



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes


Daphne Wrobel Goldberg

**Leptina e grelina na regulação do comportamento alimentar
da tartaruga *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766)**

Rio de Janeiro
2013

Daphne Wrobel Goldberg

**Leptina e grelina na regulação do comportamento alimentar da tartaruga
Eretmochelys imbricata (Linnaeus, 1766)**



Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos

Coorientador: Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

G618 Goldberg, Daphne Wrobel.
Leptina e grelina na regulação do comportamento alimentar da tartaruga *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus 1766). Daphne Wrobel Goldberg.
70 f.

Orientador: Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos.
Coorientador: Jayme da Cunha Bastos Neto.

Tese (Doutorado). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-Graduação em Biociências.

1. *Eretmochelys imbricata*. 2. Tartaruga marinha. 3. Hábitos alimentares. 4. Grelina. 5. Leptina - Teses. 6. Comportamento de nidificação - Fisiologia. 7. Reprodução animal - Aspectos endócrinos. I. Bastos, Vera Lúcia Freire da Cunha. II. Bastos, Jayme da Cunha. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 598.133

utorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Daphne Wrobel Goldberg

**Leptina e grelina na regulação do comportamento alimentar da tartaruga
Eretmochelys imbricata (Linnaeus, 1766)**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de Janeiro de 2013.

Coorientador: Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Eliana Reiko Matushima
Universidade de São Paulo

Prof.^a Dra. Nadia Regina Pereira Almosny
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Erica Patrícia Garcia de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido amigo Fernando Pazeto, o “Hulk”, “*in memoriam*” que dedicou boa parte de sua vida à conservação das tartarugas marinhas.

“A vida me ensinou a dizer adeus às pessoas que amo, sem tirá-las do meu coração (...).” *Charles Chaplin*

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que de alguma forma contribuíram para que esta tese fosse realizada. A todos eles, deixo aqui os meus mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por estar sempre presente em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Henrique e Sônia, meus exemplos de vida, força, dedicação, perseverança e honestidade, valores essenciais para a minha formação.

Agradeço aos meus irmãos, Teca e Michel, pelo amor incondicional.

Agradeço ao Gus, meu grande amor e amigo de todos os momentos, pelas inúmeras palavras de incentivo e carinho e pela experiência e direcionamento nos momentos de dúvida e angústia.

Agradeço aos meus orientadores, Vera e Jayme, pela sabedoria com que guiaram meus passos na busca pelo conhecimento.

Agradeço a minha querida amiga Juçara Wanderlinde pela oportunidade de conciliar o doutorado com as atividades do Tamar e poder estar perto das tartarugas marinhas.

Agradeço ao meu querido amigo Santiago Tobar pela paciência, compreensão e apoio em todos os momentos difíceis.

Agradeço à equipe do Tamar do Rio Grande do Norte por acreditar neste trabalho e pelo incansável apoio nas coletas.

Agradeço a Matthew H. Godfrey pelo constante apoio e incentivo ao meu crescimento intelectual e científico.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório Eduardo, Frederico, Carlúcio, Rafael, Aline, Laís, Bruna, Arthur, Lin e Roosevelt pelo companheirismo e pelo espírito de equipe.

Agradeço aos professores Anibal Sanchez e Érica Garcia de Souza pela orientação e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Fabiana pela incomensurável ajuda no processamento das amostras.

Agradeço ao professor Ronir Raggio pela imensa boa vontade e ajuda nas análises estatísticas.

Agradeço aos animais, pelas lições de pureza, simplicidade e sabedoria.

Por fim, agradeço àqueles que por um momento cruzaram meu caminho e de alguma forma contribuíram para o meu aprendizado acadêmico, pessoal e profissional.

Sê

Se não puderes ser um pinheiro,
no topo de uma colina,
Sê um arbusto no vale, mas sê
O melhor arbusto à margem do
regato.

Sê um ramo, se não puderes ser
uma árvore.

Se não puderes ser um ramo, sê
um pouco de relva
E dá alegria a algum caminho.

Se não puderes ser uma estrada,
Sê apenas uma senda,
Se não puderes ser o Sol, sê uma
estrela.

Não é pelo tamanho que terás
êxito ou fracasso...

Mas sê o melhor no que quer que
sejas.

Pablo Neruda

RESUMO

GOLDBERG, Daphne Wrobel. *Leptina e grelina na regulação do comportamento alimentar da tartaruga *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus 1766)*. 2013. 70 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2013.

Durante a temporada de nidação, fêmeas de tartarugas marinhas costumam reduzir ou cessar por completo a ingestão de alimentos. Este fato sugere que o armazenamento de energia e nutrientes para a reprodução ocorra durante o período que antecede a migração para os sítios reprodutivos, enquanto estes animais ainda se encontram nas áreas de alimentação. Do ponto de vista fisiológico, tartarugas em atividade reprodutiva são capazes de permanecer longos períodos em jejum. Fatores neuroendócrinos vêm sendo recentemente apontados como os mais relevantes para a manutenção da homeostase energética de todos os vertebrados; entre eles, a leptina (hormônio anorexígeno) e a grelina (peptídeo orexígeno). Com o objetivo de compreender o mecanismo de fome e saciedade nas tartarugas marinhas, investigamos os níveis séricos destes hormônios e de outros indicadores nutricionais em fêmeas de *Eretmochelys imbricata* desovando no litoral do Rio Grande do Norte, Brasil. Foram coletadas amostras de sangue de 41 tartarugas durante as temporadas reprodutivas de 2010/2011 e 2011/2012. Os níveis séricos de leptina diminuíram significativamente ao longo do período de nidação, de modo a explicar a busca por alimentos ao término da temporada. Ao mesmo tempo, registramos uma tendência crescente nos níveis séricos de grelina, fator este que também justifica a remigração para as áreas de alimentação no fim do período. Não foram observadas tendências lineares para alguns dos parâmetros avaliados, entre eles: hematócrito, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). É possível que a maior parte dos indicadores nutricionais tenha apresentado redução gradativa devido ao estresse fisiológico decorrente da vitelogênese e de repetidas oviposições. No entanto, é válido ressaltar que o quadro de restrição calórica por tempo prolongado é o principal responsável pelas alterações em índice de massa corpórea e padrões bioquímicos nestes animais.

Palavras-chave: *Eretmochelys imbricata*. Comportamento alimentar. Grelina. Leptina. Jejum. Temporada reprodutiva.

ABSTRACT

Reproductive female sea turtles rarely have been observed foraging during the nesting season. This suggests that prior to their reproductive migration to nesting beaches, the adult females must store sufficient energy and nutrients at their foraging grounds, and must be physiologically capable of undergoing months without feeding. Leptin (an appetite-suppressing protein) and ghrelin (a hunger-stimulating peptide) affect body weight by influencing energy intake in all vertebrates. We investigated the levels of these hormones and other physiological and nutritional parameters in nesting female hawksbill sea turtles in Rio Grande do Norte State, Brazil, by collecting consecutive blood samples from 41 turtles during the 2010/2011 and 2011/2012 reproductive seasons. We found that levels of serum leptin decreased over the nesting season, which potentially relaxed appetite suppression and led females to begin foraging either during or after the post-nesting migration. Concurrently, we recorded an increasing trend in ghrelin, which stimulated appetite towards the end of the nesting season. Both findings are consistent with the prediction that post-nesting females will begin to forage, either during or just after their post-nesting migration. We observed no seasonal trend for other physiological parameters: PCV values, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), gamma glutamyl transferase (GGT) low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) serum levels. The observed downward trends in general serum biochemistry levels were likely due to the physiological stress of vitellogenesis and nesting in addition to limited energy resources and probable fasting.

Keywords: *Eretmochelys imbricata*. Feeding behavior. Ghrelin. Leptin. Fasting. Nesting season.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Eretmochelys imbricata</i> retornando ao mar após desovar	19
Figura 2 – <i>E. imbricata</i> durante o processo de oviposição	24
Figura 3 – Mapa referente ao Centro de Lançamento da Barreira do Inferno (CLBI)	29
Figura 4 – Mapa referente ao litoral sul do município de Tibau do Sul.....	30
Figura 5 – Marcação de <i>E. imbricata</i> com anilhas de liga metálica inonel	31
Figura 6 – Processo de pesagem de <i>E. imbricata</i>	32
Figura 7 – Coleta de sangue de <i>E. imbricata</i> através de venipuntura do seio cervical dorsal	33
Figura 8 – Coleta de sangue de <i>E. imbricata</i> através de venipuntura do seio cervical dorsal	33
Figura 9 – Variação de triglicerídeos, colesterol, VLDL, proteínas totais, globulina, albumina, ureia e ácido úrico no soro de <i>E. imbricata</i>	39
Figura 10 – Diagrama de dispersão e correlação de Spearman entre as taxas de variação (Δ) de ureia e de proteínas totais por desova...	40
Figura 11 – Variação de sódio, potássio, cálcio e fósforo no soro de <i>E. imbricata</i>	42
Figura 12 – Variação de ALT, AST, FA e GGT no soro de <i>E. imbricata</i>	43
Figura 13 – Variação de grelina e leptina no soro de <i>E. imbricata</i>	43

Figura 14 – Esquema ilustrativo da resposta metabólica ao jejum prolongado, evidenciando o papel da grelina.....57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Variação do índice de massa corpórea (kg) de fêmeas de *E. imbricata* ao longo das temporadas reprodutivas.....37
- Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos séricos, níveis hormonais e hematócrito de fêmeas de *E. imbricata* durante as temporadas reprodutivas.....38
- Tabela 3 – Correlação entre as taxas de variação (Δ) dos níveis séricos de grelina e leptina, do índice de massa corpórea (kg) e dos parâmetros bioquímicos em fêmeas de *E. imbricata* com duas ou mais desovas.44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama glutamil transferase
GH	Hormônio do crescimento
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
IMC	Índice de massa corpórea
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1	Tartarugas marinhas	17
1.2	Tartaruga-de-pente (<i>Eretmochelys imbricata</i>)	18
1.3	Biologia reprodutiva	20
1.4	Hipofagia ou afagia durante o período de nidação	24
1.5	Regulação da ingestão alimentar	25
1.5.1	<u>Leptina</u>	26
1.5.2	<u>Grelina</u>	27
2	OBJETIVOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Área de Estudo	29
3.2	Animais	30
3.3	Amostras	32
3.4	Ensaio da leptina e da grelina	34
3.5	Análises bioquímicas	35
3.6	Análises estatísticas	36
4	RESULTADOS	37
5	DISCUSSÃO	45
5.1	Valores de referências	45
5.1.1	<u>Lipídeos</u>	46
5.1.2	<u>Proteínas totais</u>	46
5.1.3	<u>Ureia</u>	47
5.1.4	<u>Ácido úrico</u>	47
5.1.5	<u>Sódio e potássio</u>	47
5.1.6	<u>Cálcio e fósforo</u>	47
5.1.7	<u>Glicose</u>	48
5.1.8	<u>Atividades enzimáticas</u>	48
5.1.9	<u>Hematócrito</u>	49
5.1.10	<u>Leptina e grelina</u>	49
5.2	Variações das concentrações séricas	50
5.2.1	<u>Lipídeos</u>	50

5.2.2.	<u>Proteínas totais</u>	51
5.2.3.	<u>Ureia</u>	52
5.2.4.	<u>Ácido úrico</u>	53
5.2.5.	<u>Sódio e potássio</u>	53
5.2.6.	<u>Cálcio e fósforo</u>	54
5.2.7.	<u>Glicose</u>	54
5.2.8.	<u>Atividades enzimáticas</u>	55
5.2.9.	<u>Leptina e grelina</u>	55
6	CONCLUSÃO	58
7	SUGESTÕES FUTURAS	59
	REFERÊNCIAS	60

INTRODUÇÃO

A privação parcial ou total de alimentos por um período prolongado é considerada um componente fisiológico do ciclo biológico de diversas espécies de vertebrados (Castellini e Rea, 1992). No caso das tartarugas marinhas, a afagia é comumente observada nas fêmeas durante o período de nidação (Bjorndal, 1985; Tucker e Read, 2001; Hamann *et al.*, 2002b).

A sobrevivência a longos períodos de jejum depende de mecanismos que preservem os níveis de glicose no sangue, uma vez que este açúcar é uma fonte de energia essencial e um importante intermediário metabólico. Na maior parte dos vertebrados, a glicemia é mantida pela mobilização lipídica (triglicerídeos), com a liberação de ácidos graxos a partir de reservas de tecido adiposo (Cahill, 2006). Além de fornecer energia e NADH para a gliconeogênese hepática, os ácidos graxos são oxidados no tecido muscular, poupando assim a utilização da glicose como fonte de energia (Goldstein *et al.*, 2011). A oxidação parcial de ácidos graxos no fígado leva a produção de corpos cetônicos que podem ser utilizados pelo sistema nervoso (Cahill, 2006). No entanto, muitos órgãos utilizam apenas a glicose como fonte energética, e a síntese deste açúcar no jejum é dependente da degradação de proteínas endógenas com conversão dos aminoácidos em glicose (Finn e Dice, 2006).

As reservas lipídicas e proteicas de fêmeas de tartarugas marinhas em atividade reprodutiva são adquiridas em áreas de alimentação, antes do início da migração para áreas de desova (Hamann *et al.*, 2003). De acordo com Honarvar *et al.* (2011) o sucesso reprodutivo destes animais está diretamente associado ao consumo adequado de nutrientes e ao armazenamento de energia.

A redução da taxa metabólica durante a temporada de nidação é considerado um fator chave para a sobrevivência ao longo período de restrição calórica e para o sucesso reprodutivo das fêmeas (Hays *et al.*, 1999). De acordo com Mortimer e Portier (1989) as tartarugas marinhas tornam-se hipoativas durante a temporada, mobilizando suas reservas apenas para a reprodução. Jones *et al.* (2009) e Price *et al.* (2012) evidenciaram que *C. mydas* mantidas em cativeiro apresentaram uma redução de cerca de 50% em suas taxas metabólicas quando submetidas a um período de jejum alimentar de 10 a 15 dias.

Recentemente, foram identificados dois hormônios responsáveis pela regulação da ingestão alimentar e metabolismo energético em vertebrados – a leptina e a grelina (Denver *et al.*, 2011), ambos já isolados de répteis (Niewiarowski *et al.*, 2000; Kaiya *et al.*, 2004). A leptina é responsável pelo controle da ingestão de alimentos através da inibição do neuropeptídeo Y (NPY) no hipotálamo (Paolucci *et al.*, 2001). Além de promover a redução da ingestão de alimentos, incrementa o metabolismo energético e está envolvida na regulação da função neuroendócrina e do metabolismo da glicose e de gorduras (Romero e Zanesco, 2006). A grelina por sua vez é um peptídeo orexígeno sintetizado predominantemente em células da mucosa gástrica (Korbonits *et al.*, 2004). Ao atingir a circulação, ela induz a sensação de fome através da estimulação da liberação do neuropeptídeo Y (NPY) localizado no hipotálamo (Arsenault *et al.*, 2007).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Tartarugas marinhas

As tartarugas marinhas surgiram no período jurássico (Pritchard, 1997) e são morfologicamente distintas de outros quelônios por terem sofrido modificações, as quais permitiram uma melhor adaptabilidade ao meio. Estas modificações caracterizaram-se pelo achatamento do casco, tornando-o mais leve e permitindo uma melhor hidrodinâmica além da transformação das patas em nadadeiras, facilitando a movimentação dos animais no mar (Wyneken, 2001; Wyneken, 2003).

Por pertencerem à classe dos répteis, as tartarugas marinhas são consideradas ectotérmicas (Raphael, 2003), e o aumento da temperatura ambiental irá promover um aumento no índice metabólico destes animais (Braun-McNeill *et al.*, 2008). Assim como outros quelônios, apresentam características que as tornam facilmente identificáveis – como a presença do casco, uma estrutura óssea que recobre e protege seu corpo (Raphael, 2003). O casco é formado ventralmente pelo plastrão e dorsalmente pela carapaça, sendo a última caracterizada pela fusão das vértebras e costelas revestidas por placas córneas denominadas escudos (Boyer e Boyer, 1996). Apresentam ainda um bico córneo semelhante ao de uma ave, denominado ranfoteca, que reveste os ramos das mandíbulas. Os quelônios não apresentam ouvido externo e sua membrana timpânica é apenas uma continuação do tecido que recobre a face (Bartol e Musick, 2003; Mearns *et al.*, 2004).

Sete espécies são encontradas no mundo (Wyneken *et al.*, 2006), sendo distribuídas em áreas tropicais, subtropicais e temperadas dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico (Groombridge e Luxmoore, 1989). São elas: *Lepidochelys kempii*, *Natator depressus*, *Eretmochelys imbricata*, *Chelonia mydas*, *Lepidochelys olivacea*, *Caretta caretta* e *Dermochelys coriacea* (Pritchard, 1997; Wyneken *et al.*, 2006). As seis primeiras espécies pertencem à família Cheloniidae, e a última, à família Dermochelyidae (Pritchard, 1997; Raphael, 2003). Das sete espécies, cinco ocorrem no Brasil: *Dermochelys coriacea* (LINNEAUS, 1758; tartaruga-de-couro), *Chelonia mydas* (Linneaus, 1758; tartaruga-verde), *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829; tartaruga-oliva), *Caretta caretta* (Linneaus, 1758; tartaruga-cabeçuda) e *Eretmochelys imbricata* (Linneaus, 1766; tartaruga-de-pente) (Marcovaldi e Marcovaldi, 1999).

De acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2011), *C. caretta*, *C. mydas* e *L. olivacea* são consideradas espécies em perigo de extinção e *D. coriacea* e *E. imbricata*, espécies criticamente ameaçadas. Da mesma forma, estes animais constam na lista brasileira de espécies ameaçadas de extinção do Ministério do Meio Ambiente (Machado *et al.*, 2008), sendo *C. caretta* e *C. mydas* consideradas vulneráveis, *E. imbricata* e *L. olivacea* em perigo, e *D. coriacea* criticamente em perigo.

A depleção das populações de tartarugas marinhas tem sido relacionada a diversos fatores de origem antrópica, incluindo o desenvolvimento costeiro desordenado, a alteração ou degradação dos *habitats*, a destruição das áreas de desova, a predação de ovos, a pesca predatória e a poluição (Wyneken *et al.*, 1988; Lutcavage e Lutz, 1997). No entanto, a captura incidental de tartarugas por diferentes artes de pesca é considerada a maior causa de morte destes animais em todo o mundo (National Research Council, 1990; Marcovaldi *et al.*, 2002).

1.2 Tartaruga-de-pente (*Eretmochelys imbricata*)

A *E. imbricata* (Figura 1) é popularmente conhecida no Brasil como tartaruga-de-pente e apresenta-se amplamente distribuída por áreas tropicais costeiras. A atividade reprodutiva ocorre em praias de cerca de 60 países, no entanto, a concentração de ninhos nestas áreas é baixa (Groombridge e Luxmoore, 1989). Assim como as outras espécies de tartarugas marinhas, a *E. imbricata* apresenta ciclo de vida complexo e maturação tardia (Baillie e Groombridge, 1996), além de realizar extensas migrações, chegando a percorrer milhares de quilômetros entre áreas de alimentação e de reprodução (Vam Dam e Diez, 1998; Troëng *et al.*, 2005).



Figura 1: *Eretmochelys imbricata* retornando ao mar após desovar na praia de Sibaúma, distrito de Pipa, município de Tibau do Sul, RN.

Esta espécie apresenta distribuição circungal, sendo primeiramente encontrada em águas tropicais e numa menor extensão, em águas subtropicais. No Brasil, as áreas prioritárias de reprodução de *E. imbricata* são o litoral norte da Bahia e o litoral sul do Rio Grande do Norte (Marcovaldi *et al.*, 2007). Ocorrências ocasionais foram registradas em Sergipe, Espírito Santo (Marcovaldi e Marcovaldi, 1999) e Rio de Janeiro (Paes e Lima *et al.*, 2012). As áreas de alimentação desta espécie são frequentemente associadas a regiões recifais, devido ao hábito alimentar das tartarugas-de-pente, que se baseia preferencialmente em esponjas marinhas (Meylan, 1978). No Brasil estas áreas localizam-se nas ilhas oceânicas de Fernando de Noronha, PE e Atol das Rocas, RN, havendo evidências de que o banco dos Abrolhos, BA, também seja utilizado por este táxon (Marcovaldi *et al.*, 2011).

Dentre todas as tartarugas marinhas, a *E. imbricata* é uma das espécies que mais sofreu com a exploração, não apenas pelo consumo de sua carne e seus ovos, mas principalmente pelo uso dos escudos de queratina que recobrem sua osteoderme (Meylan, 1999). No fim da década de 70 o preço deste material era superior ao do marfim e mais de 46 países comercializavam a matéria prima, utilizada principalmente para a fabricação de joias e adornos (Mack, *et al.* 1979). A

demanda mundial pelo casco de tartarugas-de-pente reduziu drasticamente as populações desta espécie (Limpus, 1997).

Em 1968 a tartaruga-de-pente foi listada pela primeira vez pela IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais) como espécie ameaçada de extinção. Em 1973 foi incluída no apêndice I pelo CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies de Fauna e Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção), como tentativa de mitigar os impactos do comércio internacional sobre as populações. Atualmente é classificada como espécie criticamente ameaçada pela IUCN, segundo o critério A2abcde, e está inclusa na lista oficial brasileira de animais ameaçados de extinção (Marcovaldi *et al.*, 2011).

Indivíduos da espécie *E. imbricata* apresentam uma carapaça de coloração marrom com quatro pares de placas córneas laterais sobrepostas (Wyneken, 2001). A área tegumentar, referente a pescoço, cabeça e membros, apresenta-se mais escura na face dorsal e mais clara nas faces lateral e ventral (Pritchard, 1997). O plastrão é composto por nove ossos, e assim como a carapaça, é recoberto por lâminas de queratina (Wyneken, 2001). A cabeça destes animais é estreita e alongada (Wyneken *et al.*, 2006), caracterizando-se pela presença de dois pares de placas pré-frontais e três pós-orbitais (Pritchard, 1997; Wyneken, 2001; Wyneken, 2003; Seminoff *et al.*, 2003). A ranfoteca (revestimento córneo dos ramos mandibulares) desta tartaruga é estreita e longilínea e se assemelha ao bico de uma ave (Wyneken *et al.*, 2006). Esta característica é uma importante adaptação relacionada aos hábitos alimentares da espécie, que se baseiam preferencialmente na ingestão de esponjas marinhas (Meylan, 1988; McArthur e Barrows, 2004).

1.3 Biologia reprodutiva

As tartarugas marinhas são espécies de vida longa e, assim como os outros quelônios, apresentam crescimento lento (Hirth, 1997). Atingem a maturidade sexual tardiamente, estando aptas a reproduzirem-se por volta dos trinta anos (Bjorndal *et al.*, 2000). Parte do seu ciclo reprodutivo é terrestre, e isto as torna muito vulneráveis a predadores. Apenas 0,1 a 0,2% dos filhotes nascidos atingem a idade adulta, completando o ciclo biológico da espécie. Isto significa que de 1.000 filhotes

nascidos é provável que apenas um ou dois atinjam a maturidade sexual (Frazer, 1995).

Estes animais, assim como a maior parte dos répteis, apresentam reprodução sazonal, sendo este padrão reprodutivo estabelecido por hormônios esteroides (Owens, 1997; Hamann *et al.*, 2002a). Durante o período reprodutivo, que ocorre nos meses mais quentes do ano (Dodd, 1988), machos e fêmeas migram das áreas de alimentação para as áreas de reprodução (Hays *et al.*, 1999), em deslocamentos que, confirmados por telemetria por satélite, podem chegar a mais de 1500 km (Marcovaldi *et al.* 2010).

A liberação de estrógeno nas fêmeas estimula a vitelogênese através da produção da vitelogenina (proteína precursora da gema) (Heck *et al.*, 1997). Esta proteína é produzida no fígado, liberada na corrente sanguínea e absorvida pelos oócitos (Paolucci *et al.*, 2001). A vitelogênese tem início cerca de quatro a nove meses antes do início da migração dos animais para as áreas de reprodução (Wibbles *et al.*, 1990; Kwan 1994; Rostal *et al.*, 2001; Hamann *et al.*, 2002a), e os níveis de vitelogenina podem permanecer elevados por até cinco meses (Heck *et al.* 1997).

As fêmeas, em geral, procuram as praias para desovar durante a noite. Acredita-se que isso ocorra para evitar a exposição ao sol, e conseqüentemente, a altas temperaturas durante o processo de desova (Hamann *et al.*, 2003). Ela pode percorrer consideráveis distâncias até encontrar um local apropriado para desovar (Dodd, 1988). A presença de lixo ou de outros obstáculos na areia, assim como movimentação intensa, barulho ou iluminação artificial podem alterar seu trajeto, ou até mesmo interromper o processo de desova (Dodd, 1988; Miller, 1997).

Dentro de uma única temporada reprodutiva, uma fêmea pode realizar diversas posturas, com intervalos variáveis para cada espécie (Miller, 1997). O intervalo entre o retorno da fêmea ao mar após a postura de ovos e a tentativa seguinte de postura numa mesma temporada recebe o nome de período internidal (Limpus, 1985). Estudos indicam que fêmeas de tartarugas-de-pente podem desovar de uma a oito vezes numa temporada (Chan e Liew, 1999), com intervalos internidais de 15 dias em média (Mortimer e Bresson, 1999; Chacón, 2004). Apesar do grande número de estudos envolvendo aspectos reprodutivos de tartarugas marinhas, informações referentes às atividades durante os intervalos internidais

ainda são escassas e dificultam a avaliação do comportamento das fêmeas nas áreas de desova.

Além disso, as tartarugas marinhas são conhecidas por sua capacidade de retornar à mesma região onde nasceram para desovar – fenômeno conhecido como filopatria (Grassman, 1993). Ele é explicado através da teoria do “Imprinting químico” (Grassman, 1993; Lohmann *et al.*, 1990), que se baseia na capacidade dos filhotes memorizarem as características físico-químicas de sua região natal, após o nascimento, durante seu trajeto ao mar (Grassman, 1993).

Os ovos são depositados um a um ou em grupos de dois ou três, sendo que, no final da postura, eles podem preencher de 50% a 100% da cova (Dodd, 1988). O número de ovos por ninho irá variar de acordo com a espécie. Tartarugas-de-pente geralmente colocam mais de 100 ovos por ninho, e podem chegar, inclusive, a mais de 200 (Pilcher e Ali, 1999; Dobbs *et al.*, 1999). Os ovos depositados na areia permanecem em incubação por cerca de 50 a 60 dias (Chacón, 2004).

Assim como vários outros répteis, as tartarugas marinhas apresentam determinação sexual dependente da temperatura, com uma proporção igual de machos e fêmeas sendo produzida em uma temperatura pivotal específica (Mrosovsky e Pieau, 1991; Marcovaldi *et al.*, 1997; Wibbels *et al.*, 2003). Durante o processo de incubação, o sexo é definido no período termo-sensitivo, quando ocorre a diferenciação gonadal, entre o vigésimo e quadragésimo dia de incubação (Mrosovsky e Pieau, 1991; Larios, 2000). Com o aumento da temperatura em relação à temperatura pivotal, há o favorecimento da diferenciação da gônada em ovário proporcionalmente ao aumento da temperatura, podendo chegar a produção de 100% de fêmeas. No outro extremo, temperaturas mais amenas levam a razão sexual em favor dos machos. É válido reassaltar que condições meteorológicas extremas e mudanças climáticas ocasionadas pelo aquecimento global podem gerar desequilíbrios na razão sexual que poderiam ameaçar a sobrevivência dos indivíduos ou limitar o crescimento das populações (Hawkes *et al.*, 2009). Além disso, com um aumento nas temperaturas globais, as tartarugas marinhas podem passar a utilizar áreas de nidificação localizadas em latitudes mais altas com o intuito de reduzir a possível feminização (Paes e Lima *et al.*, 2012).

O nascimento é um processo bastante complexo, sendo iniciado quando os filhotes individualmente rompem a casca do ovo através de um espinho ou “carúncula” localizada na extremidade do bico córneo (Lohmann *et al.*, 1997;

McArthur *et al.*, 2004), iniciando a respiração pulmonar (McArthur *et al.*, 2004). Neste momento, observa-se uma depressão na areia acima do ninho, indicando que houve a eclosão daqueles ovos (Lohmann *et al.*, 1990; Goff *et al.*, 1998). Os filhotes cavam em direção à superfície e saem do ninho juntos, estimulados pela movimentação dos filhotes adjacentes, através da facilitação social (Carr e Hirth, 1960, Lohmann *et al.*, 1997). Geralmente, o nascimento ocorre durante a noite ou ao amanhecer (Davenport, 1997; Nagelkerken *et al.*, 2003) – comportamento explicado pela presença de temperaturas mais amenas e pelo menor risco de predação (Drake e Spotila 2002).

Após o nascimento, ao emergir na areia, os filhotes imediatamente dirigem-se ao mar (Godfrey e Barreto, 1995; Tuxbury e Salmon, 2005). Acredita-se que o principal mecanismo de orientação dos recém-nascidos seja visual, através da diferenciação da intensidade de luz (Tuxbury e Salmon, 2005), uma vez que eles tendem a se afastar de áreas escuras e a procurar áreas de brilho intenso ao longo do horizonte (Mrosovsky e Shettleworth, 1968). Desta forma, a presença de iluminação artificial nas praias de desova pode desorientar os filhotes, impedindo-os de chegar ao mar (Tuxbury e Salmon, 2005).

O momento do nascimento marca o início do fenômeno conhecido como “frenesi”, que se caracteriza por um período de alta atividade metabólica durante o qual os filhotes atravessam a faixa de areia, entram no mar e nadam compulsivamente para longe da costa (Carr and Ogren 1960; Davenport, 1997; Goff *et al.*, 1998; Nagelkerken *et al.*, 2003), reduzindo o risco de predação (Lohmann *et al.*, 1997; Nagelkerken *et al.*, 2003).



Figura 2: Fêmea de *E. imbricata* durante o processo de oviposição, em um trecho da Prainha, localizada no Centro de Lançamento da Barreira do Inferno (CLBI), no município de Parnamirim, RN.

1.4 Hipofagia ou afagia durante o período de nidação

Durante a temporada de nidação as fêmeas diminuem ou cessam completamente a ingestão de alimentos (Bjorndal, 1985; Tucker e Read, 2001; Hamann *et al.*, 2002b), possivelmente mobilizando suas reservas energéticas para fins reprodutivos (Hamann *et al.*, 2003). De acordo com Hays *et al.* (1999) esta ocorrência pode estar associada à redução do metabolismo. As fêmeas tornam-se hipoativas durante os intervalos internidais, aparentemente para poupar suas reservas energéticas para a nidação; e a busca por alimentos no período da postura implicaria num gasto energético que poderia não ser recompensado (Mortimer e Portier, 1989; Hays *et al.*, 1999).

O fato das fêmeas não se alimentarem nos períodos internidais reforça a ideia de que estes animais armazenam energia e nutrientes no período que antecede a cópula, enquanto ainda se encontram nas áreas de alimentação. A demanda de energia necessária para as diferentes etapas da reprodução pode variar individualmente, porém, de forma geral, é bastante alta e exige um grande esforço físico das fêmeas (Bjorndal, 1982). Santos *et al.* (2010), ao avaliar fêmeas de *E. imbricata* em nidação no Rio Grande do Norte, relatou que estes animais

apresentavam uma perda aproximada de 13% do seu peso ao término da temporada reprodutiva.

De acordo com Derickson (1976) e Hamann *et al.* (2002b) o armazenamento de lipídios em répteis está diretamente relacionado à reserva energética. Kwan (1994) avaliou o acúmulo de gordura em tartarugas verdes em diferentes estágios de vida. Os resultados demonstraram que fêmeas em atividade vitelogênica apresentam uma camada mais espessa de gordura sob o casco que fêmeas jovens e adultas fora de atividade reprodutiva. Segundo a autora, este acúmulo de tecido gorduroso funciona como um reservatório de energia para a reprodução.

A hipofagia observada durante a temporada tem sido explicada por diversas teorias. Carr *et al.* (1974), que avaliaram uma população de fêmeas de *Chelonia mydas* em processo de nidação na ilha de Ascensão, propuseram que as fêmeas reduziram a ingestão de alimentos devido à baixa proliferação de algas na região. Meylan (1978) sugeriu que o apetite de répteis, assim como em humanos, seja regulado por mecanismos endócrinos. No entanto, não há dados na literatura que confirmem esta teoria.

1.5 Regulação da ingestão alimentar

A regulação da ingestão de alimentos é um mecanismo fisiológico que visa manter o equilíbrio entre a tríade consumo, armazenamento e gasto energético, estando, por conseguinte, associado à homeostase energética do organismo (Leite e Brandão-Neto, 2009). Esta regulação é feita através de complexos circuitos neuronais envolvendo o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso entérico (SNE). O SNC regula a ingestão de alimentos através do centro da fome e do centro da saciedade, ambos localizados no hipotálamo (Broberger, 2005). Estas áreas, uma vez estimuladas, integram uma série de sinais que controlam a ingestão alimentar e o gasto energético (Simpson *et al.*, 2009). O SNE, por sua vez, apresenta uma grande quantidade de sensores e receptores que atuam na sinalização entre o trato gastrointestinal e o cérebro (Leite e Brandão-Neto, 2009).

Fatores neuroendócrinos vêm sendo apontados como os mais relevantes para a manutenção da homeostase energética dos organismos (Simpson *et al.*, 2009). Sinais gerados através da interação com neurônios presentes nos núcleos hipotalâmicos são capazes de aumentar a termogênese e estimular a saciedade em

momentos de muita oferta energética ou de reduzir a termogênese e estimular a fome em momentos de privação (Broberger, 2005; Simpson *et al.*, 2009). Entre esses mediadores, os mais importantes são a leptina e a grelina (Arsenault *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2009) ambos já isolados de diversas classes de vertebrados, incluindo os répteis (Niewiarowski *et al.*, 2000; Kaiya *et al.*, 2004).

