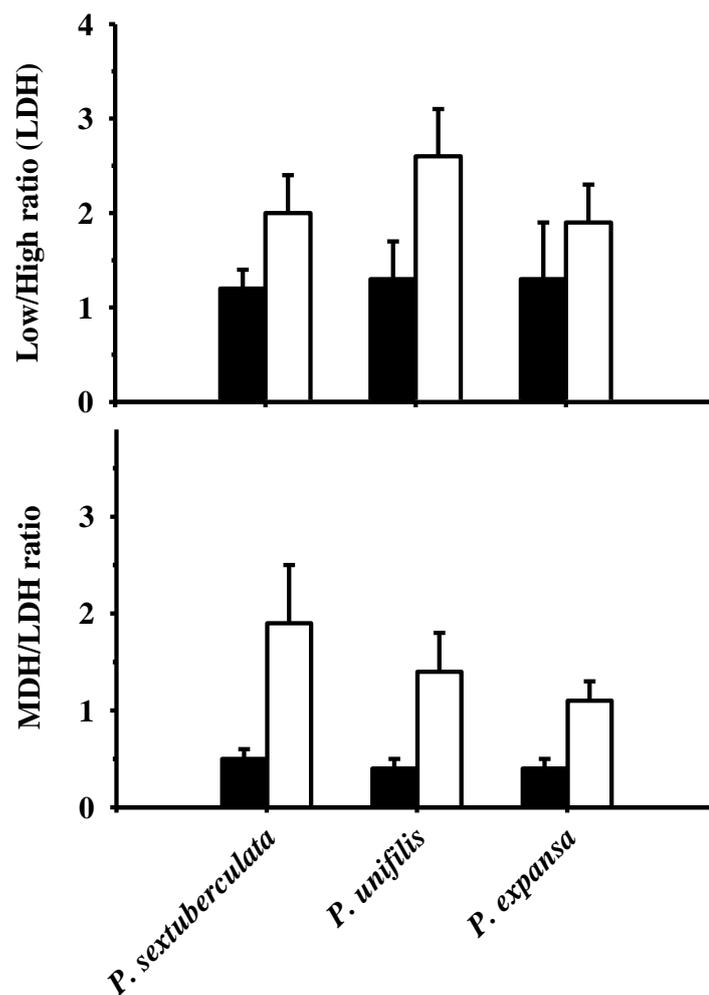


FIGURA 2 – Estimativa das atividades das enzimas-chave em várias vias metabólicas relacionadas ao metabolismo oxidativo nos músculos esqueléticos (barras sólidas) e cardíacos (barras abertas) em três quelônios amazônicos.

TABELA 2. As atividades enzimáticas da malato desidrogenase (MDH), 3-hidroxiacil Coenzima-A desidrogenase (HOAD) e isocitrato desidrogenase (IDH) no fígado e no cérebro dos filhotes de tartarugas de água doce Podocnemididae.

Tecido/Espécie	MDH	HOAD	IDH
Fígado			
<i>P. sextuberculata</i>	132,4 ± 27,6	33,5 ± 8,4	25,0 ± 0,9
<i>P. unifilis</i>	117,0 ± 46,1	11,1 ± 3,4	26,6 ± 8,1
<i>P. expansa</i>	104,9 ± 4,9	10,5 ± 4,0	NA
Cérebro			
<i>P. sextuberculata</i>	102,3 ± 5,6	NA	6,3 ± 3,4
<i>P. unifilis</i>	123,7 ± 34,9	NA	3,6 ± 0,4
<i>P. expansa</i>	107,1 ± 6,4	1,4 ± 0,2	3,3 ± 0,4

