



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE

**Estudo de antioxidantes endógenos e taxa metabólica em modelo animal
tolerante a isquemia e reperfusão**

MARCUS AURÉLIO DA COSTA TAVARES SABINO

ORIENTADOR: PROFESSOR DR. ALEXIS FONSECA WELKER

BRASÍLIA
2014

MARCUS AURÉLIO DA COSTA TAVARES SABINO

**Estudo de antioxidantes endógenos e taxa metabólica em modelo animal
tolerante a isquemia e reperfusão**

Monografia de Graduação submetida à
Faculdade de Ceilândia - Universidade
de Brasília (FCE–UnB), fazendo parte
dos requisitos necessários à obtenção
do Grau de Bacharel em Farmácia.
E-mail: marquincts@gmail.com

ORIENTADOR: PROFESSOR. Dr. ALEXIS FONSECA WELKER

BRASÍLIA
2014

Nome: SABINO, Marcus Aurélio da Costa Tavares
Título: Estudo de antioxidantes endógenos e taxa metabólica em modelo animal tolerante a isquemia e reperfusão.

Monografia de Graduação submetida à Faculdade de Ceilândia - Universidade de Brasília (FCE–UnB), fazendo parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.
E-mail: marquincts@gmail.com

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Prof. Dr. Alexis Fonseca Welker
Instituição: Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia
Assinatura:

Nome: Prof. Dr. Alex Leite Pereira
Instituição: Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia
Assinatura:

Nome: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira
Instituição: Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia
Assinatura:

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e família por todo apoio (em momentos bons e difíceis) dado durante todos estes anos no curso de Farmácia, nesta grande universidade que é a Universidade de Brasília no Campus de Ceilândia.

Agradeço intensamente a Prof.^a Dra. Carolina Arruda Freire pela coleta, cuidado dos animais, por ter se locomovido até a praia em Itapema do Norte em Santa Catarina, sem ela este trabalho não teria iniciado.

Ao Prof. Dr. Marcelo Hermes pelas ideias, entusiasmo com a pesquisa, pelas inúmeras oportunidades, e a empreitada de iniciar o que ele chama de Ecofisiologia e Bioquímica comparada, onde não necessariamente o que se faz em laboratório é a representação do todo, Charles Darwin não propôs sua teoria da evolução com resultados de laboratório, ele foi para o campo, para a natureza, ela era o seu laboratório.

Agradeço aos membros do laboratório de pesquisa (Daniel e Luana) pela convivência, e ao técnico de laboratório Francisco Orivan, grandes amigos.

E por último ao Prof. Dr. Alexis Fonseca Welker, meu mentor quando entrei no laboratório, agradeço a sua paciência, ensinamentos e generosidade, um dos grandes professores que tive na vida.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iv
ÍNDICE.....	v
SIGLAS E ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xii
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. RESPIRAÇÃO CELULAR, RADICAIS LIVRES, PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS), E ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO (ERNs).....	1
1.2. HIPÓXIA, ANÓXIA E REOXIGENAÇÃO.....	3
1.3. DEPRESSÃO METABÓLICA.....	4
1.4. CONTROLE REDOX POR ANTIOXIDANTES DE BAIXO PESO MOLECULAR.....	5
1.4.1. <i>Glutathione (GSH)</i>	5
1.4.2. <i>Ascorbato</i>	6
1.4.3. <i>Tocoferóis</i>	6
1.5. CONTROLE REDOX POR PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES E COM FUNÇÃO ENZIMÁTICA.....	6
1.5.1. <i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	6
1.5.2. <i>Catalase</i>	7
1.5.3. <i>Glutathione peroxidase (GPX)</i>	7
1.5.4. <i>Glutathione redutase (GR)</i>	7
1.5.5. <i>Glutathione S-transferase (GST)</i>	7
1.5.6. <i>Peroxiredoxinas (Prxs)</i>	8
1.5.7. <i>Tioredoxina (Trx) e tioredoxina redutase (TrX)</i>	8
1.5.8. <i>Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)</i>	8
1.5.9. <i>Oxidase alternativa (AOX)</i>	8

1.6. MARCADORES MOLECULARES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM BIOMOLÉCULAS.....	9
1.6.1. Dano em lipídeos.....	9
1.6.2. Dano em proteínas.....	10
1.6.3. Dano em DNA.....	11
CAPÍTULO 2 – ESTUDO DE ANTIOXIDANTES E TAXA METABÓLICA EM MODELO ANIMAL TOLERANTE A ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	12
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
2.1. INTRODUÇÃO.....	14
2.2. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2.1. <i>Objetivo específico</i>	16
2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.3.1. <i>Procedimento experimental</i>	17
2.3.2. <i>Análises bioquímicas</i>	17
2.3.3. <i>Níveis de equivalentes de glutathiona (Eq-GSH)</i>	17
2.3.3.1. <i>Processamento das Amostras</i>	18
2.3.3.2. <i>Solução padrão de GSH</i>	18
2.3.3.3. <i>Curva-padrão e medição</i>	18
2.3.4. <i>Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	19
2.3.5. <i>Medição de atividade enzimática</i>	19
2.3.5.1. <i>Preparo do homogeneizado</i>	19
2.3.5.2. <i>Atividade de glutathiona redutase (GR)</i>	20
2.3.5.3. <i>Atividade de glutathiona S-transferase (GST)</i>	21
2.3.5.4. <i>Atividade de citrato sintase (CS)</i>	21
2.3.5.5. <i>Atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)</i>	21
2.3.5.6. <i>Atividade de catalase</i>	22

2.3.6. <i>Medição de proteínas solúveis totais</i>	22
2.3.7. <i>Estatística</i>	23
2.4. RESULTADOS.....	24
2.5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	29
2.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXO.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Acetilcoenzima A (Acetil-CoA)

Ácido clorídrico (HCL)

Ácido tricloroacético (TCA)

Ácido tiobarbitúrico (TBA)

Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)

Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS)

Adenosina difosfato (ADP)

Adenosina monofosfato (AMP)

Adenosina trifosfato (ATP)

Antioxidantes (AH)

Ascorbato peroxidase (APX)

Bomba de sódio e potássio ATPase (Na^+/K^+ ATPase)

Cálcio 2^+ (Ca^{2+})

Cisteína (Cys)

Citrato sintase (CS)

1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB)

Cloreto de magnésio (MgCl_2)