1.5.1 Leptina

A leptina é uma proteína composta por 167 aminoácidos, sendo produzida principalmente no tecido adiposo. O nome leptina vem do grego *leptos*, que significa magro (Romero e Zanesco, 2006). Ela é responsável pelo controle da ingestão de alimentos através da inibição da formação de neuropeptídeos orexígenos, como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada à agouti (AGRP – *agouti-related protein*), e também pelo aumento da expressão de neuropeptídeos anorexígenos (hormônio estimulante de melanócitos – MSH, hormônio liberador de corticotrofina – CRH, e substâncias sintetizadas em resposta à anfetamina e cocaína), no hipotálamo (Friedman e Halaas, 1998). Em mamíferos, além de promover a redução da ingestão de alimentos, incrementa o metabolismo energético e está envolvida na regulação da função neuroendócrina e do metabolismo da glicose e de gorduras (Romero e Zanesco, 2006). A concentração plasmática de leptina está parcialmente relacionada ao tamanho da massa de tecido adiposo presente no organismo. A elevação deste hormônio no plasma indica que as reservas de gordura corporal estão adequadas. Uma vez notificado, o cérebro suprime o apetite, pela inibição da liberação do NPY e pela estimulação de peptídeos anorexígenos (Arsenault *et al.*, 2007). Por outro lado, a diminuição da secreção de leptina reduz o gasto energético, reduz a secreção de hormônios tireoidianos e de gonadotrofinas e aumenta a secreção de cortisol, (Jéquier e Tappy, 1999) levando ao acúmulo central de gordura (Damiani e Damiani, 2011). A liberação de leptina pode ser controlada por diversas substâncias, como a insulina e citocinas pró-inflamatórias que promovem uma elevação do hormônio no plasma. Inversamente, a testosterona, as catecolaminas e a exposição ao frio, reduzem a síntese de leptina (Romero e Zanesco, 2006).

A literatura evidencia ainda que a leptina pode estar envolvida com a função reprodutiva (Paolucci *et al.*, 2001). O hormônio tem sido encontrado fora do sistema nervoso central (Tartaglia *et al.*, 1995), mais especificamente em ovários e

testículos, podendo atuar como um sinal metabólico para o tecido reprodutivo (Kalra, 1993). Paolucci *et al.* (2001) reportaram a presença de leptina no plasma, fígado e ácidos graxos de fêmeas de lagartos da espécie *Podarcis sicula* e sugeriram que o hormônio pode estar envolvido no controle da função reprodutiva nestes animais.

1.5.2 Grelina

A grelina foi identificada pela primeira vez por Kojima e colaboradores em 1999. O nome origina-se da palavra *ghre*, que corresponde à palavra *grow*, cujo significado é crescimento (Romero e Zanesco., 2006). Além de ser uma substância orexígena, é um ligante endógeno para o receptor secretagogo de GH (GHS-R), estimulando a liberação do hormônio do crescimento (GH) (Zhao *et al.*, 2010). Recentemente foi descoberta em diferentes espécies de vertebrados, entre eles, anfíbios, aves, peixes e répteis (Kaiya *et al.*, 2008). De acordo com dados na literatura, o hormônio é um peptídeo composto por 28 aminoácidos em humanos (Arsenault *et al.*, 2007) e anfíbios (Kaiya *et al.*, 2001), 26 aminoácidos em peixes cartilagosos (Kawakoshi *et al.*, 2007) e 25 aminoácidos em quelônios (Kaiya *et al.*, 2004). A grelina é sintetizada predominantemente em células da mucosa gástrica e em menores quantidades no intestino, pâncreas, hipotálamo, rins e pituitária (Korbonits *et al.*, 2004). Ao atingir a circulação, ela induz a sensação de fome através da estimulação da liberação do NPY e da AGRP, ambos localizados no hipotálamo (Arsenault *et al.*, 2007). Estudos com humanos e roedores evidenciaram que os níveis plasmáticos de grelina se elevam pouco antes das refeições e diminuem de 60 a 120 minutos após a ingestão de alimentos (Korbonits *et al.*, 2004). Pesquisas recentes comprovaram que o jejum induz a elevação dos níveis séricos de grelina em determinadas espécies de anfíbios (Kaiya *et al.*, 2001), peixes (Unniappan *et al.*, 2004) e aves (Kaiya *et al.*, 2008). Goldstein *et al.* (2011), foi além, e sugeriu que a grelina está diretamente ligada à manutenção do metabolismo glicêmico durante o jejum. De acordo com os autores, o hormônio impede a depleção dos níveis de glicose no sangue, mantendo níveis basais do açúcar durante restrições calóricas prolongadas. Apesar da grelina ser um hormônio em evidência e de importância crucial no mecanismo de controle energético, ainda não há relatos na literatura sobre os seus efeitos na regulação do comportamento alimentar de répteis.

2 OBJETIVOS

- ❖ Medir os níveis de leptina e grelina no soro de fêmeas de *E. imbricata* ao longo do processo de nidação.
- ❖ Determinar parâmetros bioquímicos indicadores do estado nutricional de *E. imbricata* ao longo do processo de nidação.
- ❖ Correlacionar o índice de massa corpórea, os níveis séricos de grelina e leptina e os parâmetros bioquímicos indicadores do estado nutricional de *E. imbricata* no período em questão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo

O monitoramento foi realizado no município de Parnamirim, no estado do Rio Grande do Norte ($5^{\circ} 54' 56''\text{S}$ e $35^{\circ} 15' 46''\text{W}$) na temporada 2010/2011. A área em questão faz parte do Centro de Lançamento da Barreira do Inferno, primeira base da Força Aérea Brasileira para lançamentos de foguetes do Brasil. Compreende as praias do Alagamar, Morro Branco e Prainha (Figura 3).

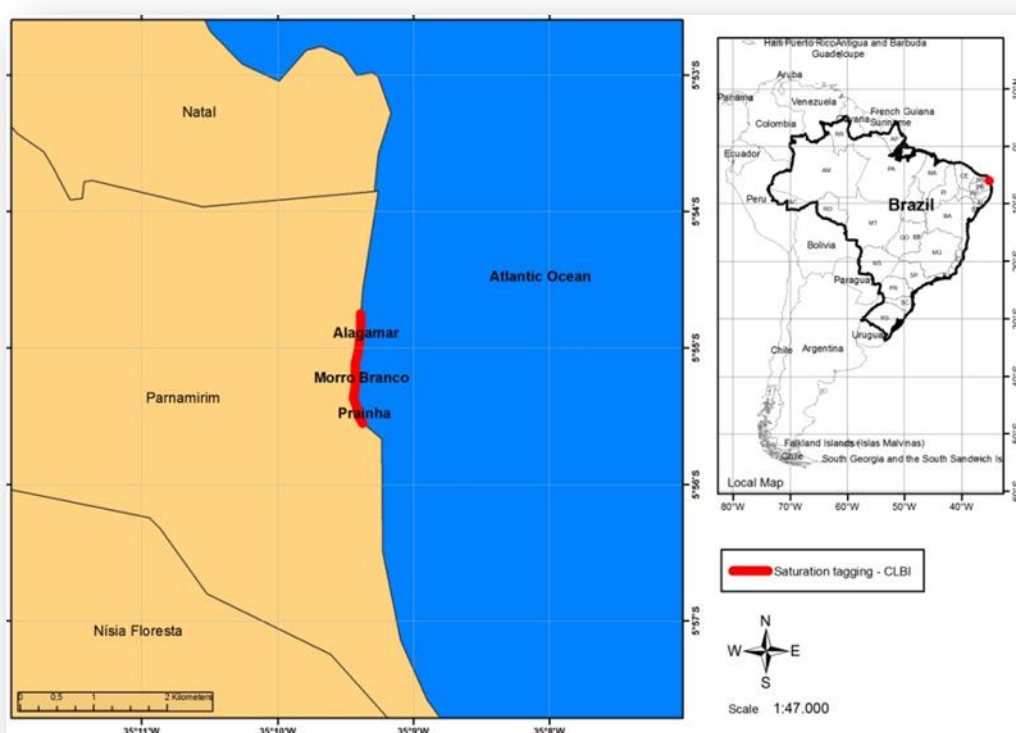


Figura 3: Área monitorada durante o período de dezembro de 2010 a abril de 2011, situada no Centro de Lançamento da Barreira do Inferno, no município de Parnamirim, no estado do Rio Grande do Norte ($5^{\circ} 54' 56''\text{S}$ e $35^{\circ} 15' 46''\text{W}$). A área compreende as praias do Alagamar, Morro Branco e Prainha e faz parte da área de atuação da Base de Natal (CLBI) do Projeto TAMAR-ICMBio.

A área monitorada na temporada 2011/2012 tem aproximadamente 4 km de extensão e está situada no litoral sul do município de Tibau do Sul, no estado do Rio Grande do Norte ($6^{\circ} 13' 40''\text{S}$ e $35^{\circ} 03' 05''\text{W}$). Compreende as praias do Chapadão, Minas e Sibaúma e faz parte da área de atuação da Base de Pipa do Projeto TAMAR-ICMBio (Figura 4).

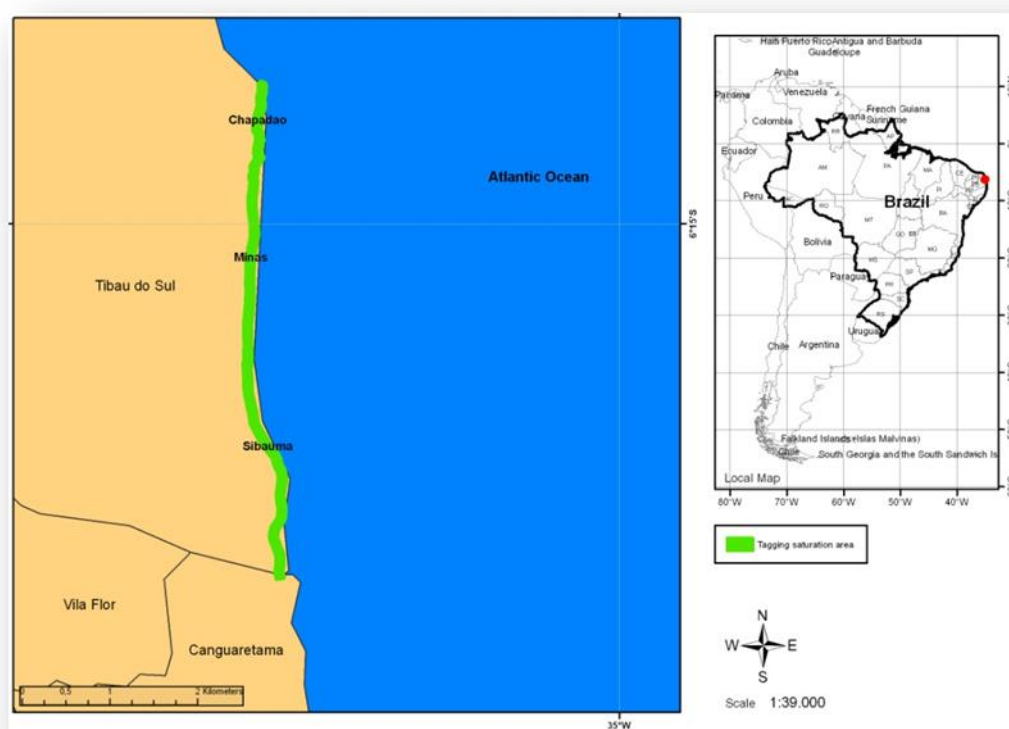


Figura 4: Área monitorada durante o período de dezembro de 2011 a abril de 2012, situada no litoral sul do município de Tibau do Sul, no estado do Rio Grande do Norte ($6^{\circ} 13' 40''\text{S}$ e $35^{\circ} 03' 05''\text{W}$). A área compreende as praias do Chapadão, Minas e Sibaúma e faz parte da área de atuação da Base de Pipa do Projeto TAMAR-ICMBio.

3.2 Animais

Foram amostradas 21 fêmeas da espécie *E. imbricata* na temporada reprodutiva de 2010/2011 e 20 na temporada de 2011/2012 (n total = 41 animais). O monitoramento noturno da praia foi intensivo no trecho pré-determinado e teve início às 19h00 e término às 5h00. Os animais foram avaliados durante a desova, tendo sido submetidos aos processos de marcação (Figura 5), biometria e pesagem (Figura 6). Estes procedimentos foram iniciados na etapa final da postura dos ovos, com o objetivo de minimizar as interferências externas. As fêmeas foram marcadas com anilhas de liga metálica inonel (# 681 National Band and Tag Company) aplicadas junto à primeira escama proximal na região da axila em ambas as nadadeiras anteriores. O uso destas marcas permitiu a identificação dos animais recapturados e desta forma, foi possível obter amostras seriadas do mesmo

indivíduo. O material utilizado para pesagem das tartarugas consistia numa trave composta por três barras de aço, dois calços de madeira e uma balança digital com capacidade máxima de 500 kg e precisão de ± 100 g (Oswaldo Filizola, Técnica Industrial Oswaldo Filizola Ltda., São Paulo, Brasil). A tartaruga era colocada sobre uma lona de tecido reforçada acoplada a hastes de madeira de 10 cm² de espessura e 2,5 m de comprimento. A lona era então erguida, sendo presa à trave de aço através de cordas e um mosquetão. Três pessoas participavam do processo, sendo que duas erguiam as hastes da lona com a tartaruga e uma verificava o peso do animal (Figura 6).



Figura 5: Marcação de fêmea com alicate próprio e anilhas de liga metálica inconfel.



Figura 6: Processo de pesagem da fêmea de *E. imbricata* na praia de Morro Branco, Centro de Lançamento da Barreira do Inferno, município de Parnamirim, RN.

3.3 Amostras

As coletas de sangue foram realizadas por venopunção do seio cervical dorsal. Uma agulha de calibre 40x12 acoplada a uma seringa plástica descartável de 10 mL foi inserida perpendicularmente à região dorsal do pescoço e lateralmente e paralelamente à linha média do mesmo, numa angulação de 45 graus (figuras 7 e 8). Não houve evidência de hemólise ou de contaminação linfática.

Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram divididas em dois frascos, sendo um sem anticoagulante e o outro com heparina sódica. As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas a 1800 xg (4000 rpm) durante 10 minutos (Centribio, Modelo 80-2B). O soro foi separado em até 15 minutos após a coleta e dividido em alíquotas. Parte deste soro foi acidificada com ácido clorídrico a 1N, tratada com o inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) e congelada a -20 °C para as dosagens de grelina. O soro restante foi imediatamente congelado a -20 °C (sem tratamento prévio) para análises bioquímicas e dosagens de leptina. O hematócrito foi determinado por meio de uma centrífuga de micro-hematócrito (Centribio, modelo H-240).



Figura 7: Coleta de sangue de *E. imbricata* através de venopunção do seio cervical dorsal, praia do Chapadão, distrito de Pipa, Tibau do Sul, RN.



Figura 8: Coleta de sangue de *E. imbricata* através de venopunção do seio cervical dorsal, na Prainha, no Centro de Lançamento da Barreira do Inferno (CLBI), Parnamirim, RN.

3.4 Ensaios da leptina e da grelina

Inicialmente foram adquiridos *kits* de ensaio de leptina e grelina por imunoadsorção enzimática (ELISA-SPIbio®). A técnica de ELISA baseia-se na interação entre antígenos e anticorpos específicos. Na metodologia do *kit* de leptina, anticorpos específicos contra leptina humana encontram-se aderidos a placa de poliestireno. Amostras dos soros são adicionadas de modo a formarem-se reações antígeno-anticorpo em sequência e a presença específica da leptina é mensurada por ação da peroxidase de rabanete (ligada ao último anticorpo) sobre tetrametilbenzidina.

No caso da grelina, anticorpos monoclonais contra o domínio C-terminal do hormônio em questão são aderidos aos poços da placa de poliestireno e os soros a serem testados são adicionados às placas para a formação de complexos imunes. Após esta primeira etapa, um conjugado AChE–Fab` que reconhece a parte N-terminal da grelina, é adicionado. Após a lavagem, a atividade da colinesterase ligada é medida pelo aparecimento da cor amarela, indicando a quantidade de grelina presente nas amostras.

Apesar de vários autores citarem a utilização destes testes para a mensuração de grelina e leptina para várias espécies de vertebrados não humanos, os aqui utilizados não permitiram a obtenção do perfil hormonal das tartarugas marinhas. É válido ressaltar que o processamento das amostras foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Após diversas tentativas sem sucesso, entramos em contato com os autores do artigo “Structural determination and histochemical localization of ghrelin in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*”, Kaiya *et al.* (2004). Apesar da grelina e leptina humanas e as de quelônios apresentarem-se bastante semelhantes na porção N-terminal, apresentam-se extremamente heterólogas quanto à região C-terminal. Possivelmente, este fato impossibilitou a detecção de ambos os hormônios pela metodologia escolhida. Esta idéia foi apoiada pelo Dr. Kaiya, do Instituto de Pesquisa do Centro Nacional de Cardiologia de Fujishirodai, em Osaka, no Japão, e sua sugestão foi que as dosagens de grelina e leptina em vertebrados não humanos devem ser feitas através de radioimunoensaio, uma vez que este método utiliza apenas a porção N-terminal dos hormônios.

A concentração de leptina e de grelina no soro foi, portanto, determinada através do método de radioimunoensaio, sendo utilizados *kits* da Linco[®] (Linco[®] Research, St. Charles, Missouri, EUA) para leptina e grelina humanas respectivamente. Estes *kits* são capazes de detectar os hormônios em diversas espécies de vertebrados não humanos e, portanto, são considerados *kits* multiespécie. O princípio do radioimunoensaio baseia-se na competição entre um antígeno marcado isotopicamente (traçador) e o mesmo antígeno não marcado (padrão ou desconhecido) pelos sítios de ligação de seus anticorpos específicos, formando um complexo antígeno-anticorpo. Neste sistema, as concentrações de traçador e de antígeno são constantes, e as curvas de calibração são obtidas através da adição de concentrações crescentes de antígeno padrão. Consequentemente, a proporção de complexo radioativo formado (antígeno marcado-anticorpo) é inversamente proporcional à concentração de antígeno não marcado (leptina e grelina) nas amostras. A radioatividade emitida pela amostra é medida através de um contador de raios gama, avaliando-se desta forma, a concentração hormonal da amostra.