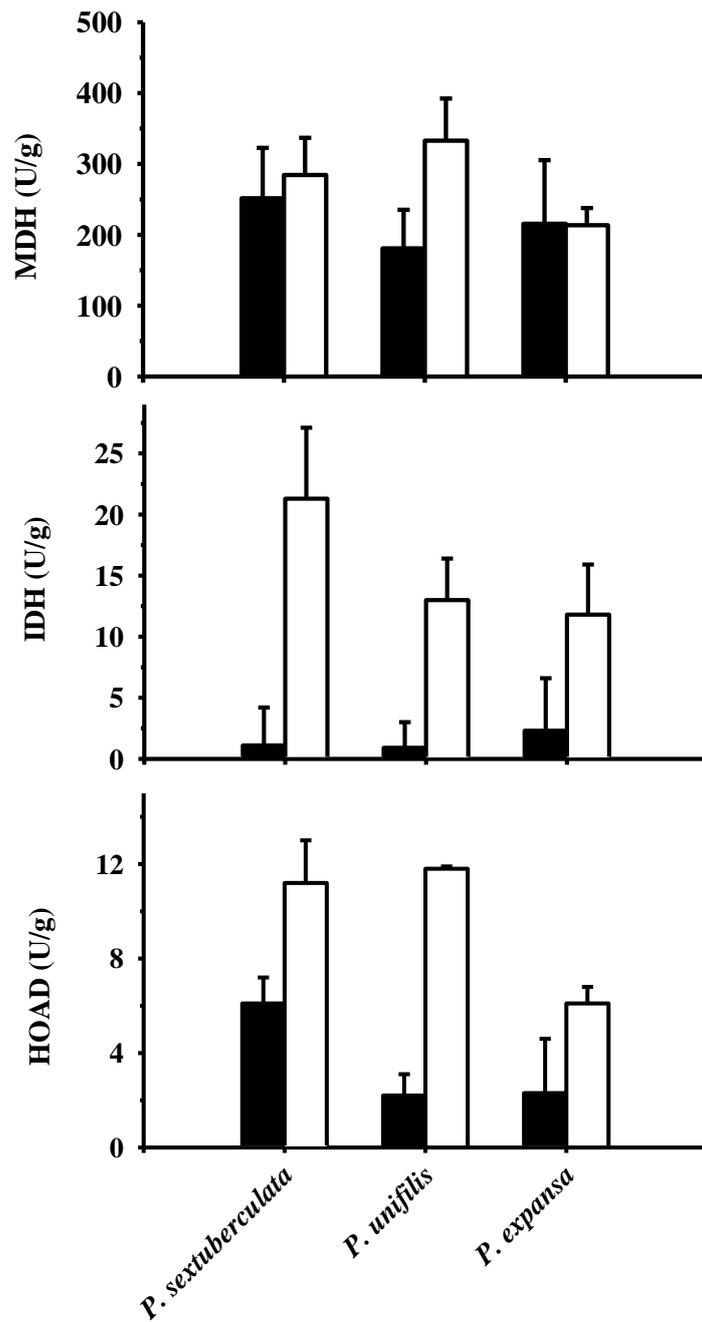


FIGURA 3 - Potencial glicolítico com base em relação Baixo / Alto (LDH) e relação de MDH / LDH de esqueléticos (barras sólidas) e coração (barras abertas) músculos das três tartarugas de água doce.

TABELA 3. Potencial glicolítico com base na relação de baixa/alta da LDH e razão MDH/LDH no fígado e cérebro dos filhotes em três tartarugas de água doce.

	Razão baixa/alta da LDH	Razão MDH/LDH
Fígado		
<i>P. sextuberculata</i>	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,3
<i>P. unifilis</i>	1,1 ± 0,3	0,7 ± 0,4
<i>P. expansa</i>	1,0 ± 0,4	0,8 ± 0,4
Cérebro		
<i>P. sextuberculata</i>	2,6 ± 0,6	1,8 ± 0,3
<i>P. unifilis</i>	2,5 ± 0,3	2,1 ± 0,5
<i>P. expansa</i>	3,9 ± 2,4	1,9 ± 0,2

TABELA 4. As atividades das enzimas (U/g) relacionadas ao metabolismo dos aminoácidos e corpos cetônicos em quatro tecidos de quelônios amazônicos.