Dehidroascorbato redutase (DHA)

8-dehidroxiguanina (8-oxo-dGua)

Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Espécies reativas de nitrogênio (ERNs)

Equivalentes de glutathiona (Eq-GSH)

Fator nuclear kappa B (NF-kB)

Fosfato inorgânico (Pi)

Ferro 2^+ (Fe^{2+})

Ferro 3^+ (Fe^{3+})

Flavina adenina mononucleotídeo dihidrogênio (FADH₂)

Fator nuclear 2 relacionado a eritróides (Nrf2)

Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF)

Elemento de resposta antioxidante (ARE)

Guanosina monofosfato cíclico (cGMP)

Glicina (Gli)

Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

Glutamato (Glu)

Glutamato-cisteína ligase (GCL)

Glutathiona (GSH)

Glutathiona dissulfeto (GSSG)

Glutathiona peroxidase (GPX)

Glutathiona peroxidase dependente de Selenium (Se-GPX)

Glutathiona sintetase (GS)

Glutathiona S-transferase (GST)

Glutathiona redutase (GR)

Glutathiona S-transferase (GST)

8-hidroxi guanina (8-OH-Gua)

4-hydroxy-2,3-trans-nonenal (4-HNE)

Lipídeo (LH)

Lipídeos hidroperóxidos (LOOH)

Magnésio 2⁺ (Mg²⁺)

Malondialdeídos (MDA)

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)

Nicotinamida difosfato dinucleotídeo hidrogênio (NADH)

Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP)

Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogênio (NADPH)

NOS endotelial (eNOS ou NOS2)
NOs induzida (iNOS ou NOS3)
NOs neuronal (nNOS ou NOS1)
NOS mitocondrial (mtNOS)
 $\cdot\text{NO}_2$ (dióxido de nitrogênio)
 NO_2^- (nitrito)
Oxidases de NADPH (NOX)
Oxidase alternativa (AOX)
Óxido nítrico (NO)
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Peróxido nitrito (ONOO^-)
Peroxiredoxinas (Prxs)
Proteínas de choque térmico (HSPs)
Radical ânion superóxido (O_2^-)
Radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$)
Superóxido dismutase (SOD)
Sintase de óxido nítrico (NOS)
Ubiquinona em sua forma oxidada (Q)
Radical lipídico (L^\cdot)
Radical peroxila (LOO^\cdot)
Radical alcoxila (LO^\cdot)
Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)
Superóxidos dismutases (SODs)
Tampão fosfato (KPi)
Tioredoxina (Trx)
Tioredoxina redutase (TrxR)
5-tio-2-ácido nitrobenzóico (TNB)

2-vinilpiridina (2-VP)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Varredura em diferentes comprimentos de onda (entre 200 e 700nm) em extrato de anêmonas com diferentes centrifugações. Diluição 1:10, condições do extrato cru ou homogeneizado: feito com tampão fosfato 50 mM e EDTA 0,5 mM, inibidor de proteases (PMSF) 1 mM final, cocktail de inibidores de proteases diluído 1:1000 a partir da solução estoque. 20
- Figura 2. Níveis de equivalentes de glutathiona (Eq-GSH) em espécimes de *Budonossoma Caissarum* expostos ao ar por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$ 24
- Figura 3. Níveis de glutathiona (GSH) em espécimes de *Budonossoma Caissarum* expostos ao ar por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$ 24
- Figura 4. Níveis de glutathiona oxidada (GSSG) em espécimes de *Budonossoma Caissarum* expostos ao ar por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$ 25
- Figura 5. Razão GSSG/GSH em espécimes de *Budonossoma Caissarum* expostos ao ar por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$ 25
- Figura 6. Níveis de atividade de catalase em espécimes de *Budonossoma Caissarum* expostos ao ar por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$ 26
- Figura 7. Níveis de atividade de glutathiona redutase (GR) em espécimes de *Budonossoma Caissarum* expostos ao ar por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$26
- Figura 8. Níveis de atividade de glutathiona S-transferase (GST) em espécimes de *Budonossoma Caissarum* expostos ao ar por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$27
- Figura 9. Níveis de atividade de citrato sintase (CS) em espécimes de *Budonossoma Caissarum* expostos ao ar por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$ 27
- Figura 10. Níveis de atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em espécimes de *Budonossoma Caissarum* expostos ao ar por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$ 28
- Figura 11. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em espécimes de *Budonossoma Caissarum* expostos ao ar por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$ 28

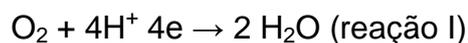
Figura 12. Status redox da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na mitocôndria. 38

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1. RESPIRAÇÃO CELULAR, RADICAIS LIVRES, PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS), E ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO (ERNs)

O processo de obtenção de energia química na respiração celular de organismos aeróbios (p.ex. animais, plantas) é um processo dependente de oxigênio, este é reduzido à água, e os macronutrientes são oxidados por reações de oxido-redução (redox). A energia química retirada, por exemplo, da molécula de glicose é conservada em coenzimas em suas formas reduzidas, nicotinamida difosfato hidrogênio (NADH) e flavina adenina mononucleotídeo dihidrogênio (FADH₂), estas são oxidadas nos complexos respiratórios na mitocôndria em reações redox (Murphy, 2009).

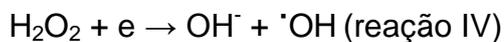
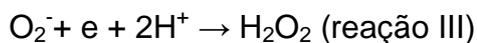
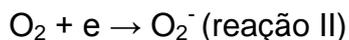
O complexo I oxida o NADH formando NAD⁺, por sua vez o mesmo complexo bombeia prótons para o espaço intermembrana, o FADH₂ é oxidado pelo complexo II, e seus elétrons são transferidos para a ubiquinona em sua forma oxidada (Q), porém o complexo II não bombeia prótons, já o complexo III é responsável por transferir os elétrons para o citocromo C, que ao se reduzir transfere seus elétrons para o complexo IV, local da redução completa de O₂, onde ocorre a formação de moléculas de H₂O. A concentração de prótons acumulada ou força próton motriz é importante para movimentar a fábrica biomolecular ATP sintase, onde produz adenosina trifosfato (ATP) a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi) (ver figura no anexo) (Murphy, 2009). A seguir reações redox da redução completa do O₂ no complexo IV (Halliwell, 1982):



Devido à redução monoelétrica do oxigênio, formam-se intermediários reativos, ou espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas constantemente na cadeia respiratória, em processos fisiológicos e patológicos (Kowaltowski et al., 2009; Hamanaka e Chandel, 2010). Apesar de mais 90% do O₂ ser consumido no complexo IV, o mesmo não libera EROs, ele produz, mas não libera, pois os intermediários reativos estão firmemente seguros a íons metálicos dentro da enzima (Halliwell, 1982; Turrens, 2003).