3.5 Análises bioquímicas

Foram determinados os níveis séricos de glicose, uréia, ácido úrico, triglicerídeos (TG), colesterol total, LDL (lipoproteína de baixa densidade), HDL (lipoproteína de alta densidade) e VLDL-c (lipoproteína de densidade muito baixa), fósforo, cálcio, potássio, sódio, e proteína total. Para determinação dos níveis séricos de uréia, ácido úrico, colesterol, HDL e triglicerídeos, foi utilizado o aparelho da marca Ciba Express 550[®] (linha Ciba Corning Ltda.). Para todos os testes foram utilizados kits bioquímicos da marca Labtest[®], fornecidos pela empresa Enzipharma e o processamento das amostras foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. A VLDL foi calculada através da fórmula $VLDL = TG / 5$. As dosagens de sódio e potássio foram realizadas no fotômetro de chama e os valores de cálcio e ferro foram obtidos através do aparelho de bioquímica semiautomático Bio2000[®] (linha Bio Plus). Os valores da glicose foram avaliados no momento da coleta, através de um glucômetro (One Touch Ultra 2[®]).

Para avaliação de dano tecidual foram determinados os níveis de atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamil transferase (GGT) no soro, para isso foi utilizado o aparelho da marca Ciba Express 550[®] (linha Ciba Corning Ltda.).

3.6 Análises estatísticas

Foram calculados a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação e a mediana para os valores referentes ao peso, hematócrito e parâmetros bioquímicos analisados. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$.

Para avaliar possíveis tendências nos parâmetros avaliados, foram realizadas comparações estatísticas por meio de um teste não paramétrico de Wilcoxon, entre a primeira postura, usada como controle, e as posturas seguintes. Este teste foi utilizado apenas para animais com duas ou mais desovas.

Com o objetivo de comprovar estatisticamente o quadro de proteólise nas fêmeas, foi utilizada a correlação de Spearman entre os valores Δ (obtidos pelo coeficiente angular da reta de regressão, com número de desovas variando de 2 a 5 vezes) de ureia e de proteínas totais por desova.

Para avaliar as correlações entre as mudanças nos níveis de grelina e leptina, alterações do peso, parâmetros bioquímicos e valores de hematócrito ao longo do período, foi utilizado o coeficiente de Spearman. O nível de significância para os testes foi de $\alpha = 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software SPSS versão 17 (SPSS Inc, Chicago).

4 RESULTADOS

Quarenta e uma tartarugas-de-pente foram amostradas pelo menos uma vez no presente estudo, e destas, 27 tartarugas foram amostradas duas ou mais vezes durante oviposições subsequentes. O IMC médio das fêmeas após a primeira postura foi de $82,2 \pm 11,7$ kg. As tartarugas apresentaram uma redução do IMC que variou entre 4,4 e 10,1 kg (Tabela 1) ao longo de ambas as temporadas reprodutivas estudadas.

Tabela 1: Estatística descritiva do peso (kg) de fêmeas da espécie *E. imbricata* durante as temporadas reprodutivas de 2010/2011 e 2011/2012 no Rio Grande do Norte, Brasil. Números negativos indicam perda de massa corpórea em kg.

Estatística descritiva	Peso, segundo a desova					Variação em relação à 1ª desova			
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	2ª	3ª	4ª	5ª
n	41	27	14	7	3	27	14	7	3
Média	82.2	78.4	80.6	80.3	81.0	-4.4	-7.8	-9.5	-10.1
Desvio-padrão	11.7	10.6	8.3	8.2	1.8	3.7	4.7	3.6	3.5
Mínimo	60.2	58.0	65.6	63.9	79.5	-18.5	-18.3	-15.1	-13.4
1º quartil	72.8	69.6	74.6	75.1	79.5	-5.6	-10.4	-11.0	-13.4
Mediana	82.9	79.2	84.2	83.4	80.4	-3.6	-7.1	-10.4	-10.5
3º quartil	91.8	88.4	86.2	85.6	83.0	-1.6	-4.1	-7.3	-6.4
Máximo	103.4	92.3	90.5	87.2	83.0	-0.9	-1.2	-3.8	-6.4
P-valor pelo teste de Wilcoxon (em relação à 1ª desova)						< 0,001	< 0,001	0.016	0.250 ^a

^a Não significativo devido ao número de indivíduos que desovaram cinco vezes (n = 3).

A maior parte dos parâmetros bioquímicos analisados apresentou um baixo coeficiente de variação, com exceção da grelina e da leptina, que apresentaram ampla variação ao longo de ambas as temporadas de nidadao (Tabela 2).

Ao longo das temporadas, observou-se uma redução gradativa nos seguintes parâmetros bioquímicos: triglicérides, colesterol, VLDL, proteína total, globulina, albumina e ácido úrico. Os níveis séricos de uréia, por sua vez, apresentaram elevação gradual ao longo do período.

As comparações estatísticas entre as primeiras posturas, utilizadas como controle, e as posturas seguintes em cada temporada reprodutiva, foram feitas através do teste não paramétrico de Wilcoxon (Figura 9A-H). O teste foi significativo

para todas as tartarugas ($P < 0,05$), exceto para os animais que desovaram cinco vezes, devido ao pequeno tamanho da amostra ($n = 3$).

O gráfico de dispersão entre os valores Δ de ureia e de proteínas totais por desova (Figura 10) mostra uma correlação significativamente negativa entre as variáveis, onde os níveis de ureia tendem a aumentar, ao passo que, os níveis de proteína total tendem a diminuir. A correlação de Spearman, portanto, evidenciou a presença de catabolismo protéico muscular durante o período de nidação.

Tabela 2: Estatística descritiva dos parâmetros bioquímicos séricos, níveis hormonais e hematócrito de fêmeas de *E. imbricata* ($n = 41$) durante as temporadas reprodutivas de 2010/2011 e 2011/2012 no Rio Grande do Norte, Brasil. Concentrações referentes a primeira desova de cada indivíduo.

Parâmetros bioquímicos	Estatística descritiva					
	Média	Desvio-padrão (DP)	CV ^a	Mínimo	Mediana	Máximo
Triglicédeos (mg/dl)	1033	202	19.6%	693	989	1536
Colesterol (mg/dl)	287	42	14.8%	224	275	395
VLDL (mg/dl)	201	44	21.8%	138	193	307
LDL (mg/dl)	53.8	7.1	13.2%	41.0	53.0	68.0
HDL (mg/dl)	32.5	10.9	33.6%	16.0	32.0	63.0
Proteínas (g/dl)	5.45	0.63	11.6%	4.30	5.60	6.70
Globulina (g/dl)	3.34	0.40	12.1%	2.70	3.30	4.00
Albumina (g/dl)	2.11	0.43	20.5%	1.30	2.10	2.80
Ureia (mg/dl)	20.6	4.2	20.4%	12.0	21.0	28.0
Glicose (mg/dl)	98.6	14.6	14.9%	73.0	97.0	129.0
Cálcio (mg/dl)	11.6	1.5	12.8%	9.0	11.6	14.6
Fósforo (mg/dl)	11.3	1.4	12.3%	8.5	11.1	13.9
Sódio (mEq/l)	139.6	3.5	2.5%	132.0	140.0	145.0
Potássio (mEq/l)	5.09	0.76	15.0%	3.90	4.90	7.70
Ácido úrico (mg/dl)	0.95	0.17	18.4%	0.60	0.90	1.30
ALT (U/L)	6.6	2.4	37.0%	2.0	6.0	13.0
AST (U/L)	55.4	7.1	12.8%	42.0	55.0	69.0
FA (U/L)	15.9	3.7	23.2%	7.0	16.0	24.0
GGT (U/L)	10.8	2.4	22.4%	7.0	11.0	15.0
Grelina (pg/ml)	65.3	44.0	67.4%	7.5	51.1	189.9
Leptina (ng/ml)	1070	1053	98.5%	143	862	6199
Hematócrito (%)	39.4	2.9	7.3%	34.0	40.0	44.0

^a CV = coeficiente de variação = Desvio-padrão / média

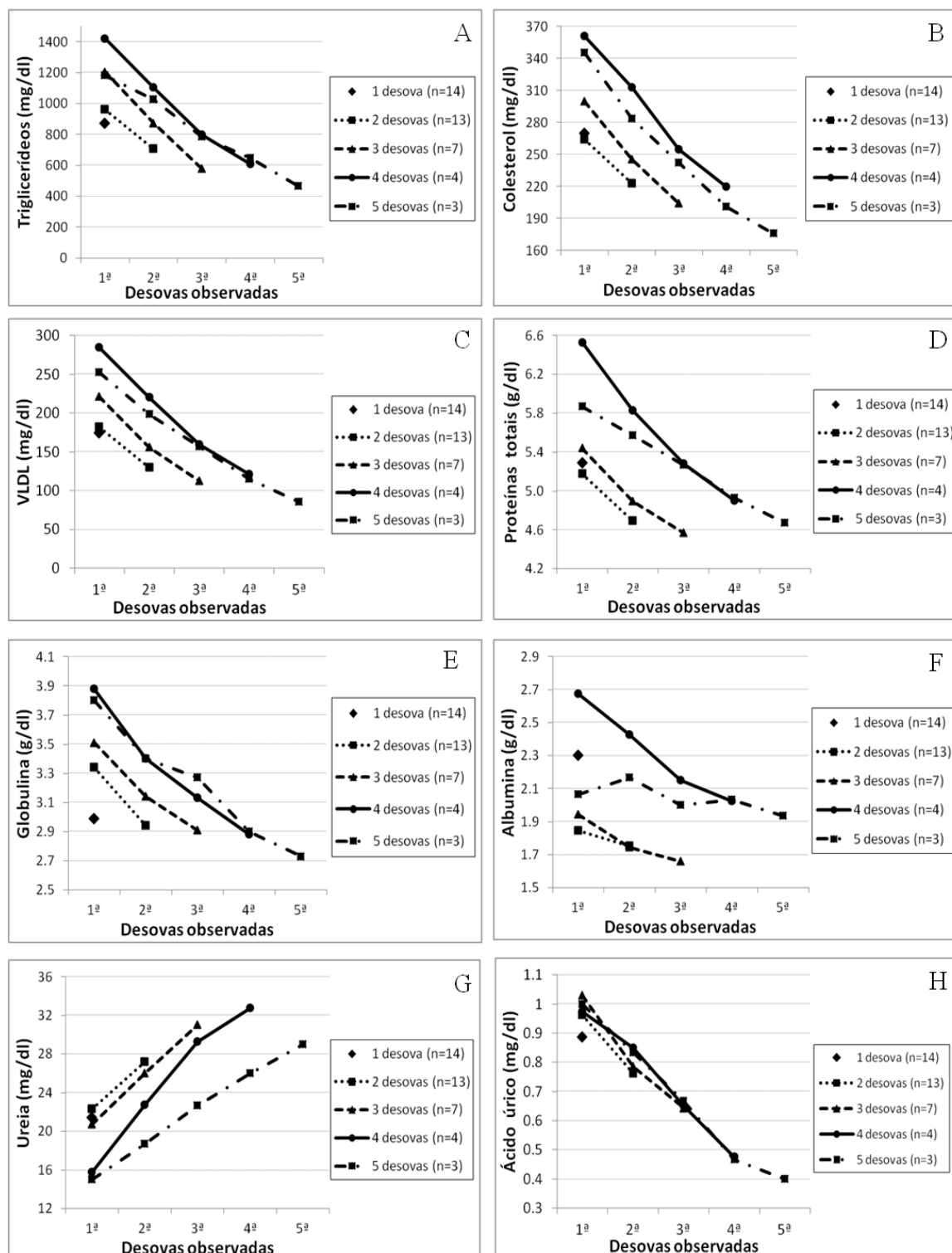


Figura 9: Variação nas concentrações de triglicerídeos, colesterol, VLDL, proteínas totais, globulina, albumina, ureia e ácido úrico no soro de fêmeas de *E. imbricata* ao longo das temporadas reprodutivas de 2010/2011 e 2011/2012. Os valores foram agrupados segundo o número de desovas. Os valores de triglicerídeos (A), colesterol (B), de VLDL (C), proteína total (D), globulina (E), albumina (F), ureia (G) e ácido úrico (H) variaram significativamente com o número crescente de desovas ($P < 0,05$ pelo teste de Wilcoxon para todos os grupos, exceto para as tartarugas que desovaram 5 vezes).

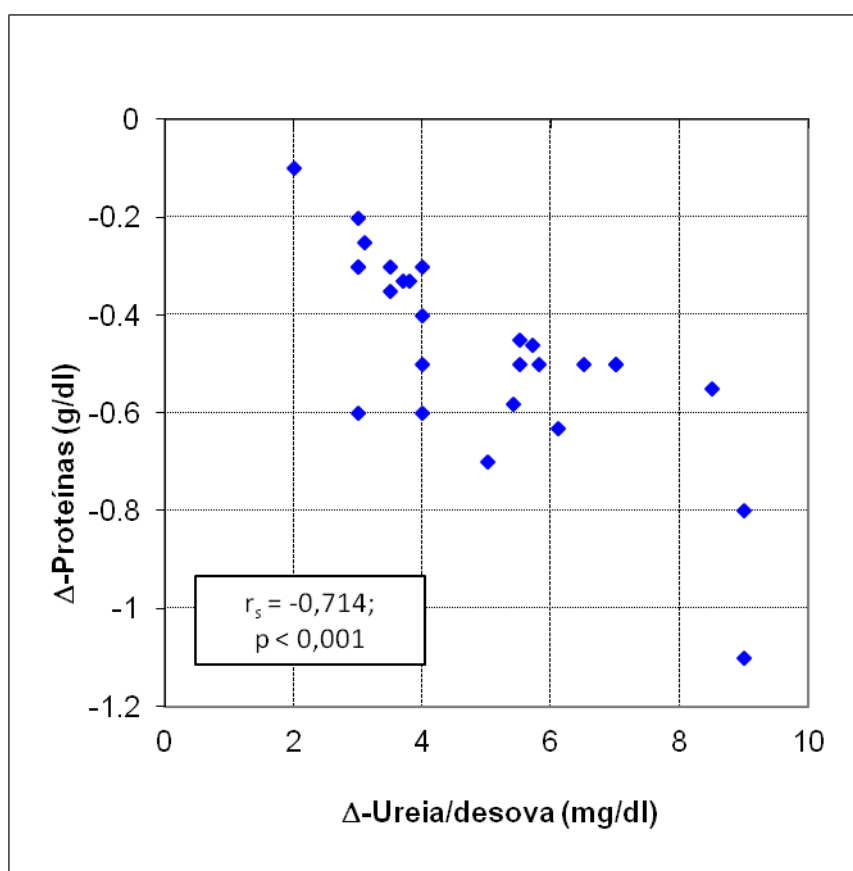


Figura 10: Diagrama de dispersão e correlação de Spearman entre as taxas de variação (Δ) de ureia e de proteínas totais por desova em fêmeas de *E. imbricata* ($n = 27$) ao longo das temporadas reprodutivas de 2010/2011 e 2011/2012. Foram consideradas somente as fêmeas com 2 ou mais desovas por temporada reprodutiva. O diagrama mostra uma correlação negativa entre as variáveis – os níveis séricos de ureia tendem a aumentar ao longo do período com a diminuição dos níveis séricos de proteínas totais, indicando um quadro de catabolismo proteico muscular. As taxas (Δ) foram obtidas pelo coeficiente angular da reta de regressão, com número de desovas variando de 2 a 5 vezes.

Os níveis de cálcio, fósforo, sódio e potássio também diminuíram significativamente com o aumento do número de desovas ($P < 0,05$), exceto para as tartarugas que desovaram 5 vezes, devido ao pequeno tamanho da amostra ($n = 3$) (Figura 11A-D).

Os níveis séricos de glicose, LDL e HDL, assim como os valores de hematócrito e as atividades enzimáticas de ALT, AST, FA e GGT (Figura 12) não variaram de forma linear ao longo de cada temporada de nidação. Foram observadas variações, entretanto, estas não seguiram uma tendência.

A concentração de leptina no soro variou entre 143 e 6199 ng / ml. Os valores mais elevados foram observados no início do período reprodutivo e diminuíram significativamente até o final da temporada (Figura 13). A concentração de grelina, por sua vez, variou entre 7,5 e 189,9 pg / ml. Seus níveis séricos foram expressivamente mais baixos no início do período reprodutivo e aumentaram significativamente até o final da temporada (Figura 13).

Os resultados das correlações de Spearman entre as mudanças nos níveis de grelina e leptina, alterações do peso, parâmetros bioquímicos e valores de hematócrito ao longo da temporada de nidação encontram-se descritos na tabela 3.