	GDH	ALaAT	SKT	3-HBDH
Músculo				
<i>P. sextuberculata</i>	2,4 ± 0,8	2,1 ± 0,9	3,0 ± 1,8	1,4 ± 0,5
<i>P. unifilis</i>	2,5 ± 0,8	1,5 ± 0,6	1,9 ± 1,0	0,6 ± 0,3
<i>P. expansa</i>	2,8 ± 1,9	1,9 ± 0,7	1,9 ± 1,0	0,7 ± 0,6
Coração				
<i>P. sextuberculata</i>	4,5 ± 0,6	2,8 ± 1,1	1,1 ± 0,7	NA
<i>P. unifilis</i>	5,0 ± 4,2	1,9 ± 1,0	0,7 ± 0,3	NA
<i>P. expansa</i>	4,3 ± 1,3	2,1 ± 0,7	NA	0,7 ± 0,1
Fígado				
<i>P. sextuberculata</i>	19,5 ± 0,6	3,3 ± 0,5	NA	0,7 ± 0,2
<i>P. unifilis</i>	22,0 ± 0,2	2,5 ± 0,8	NA	0,4 ± 0,3
<i>P. expansa</i>	NA	1,8 ± 0,7	NA	0,7 ± 0,4
Cérebro				
<i>P. sextuberculata</i>	6,5 ± 2,8	NA	0,9 ± 0,6	NA
<i>P. unifilis</i>	7,9 ± 0,8	NA	0,5 ± 0,3	NA
<i>P. expansa</i>	6,9 ± 2,3	NA	0,3 ± 0,2	NA

Discussão

As medidas das enzimas metabólicas pode indicar o perfil geral do metabolismo energético e a relação com estilo de vida e aspectos da dieta do animal. Vários estudos nesse sentido foram realizados para um grande número de espécies de vertebrados (Monn & Mommsen, 1987; Driedzic & Almeida-Val, 1996). No entanto, existem poucos dados disponíveis para répteis em geral.

Algumas espécies de tartarugas estão entre os vertebrados mais tolerantes à anóxia. Por exemplo, algumas espécies de tartarugas de regiões temperadas são capazes de sobreviver até quatro meses em condições anóxicas a baixa temperatura durante a hibernação (Herbert & Jackson, 1985). A chave para a sobrevivência à anóxia prolongada nestes animais é o resultado da produção e utilização de ATP durante a submersão para manter os gradientes iônicos transmembrana essenciais (Lutz & Nilsson, 1997). Outros mecanismos metabólicos incluem: (i) a estimulação da glicogenólise, fornecendo substrato para a glicólise anaeróbia e aumentar a produção de ATP; (ii) a regulação das atividades absolutas das vias tanto do metabolismo aeróbico quanto anaeróbico; e (iii) a regulação das relações de capacidade glicolíticas/oxidativas em cada tecido (Almeida-Val & Hochachka, 1995; Storey, 1996).

O perfil das enzimas do metabolismo nos diferentes tecidos dos filhotes de Podocnemididae exibiu alta capacidade anaeróbia glicolítica para as três espécies de tartarugas de água doce da Amazônia aqui estudados (*Podocnemis expansa*, *P. unifilis* e *P. sextuberculata*). Os altos níveis de LDH e o baixo valor da relação MDH/LDH sugerem que, durante o mergulho (ou em situações de anoxia) a produção de ATP é sustentada pela quebra de carboidratos e produção de lactato. No entanto, é provável que o glicogênio seja a fonte primária de combustível, uma vez que a atividade da hexoquinase (HK) é relativamente baixa nos principais tecidos das três espécies de tartarugas de água doce estudadas.