Exemplos de EROs são o radical ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil ([•]OH). As formas O₂⁻ e [•]OH são consideradas radicais livres por possuírem elétrons desemparelhados em seu orbital de energia mais externo, já o H₂O₂ não, este possui certa estabilidade química, com alto grau de difusão pela célula, e pode sair desta, pode reagir com metais de transição presentes em grupos prostéticos de proteínas nos complexos respiratórios produzindo o [•]OH, muito nocivo à célula (Hermes-

Lima, 2004; Kowaltowski et al., 2009), ver reação abaixo da formação de EROs (adaptado de Hermes-Lima, 2004):



As EROs são produzidas de forma natural e principalmente na mitocôndria pelos complexos I, II e III, devido à redução parcial do O_2 com grupos prostéticos destes complexos, e com a própria ubiquinona, formando o intermediário reativo O_2^- (ver figura no anexo) (Turrens, 2003; Murphy, 2009; Brand, 2010). Devido a sua alta reatividade, EROs podem oxidar biomoléculas, como carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, alterando sua estrutura, que pode afetar a sua função (Hamanaka e Chandel, 2010). Quando se gera EROs em altos níveis, acima da capacidade do controle celular, ocorre uma situação chamada de estresse oxidativo, entretanto há um novo conceito de estresse oxidativo, proposta por Jones (2006): “ruptura do controle e sinalização redox”. Em ambos os conceitos se têm aumento da concentração de pró-oxidantes.

Há outros compartimentos intracelulares geradores de EROs, como os peroxissomos presentes em animais, e os glioxissomos presentes em plantas, como fontes de H_2O_2 . A geração nestes compartimentos se dá graças à presença de enzimas como superóxido dismutase (SOD), que dismuta o O_2^- em H_2O_2 , e a catalase pode clivar esta molécula em H_2O e O_2 (ver figura no anexo). As oxidases de NADPH (NOX) também produzem EROs, e O_2 é transformado em O_2^- e H_2O_2 . NOX são consideradas como parte de um sistema sensor de níveis de oxigênio na célula, com diversas outras funções, e presente em compartimentos como mitocôndria, retículo endoplasmático (Bedard e Krause, 2007; Zamocky et al., 2008; Quinlan et al., 2012).

Há também a geração de formas reativas de nitrogênio em animais, chamadas de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), e quando se tem sua produção acima da capacidade de removê-las, tem-se o estresse nitrosativo (Ogino e Wang, 2007). As ERNs são geradas em processos fisiológicos e patológicos, através de sintases de óxido nítrico (NOS), elas produzem óxido nítrico (NO), um radical livre e importante vasodilatador (Hermes-Lima, 2004).

As isoformas de NOS possuem seu nome devido a sua presença em determinados tecidos ou condições. Por exemplo, NOs neuronal (nNOS ou NOS1), NOS endotelial (eNOS ou NOS2), e NOs que são induzidas (iNOS ou NOS3), há também a existência de NOS mitocondrial (mtNOS) (Hermes-Lima,

2004). Ambas isoformas possuem como substrato o aminoácido L-arginina. O NO pode reagir com O_2^- e formar peróxido nitrito ($ONOO^-$), ou reagir com o próprio O_2 e formar *NO_2 (dióxido de nitrogênio), uma forma muito reativa de radical livre. NO também reage com *NO_2 , formando NO_2^- (nitrito), principal produto da decomposição de NO. $ONOO^-$ não é um radical livre, porém o mesmo é tóxico as células, com alta estabilidade (Jr Kerwin, 1995). NO tem importante função na ativação de enzimas, como guanilato ciclase, enzima que produz guanosina monofosfato cíclico (cGMP), um mensageiro em processos de sinalização celular (Jr Kerwin, 1995).

1.2. HIPÓXIA, ANÓXIA E REOXIGENAÇÃO

Durante uma situação de redução do fluxo sanguíneo em determinado tecido, causando hipóxia ou até mesmo anóxia, a falta de oxigênio pode interromper o fluxo de elétrons na mitocôndria, comprometendo a produção de ATP. Há uma série de sistemas que são ATP dependentes, como as bombas de Sódio e Potássio ATPase (Na^+/K^+ ATPase), biossíntese e fosforilação de proteínas, bombas de Cálcio $^{++}$ (Ca^{++}) (Honda et al., 2005). A não manutenção do funcionamento destes sistemas pode promover um desequilíbrio homeostático celular, contribuindo para a morte celular em tecidos sensíveis a falta de oxigênio como sistema nervoso central, rim, intestino e coração (Takashi e Ashraf, 2000; Sugawara et al., 2002; Eltzchig, 2011).

Um das explicações para a morte tecidual é o excesso da produção de radicais livres, como também intensos processos inflamatórios, mobilização de Ca^{++} para o interior da célula (i.e. oriundo tanto extracelularmente quanto dos reservatórios presentes no retículo endoplasmático ou sarcoplasmático, bem como da mitocôndria) e ativação de vias de morte celular (Honda et al., 2005). Entretanto, esperar-se-ia que o retorno do oxigênio reestabelecesse o funcionamento dos processos celulares, porém as células passam a consumir o O_2 de maneira abrupta, com grande produção de radicais livres e lesão tecidual, sendo estas lesões maiores do que durante o período de isquemia (Zweier et al., 1988; Honda et al., 2005; Welker et al., 2012). Este é um paradoxo do oxigênio, pois mesmo sendo essencial ao metabolismo celular, o oxigênio contribui para lesões teciduais. Mas quando os tecidos ou células são incubados com antioxidantes (p.ex. SOD e catalase), ocorre diminuição da produção de EROs, o que evita os danos oriundos da injúria da isquemia, bem como da reperfusão (Zweier et al., 1988).

A produção de EROs durante a isquemia tem sido chamada de mais um paradoxo do oxigênio, pois com baixos níveis de O_2 , ocorre um aumento da formação de EROs, fenômeno ainda não muito compreendido (Welker et al., 2012, Welker et al., 2013).