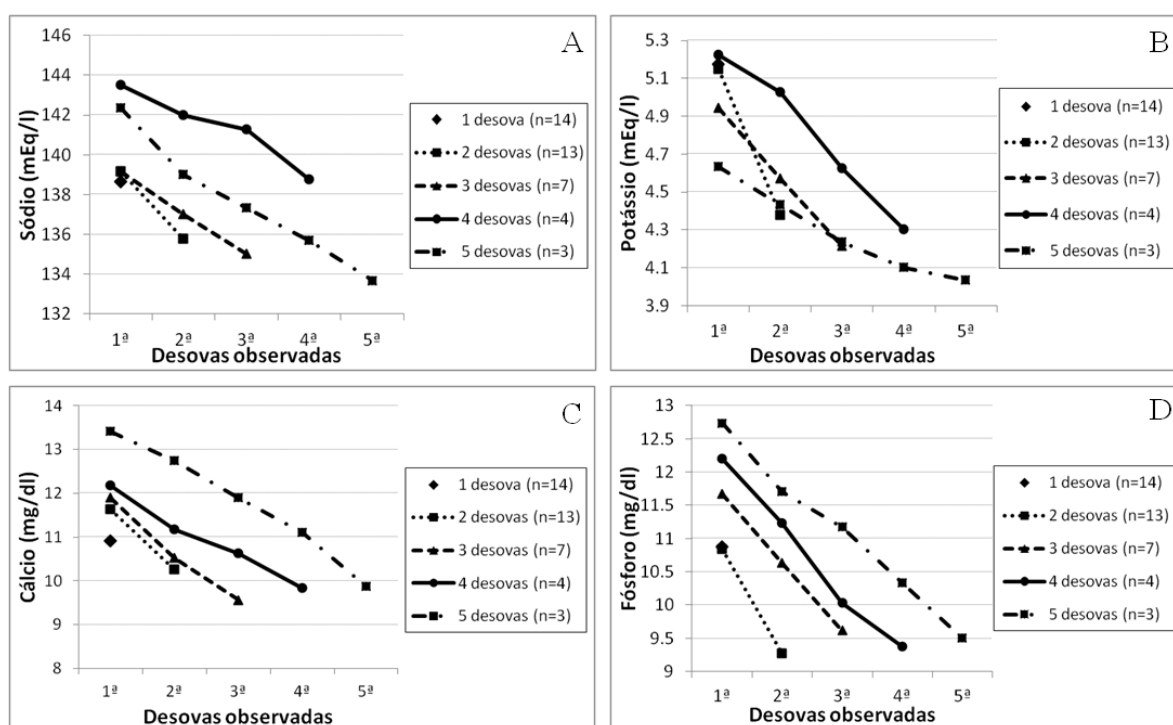


Figura 11: Variação nas concentrações de sódio, potássio, cálcio e fósforo no soro de fêmeas de *E. imbricata* ao longo das temporadas reprodutivas de 2010/2011 e 2011/2012. Os valores foram agrupados segundo o número de desovas. Os valores de sódio (A), potássio (B), de cálcio (C) e de fósforo (D) variaram significativamente com o número crescente de desovas ($P < 0,05$ pelo teste de Wilcoxon para todos os grupos, exceto para as tartarugas que desovaram cinco vezes).

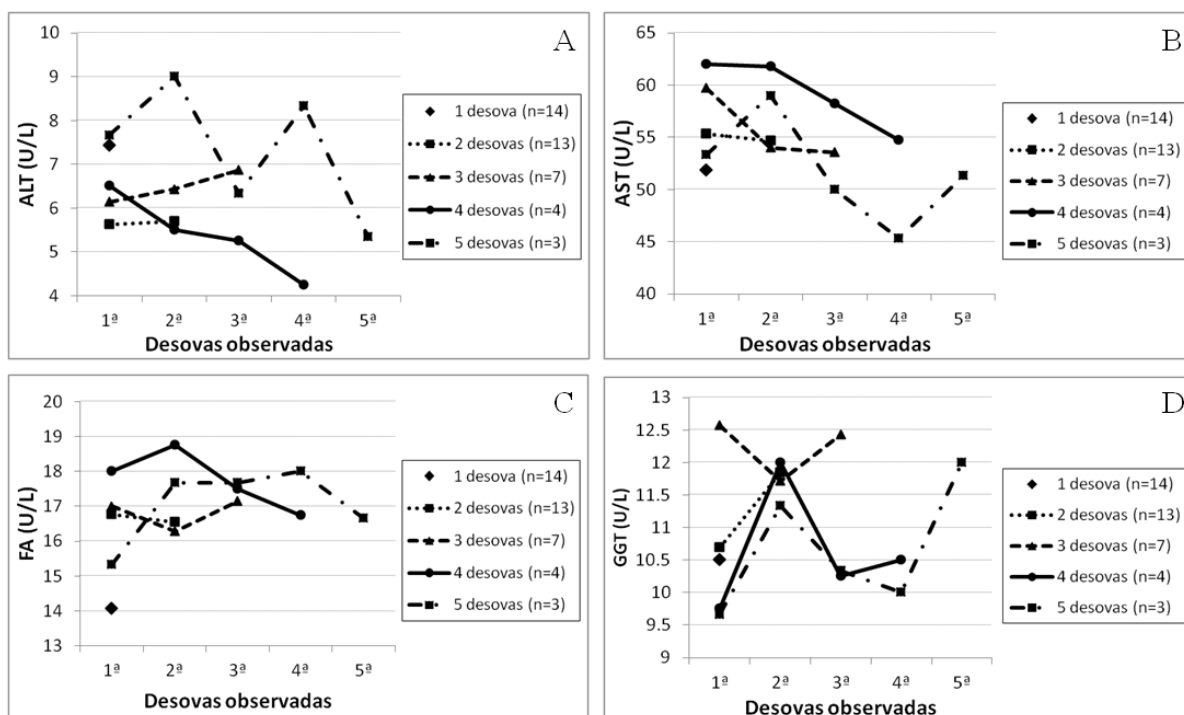


Figura 12: Variação nas concentrações de ALT, AST, FA e GGT no soro de fêmeas de *E. imbricata* ao longo das temporadas reprodutivas de 2010/2011 e 2011/2012. Os valores foram agrupados segundo o número de desovas. Não houve variação significativa dos níveis séricos enzimáticos com o número crescente de desovas ($P < 0,05$ pelo teste de Wilcoxon para todos os grupos, exceto para as tartarugas que desovaram cinco vezes).

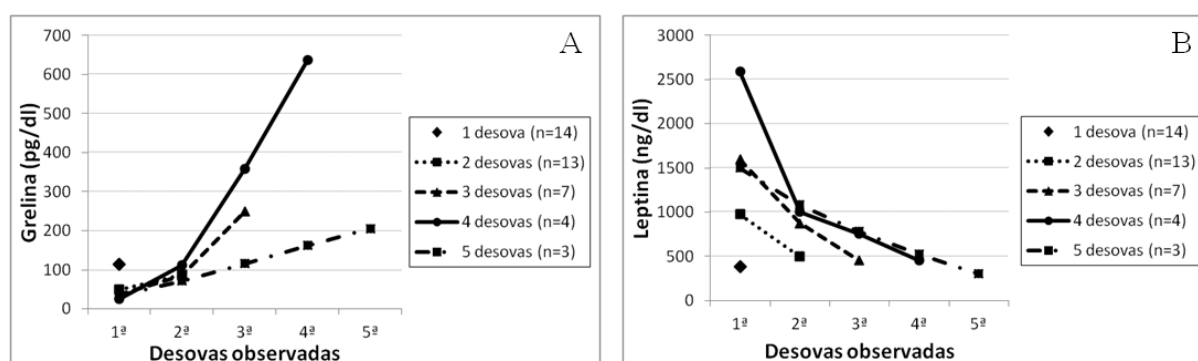


Figura 13: Variação nas concentrações de leptina e grelina no soro de fêmeas de *E. imbricata* ao longo das temporadas reprodutivas de 2010/2011 e 2011/2012. Os valores foram agrupados segundo o número de desovas. Os valores de grelina (A) e de leptina (B) variaram significativamente com o número crescente de desovas ($P < 0,05$ pelo teste de Wilcoxon para todos os grupos, exceto para as tartarugas que desovaram cinco vezes).

Tabela 3: Correlação entre as taxas de variação (Δ)^a dos níveis séricos de grelina e leptina, peso e dos parâmetros bioquímicos em tartarugas-de-pente com duas ou mais desovas, durante as temporadas de 2010/2011 e 2011/2012, no Rio Grande do Norte, Brasil (n = 27). Correlações significativas estão indicadas em negrito.

Variação por desova	Correlação com Δ^a -Grelina/desova		Correlação com Δ^a -Leptina/desova	
	Coefficiente de Spearman (r_s)	p-valor	Coefficiente de Spearman (r_s)	p-valor
Δ -Peso/desova	-0.233	0.242	0.497	0.008
Δ -Triglicérides/desova	-0.194	0.333	0.548	0.003
Δ -Colesterol/desova	-0.285	0.149	0.529	0.005
Δ -VLDL/desova	-0.154	0.444	0.640	< 0,001
Δ -LDL/desova	-0.087	0.668	0.116	0.563
Δ -HDL/desova	-0.244	0.221	0.076	0.707
Δ -Proteínas/desova	0.052	0.796	0.426	0.027
Δ -Globulina/desova	0.373	0.056	0.045	0.824
Δ -Albumina/desova	-0.159	0.427	0.418	0.030
Δ -Ureia/desova	0.078	0.699	-0.291	0.141
Δ -Glicose/desova	-0.182	0.365	0.098	0.628
Δ -Cálcio/desova	0.065	0.747	0.167	0.405
Δ -Fósforo/desova	-0.059	0.771	0.208	0.298
Δ -Sódio/desova	-0.092	0.649	0.124	0.537
Δ -Potássio/desova	-0.258	0.194	0.113	0.574
Δ -Ácido úrico/desova	0.015	0.939	0.276	0.164
Δ -ALT/desova	0.038	0.852	0.074	0.714
Δ -AST/desova	-0.108	0.591	0.038	0.850
Δ -ALP/desova	-0.352	0.072	0.303	0.124
Δ -GGT/desova	-0.192	0.338	0.114	0.571
Δ -Hematócrito/desova	-0.141	0.483	-0.073	0.719

^a Obtidas pelo coeficiente angular da reta de regressão, com número de desovas variando de 2 a 5 vezes.

* Números negativos indicam uma correlação negativa.

5 DISCUSSÃO

A afagia observada durante o período reprodutivo nas fêmeas de tartarugas marinhas é considerada um componente natural do ciclo biológico destes animais. O jejum prolongado implica na mobilização e utilização dos lipídios para o metabolismo energético e das reservas proteicas para a gliconeogênese. Em muitas espécies, a afagia ocorre quando o animal está envolvido em outras atividades importantes, que competem com a alimentação (Mrosovsky e Sherry, 1980).

5.1 Valores de referências

Análises bioquímicas e hematológicas representam uma importante ferramenta de monitoramento da saúde e estado fisiológico dos organismos (Wyneken *et al.*, 2006). De forma geral, a avaliação dos parâmetros fisiológicos de espécies incluídas nas listas de extinção - através de quaisquer exames - é de suma importância para o desenvolvimento de planos de manejo e conservação adequados para estes animais (Bolten e Bjorndal, 1992). Segundo Campbell (2006), estudos referentes a alterações na bioquímica sanguínea de répteis ainda são bastante escassos, se comparados aos de animais domésticos. Com relação às tartarugas marinhas, os dados hematológicos e bioquímicos também são extremamente limitados, sendo a maior parte deles provenientes de animais de cativeiro (Bolten e Bjorndal, 1992). Fatores como o estresse de confinamento, dietas artificiais e contato com outros animais podem alterar de forma significativa os parâmetros sanguíneos analisados e, portanto, estudos envolvendo indivíduos de vida livre retratam de forma mais fidedigna os aspectos fisiológicos de uma população.

Este é o primeiro estudo a estabelecer valores bioquímicos de referência para fêmeas de *E. imbricata* em atividade reprodutiva no Atlântico Sul Ocidental.

5.1.1 Lipídeos

A concentração média de triglicerídeos foi de 1033 mg / dL \pm 202; Tabela 2). Estes valores encontram-se bastante elevados quando comparados aos obtidos para outras espécies de tartarugas marinhas em atividade reprodutiva (Hasbún *et al.*, 1998; Goldberg *et al.*, 2011). Os níveis séricos de colesterol (287mg / dl \pm 42) apresentaram-se dentro do intervalo estabelecido por Hasbún *et al.* (1998) para fêmeas de tartarugas-verdes (*Chelonia mydas*) nos Emirados Árabes Unidos (226,082 mg / dl \pm 123,06), e por Goldberg *et al.* (2011) para fêmeas de tartaruga-cabeçuda (*Caretta caretta*) (247,752 mg / dl \pm 48,52). Derickson (1976) observou que os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol estão normalmente aumentados durante o período reprodutivo nas fêmeas, devido ao processo de vitelogênese e formação dos ovos. Além disso, fêmeas em geral apresentam níveis lipídicos mais elevados que os machos (Wilkinson, 2004).

5.1.2 Proteínas totais

Os valores médios de proteínas totais (5,45 g / dl \pm 0,63; Tabela 2) foram ligeiramente mais elevados do que os encontrados por Alkindi *et al.* (2001) para *E. imbricata* na Península Arábica (3,78 g / dl \pm 0,19) e por Deem *et al.* (2006) para tartarugas-de-couro (*Dermochelys coriacea*) na República do Gabão (4,6 g / dl \pm 1,0). Os valores observados no presente estudo apresentaram-se elevados no início do período de nidação, sendo compatíveis com a atividade vitelogênica (Deem *et al.*, 2009).

Os valores médios de albumina sérica (2,11 g / dl \pm 0,43; Tabela 2) foram altos quando comparados aos de Deem *et al.* (2006), Gelli *et al.* (2008), Deem *et al.* (2009) e Honarvar *et al.* (2011) para tartarugas em atividade reprodutiva. Lagarde *et al.* (2003) e Wilkinson (2004) relataram que os valores de albumina podem se elevar em até 30% durante o período nidai.

A concentração média de globulina sérica (3,34 g / dl \pm 0,40; Tabela 2) foi semelhante à encontrada por Deem *et al.* (2009) para *C. caretta* em atividade reprodutiva.

5.1.3 Ureia

Os valores de ureia variaram entre 12 e 28 mg / dl, sendo a média de 20,6 mg / dL (Tabela 2). Campbell (1996) encontrou valores ligeiramente mais altos para fêmeas adultas de *C. caretta*, *C. mydas*, *E. imbricata* e *Lepidochelys kempii*, fora do período reprodutivo. Wyneken *et al.* (2006) relataram valores ainda mais elevados para indivíduos juvenis de *C. caretta*.

5.1.4 Ácido úrico

Os valores médios de ácido úrico (0,95 mg / dl \pm 0,17; Tabela 2) foram mais elevados que os encontrados por Deem *et al.* (2006) e Honarvar *et al.* (2011), ambos para *D. coriacea*. Bolten e Bjorndal (1992) encontraram valores ainda maiores em *C. mydas* juvenis (1,5 mg / dl \pm 0,6), provavelmente devido ao fato destes animais serem essencialmente carnívoros quando jovens (Campbell, 2004; Campbell, 2006). Além disso, é provável que a concentração de ácido úrico seja mais elevada em amostras de sangue provenientes de áreas de alimentação, uma vez que os animais se alimentam diariamente (Honarvar *et al.*, 2011).

5.1.5 Sódio e potássio

Os níveis médios de sódio (139,6 mEq / l \pm 3,5) e potássio (5,09 mEq / l \pm 0,76) no presente estudo (Tabela 2) foram semelhantes aos encontrados por Deem *et al.* (2006) e (2009), Goldberg *et al.* (2011) e Honarvar *et al.* (2011), para tartarugas em atividade reprodutiva.

5.1.6 Cálcio e fósforo

Os valores médios de cálcio (11,6 mg / dl \pm 0,25; Tabela 2) foram similares aos descritos por Honarvar *et al.* (2011) para *D. coriacea* em período de nidação ligeiramente superiores aos descritos por Deem *et al.* (2006) para a mesma espécie. Os valores médios de fósforo (11,3 mg / dl \pm 1,4) ficaram dentro do intervalo estabelecido para tartarugas durante a temporada reprodutiva (Deem *et al.*, 2006; Honarvar *et al.*, 2011). Fêmeas em atividade nidai apresentam uma elevação

fisiológica dos níveis de cálcio e fósforo no sangue para a vitelogênese e formação do ovo (Lagarde *et al.*, 2003; Wilkinson, 2004).

5.1.7 Glicose

A concentração média de glicose (98,6 mg / dl \pm 14,6) foi relativamente mais alta que a encontrada por Honarvar *et al.* (2011) (86,34 mg / dl \pm 1,83) e por Deem *et al.* (2006) (78 mg / dl \pm 13) para *D. coriacea*.

Apesar de a glicose ser considerada uma das fontes energéticas mais importantes, não é um indicador expressivo do estado nutricional dos indivíduos. O controle homeostático hormonal realizado pelo organismo se sobrepõe, muitas vezes, a alterações que a dieta possa causar sobre a glicemia (González e Silva, 2004). Além disso, o estresse causa variações expressivas na glicemia, portanto, o excesso de manipulação do animal no momento da coleta pode gerar um quadro de hiperglicemia iatrogênica. O estresse aumenta a secreção de catecolaminas, que por sua vez podem aumentar a glicemia através da estimulação da glicogenólise e gliconeogênese hepáticas, além de interferir no transporte de glicose nos tecidos periféricos (Yamada *et al.*, 1993). Mesmo havendo alguma discordância quanto a real capacidade da glicemia refletir o status energético dos animais, há uma tendência geral de recomendação da avaliação deste parâmetro no perfil metabólico (González e Silva, 2004).

5.1.8 Atividades enzimáticas

A atividade média de ALT (6,6 U / l \pm 2,4; Tabela 2) está dentro do intervalo encontrado por Honarvar *et al.* (2011) para tartarugas em atividade reprodutiva (8,83 U / l \pm 0,39). Deem *et al.* (2006 e 2009) encontraram atividades mais baixas para *D. coriacea* e *C. caretta* (4 U / l \pm 2).

A atividade média de AST (55,4 U / l \pm 17,1, Tabela 2) foi mais baixa quando comparada a outros estudos (Deem *et al.*, 2006, 2009; Goldberg *et al.*, 2011; Honarvar *et al.*, 2011).