Tem sido sugerido que HK, LDH, as razões baixa/alta da LDH e MDH/LDH são importantes indicadores do potencial glicolítico. Esses perfis sugerem que o

metabolismo de carboidratos ocorre por meio da via anaeróbia (Almeida-Val et al., 1994). Curiosamente, em todos os filhotes de tartarugas, os perfis da enzima LDH são especialmente elevadas no fígado. Isso provavelmente pode estar relacionado à produção de energia anaeróbica. O elevado nível de atividade da LDH e sua insensibilidade à inibição pelo piruvato pode indicar que as subunidades tipo M (isoenzima LDH-tipo muscular) predominam no tecido hepático. Um estudo envolvendo perfil eletroforético para identificar o padrão tecidual das isozimas (M₄, H₄, M₃H₁, M₂H₂, M₁H₃ e H₄) nos diferentes tecidos pode ajudar a esclarecer esses aspectos.

Na verdade, o perfil glicolítico do fígado é metabolicamente semelhante ao potencial anaeróbico de músculo branco nos filhotes aqui estudados. Esta organização metabólica é consistente com o estilo de vida desses animais. De acordo com a população local, estas tartarugas são capazes de submergir por longos períodos de tempo. Em outras espécies, a depressão metabólica (Lutz e Nilsson, 1997; Hochachka & Lutz, 2001), a função cardiodinâmica (Farrell et al., 1994; Wasser et al., 1997), ativação anaeróbica (Watson et al., 1994; Storey, 1996) e equilíbrio ácido-base (Wasser et al., 1997; Jackson, 2000) são clássicos mecanismos fisiológicos e bioquímicos utilizados pelas tartarugas, e isso pode explicar a capacidade desses animais tolerar longos períodos de anoxia. Portanto, acreditamos que a ativação da glicólise anaeróbia no fígado é um fator-chave para sobreviver durante a apnéia prolongada.

Embora as três espécies estudadas apresentem semelhanças no perfil glicolítico anaeróbico, existem algumas diferenças em relação à organização do metabolismo oxidativo. Todos os tecidos analisados de *P. sextuberculata* exibem elevadas atividades de enzimas do ciclo do ácido cítrico (MDH e IDH), beta-oxidação dos ácidos graxos (HOAD), corpos cetônicos (SKT e 3-HBDH) e oxidação de aminoácidos (AlaAT).

Análises multivariadas mostram uma forte associação entre as enzimas do ácido cítrico e aquelas associadas ao metabolismo dos aminoácidos no músculo de

iaçá. O catabolismo das proteínas produz aminoácidos cetogênicos, tais como alanina, que pode ser um importante combustível para órgãos como o cérebro e o coração durante a inanição. Em uma tartaruga de água doce de regiões temperadas, *Chrysemis picta bellii*, as mitocôndrias dos cardiomiócitos oxidam corpos cetônicos em taxas elevadas de uma maneira semelhante a piruvato (Almeida-Val et al., 1994).

A relação entre as enzimas AlaAT e aquelas do ciclo do ácido cítrico podem indicar uma dependência de aminoácidos para sustentar essa via. Para alguns vertebrados aquáticos, como peixes, a alanina pode ser produzida a partir do glutamato e piruvato por transaminação, a amônia provavelmente é liberada a partir do glutamato por desaminação oxidativa (Jürss & Bastrop, 1995). É possível observar que as atividades da GDH e AlaAT do fígado estão suficientemente elevadas para sustentar essa via. Com isso, nós sugerimos o perfil metabólico dessa espécie (*P. sextuberculata*) está organizado para melhorar a oxidação de aminoácidos a partir de uma dieta rica em proteínas. De fato, as observações de campo sugerem uma dieta altamente carnívora para esta espécie, que consiste em grande parte de pequenos moluscos (Fachin-Teran et al., 1995).

Por outro lado, as relações entre as enzimas metabólicas sugerem que a produção de ATP ocorre por via aeróbica. E o carboidrato é a principal fonte energética para sustentar tal via tanto em *P. expansa* quanto *P. unifilis*. Ambas as espécies são tipicamente herbívoros (Fachin-Teran et al., 1995) e que consomem grandes quantidades de macrófitas aquáticas (Figura 3). Isso sugere que esse aspecto da alimentação tende a sustentar o direcionamento de carboidrato para a produção de energia.