Além destes paradoxos, outro paradoxo (o terceiro) dito na literatura, é que o envelhecimento é um processo consequente dos danos oxidativos acumulados no DNA por EROs, ou seja, apesar de o saldo energético da síntese de ATP ser bem maior com o metabolismo aeróbio, o desequilíbrio termodinâmico celular e envelhecimento tem aparentemente forte relação com o O₂, proposto por Denham Harman na década de 50 (Harman, 1956). Porém há algumas críticas e debates sobre esta teoria, bem como outros processos que podem contribuir para o envelhecimento celular, tais como a não renovação dos telômeros, e mais recentemente sobre o papel do sistema imunológico como fator principal do processo de envelhecimento, envolvendo diretamente o fator de transcrição fator nuclear kappa B (NF-kB) (Salminen e Kaarniranta, 2010).

1.3. DEPRESSÃO METABÓLICA

Na natureza, observa-se em uma gama de seres vivos em diversos filos no reino animal uma situação denominada de hipometabolismo ou depressão metabólica, na qual se tem uma forte redução dos processos fisiológicos e metabólicos em um ritmo mais lento (Hermes-Lima e Zenteno-Savín, 2002).

A depressão metabólica geralmente ocorre como resposta adaptativa em relação à escassez de nutrientes, água ou mudanças sazonais como a chegada do inverno, muito conhecido em ursos e esquilos que hibernam, bem como invertebrados que estivam (Hermes-Lima e Zenteno-Savín, 2002). Há reptéis, que em ambientes congelados como nos Estados Unidos e Canadá, resistem ao congelamento por entrar em depressão metabólica, modificando o conteúdo sanguíneo com alta liberação de moléculas crioprotetoras (ex. glicose, glicerol e alguns componentes proteicos), o que evita o congelamento do sangue, hipotermia, geração de cristais de gelo, e posterior rompimento das células (Welker et al., 2008). Nos animais que estivam, como caramujos, a estivação pode ocorrer em tempos não relacionados com a chegada do inverno, mas como resposta a escassez de nutrientes ou água; estes animais que hibernam ou estivam tem capacidade de resistir à anóxia ou hipóxia por longos períodos, mas em ambos os casos, ocorre forte redução da biossíntese de ATP, diminuição dos processos que consomem ATP, baixa da taxa metabólica, com forte queda do consumo de O₂ (Hermes-Lima e Zenteno-Savín, 2002).

O metabolismo energético durante a hibernação, estivação é mantido através da ativação de vias anaeróbias, manutenção glicêmica por gliconeogênese, consumo de estoque de gordura (clássico em mamíferos hibernantes) (Wang e Lee, 1996). Este fenômeno biológico faz parte de um complexo e integrado comportamento que visa à sobrevivência, economia de energia até que as condições se tornem favoráveis. Durante o despertar, saída

da estivação e hibernação, os processos fisiológicos tendem a voltar ao normal, assim como o retorno do consumo de O₂ (Wang e Lee, 1996).

Durante o estado hipometabólico, alguns órgãos são mantidos irrigados com oxigênio enquanto outros não. No coração de mamífero de marmota *Marmota monax* ocorre manutenção do fluxo sanguíneo, porém o rim possui uma forte redução da irrigação, em esquilos o sistema circulatório continua rico em eritrócitos, porém o sistema nervoso central tem baixa perfusão (Frerichs e Hallenbeck, 1998; Li et al., 2013). Pode-se considerar que estes órgãos ficam isquêmicos, porém não apresentam lesões, e mesmo durante a reoxigenação (durante o despertar), não se observam alterações patológicas observadas em mamíferos não tolerantes a isquemia e reperfusão (Drew et al., 2001). Como eles regulam a produção de EROs durante a entrada na depressão metabólica e durante o despertar? Uma das explicações bem aceitas é o alto poder constitutivo de antioxidantes, bem como aumento de sua biossíntese ou aumento da atividade de enzimas antioxidantes, controlando os níveis de EROs durante a entrada e saída da depressão metabólica, assim como em situações de mediação de hipóxia/anóxia e durante a reoxigenação (Hermes-Lima et al., 1998; Orr et al., 2009; Welker et al., 2013).

1.4. CONTROLE REDOX POR ANTIOXIDANTES DE BAIXO PESO MOLECULAR

1.4.1. Glutathiona (GSH)

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina (γ -L-Glu-L-Cys-L-Gli), sua biossíntese ocorre em duas etapas, ambas dependentes de ATP, e íons magnésio (Mg²⁺). Na primeira etapa, uma ligase liga glutamato e cisteína, glutamato-cisteína ligase (GCL), o dipeptídeo formado é rapidamente transformado em glutathiona pela glutathiona sintetase (GS), quando em altos níveis, GSH inibe sua própria biossíntese, inibindo GCL por retroalimentação negativa, GCL é fator limitante para a biossíntese da mesma (Meister, 1995; Griffith, 1999).

A GSH é um antioxidante, pode reagir com radicais livres, é co-substrato de enzimas, sendo um agente redutor, pode se ligar reversivelmente a proteínas com resíduos de cisteína, evitando modificações irreversíveis durante situações de estresse oxidativo e nitrosativo, chamado de S-glutathionilação, uma modificação pós traducional (Griffith, 1999). Os níveis molares de GSH em mamíferos variam de 1 a 10 mM, com alta concentração no núcleo e mitocôndria (Marí et al., 2009). Quando GSH é oxidada, forma glutathiona dissulfeto (GSSG), possuindo assim um par redox (GSH/GSSG), sendo que esta relação é de maneira geral (10:1), e quanto menor for esta razão, maior o nível de desbalanço redox, um indicador de estresse oxidativo (ver figura no

anexo) (Marí et al., 2009). GSSG possui alta concentração no retículo endoplasmático, como fonte doadora de enxofre (Marí et al., 2009).

A regulação gênica positiva de GSH ocorre por ativação do fator de transcrição fator nuclear 2 relacionado a eritróides (Nrf2), este se liga ao promotor do gene de GCL e GS, ambos possuem uma sequência de DNA denominada de elemento de resposta antioxidante (ARE), assim como glutathione S-transferase (GST). GSH está envolvida na modulação da proliferação celular, apoptose (Hur e Gray, 2010; Marí et al., 2009).