A atividade da FA (15,9 U / l \pm 3,7; Tabela 2) foi semelhante a observada por Flint *et al.* (2010) para *C. caretta* em Queensland, Austrália, e por Goldberg *et al.* (2011) para a mesma espécie no Brasil. Whitaker e Krum (1999) encontraram

atividades séricas mais elevadas para juvenis de *C. caretta* (média de 73,9 U / l). Bolten e Bjorndal (1992) também observaram atividades médias de FA mais altas para tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) juvenis, sendo a média de 43 U / l. Segundo Almosny e Monteiro (2006) e Campbell (2006), é possível que a FA esteja associada ao aumento da atividade osteoblástica. Com base nesta informação, pode-se sugerir que animais em fase de desenvolvimento apresentem níveis séricos mais elevados da enzima, uma vez que os osteoblastos são responsáveis pela síntese de matriz óssea.

A atividade sérica da GGT variou entre 7 e 15 U / l (média de 10,8 U / l \pm 2,4; Tabela 2). Estes valores são semelhantes aos descritos por Deem *et al.* (2006 e 2009), embora a GGT não seja considerada um parâmetro freqüentemente utilizado para avaliar as condições de saúde de tartarugas marinhas (Wilkinson 2004), uma vez que atividades enzimáticas teciduais consideradas normais são extremamente baixas (Divers, 2000).

5.1.9 Hematócrito

Os valores de hematócrito aqui documentados (39,4% \pm 2,9; Tabela 2) foram relativamente maiores que os descritos para *D. Coriacea* na Guiné Equatorial (36,4% \pm 0,59) (Honarvar *et al.*, 2011) e no Gabão (36% \pm 5,4) (Deem *et al.*, 2006). Fong *et al.* (2010) encontraram valores ainda mais baixos para *C. mydas* adultas em Taiwan.

Animais debilitados tendem a apresentar um hematócrito mais baixo, como mostrou Caliendo *et al.* (2010) para *E. imbricata* juvenis em processo de reabilitação (19,2% \pm 3,4). Os valores médios de PCV em *E. imbricata* juvenis após o tratamento em uma instalação de recuperação foram também muito inferior (Caliendo *et al.* 2010). Kakizoe *et al.* (2007) observaram um aumento significativo do hematócrito em *C. caretta* a medida que os indivíduos se tornam mais velhos.

5.1.10 Leptina e grelina

Os valores médios de leptina no soro (1070 ng / ml \pm 1053; Tabela 2) aqui relatados foram consideravelmente mais elevados do que os encontrados por

Paolucci *et al.* (2001) para lagartos *Podarcis sicula* (1,7 ng / ml) e por Krempler *et al.* (1998) para humanos com peso normal (8,4 ng / ml). Este fato pode ser explicado devido às tartarugas marinhas serem consideradas animais com elevado índice de massa corpórea e serem capazes de armazenar grande quantidade de gordura sob a carapaça e o plastrão (Kwan, 1994).

Os valores médios de grelina encontrados na primeira desova de 65,3 pg/ ml \pm 44 (Tabela 2) foram significativamente inferiores aos descritos por Tschöp *et al.* (2001) para humanos e por Toshinai *et al.* (2001) para ratos. No entanto, foram semelhantes aos encontrados por Ortiz *et al.* (2003) em elefantes-marinheiros-do-norte (*Mirounga angustirostris*) alimentados (em média 70 pg / ml). O jejum também é considerado um componente natural do ciclo biológico destes mamíferos, e após alguns meses de restrição calórica, os níveis de grelina subiram para uma média de 150 pg / ml.

Infelizmente, não existem valores de referência na literatura para os níveis de leptina e grelina em espécies de quelônios.

5.2 Variações das concentrações séricas

Este é o primeiro estudo a avaliar as tendências nas concentrações bioquímicas séricas e valores de hematócrito para fêmeas da espécie *E. imbricata* em nidação. Devido ao fato destas fêmeas permanecerem uma média de 3 meses sem se alimentar, é esperada uma redução na massa corpórea destes animais, acompanhada por alterações de indicadores nutricionais presentes no sangue. É válido ressaltar que a diminuição no índice de massa corpórea por si só já constitui uma importante alteração na fisiologia das tartarugas marinhas.

5.2.1 Lipídeos

As concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol e VLDL no início da temporada de desova encontravam-se bastante elevadas na maior parte dos animais analisadas, o que é esperado para fêmeas em atividade reprodutiva (Derickson 1976; Hamann *et al.*, 2003;. Deem *et al.*, 2009;. Goldberg *et al.*, 2011). Foi possível observar uma diminuição gradativa nestas concentrações ao longo do

período reprodutivo, atingindo o pico mínimo ao término da temporada (Figura 9A–C). Isto significa que as fêmeas iniciam a temporada de desova com boa condição corpórea adquirida previamente nas áreas de alimentação. Estes resultados são compatíveis com os de Price *et al.* (2012), que também notaram uma redução significativa nos níveis médios de triglicerídeos de *C. mydas* juvenis submetidas a um período de jejum que variou entre 5 e 15 dias. Ao longo do período reprodutivo, os triglicerídeos vão sendo degradados pela lipase a ácidos graxos e glicerol (Finn e Dice, 2006; Goldstein *et al.*, 2011). Os ácidos graxos são utilizados como fonte de energia, especialmente no tecido muscular, reduzindo a demanda orgânica por glicose. Além disso, durante o jejum, os ácidos graxos entram na formação de corpos cetônicos, que são uma importante fonte de energia para alguns tecidos, como o cérebro, quando os níveis de glicose encontram-se baixos (Price *et al.* 2012). O glicerol por sua vez, pode formar uma pequena quantidade de glicose (McCue, 2010), porém, a maior parte é gerada a partir dos aminoácidos glicogênicos provenientes da proteólise.

De acordo com Hamann *et al.* (2002b), fêmeas da espécie *C. mydas* apresentam picos de concentração de triglicerídeos plasmáticos durante a vitelogênese e a cópula. Segundo os autores, após a última oviposição, estas concentrações tendem a diminuir significativamente. Deem *et al.* (2009) realizaram um estudo comparativo envolvendo tartarugas cabeçudas em diferentes situações: em atividade reprodutiva, se alimentando em áreas de forrageio e em casos de encalhes devido a afecções diversas. O estudo evidenciou que fêmeas em período de nidação apresentam os maiores níveis de triglicerídeos e colesterol plasmáticos. Este dado pode ser explicado pelo fato de que fêmeas em atividade reprodutiva permanecem meses ou anos em áreas de forrageio se preparando para o período de nidação.

5.2.2. Proteínas totais

Os valores de proteínas séricas observados apresentaram-se elevados no início do período de nidação e de forma geral foram decaindo até o término do período em questão (Figura 9D–F). Os valores iniciais encontrados são compatíveis com a atividade vitelogênica durante a temporada reprodutiva. De acordo com

Deem *et al.* (2009) fêmeas em atividade reprodutiva apresentam os níveis plasmáticos de proteína total e albumina mais elevados que fêmeas fora do período nidal. A queda que observamos nos níveis de proteína sérica ao longo do período reprodutivo também deve estar relacionada à proteólise endógena, que fornece aminoácidos como substrato para a gliconeogênese (Finn e Dice, 2006). A síntese de glicose no jejum é, portanto, dependente da degradação de proteínas endógenas com conversão dos aminoácidos em glicose. Além disso, aminoácidos também são usados na formação de substâncias nitrogenadas importantes, como por exemplo, purinas e o grupamento heme e em caso de déficit calórico, como fonte energética.

É válido ressaltar, no entanto, que a velocidade de queda das proteínas totais variou ao longo do período de nidação, sendo mais acelerada nas fases inicial e média do ciclo. Este fato pode ser explicado devido a uma adaptação do organismo ao jejum, havendo diminuição da utilização de glicose pelos tecidos devido a troca da fonte energética, permitindo assim que ocorra diminuição da degradação de proteínas à medida que o jejum se prolonga.

5.2.3. Ureia

A ureia é um metabólito produzido no fígado a partir da amônia proveniente do catabolismo de aminoácidos e do ciclo da amônia no mesmo órgão. A concentração de ureia no sangue de tartarugas marinhas irá variar de acordo com a quantidade de proteína ingerida na dieta (Bonnet, 1979) e com a utilização dos aminoácidos como fonte de glicose pelo organismo (Finn e Dice, 2006).

As concentrações séricas de ureia no início da temporada reprodutiva encontravam-se semelhantes aos valores encontrados por Deem *et al.* (2009) para tartarugas cabeçudas em áreas de alimentação. No entanto, os níveis séricos de ureia ao longo do período de nidação apresentaram elevação gradativa (Figura 9G). A perda de peso observada ao longo da temporada associada à redução dos valores das proteínas totais e à elevação do nível sérico de ureia sugere proteólise endógena para a formação de glicose (gliconeogênese). O jejum prolongado intensifica a degradação de proteínas musculares, uma vez que as cadeias carbonadas destes aminoácidos serão utilizadas na gliconeogênese. Desta forma, a eliminação dos grupamentos amino restantes irá promover um aumento na

formação e excreção de ureia (Finn e Dice 2006; Wood *et al.*, 2010). A ureia por sua vez, pode ser reabsorvida pela bexiga urinária para ser reutilizada pelo organismo (Wilkinson, 2004). Em função da proteólise e da reabsorção através da bexiga, a uremia apresentou aumento gradativo ao longo do período (Figura 10).

5.2.4. Ácido úrico

No presente estudo, as fêmeas apresentaram uma redução gradativa nos níveis de ácido úrico ao longo do período reprodutivo (Figura 9H). Este fato pode ser explicado pela redução na ingestão de nucleotídeos presentes nos alimentos durante a temporada (Honarvar *et al.*, 2011). Os ácidos nucleicos provenientes da dieta são normalmente quebrados em nucleotídeos. Bases livres de pirimidina e purina são formadas quando estes nucleotídeos sofrem hidrólise enzimática. Ao serem catabolizadas, as pirimidinas formam $\text{CO}_2 + \text{NH}_3^+$ e as purinas irão formar o ácido úrico (Wright, 1995). De acordo com Wilkinson (2004), o aumento na ingestão de alimentos ricos em proteína promove elevação nos níveis de ácido úrico no sangue.

Estudos envolvendo a composição da urina de tartarugas marinhas citam a presença de ureia e amônia como os principais resíduos nitrogenados (Bonnet, 1979). De acordo com o autor, a quantidade de ácido úrico formada é muito pequena nestes animais. O ácido úrico, ao contrário da ureia, não pode ser reabsorvido pela bexiga urinária, uma vez que o composto orgânico é insolúvel em água (Wilkinson, 2004).

5.2.5. Sódio e potássio

O sódio e o potássio ingeridos na dieta são absorvidos no intestino e transportados aos rins, onde serão excretados ou reabsorvidos, dependendo das necessidades do réptil. No caso das tartarugas marinhas, a maior parte destes elementos provém da dieta e da água do mar, ingerida junto com os alimentos (Lutz, 1997). As concentrações de sódio e potássio diminuíram significativamente ao longo da temporada de nidação (Figura 11). A redução nos níveis séricos destes

elementos pode representar a depleção de nutrientes em função do grande esforço reprodutivo e da afagia ou pode ainda representar um eventual retorno a concentrações fisiológicas ao término do período (Honarvar *et al.*, 2011). Deem *et al.* (2009) também observaram a queda nos níveis de potássio plasmático de tartarugas cabeçudas na temporada reprodutiva e correlacionaram este fato com a redução na ingestão de alimentos durante o período. Os valores médios fisiológicos de potássio no soro ou no plasma variam de acordo com a espécie de réptil, mas geralmente permanecem numa faixa de 2 a 6 mEq / L, e os de sódio apresentam variação entre 120 e 170 mEq / L (Campbell, 2006).

5.2.6. Cálcio e fósforo

As fêmeas em período reprodutivo apresentam uma elevação nos níveis de cálcio e fósforo plasmáticos (Lagarde *et al.*, 2003). Os picos de concentração ocorrem após a cópula e estão vinculados à vitelogênese e à formação do ovo (Deem *et al.*, 2006). Ao chegarem às áreas de nidificação, onde irão permanecer cerca de três meses, as fêmeas cessam ou reduzem a ingestão de alimentos, e desta forma, a concentração sérica destes minerais tende a diminuir. Os níveis séricos de cálcio e de fósforo neste estudo apresentaram-se elevados no início da temporada de desova e reduziram-se gradativamente até o término do período reprodutivo (Figura 11). De acordo com Honarvar *et al.* (2011), assim como para sódio e potássio, a redução nos níveis séricos destes elementos pode representar a depleção de nutrientes em função do grande esforço reprodutivo e da afagia ou pode ainda representar um eventual retorno a concentrações fisiológicas ao término do período.

5.2.7. Glicose

A concentração sérica de glicose não variou de forma linear para todos os animais ao longo da temporada reprodutiva. No entanto, houve uma tendência à redução dos níveis glicêmicos. Durante o jejum, o glucagon, cuja secreção é estimulada por um quadro de hipoglicemia, atua no fígado, estimulando a

glicogenólise e a gliconeogênese, de forma a disponibilizar moléculas de glicose para o organismo (Kaneko, 1997).

Goldstein *et al.* (2011) encontraram indícios de que durante o jejum, níveis elevados de grelina podem aumentar a glicemia, impedindo que a depleção calórica prolongada leve o indivíduo a morte.

5.2.8. Atividades enzimáticas

No presente estudo, não houve correlação significativa das enzimas avaliadas com o peso dos animais. Além disso, a avaliação das atividades enzimáticas não apresentou diferenças significativas ao longo dos intervalos internidais.

Estas enzimas estão presentes no citoplasma de diferentes células e são liberadas na circulação sanguínea somente por destruição ou alteração de permeabilidade das membranas celulares (Wilkinson, 2004). Por estarem aptas a reprodução, as fêmeas encontravam-se híginas e, portanto as atividades enzimáticas não apresentaram alteração.

5.2.9. Leptina e grelina

Os níveis séricos de leptina apresentaram-se elevados no início da temporada de nidação e diminuíram significativamente ao longo do período até atingir um pico mínimo próximo de 500 ng/dl (Figura 13A).

Tartarugas marinhas em atividade reprodutiva permanecem longos períodos em áreas de alimentação, onde acumulam energia, sob a forma de triglicerídeos, que serão utilizados durante a temporada de nidação (Hamann *et al.*, 2002b). O ganho de peso aumenta os níveis de leptina no sangue, uma vez que o hormônio é produzido pelo tecido adiposo (Romero e Zanesco, 2006). No início da temporada, as fêmeas de *E. imbricata* estão com um alto índice de massa corpórea e por este motivo apresentam concentrações séricas de leptina bastante elevadas. Este fato explica o quadro de afagia ou hipofagia nestes animais e a consequente perda de peso observada ao longo do período. É possível que esta seja uma estratégia para melhorar a eficiência reprodutiva, uma vez que a procura por alimentos no período

de postura implicaria num gasto calórico que poderia não ser recompensado. De forma geral, a afagia é considerada um componente natural no ciclo biológico de várias espécies (Castellini e Rea, 1992) e é bastante comum quando os animais estão envolvidos em outras atividades importantes, que competem com a alimentação (Mrosovsky e Sherry, 1980).

De forma geral, as fêmeas com maior número de posturas ao longo da temporada apresentaram níveis séricos de leptina mais altos do que as fêmeas com menor número de desovas. Além disso, ao término do período nidal todas as tartarugas observadas apresentaram um pico mínimo de leptina no sangue (valores próximos de 500 ng/dl). É possível que este limite mínimo esteja envolvido com o término da temporada, de forma que os animais iniciem a migração para buscar alimentos e repor as reservas depletadas. Sugere-se então que além da regulação da ingestão alimentar, a leptina possa também auxiliar na regulação da atividade reprodutiva em fêmeas de *E. imbricata*. Para confirmar esta hipótese é indicada a realização de estudos envolvendo a quantificação de leptina em gônadas de fêmeas de tartarugas marinhas em atividade reprodutiva.

Ao contrário da leptina, a grelina é um peptídeo orexígeno que estimula a ingestão de alimentos (Romero e Zanesco, 2006; Zhao *et al.*, 2010). Ao chegarem às áreas reprodutivas, as fêmeas encontram-se saciadas, com baixos níveis séricos do peptídeo. Ao longo do período de nidação, os níveis de grelina vão aumentando gradativamente (Figura 13B), de modo que, ao término da temporada, elas migram novamente para áreas de alimentação. É provável que o aumento da grelina associado à redução da leptina seja o fator que desencadeie a busca por alimentos nestes animais após o encerramento da atividade reprodutiva.

Estes resultados reforçam a hipótese recentemente publicada por Goldstein *et al.* (2011) de que a grelina está diretamente ligada à manutenção do metabolismo energético durante o jejum. Basicamente, estes autores mostraram que a grelina é capaz de elevar os níveis de glicose no sangue de ratos durante situações de restrição calórica severa (Figura 13). De forma geral, nossos dados fornecem evidências de que a grelina também exerce um papel semelhante em tartarugas marinhas, evitando um quadro de hipoglicemia e morte durante períodos prolongados de jejum. Para compreender este mecanismo de forma mais detalhada, é preciso entender a resposta fisiológica do organismo a situações de depleção calórica. O jejum promove uma redução nos níveis de glicose sanguínea, que é

detectada através de hormônios sensores de glicose, localizados no sistema nervoso central. A seguir, ocorre ativação do sistema nervoso simpático e como consequência, a norepinefrina é liberada na parede do estômago, estimulando a secreção de grelina. A grelina por sua vez, atua no hipotálamo e hipófise, induzindo a produção do hormônio de crescimento (GH), o qual mantém a glicemia (Goldstein *et al.*, 2011) (Figura 13). Este sistema torna-se indispensável quando as reservas de tecido adiposo foram depletadas em função da restrição calórica prolongada. Novas pesquisas acerca deste mecanismo de homeostase energética devem ser instituídas, dada a importância do tema. No entanto, é válido ressaltar que o estudo com tartarugas marinhas oferece uma excelente oportunidade para compreender o funcionamento deste sistema, uma vez que estes animais apresentam características únicas de controle do metabolismo energético durante o jejum.