Figura 4. Representação esquemática de uma tartaruga alimentando-se de macrófitas na floresta inundada. Durante a vitelogênese, as fêmeas devem transferir uma grande quantidade de material nutritivo para o vitelo (Desenho: Maria Isabel da Silva).

Conclusões

- Todas as três tartarugas de água doce da Amazônia analisadas apresentam uma organização metabólica para suportar altas capacidades anaeróbicas;
- Em todas as espécies, o fígado apresenta uma elevada atividade incomum para a LDH e insensibilidade à inibição pelo piruvato. O baixo nível de atividade da HK indica uma preferência combustível de carboidrato preferencialmente pelo glicogênio, ao invés da glicose;
- As espécies estudadas apresentam um potencial glicolítico semelhante;
- O metabolismo dos aminoácidos e corpos cetônicos em iaçá, *P. sextuberculata*, são consistentes com dieta protéica mista de animais e plantas.

Referências bibliográficas

ALHO, C.J., CARVALHO, A.G.C. & PÁDUA, L.F.M., 1979, Ecologia da tartaruga da Amazônia e avaliação de seu manejo na Reserva Biológica do Trombetas. *Bras. Florest.* 9: 29-47.

- ALMEIDA-VAL, V.M.F., BUCK, L.T. & HOCHACHKA, P.W., 1994, Substrate and acute temperature effects on turtle heart and liver mitochondria. *Am. J. Physiol.*, 266: R858-R862.
- ALMEIDA-VAL, V.M.F. & HOCHACHKA, P.W., 1995, Air-breathing fishes: Metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. In: P.W. HOCHACHKA & T.P. MOMMSEN (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, Vol. 5. Elsevier, Amsterdam, pp. 45-55.
- AVERY, H.W., SPOTILA, J.R., CONGDON, J.D., FISCHER Jr, R.U., STANDORA, E.A. & AVERY, S.B., 1993, Roles of diet protein and temperature in the growth and nutritional energetics of juvenile slider turtles, *Trachemys scripta*. *Physiol. Zool.*, 66: 902-925.
- AYRES, M., AYRES Jr, M., AYRES, D.L & SANTOS, A.S., 2000, BioEstat 2.0. Editora da Sociedade Civil Mamirauá/MCT/CNPq, Brasília, Brazil.
- BEST, R.C., 1984, The aquatic mammals and reptiles of the Amazon. In: H. Sioli (Ed.), *The Amazon limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, pp. 371-412.
- BOOTH, D.T., 2003, Composition and energy density of eggs from two species of freshwater turtle with twofold ranges in egg size. *Comp. Biochem. Physiol.*, 134A: 129-137.
- DRIEDZIC, W.R. & ALMEIDA-VAL, V.M.F., 1996, Enzymes of cardiac energy metabolism in amazonian teleosts and the fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). *J. Exp. Zool.*, 274: 327-333.

- DUNCAN, W. P.; MARCON, J. L., 2009, Enzymes of energy metabolism in hatchling of amazonian freshwater turtles (Testudines, Podocnemididae). *Braz. J. Biol.*, 69(2): 319-325.
- DUNCAN, W.P.; MARIA-SILVA, I.; CUNHA, S. L. R.; AREOSA, V. B. M.; ANDRADE, P. C. M., 2012, O vitelo residual e sua importância para o manejo dos quelônios aquáticos recém-eclodidos. In: Manejo Comunitário de Quelônios no Médio Amazonas e Juruá - Projeto Pé-de-Pincha. (ANDRADE, P. C. M. Org.). 1ª Edição. UFAM, Gráfica Moderna, Manaus, 756p. II.
- FACHIN-TERAN, A., VOGT, R.C. & SOARES-GOMEZ, M.F., 1995, Food habits of an assemblage of five species of turtles in the Rio Guapore, Rondonia, Brazil. *J. Herpetol.*, 29: 536-547.
- FARREL, A.P., FRANKLIN, C.E., ARTHUR, P.G., THORARENSEN, H. & COUSINS, K.L., 1994, Mechanical performance of an in situ perfused heart from turtle Chrysemys scripta during normoxia and anoxia at 5°C and 15°C. *J. exp. Biol.*, 191: 207-229.
- FINKLER, M.S., BOWEN, J.T., CHRISTMAN, T.M. & RENSHAW, A.D., 2002, Effects of hydric conditions during incubation on body size and triglyceride reserves of overwintering hatchling snapping turtles (Chelydra serpentina). *Copeia*. 2: 504-510.
- HERBERT, C.V. & JACKSON, D.C., 1985, Temperature effects on the responses to prolonged submergence in the turtle Chrysemys picta bellii. II. Metabolic rate,