1.4.2. Ascorbato

O ascorbato é uma vitamina para os seres humanos (vitamina C), entretanto outros mamíferos são capazes de sintetizar, como esquilos. Há peroxidases que são dependentes de ascorbato, ascorbato peroxidase (APX), que cliva o H_2O_2 em H_2O , oxidando ascorbato a dehidroascorbato, este último pode ser reciclado por dehidroascorbato redutase (DHA), utilizando moléculas de GSH como agente redutor. APX está presente em plantas, e em certos grupos de animais (Hermes-Lima, 2004). Ascorbato é um antioxidante hidrofílico, muito conhecido entre marinheiros que ficavam longos períodos sem ingerir frutos cítricos que continham esta vitamina, sendo a causa de escorbuto. Provocando hemorragias em gengivas, feridas não cicatrizantes, dores em articulações, sendo que o problema era resolvido com a administração de suco de limão (Hermes-Lima, 2004). Ascorbato é importante para a absorção intestinal de íons ferro por reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} (Hermes-Lima, 2004).

1.4.3. Tocoferóis

Os tocoferóis são moléculas orgânicas não proteicas solúveis em lipídeos. A vitamina E está dentro do grupo sendo um α -tocoferol, os tocoferóis são antioxidantes lipofílicos, protegendo membranas celulares por prevenir a propagação da peroxidação lipídica (Hermes-Lima, 2004).

1.5. CONTROLE REDOX POR PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES E PROTEÍNAS COM FUNÇÃO ENZIMÁTICA

1.5.1. Superóxido dismutase (SOD)

As superóxido dismutases (SODs) são enzimas que dismutam o O_2^- em H_2O_2 (ver figura no anexo). Estão presentes em diversos compartimentos na célula como núcleo, mitocôndria, peroxissomos, membrana celular. As isoformas possuem diferenças além do peso molecular, a presença de íons diferentes em seu grupo prostético, por exemplo, há SOD dependente de Cobre e Zinco (Cu/Zn-SOD), presente na membrana externa da mitocôndria, ou a SOD extracelular, que possui ferro no seu grupo prostético (Fe-SOD), e a

SOD dependente de Manganês (Mn-SOD) presente na membrana interna da mitocôndria (Zelko et al., 2002).

1.5.2. Catalase

A catalase é uma enzima que controla altos níveis de H_2O_2 produzidos na célula. Sua catálise intrínseca cliva a molécula de H_2O_2 em H_2O e O_2 (ver figura no anexo). Presente principalmente nos peroxissomos em animais e glioxissomos em plantas, porém também se tem em mamíferos a presença desta na mitocôndria. Catalase é uma enzima ubíqua, evidenciada em muitos representantes de eucariotos e procariotos, com algumas exceções de microorganismos (Zamocky et al., 2008).

1.5.3. Glutathione peroxidase (GPX)

As glutathione peroxidases (GPXs) são enzimas relacionadas com o controle de peróxidos orgânicos e inorgânicos utilizando GSH como agente redutor. A catálise de H_2O_2 em H_2O e O_2 se dá pela isoforma dependente de selenium (Se-GPX), sendo que uma dieta pobre neste micronutriente pode reduzir os níveis constitutivos de Se-GPX, já peróxidos orgânicos são catalisados por outras isoformas de GPX (ver figura no anexo) (Hermes-Lima, 2004). Por regularem sistemas como peróxidos, a função como antioxidante pode afetar em outras funções, já que os peróxidos participam de importantes vias em processos de sinalização celular, peróxidos orgânicos podem ativar lipoxigenases e ciclooxigenases, envolvidos em processos inflamatórios, apoptose (Hermes-Lima, 2004).

1.5.4. Glutathione reductase (GR)

Glutathione reductase (GR) é um sistema enzimático que reduz GSSG a GSH na presença de NADPH (figura 1), presente em mitocôndria e peroxissomos, observado também em cloroplastos, importante também na integridade das hemácias, mantendo baixa a relação GSSG/GSH (Hou et al. 2004).

1.5.5. Glutathione S-transferase (GST)

Glutathione S-transferase (GST) faz parte de uma família de enzimas que desintoxicam xenobióticos (sistema de fase II) externos e metabólitos celulares, envolvendo a conjugação de GSH com o alvo, aumentando a hidrofiliabilidade do composto, importante para excreção celular. Há diversas formas de GSTs, algumas com funções diferentes, há, por exemplo, GST com atividade de peroxidase, transformando peróxidos lipídicos em correspondentes alcoólicos, evitando o acúmulo de aldeídos produzidos na peroxidação lipídica por radicais livres (ver figura no anexo) (Raza, 2011).

1.5.6. Peroxiredoxinas (Prxs)

Peroxiredoxinas (Prxs) são enzimas que controlam níveis de H_2O_2 produzidos na célula, mas podem ter como substratos peróxidos orgânicos e peroxidonitrito, utilizando o agente redutor tioredoxina necessário para a catálise. Presentes em bactérias, plantas, fungos e animais, as Prxs parecem ter uma raiz evolutiva ligada ao grupo enzimático de tioredoxina redutase (Trx), possuem um mecanismo catalítico conservado em comum, apresentando no seu sítio ativo um resíduo 2 Cys (cisteína), tanto nas porções amino (NH_2) e carboxi terminal ($COOH$) importante no seu ciclo catalítico, há também Prxs com apenas um resíduo de cisteína (Prx 1 Cys) (Hall et al., 2009).

1.5.7. Sistema Tioredoxina (Trx) e tioredoxina redutase (TrxR)

É uma pequena proteína, ubíqua, com dois resíduos de meia cistina no seu centro ativo, tendo uma sequência de aminoácidos -Cys-Gli-Pro-Cys-. Existe em duas formas, a forma reduzida (tioredoxina-(SH₂)), e na forma oxidada (tioredoxina-S₂) (ver figura no anexo). Trx participa de reações redox através da oxidação reversível de seu grupo ativo ditiol para a forma dissulfito, e catalisa reações de troca tiol-dissulfito, sistema importante na doação de hidrogênio para a síntese de precursores de DNA, substrato para enzimas redutoras, fator regulador de enzimas ou receptores, participa como subunidade para DNA polimerase virais, como também na estrutura e dobramento de proteínas. Tioredoxina-S₂ pode ser reduzida pela flavoproteína tioredoxina redutase (TrxR) na presença de NADPH (Holmgren, 1985).