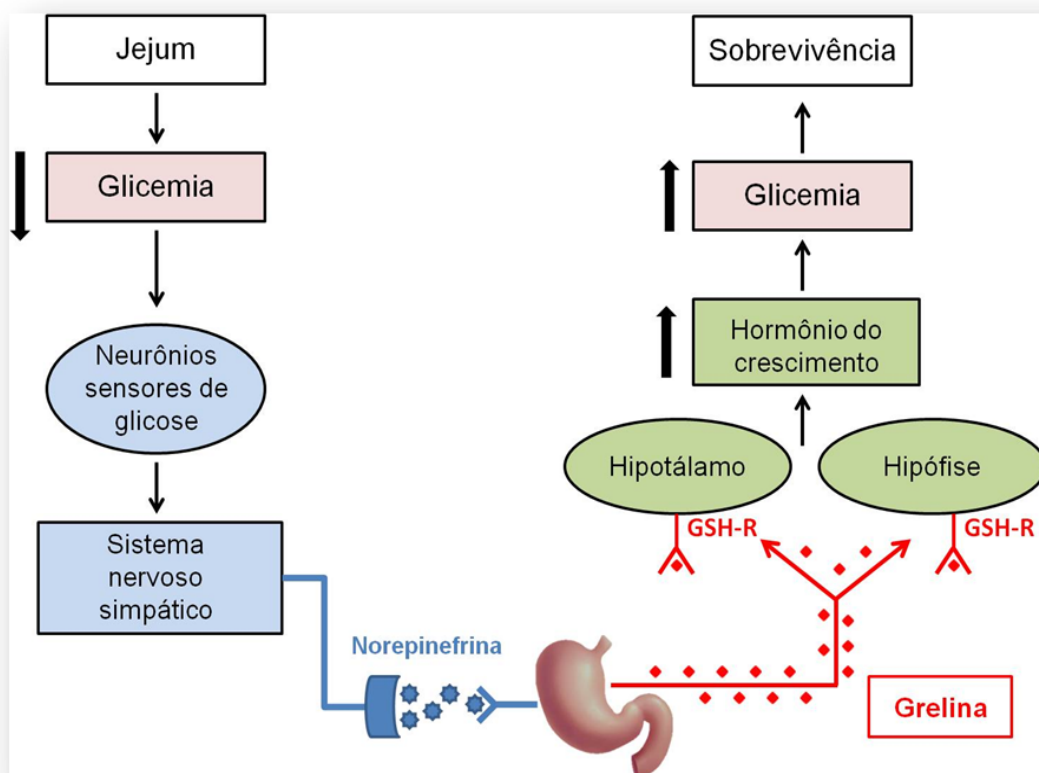


Figura 14: Esquema ilustrativo da resposta metabólica ao jejum prolongado, evidenciando o papel da grelina na manutenção dos níveis de glicose sanguínea. Adaptado de Goldstein *et al.* (2011).

6 CONCLUSÃO

A perda de peso associada à redução dos níveis séricos de triglicerídeos, proteínas totais e ácido úrico e ao concomitante aumento de ureia comprovaram um quadro catabólico gerado pela falta de alimentação das fêmeas de *E. imbricata* durante o período de nidação. É provável que os animais parem de se alimentar por estarem envolvidos com a atividade reprodutiva. De acordo com os resultados obtidos, os hormônios grelina e leptina, ambos capazes de afetar o apetite e a ingestão de alimentos em diversas classes de vertebrados, também desempenham esta função nas tartarugas marinhas. O aumento dos níveis séricos do peptídeo orexígeno grelina e a diminuição dos níveis da proteína anorexígena leptina ao longo da temporada reprodutiva comprovam este fato. Além disso, é provável que depois da última postura, quando os níveis de leptina encontram-se diminuídos e os de grelina elevados, a *E. imbricata* migre novamente para áreas de alimentação para repor suas reservas depletadas.

Este é o primeiro estudo a correlacionar as taxas de variação de grelina e de leptina com parâmetros bioquímicos séricos em fêmeas de *E. imbricata* ao longo do período de nidação. Isto significa que a grelina e a leptina são a chave para a compreensão de um sistema energeticamente eficiente que garante aos animais uma resistência em longo prazo ao jejum durante toda a temporada reprodutiva. É válido ressaltar ainda, que as dosagens destes hormônios no sangue podem ser utilizadas como um índice para avaliar se fêmeas de outras populações estão ou não se alimentando nas áreas de nidificação.

7 SUGESTÕES FUTURAS

Com base nos resultados obtidos e considerando a necessidade de contribuições de estudos que esclareçam de forma definitiva quais sistemas estão envolvidos na regulação do apetite e da ingestão alimentar em tartarugas marinhas, julga-se fundamental a realização de futuras pesquisas. Estas proporcionarão o esclarecimento de lacunas no ciclo de vida destes animais e a compreensão de um mecanismo vital para a sobrevivência das diferentes espécies. Neste sentido sugerimos a associação dos dados aqui apresentados a técnicas de telemetria e filmagem com microcâmeras fixadas à carapaça dos animais para avaliar o deslocamento e o comportamento das fêmeas durante os intervalos internidais. A partir dos dados obtidos sobre o comportamento das fêmeas neste período, será possível delinear as áreas de uso e, portanto, áreas prioritárias de conservação para os animais nas regiões estudadas.

REFERÊNCIAS

- ALMOSNY, N. R. P.; MONTEIRO, A. O. Patologia Clínica. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. S.; CATÃO-DIAS, J. L. (Eds.) *Tratado de animais selvagens - medicina veterinária*. São Paulo: Roca, 2006. p. 939–966.
- ALKINDI, A. Y. A.; MAHMOUD, I. Y.; KHAN, H. Hemoglobin, Hemoglobin, plasma Fe+ + and total protein in olive ridley and hawksbill turtles under natural condition in Masirah Island, Oman. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 4, n. 5, p. 608–610, 2001.
- ARSENAULT, J. E.; HAVEL, P. J.; DE ROMAÑA, D. L.; PENNY, M. E.; VAN LOAN, M. D. BROWN, K. W. Longitudinal measures of circulating leptin and ghrelin concentrations are associated with the growth of young Peruvian children but are not affected by zinc supplementation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 86, p. 1111–1119, 2007.
- BAILLIE, J.; GROOMBRIDGE, B. IUCN Red List of Threatened Animals. Gland, Switzerland: IUCN, 368 pp. 1996.
- BARTOL, S. M.; MUSICK, J. A. Sensory Biology of Sea Turtles. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A.; WYNEKEN, J. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles Volume II*. Florida: CRC Press LLC, 2003. p. 79–102.
- BJORNDAL, K. A. The consequences of herbivory for the life history pattern of the Caribbean green turtle. In: BJORNDAL, K. A. (Ed.) *Biology and Conservation of Sea Turtles*, Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1982, p. 111–116.
- BJORNDAL, K. A. Nutritional ecology of sea turtles. *Copeia*, n. 3, p. 736–751, 1985.
- BJORNDAL, K. A.; BOLTEN, A. B.; MARTINS, H. R. Somatic growth model of juvenile loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*: duration of pelagic stage. *Marine Ecology Progress Series* v. 202, p. 265–272, 2000.
- BOLTEN, A. B.; BJORNDAL, K. A. Blood profiles of a wild population of green turtles (*Chelonia mydas*) in the southern Bahamas: size-specifics and sex-specifics relationships. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 28, n. 3, p. 407-413, 1992.
- BONNET, B. Influence of the nutritional conditions on the organic composition of blood and urine in the juvenile sea turtle *Chelonia mydas*. *Aquaculture*, v. 16, p. 253-260, 1979.
- BOYER, T. H.; BOYER, D. M. Turtles, tortoises and terrapins. In: MADER, D. R. (Ed.) *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. SAUNDERS COMPANY, 1996. p. 61-78.
- BRAUN-MCNEILL, J.; SASSO, C. R.; EPPERLY, S. P.; RIVERO, C. Feasibility of using sea surface temperature imagery to mitigate cheloniid sea turtle–fishery interactions off the coast of northeastern USA. *Endangered Species Research*, v. 5, p. 257–266, 2008.

BROBERGER, C. Brain Regulation of Food Intake and Appetite Molecules and Networks. *Journal of Internal Medicine*, v. 258, p. 301–327, 2005.

CAHILL, G. F. Jr. Fuel metabolism in starvation. *Annual Review of Nutrition*, v. 26, p. 1–22, 2006.

CALIENDO, V.; MCKINNEY, P.; ROBINSON, D.; BAVERSTOCK, W.; HYLAND, K. Plasma biochemistry and hematology values in juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) undergoing rehabilitation. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, v. 20, p. 117–121, 2010.

CAMPBELL, T. W. Sea Turtle Rehabilitation. In: MADER, D. R. (Ed.) *Reptile Medicine and Surgery*. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. SAUNDERS COMPANY, 1996. p. 427–436.

CAMPBELL, T. W. Clinical Chemistry of Reptiles. In: THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; CAMPBELL, T. W.; DENICOLA, D. B.; FETTMAN, M. J.; LASSEN, E. D.; REBAR, A.; WEISER, G. (Eds.) *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 493–498.

CAMPBELL, T. W. Clinical Pathology of Reptiles. In: MADER, D. R. (Ed.) *Reptile Medicine and Surgery*. Missouri: SAUNDERS Elsevier, 2006. p. 490–532.

CARR, A.; OGREN, L. The ecology and migrations of sea turtles, 3 *Dermochelys* in Costa Rica. *American Museum Novitates*, p. 1–29, 1960.

CARR, A.; HIRTH, H. Social Facilitation in green turtles siblings. *Animal Behaviour* IX, n. 1–2, p. 68–70, 1960.

CARR A.; ROSS, P.; CARR, S. Internesting behavior of the green turtle, *Chelonia mydas*, at a mid-ocean island breeding ground. *Copeia*, n. 3, p. 703–706, 1974.

CASTELLINI, M. A.; REA, L. D. The biochemistry of natural fasting at its limits. *Cellular Molecular Life Science*, v. 48, p. 575–582, 1992.

CHACÓN, D. La tortuga carey Del Caribe – Introducción a su biología e estado de conservación. WWF – Programa Regional para América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica. 2004.

CHAN, E. H.; LIEW, H. C. Hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata* nesting on Redang Island, Malaysia, from 1993-1997. *Chelonian Conservation and Biology*, v. 3, n. 2, p. 326–329, 1999.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. *Revista Brasileira de Clínica Médica*, v. 9, n. 2, p. 138–45, 2011.

DAVENPORT, J. Temperature and the life-history strategies of sea turtles. *Journal of Thermal Biology*, v. 22, n. 6, p. 479–488, 1997.

- DEEM, S. L.; DIERENFELD, E. S.; SOUNGUET, G. P.; ALLEMAN, A. R.; CRAY, C.; POPPENG, R. H.; NORTON, T. M.; KARESH, W. B. Blood values in free-ranging nesting leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*) on the coast of the Republic of Gabon. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 37, n. 4, p. 464–471, 2006.
- DEEM, S. L.; NORTON, T. M.; MITCHELL, M. A.; SEGARS, A. L.; ALLEMAN, A. R.; CRAY, C.; POPPENG, R. H.; DODD, M.; KARESH, W. B. Comparison of blood values in foraging, nesting, and stranded loggerhead turtles (*Caretta caretta*) along the coast of Georgia, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 45, p. 41–56, 2009.
- DENVER R. J.; BONETT, R. M.; BOORSE, G. C. Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology*, v. 94, n. 1, p. 21–38, 2011.
- DERICKSON, W. K. Lipid Storage and Utilization in Reptiles. *American Zoology*, v. 16, p. 711-723, 1976.
- DIVERS, S. J. Reptilian Renal and Reproductive Disease Diagnosis. In: FUDGE, A. M. (Ed.) *Laboratory Medicine – Avian and Exotic Pets*. Philadelphia: W B Saunders Company, 2000. p. 217–222.
- DOBBS, K. A.; MILLER, J. D.; LIMPUS, C. J.; LANDRY JR., A. M. Hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, Nesting at Milman Island, Northern Great Barrier Reef, Australia. *Chelonian Conservation and Biology*, v. 3, n. 2, p. 344–361, 1999.
- DODD, C. K. A biological synopsis of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758). *Fish and Wildlife Service, Biology of Reptiles*, v. 14, n. 88, p. 1–110, 1988.
- DRAKE, D. L.; SPOTILA, J. R. Thermal tolerances and the timing of sea turtle hatchling emergence. *Journal of Thermal Biology*, v. 27, p. 71–81, 2002.
- FINN, P. F.; DICE, J. F. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition*, v. 22, p. 830–844, 2006.
- FLINT, M.; MORTON, J. M.; LIMPUS, C. J.; PATTERSON-KANE, J. C.; MILLS, P. C. Reference intervals for plasma biochemical and hematologic measures in Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) from Moreton Bay, Australia. *Journal of Wildlife Diseases* v. 46, p. 731–741, 2010.
- FONG, C.; CHEN, H.; CHENG, I. Blood profiles from wild populations of green sea turtles in Taiwan. *Journal of Veterinary Medicine and Health*, v. 2, p. 008-010, 2010.
- FRAZER, N. B. Loggerhead Sea Turtles *Caretta Caretta*. In: PLOTKIN, P. T. (Ed.) *National Marine Fisheries Service and U. S. Fish and Wildlife Service Status Reviews for Sea Turtles Listed under the Endangered Species Act of 1973*. National Marine Fisheries Service, Silver Spring, Maryland, 1995.
- FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, v. 395, n. 6704, p. 763–770, 1998.

GELLI, D.; FERRARI, V.; ZANELLA, A.; ARENA, P.; POZZI, L.; NANNARELLI, S.; VACCARO, C.; BERNARDINI, D.; ROMAGNOLI, S. Establishing physiological blood parameters in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *European Journal of Wildlife Research*, n. 55, p. 59–63, 2008.

GODFREY, M. H.; BARRETO, R. Beach vegetation and seafinding orientation of turtle hatchlings. *Biological Conservation*, v. 74, p. 29 – 32, 1995.

GOFF, M.; SALMON, M.; LOHMANN, K. J. Hatchling sea turtles use surface waves to establish a magnetic compass direction. *Animal Behavior*, v. 55, p. 69–77, 1998.

GOLDBERG, D. W.; WANDERLINDE, J.; FREIRE, I. M. A.; SILVA, L. C. P.; ALMOSNY, N. R. P. Serum biochemistry profile determination for wild loggerhead sea turtles *Caretta caretta* nesting in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil. *Ciência Rural*, v. 41, p. 143–148, 2011.

GOLDSTEIN, J. L.; ZHAO, T. J.; LI, R. L.; SHERBET, D. P.; LIANG, G.; BROWN, M. S. Surviving starvation: Essential role of the ghrelin-growth hormone axis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 76, 2011.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. *Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária*. 2004. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GRASSMAN, M. Chemosensory orientation behavior in juvenile sea turtles. *Brain Behavior Evolution*, v. 41, n. 3–5, p. 224–228, 1993.

GROOMBRIDGE, B.; LUXMOORE, R. *The Green Turtle and Hawksbill (Reptilia: Cheloniidae): World Status, Exploitation and Trade*. Lausanne, Switzerland: CITES Secretariat, 601 pp. 1989.

HAMANN, M.; JESSOP, T. S.; LIMPUS, C. J.; WHITTIER, J. M. Interactions among endocrinology, seasonal reproductive cycles and the nesting biology of the female green sea turtle. *Marine Biology*, v. 140, p. 823–830, 2002a.

HAMANN, M.; LIMPUS, C. J.; WHITTIER, J. M. Patterns of lipid storage and mobilisation in the female green sea turtle (*Chelonia mydas*). *Journal of Comparative Physiology B*, v. 172, p. 485–493, 2002b.

HAMANN, M.; LIMPUS, C. J.; WHITTIER, J. M. Seasonal variation in plasma catecholamines and adipose tissue lipolysis in adult female green sea turtles (*Chelonia mydas*). *General Comparative Endocrinology*, v. 130, p. 308–316, 2003.

HASBUN, C. R.; LAWRENCE, A. J.; NALDO, J.; SAMOUR, J. H.; ALGHAIS S. M. Normal blood chemistry of free-living green sea turtles, *Chelonia mydas*, from the United Arab Emirates. *Comparative Haematology International*, v. 8, p. 174–177, 1998.

HAWKES, L. A.; BRODERICK, A. C.; GODFREY, M. H.; GODLEY, B. J. Climate change and marine turtles. *Endangered Species Research* v. 7, p. 137–154, 2009.

HAYS, G. C.; LUSCHI, P.; PAPI, F., DEL SEPPIA, C.; MARSH, R. Changes in behaviour during the interesting period and postnesting migration for Ascension Island green turtles. *Marine Ecology Progress Series*, v. 189, p. 263–273, 1999.