- blood acid-base and ionic changes, and cardiovascular function in aerated and anoxic water. *Physiol. Zool.*, 58: 670-681.
- HOCHACHKA, P.W. & LUTZ, P.L., 2001, Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animal. *Comp. Biochem. Physiol.*, 130B: 435-459.
- JACKSON, D.C., 2000, Living without oxygen: lessons from the freshwater turtle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 125A: 299-315.
- JONES, S.M., BENNETT, E.J. & SWADLING, K.M., 1998, Lipids in yolks and neonates of the viviparous lizard Niveoscincus metallicus. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121B: 465-470.
- JÜRSS, K. & BASTROP, R., 1995, Amino acid metabolism in fish. In: P.W. HOCHACHKA & T.P. MOMMSEN (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Vol. 4. Elsevier, Amsterdam, pp. 159-189.
- LANCE, V.A. & MORAFKA, D.J., 2001, Post natal lecithotroph: a new age class in the ontogeny of reptiles. *Herpetol. Monographs*, 15: 124-134.
- LUTZ, P.L. & NILSSON, G.E., 1997, Contrasting strategies for anoxic brain survival - glycolysis up or down. *J. exp. Biol.* 200: 411-419.
- MITTERMEIER, R.A. & WILSON, R.A., 1974, Redescription of Podocnemis erythrocephala (Spix, 1824), an Amazonian Pelomedusid turtle. *Papéis Avulsos do Museu de São Paulo*, 28: 147-162.
- MOON, T.W. & MOMMSEN, T.P., 1987, Enzymes of intermediary metabolism in tissues of the little skate, Raja erinacea. *J. Exp. Zool.*, 244: 9-15.

- NAGLE, R.D. & BURKE, V.J. & CONGDON, J.D., 1998, Egg components and hatchling lipid reserves: parental investment in kinosternid turtles from the Southeastern United States. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120B: 145-152.
- PACKARD, G.C., PACKARD, M.J., MILLER, K. & BOARDMAN, T.J., 1984, Influence of hydration of the environment on the pattern of nitrogen excretion by embryonic snapping turtles (Chelydra serpentina). *J. exp. Biol.*, 108: 195-204.
- ROWE, J.W., HOLY, L., BALLINGER, R.E. & STANLEY-SAMUELSON, D. 1995, Lipid provisioning of turtle eggs and hatchlings: total lipid, phospholipid, triacylglycerol and triacylglycerol fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B: 323-330.
- SOINI, P. 1997, *Biología y manejo de la tortuga, Podocnemis expansa*. Tratado de Cooperación Amazonica. Secretaria Pro Tempore Venezuela. FAO
- STOREY, K.B., 1996, Metabolic adaptations supporting anoxia tolerance in reptiles: recent advances. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B: 23-35.
- THOMPSON, M.B., SPEAKE, B.K., RUSSELL, K.J., McCARTNEY, R.J. & SURAI, P.F., 1999, Changes in fatty acid profiles and in protein, ion and energy contents of eggs of the Murray short-necked turtle, Emydura macquarii (Chelonia, Pleurodira) during development. *Comp. Biochem. Physiol.*, 122A: 75-84.
- WASSER, J.S., GUTHRIE, S.S. & CHARI, M., 1997, In vitro tolerance to anoxia and ischemia in isolated heart from hypoxia sensitive and hypoxia tolerant turtles. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A: 1359-1370.