Tioredoxina redutase é uma enzima que contém FAD, apresenta similaridades funcionais com GR, possui um centro redox ativo dissulfito no seu centro ativo, com a sequência de aminoácidos -Cys-Ala-Thr-Cys-. Seu mecanismo de ação envolve doação de elétrons do NADPH, reduzindo FAD a FADH₂, este é oxidado e tioredoxina-S₂ é reduzida a tioredoxina-(SH₂) (Holmgren, 1985).

1.5.8. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) compõe a via das pentoses fosfato, um dos principais sistemas produtores de NADPH, utilizado em reações de biossíntese, como na síntese de nucleotídeos, utilizado como cofator de GR, reciclando GSH de novo. A deficiência funcional de G6PD em humanos deixa as pessoas mais susceptíveis a estresse oxidativo, com baixa da produção de NADPH, aumento de glutatilonilação de proteínas e diminuição de função destas, como proteínas com função de reparo ao DNA (Ayene et al., 2008).

1.5.9. Oxidase alternativa (AOX)

Além dos antioxidantes citados, os animais marinhos (e plantas) possuem sistemas particulares relacionados com o controle dos níveis de EROs, como oxidase alternativa (AOX), uma enzima presente na mitocôndria, onde reduz o O_2 em H_2O , assim como o complexo IV; ela também oxida ubiquinol, evitando o bombeamento de prótons e diminuição do potencial de membrana mitocondrial, mantendo o fluxo de elétrons na cadeia respiratória quando o complexo IV se encontra inibido. É importante no controle de pO_2 intracelular, balanço redox e considerada um antioxidante (Almeida e Dimascio, 2011; Welker et al., 2013).

1.6. MARCADORES MOLECULARES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM BIOMOLÉCULAS

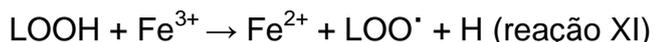
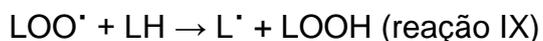
1.6.1. Dano em lipídeos

A peroxidação lipídica é uma das principais causas de injúria e morte celular. É uma reação em cadeia, geralmente causada por metais de transição, sendo que oxidantes deterioram a membrana fosfolipídica que contém ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS). O grau de peroxidação lipídica depende do tipo de oxidante, e o nível do mesmo, podendo ter poucos efeitos, alteração de fluidez e até mesmo rompimento das membranas celulares, tendo ligações com condições patológicas e doenças em humanos. No retículo endoplasmático, por exemplo, a peroxidação lipídica pode quebrar a homeostasia de íons Ca^{++} e promover efluxo deste para o citoplasma, ativando ou desativando enzimas em momentos desnecessários. Exemplos destas enzimas são proteases, fosfolipases e endonucleases; estas podem degradar enzimas, membranas e DNA. Cálcio também pode ativar NOS, produzindo NO, que ao reagir com O_2^- , forma-se $ONOO^-$ (Hermes-Lima, 2004).

O início da propagação da peroxidação lipídica começa com a abstração de elétrons por um oxidante ($\cdot OH$, $ONOO^-$) de um lipídeo (LH), a transferência do elétron do lipídeo para o radical estabiliza o último, porém forma um intermediário radical lipídico (L^\cdot), e tende a se estabilizar com a formação de estrutura de ressonância de elétrons, formando um dieno conjugado. Dieno conjugado pode reagir com oxigênio molecular, o que propicia a propagação da peroxidação lipídica com a formação de radicais lipídicos, o radical peroxila (LOO^\cdot), a seguir a reação de iniciação da peroxidação lipídica (adaptado de Hermes-Lima, 2004):

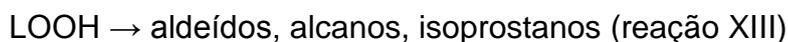


LOO[•] pode reagir com outras PUFAS e produzir lipídeos hidroperóxidos (LOOH), estes podem reagir com metais de transição como íons Fe²⁺, produzindo radical alcóxila (LO[•]), ou reagir com íons Fe³⁺ produzindo LOO[•], a seguir a reação de propagação da peroxidação lipídica (adaptado de Hermes-Lima, 2004):



Deste modo, pode-se dividir em fases a peroxidação lipídica: início, propagação e terminação. No início há baixos níveis de oxigênio, posteriormente aumento do consumo deste na fase de propagação, e na terminação da peroxidação lipídica, ocorre baixa do consumo de O₂.

A peroxidação de lipídeos pode ter seu término através da reação entre os próprios radicais lipídicos, decomposição por antioxidantes (AH) de LOOH, L e LOO ou a decomposição para outros produtos como gases de hidrocarbonos, aldeídos, isoprostanos, ver esquema da terminação da peroxidação lipídica:



Sobre os aldeídos, são os produtos da peroxidação lipídica mais relevante. Os produtos aldeídos relacionados aos PUFAs são malondialdeídos (MDA), hexanal, 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal (4-HNE), 2 propenal (acroleína) (Hermes-Lima, 2004). MDA é um dos produtos mais comuns da peroxidação lipídica, mas não é um produto estável, aldeído desidrogenases transformam o MDA a correspondentes alcoólicos (Hermes-Lima, 2004).

1.6.2. Dano em proteínas

Proteínas podem ser danificadas por mecanismos vinculados a radicais livres, irradiação, produtos da peroxidação lipídica e oxidação de açúcares com a formação de aldeídos, formando grupos carbonil, ocasionando a formação de adutos com proteínas, metabólitos derivados de NO, bem como reações mediadas por metais. O radical superóxido pode inativar aconitase (enzima presente no ciclo de Krebs), o radical hidroxil pode oxidar praticamente todos os resíduos de aminoácidos (Hermes-Lima, 2004). Na oxidação de proteínas ocorre a formação de grupos carbonyl, oxidação de resíduos de cisteína, e ditirosina. Entretanto, a formação de proteínas carboniladas como produtos finais de oxidação de proteínas são as mais relevantes em relação ao ataque

por radicais livres, tendo boa aceitação como marcador de estresse oxidativo em proteínas. Seus níveis estão aumentados, por exemplo, em pessoas com hábito de fumar e etilismo, injúria da isquemia e reperfusão, hiperóxia, Doença de Alzheimer e Parkinson, diabetes (Hermes-Lima, 2004).