HECK, J.; MACKENZIE, D. S.; ROSTAL, D.; MEDLER, K.; OWENS, D. Estrogen induction of plasma vitellogenin in the Kemp's Ridley sea turtle (*Lepidochelys kempi*). *General Comparative Endocrinology*, v. 107, p. 280–288, 1997.

HIRTH, H. F. Synopsis of the Biological Data on the Green Turtle, *Chelonia mydas* (Linnaeus 1758). *Biological Report*, v. 97, n. 1, p. 1–129. U. S. Department of Interior, 1997.

HONARVAR, S.; BRODSKY, M. C.; FITZGERALD, D. B.; ROSENTHAL, K. L.; HEARN, G.W. Changes in plasma chemistry and reproductive output of nesting leatherbacks. *Herpetologica*, v. 67, n. 3, p. 222–235, 2011.

IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES. Version 2011.1.
<www.iucnredlist.org>. Downloaded on 05 July 2011.

JÉQUIER, E.; TAPPY, L. Regulation of body weight in humans. *Physiological Reviews*, v. 79, n. 2, p. 451–80, 1999.

JONES, T. T.; HASTINGS, M. D.; BOSTROM, B. L.; ANDREWS, R. D.; JONES, D. R. Validation of the use of doubly labeled water for estimating metabolic rate in the green turtle (*Chelonia mydas*): a word of caution. *Journal of Experimental Biology*, v. 212, p. 2635–2644, 2009.

KAIYA, H.; KOJIMA, M.; HOSODA, H.; KODA, A.; YAMAMOTO, K.; KITAJIMA, Y.; MATSUMOTO, M.; MINAMITAKE, Y.; KIKUYAMA, S.; KANGAWA, K. Bullfrog ghrelin is modified by *n*-octanoic acid at its third threonine residue. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 40441–40448, 2001.

KAIYA, H.; SAKATA, I.; KOJIMA, M.; HOSODA, H.; SAKAI T.; KANGAWA, K. Structural determination and histochemical localization of ghrelin in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. *General Comparative Endocrinology*, v. 138, p. 50–57, 2004.

KAIYA, H.; MIYAZATO, M.; KANGAWA, K.; PETER, R. E.; UNNIAPPAN, S. Ghrelin: A multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, v. 149, p. 109–128, 2008.

KAKIZOE, Y.; SAKAOKA, K.; KAKIZOE, F.; YOSHII, M.; NAKAMURA, H.; KANOU, Y.; UCHIDA, I. Successive changes of hematologic characteristics and plasma chemistry values of juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 38, p. 77–84, 2007.

KALRA, S. Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocrine Reviews*, v. 14, p. 507–538, 1993.

KANEKO J. J. Carbohydrate Metabolism and Its Diseases. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. California: Academic Press, 1997. p. 45–81.

KAWAKOSHI, A.; KAIYA, H.; RILEY, L. G.; HIRANO, T.; GRAU, E. G.; MIYAZATO, M.; HOSODA, H.; KANGAWA, K. Identification of a ghrelin-like peptide in two species of shark, *Sphyrna lewini* and *Carcharhinus melanopterus*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 151, n. 3, p. 259–268, 2007.

KORBONITS, M.; GOLDSTONE, A. P.; GUEORGUIEV, M.; GROSSMAN A. B., Ghrelin - a hormone with multiple functions, *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 25, p. 27–68, 2004.

KREMPLER, F.; HELL, E.; WINKLER, C.; BREBAN, D.; PATSCH, W. Plasma leptin levels: interaction of obesity with a common variant of insulin receptor substrate-1. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v. 18, p. 1686 –1690, 1998

KWAN, D. Fat reserves and reproduction in the green turtle, *Chelonia mydas*. *Wildlife Research*, v. 21, n. 3, p. 257–266, 1994.

LAGARDE, F. A.; BONNET, X.; HENEN, B.; NAGY, K.; CORBIN, J.; LACROIX, A.; TROUVÉ, C. Plasma steroid and nutrient levels during the active season in wild *Testudo horsfieldi*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 134, p. 139–146, 2003.

LARIOS, H. M. Determinación del sexo en crías. In: ECKERT, K. L.; BJORNADAL, K. A.; GROBOIS, F. A. A.; DONNELLY, M. (Ed.) *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. 4. ed. UICN/CSE Grupo Especialista en Tortugas Marinas, 2000. p.150–154.

LEITE, L. D.; BRANDÃO-NETO, J. Integração neuroendócrina na regulação da ingestão alimentar. *Neurobiologia*, v. 72, n. 2, p. 127–143, 2009.

LIMPUS, C. J. A study of the Loggerhead Turtle, *Caretta caretta* in Queensland. Ph.D. Dissertation - University of Queensland, Brisbane, Australia. 481p, 1985.

LIMPUS, C. J. Marine turtle populations of Southeast Ásia and the western Pacific region: distribution and status. In: NOOR, Y. *et al.* Proc. Workshop on Marine Turtle Research and Management in Indonesia. Bogor, Indonesia. Wetlands Int'1. PHP a Environment Australia, p. 37–73. 1997.

LOHMANN, K. J.; SALMON, M.; WYNEKEN, J. Functional Autonomy of Land and Sea Orientation Systems in Sea Turtle Hatchlings. *Biology Bulletin*, v. 179, p. 214–218, 1990.

LOHMANN, K. J.; WITHERINGTON, B. E.; LOHMANN, C. M. F.; SALMON, M. Orientation, Navigation, and Natal Beach Homing in Sea Turtles. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. *The Biology of Sea Turtles*. Florida: CRC Press LLC, 1997. p. 107–136.

LUTCAVAGE, M. E.; LUTZ, P. L. Diving Physiology. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles*. Florida: CRC Press LLC, 1997. p. 277–296.

LUTZ, P. L. Salt, Water and pH Balance in Sea Turtles. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles*. Florida: CRC Press LLC, 1997. p. 343–362.

MACHADO, A. B. M., DRUMMOND, G. M., AND PAGLIA, A. P. (eds.) (2008) Livro Vermelho das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Brasília, Brasil: MMA / Biodiversitas.

MACK, D., DUPLAIX, N., WELLS, S. The sea turtle: an animal of divisible parts. Internatinal trade in sea turtles products. Washington, DC: TRAFFIC (USA) World Wild Report 1:1–86, 1979.

MARCOVALDI, M. A.; GODFREY, M. H.; MROSOVSKY, N. Estimating sex ratios of loggerhead turtles in Brazil from pivotal incubation durations. *Canadian Journal of Zoology*, v. 75, p. 755–770, 1997.

MARCOVALDI, M. A.; MARCOVALDI, G. G. Marine turtles of Brazil: the history and structure of Projeto TAMAR-IBAMA. *Biological Conservation*, v. 91, p. 35–41, 1999.

MARCOVALDI, G. G.; MARCOVALDI, M. A.; SALES, G. THOMÉ, J. C.; COELHO, A. C.; GALLO, B. Plano de Ação Nacional para a redução de Captura Incidental de Tartarugas Marinhas pela Atividade Pesqueira. *Gerenciamento Costeiro Integrado*, Santa Catarina, n.2, p. 36–37, 2002.

MARCOVALDI, M. A.; LOPEZ, G. G.; SANTOS, A. J. B.; BELLINI, C.; BARATA, P. C. R. Fifteen years of hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Brazil: a promising trend. *Chelonian Conservation and Biology*, v. 6, n. 2, p. 223–228, 2007.

MARCOVALDI, M. A.; LOPEZ, G. G.; SOARES, L. S.; LIMA, E. H. S. M.; THOMÉ, J. C. A. ALMEIDA, A. P. Satellite-tracking of female loggerhead turtles highlights fidelity behavior in northeastern Brazil. *Endangered Species Research*, v. 12, p. 263–272, 2010.

MARCOVALDI, M. A.; LOPEZ, G. G.; SOARES, L. S.; SANTOS, A. J. B.; BELLINI, C.; SANTOS, A. S.; LOPEZ, M. Avaliação do estado de conservação da tartaruga marinha *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus 1766) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, v. 1, p. 20–27, 2011.

MCARTHUR, S.; MEYER, J.; INNIS, C. Anatomy and Physiology. In: MCARTHUR, S.; WILKINSON, R.; MEYER, J. (Eds.) *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2004. p. 35–71.

MCARTHUR, S.; BARROWS, M. Nutrition. In: MCARTHUR, S.; WILKINSON, R.; MEYER, J. (Eds.) *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2004. p. 73–82.

MCCUE, M. D. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, v. 156, n. 1, p. 1–18, 2010.

MEYLAN, A. B. The Behavioral ecology of the west Caribbean green turtle (*Chelonia mydas*) in the interesting habitat. 1978. 100 f. Master's Thesis - University of Florida. 1978.

MEYLAN, A. Spongivory in hawksbill turtles: a diet of glass. *Science*, v. 239, n. 4838, p. 393–395, 1988.

MEYLAN, A. B. Status of the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean region. *Chelonian Conservation and Biology* v. 3, n. 2, p. 177–184, 1999.

MILLER, J. D. Reproduction in Sea Turtles. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles*. Florida: CRC Press LLC, 1997. p. 51–82.

MORTIMER, J.A.; PORTIER, K.M. Reproductive Homing and Internesting Behavior of the Green Turtle (*Chelonia mydas*) at Ascension Island, South Atlantic Ocean. *Copeia*, v. 4, p. 962–977, 1989.

MORTIMER, J. A.; BRESSON, R. Temporal distribution and periodicity in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting in Cousin Island, Republic of Seychelles, 1971-1997. *Chelonian Conservation and Biology*, v. 3, n. 2, p. 318–325, 1999.

MROSOVSKY, N.; SHETTLEWORTH, S. J. Wavelength preferences and brightness cues in the water finding behaviour of sea turtles. *Behavior*, v. 32, p. 211–257, 1968.

MROSOVSKY, N.; SHERRY, D. F. Animal anorexias. *Science*, v. 207, p. 837–842, 1980.

MROSOVSKY, N.; PIEAU, C. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia*, v. 12, p. 169–179, 1991.

NAGELKERKEN, I.; PORS, L.P.J.J.; HOETJES, P. Swimming behaviour and dispersal patterns of headstarted loggerhead turtles *Caretta Caretta*. *Aquatic Ecology*, v. 37, p. 183–190, 2003.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Decline of sea turtles: causes and prevention. Washington: National Academy Press. 1990. 260 p.

NEGRÃO, A. B.; LICÍNIO J. Leptina: diálogo entre adipócitos e neurônios. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia*, v. 44, n. 3, p. 205–214, 2000.

NIEWIAROWSKI, P. H.; BALK, M. L.; LONDRAVILLE, R. L. Phenotypic effects of leptin in an ectotherm: a new tool to study the evolution of life histories and endothermy? *Journal of Experimental Biology*, v. 203, p. 295–300, 2000.

ORTIZ, R. M.; NOREN, D. P., ORTIZ, C. L.; TALAMANTES, F. GH and gherlin increase with fasting in a naturally adapted species, the northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*). *Journal of Endocrinology*, v. 178, p. 533–539, 2003.

- OWENS, D. W. Hormones in the Life History of Sea Turtles. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles*. Florida: CRC Press LLC, 1997. p. 315–342.
- PAES E LIMA, E.; WANDERLINDE, J.; ALMEIDA, D. T.; LOPEZ, G. G.; GOLDBERG, D. W. Nesting ecology and conservation of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) in Rio de Janeiro, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology* v. 11, n. 2, p. 2012.
- PAOLUCCI, M.; ROCCO, M.; VARRICCHIO, E. Leptin presence in plasma, liver and fat bodies in the lizard *Podarcis sicula*: Fluctuations throughout the reproductive cycle. *Life Sciences*, n. 69, p. 2399–2408, 2001.
- PILCHER, N. J.; ALI, L. Reproductive biology of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in Sabah Malaysia. *Chelonian Conservation and Biology*, v. 3, n. 2, p. 330–336, 1999.
- PRICE, E. R.; JONES, T. T.; WALLACE, B. P.; GUGLIELMO, C. G. Serum triglycerides and β -hydroxybutyrate predict feeding status in green turtles (*Chelonia mydas*): Evaluating a single blood sample method for assessing feeding/fasting in reptiles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 439, p. 176–180, 2012.
- PRITCHARD, P. C. H. Evolution, Phylogeny, and Current Status. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles*. Florida: CRC Press LLC, 1997. p. 1–28.
- RAPHAEL, B. L. Chelonians (Turtles, Tortoises). In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. (Eds.) *Zoo and Wild Animal Medicine*. 5 ed. Missouri: Saunders, 2003. 48–58.
- ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. *Revista de Nutrição*, v. 19, n. 1, p. 85–91, 2006.
- ROSTAL, D. C.; GRUMBLES, J. S.; PALMER, K. S.; LANCE, V. A.; SPOTILA, J. R.; PALADINO, F. V. Changes in gonadal and adrenal steroid levels in the leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*) during the nesting cycle. *General and Comparative Endocrinology*, v. 122, p. 139–147, 2001.
- SANTOS, A. J. B.; FREIRE, E. M. X.; BELLINI, C.; CORSO, G. Body mass and the energy budget of gravid hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) during the nesting season. *Journal of Herpetology*, n. 44, p. 352–359, 2010.
- SEMINOFF, J. A.; KARL, S. A.; SCHWARTZ, T.; RESENDIZ, A. Hybridization of the green turtle (*Chelonia mydas*) and hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Pacific ocean: indication of an absence of gender bias in the directionality of crosses. *Bulletin of Marine Science*, v. 73, n. 3, p. 643–652, 2003.
- SIMPSON, K. A.; MARTIN, N. M.; BLOOM, S. R. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia*, v. 53, n. 2, p. 120–128, 2009.

TARTAGLIA, L. A.; DEMDSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. A.; CLARK, F. T.; DEEDS, J.; MURI, C.; SANKE, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K. J.; SMUTKO, J. S.; MAYS G. G.; WOOLF, E. A.; MONROE, C. A.; TEPPER, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, v. 83, p. 1263–1271, 1995.

TOSHINAI, K.; MONDAL, M. S.; NAKAZATO, M.; DATE, Y.; MURAKAMI, N.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K.; MATSUJURA, S. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n. 281, p. 1220–1225, 2001.

TROËNG, S.; DUTTON, P. H.; EVANS, D. Migration of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* from Tortuguero, Costa Rica. *Ecography*, v. 28, n. 3, p. 394–402, 2005.

TSCHÖP, M.; SMILEY, D. L.; HEIMAN, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, v. 407, p. 908–913, 2001.

TUCKER, A. D.; READ, M. A. Frequency of foraging by gravid green turtles (*Chelonia mydas*) at Raine Island, Great Barrier Reef. *Journal of Herpetology*, v. 35, p. 500–503, 2001.

TUXBURY, S. M.; SALMON, M. Competitive interactions between artificial lighting and natural cues during seafinding by hatchling marine turtles. *Biological Conservation*, v. 121, p. 311–316, 2005.

UNNIAPPAN, S.; CANOSA, L. F.; PETER, R. E. Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections. *Neuroendocrinology*, v. 79, p. 100–108, 2004.

VAM DAM, R. P.; DIEZ, C. E. Caribbean hawksbill turtle morphometrics. *Bulletin of marine science*, v. 62, n. 1, p. 145–155, 1998.

WHITAKER, B. R.; KRUM, H. Medical management of sea turtles in aquaria. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. (Eds.) *Zoo & Wild animal medicine*. v. 4. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999. p. 217 – 231.

WIBBELS, T.; OWENS, D.; LIMPUS, C.; REED, P.; AMOSS, M. Seasonal changes in gonadal steroid concentrations associated with migration, mating, and nesting in loggerhead sea turtles. *General and Comparative Endocrinology*, v. 79, n. 3, p. 154–164, 1990.

WIBBELS, T. 2003. Critical approaches to sex determination in sea turtles. In: P. Lutz, J.A. Musick & J. Wyneken (Eds.). *The Biology of Sea Turtles*. Vol II. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 103-134.

WILKINSON, R. Clinical Pathology. In: MCARTHUR, S.; WILKINSON, R.; MEYER, J. (Eds.) *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2004. p. 141-186.

WOOD, C. M.; WALSH, P. J.; KAJIMURA, M.; MCCLELLAND, G.; CHEW, S. F. The influence of feeding and fasting on plasma metabolites in the dogfish shark (*Squalus acanthias*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A, Molecular & Integrative Physiology*, v. 155, n. 4, p. 435–444, 2010.

WRIGHT, P. A. Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *The Journal of Experimental Biology* 198: 273–281, 1995.

WYNEKEN, J.; BURKE, T. J.; SOLOMON, M.; PEDERSEN, D. K. Egg failure in natural and relocated sea turtle nests. *Journal of Herpetology* 22: 88–96, 1988.

WYNEKEN, J. *The Anatomy of Sea Turtles*. U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470. 2001, 172 p.

WYNEKEN, J. The External Morphology, Musculoskeletal System, and Neuro-Anatomy of Sea Turtles. In: LUTZ, P. L.; MUSICK, J. A.; WYNEKEN, J. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles volume II*. Florida: CRC Press LLC, 2003. p. 39-78.

WYNEKEN, J. et al. Medical Care of Sea Turtles. In: MADER, D. R. *Reptile Medicine and Surgery*. 2 ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2006. p. 972–1007.

YAMADA, F.; INOUE, S.; SAITOH, T.; TANAKA, K.; SATOH, S.; TAKAMURA, Y. Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology*, v. 132, p. 2199–2205, 1993.

ZHAO, T. A. et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS*, v. 107, n. 16, p. 1467–7472, 2010.