1.6.3. Dano em DNA

O dano ao DNA pode ocorrer por modificações oxidativas, tendo implicações na carcinogênese e envelhecimento. Estas modificações podem ser promovidas por ozônio, $\cdot\text{OH}$, aldeídos, H_2O_2 (este na presença de metais de transição, assim como O_2^-), radiação ionizante, ERNs. Estas modificações ocorrem nas bases ou pode haver a quebra da molécula de DNA por EROs, onde o H_2O_2 reage com Fe^{2++} (reação de Fenton), formando o radical $\cdot\text{OH}$, este pode modificar todas as bases de DNA. A formação de 8-hidroxi guanina (8-OH-Gua) e sua base livre 8-deohidroxi guanina (8-oxo-dGua) são produtos da reação de $\cdot\text{OH}$ com a base guanina, indicadores de dano em DNA (Hermes-Lima, 2004).

CAPÍTULO 2 – ESTUDO DE ANTIOXIDANTES E TAXA METABÓLICA EM MODELO ANIMAL TOLERANTE A ISQUEMIA E REPERFUSÃO

RESUMO

O estresse oxidativo é um dos fatores principais de injúria durante o processo de isquemia e reperfusão, entretanto há modelos animais que lidam com a ausência de oxigênio sem alterações oxidativas em biomoléculas, em ambientes considerados potencialmente estressantes como no ambiente das marés. Neste tipo de ambiente, devido a processos cíclicos de baixa e alta das marés, espécies sésseis (presas ao substrato rochoso) marinhas que dependem de oxigênio dissolvido da água do mar, ficam privadas deste durante o período de maré baixa, e durante o retorno das marés, há a reintrodução do oxigênio da água. Em mamíferos durante a isquemia e reoxigenação, há intensa produção de radicais livres, ainda assim a anêmona do litoral brasileiro *Budonossoma caissarum* prospera nestas condições. Qual a importância dos antioxidantes para lidar com potencial estresse oxidativo quando expostas ao ar? O objetivo foi investigar a importância dos antioxidantes endógenos, atividade mitocondrial e marcador de estresse em lipídeos em *B. caissarum* na exposição aérea por três e seis horas. Não houve diferença significativa nos diversos parâmetros analisados ($P > 0,05$) nos antioxidantes, incluindo parâmetros de GSH, atividade de catalase, glutathione S-transferase e glutathione redutase; sem mudanças ($P > 0,05$) para atividade de enzimas do metabolismo intermediário (citrato sintase e glicose-6-fosfato desidrogenase), assim como marcador molecular de estresse oxidativo em lipídeos (TBARS). Estes resultados são impressionantes, demonstrando que *B. caissarum* tem uma resistência complexa em resposta a exposição aérea.

Palavras chaves: Estresse oxidativo, isquemia, reperfusão, antioxidantes, *Budonossoma caissarum*.

ABSTRACT

Oxidative stress is a main element of ischemia and reperfusion injury, however there are animals models who survive in absence of oxygen without oxidative changes in biomolecules, living in environment potentially stressful such as tidal environment. In these environments, because cyclic process of low and high tidal, marine species fixed on rock in which depends of dissolved oxygen of sea, stayed private of oxygen and exposed to air exposition during low tide, and during return of high tidal, there is the reintroduction of oxygen of water. In mammals during ischemia and reoxygenation, there is overproduction of free radical, but in similar conditions the Brazilian coast anemone *Budonossoma caissarum* prosperous. What is the importance of antioxidants for the potential oxidative stress during air exposition? The objective of this study was research importance of endogenous antioxidants, mitochondrial activity and oxidative stress markers in lipids of *B. caissarum* when entered to air exposition for tree and six hours. There was no significant difference for many parameters assayed ($P > 0,05$) in antioxidants, including GSH parameters, activity of catalase, glutathione S-transferase and glutathione reductase; no changes ($P > 0,05$) for activity enzymes of intermediary metabolism (citrate synthase and glucose-6-phosphate dehydrogenase), as well oxidative stress markers in lipids (TBARS). These results are impressive, demonstrating who *B. caissarum* have a complex resistance to air exposition.

Keywords: Oxidative stress, ischemia, reperfusion, antioxidants, *Budonossoma caissarum*.

2.1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes problemas relacionados com a vida moderna são os distúrbios cardiovasculares. Cerca de 18 milhões de pessoas morrem por ano no mundo, com alta prevalência em pessoas obesas e diabéticas (Hossain et al., 2007). Um evento comum que acomete estas pessoas é a falta de oxigênio tecidual, conhecido como isquemia, que pode ser induzida por acúmulo de placa de gorduras na parede do endotélio (aterosclerose) (Stocker e Keaney, 2004). Neurônios de mamíferos em situações de níveis reduzidos de oxigênio (hipóxia) ou ausência do mesmo (anóxia) por cinco minutos podem ter efeitos deletérios à sobrevivência, podendo haver complicações irreversíveis durante a isquemia e durante o retorno sanguíneo (reperfusão), e levar a óbito o indivíduo, processo chamado de injúria da isquemia e reperfusão (Storey e Storey, 2004).

Um dos mecanismos propostos para a morte celular, além da falta de oxigênio, é a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela mitocôndria, conhecido como estresse oxidativo (Hermes-Lima e Zenteno-Savín, 2002; Welker et al., 2012). Foi demonstrado que não apenas durante a isquemia, mas também na reperfusão, há um forte aumento da produção de ROS com conseqüente dano na estrutura e função de biomoléculas (i.e. lipídeos de membrana, proteínas, DNA) (Lefer e Granger, 2000; Welker et al., 2012). Entretanto, há alguns modelos animais que toleram o evento da injúria de processos isquêmicos e pós isquêmicos sem danos oxidativos (Frerichs e Hallenbeck, 1998; Kurtz et al. 2006).

Uma das estratégias que alguns organismos possuem para lidar com a falta de oxigênio é reduzir os processos que demandam por ATP, como a redução global da biossíntese de proteínas, optando por rotas bioquímicas anaeróbicas, permanecendo por longos períodos sem nutrientes, evento chamado de depressão metabólica (Hermes-Lima e Zenteno-Savín, 2002). Entretanto durante estas flutuações de disponibilidade de oxigênio, observa-se que alguns animais toleram os danos mediados por EROs controlando a superprodução das mesmas em momentos de anóxia/hipóxia e reoxigenação, com altos níveis constitutivos de antioxidantes e aumento de atividade de enzimas, como superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPX) e antioxidantes não enzimáticos, como glutathione (GSH), ascorbato, denominado de preparo para o estresse oxidativo (Drew et al., 1999; Welker et al., 2012; Welker et al., 2013).

Uma destas situações de intenso estresse é o observado em organismos marinhos que vivem ancorados em rochas e ficam diariamente expostos ao ar ambiente devido aos ciclos diários de baixa e alta das marés no ambiente costeiro (Freire et al., 2011a; Freire et al., 2011b, Gracey et al.,

2008). Uma anêmona adaptável a este ambiente é *Bunodosoma caissarum* do litoral costeiro brasileiro. Conforme a maré baixa, geralmente as anêmonas desta espécie ficam expostas ao ar, sendo privadas do O₂ dissolvido da água (um tipo de anóxia), porém o retorno da maré traz consigo água marinha rica em O₂ (similar a reperfusão), o que pode ser encarado como uma situação potencial de estresse oxidativo. Há também a ocorrência de flutuações de fatores abióticos como temperatura e salinidade no ambiente das marés (Amado et al., 2011; Gracey et al., 2008). Sabe-se que *B. caissarum* possui ajustes osmorregulatórios para lidar com a exposição aérea, com liberação externa de substância mucosa, diminuindo a perda de água. Por outro lado, outra espécie de anêmona (*Anemonia sargassensis*) que vive próximo do local de *B. caissarum*, que fica sempre submersa em água, pouco resiste à exposição aérea por pouco mais de uma hora (Amado et al., 2011).

Ainda não se sabe sobre as estratégias desta espécie no que tange ao metabolismo redox envolvendo o controle dos níveis de EROs por sistemas antioxidantes em situações de estresse aéreo, bem como se a mesma entra num estado de depressão metabólica para lidar com a exposição aérea, como observado em outros invertebrados marinhos (Fields e Quinn, 1981; Welker et al., 2013). Dois recentes trabalhos mostram que nos ciclos das marés quando a espécie *Mytilus californius* no seu ambiente natural na exposição aérea em momentos mais quentes do dia, analisando o perfil global de transcrição de genes, houve aumento da expressão de genes antioxidantes, como GST, GPX e Prxs (Gracey et al., 2008). O que dá respaldo ao preparo para o estresse oxidativo. Na mesma espécie também observaram aumento da expressão de genes de proteínas de choque térmico (HSPs), relacionadas com o correto dobramento de proteínas (Connor e Gracey, 2011). Estes dados indicam que durante a exposição aérea nas marés no mexilhão, há uma provável condição de desbalanço redox.

Todavia estes trabalhos carecem de informações mais apuradas sobre o metabolismo de radicais livres, no que tange a atividade de enzimas antioxidantes, metabolismo anaeróbico, bem como não avaliaram marcadores moleculares de estresse oxidativo em lipídeos. Sabendo que animais como mamíferos (humanos, ratos) sofrem danos oxidativos quando em hipóxia, anóxia e reoxigenação, como estes animais sobrevivem sem oxigênio da água? Há um preparo para o estresse oxidativo durante a exposição aérea como observado em outras espécies tolerantes à variação da disponibilidade de O₂?

2.2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta antioxidante e taxa metabólica (visto como atividade mitocondrial) de *B.caissarum* em exposição aérea por três e seis horas.

2.2.1. Objetivo específico

Avaliar a atividade enzimática de enzimas antioxidantes, níveis constitutivos do importante peptídeo GSH, atividade de enzimas do metabolismo intermediário, e níveis de danos oxidativos em lipídeos.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Procedimento experimental

As anêmonas foram coletadas da Praia de Itapema do Norte, Santa Catarina, coordenadas 26° 04'S; 48° 36'W". Os animais foram levados para o laboratório e divididos em três grupos experimentais: animal submerso em água do mar, em condições ideais de pH, temperatura, salinidade e oxigenação; e dois grupos expostos ao ar, no tempo de três e seis horas; os animais foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer -80°C.

Foram investigados sistemas relacionados com o sistema antioxidante e taxa metabólica: (i) antioxidantes não enzimáticos, no caso, o importante peptídeo glutathiona (GSH), sendo equivalentes de glutathiona (Eq-GSH), GSH, GSSG e razão GSSG/Eq-GSH, este último é um indicador de desbalanço redox; antioxidantes enzimáticos como atividade de catalase, glutathiona redutase (GR), glutathiona S-transferase (GST); enzimas relacionadas com o metabolismo intermediário, como citrato sintase (CS) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), e por um marcador de estresse oxidativo em lipídeos, TBARS.

2.3.2. Análises bioquímicas

Todas as análises foram feitas utilizando o leitor de Microplaca SpectraMax (Molecular Devices, Multi-Mode Microplate Readers), com exceção da atividade de catalase, pois não havia microplaca específica para trabalhar na região do ultravioleta. Ambas as análises envolviam métodos colorimétricos.

2.3.3. Níveis de equivalentes de glutathiona (Eq-GSH)

A concentração de glutathiona total foi determinada através da reação entre os grupos sulfidríla de duas moléculas de GSH com uma molécula 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), produzindo duas moléculas 5-tio-2-ácido nitrobenzóico (TNB) que absorvem luz em 412 nm, e uma molécula de GSSG, na proporção 2 (GSH):1 (GSSG).

O método se baseia no descrito por Akerboom e Sies (1981; APUD, Welker, 2009) e os passos dos procedimentos metodológicos para a medição dos níveis totais de glutathiona foram feitos de acordo com Welker (2009). Os níveis totais de glutathiona podem ser expressos como equivalentes de glutathiona (Eq-GSH), conhecido como método enzimático, já que a GSSG presente na amostra é reduzido a GSH pela presença de GR e NADPH, proporcionando a especificidade do método para a medição de GSH. Na medição de GSSG, a GSH era impedida de participar da reação por meio da reação com 2-vinilpiridina (2-VP), uma derivatização. A concentração de Eq-GSH e GSSG foi determinada através da formação de TNB, estimada através

da variação da absorbância em 412 nm por minuto. A GSH presente na amostra reage com DTNB, produzindo GSSG e TNB. A formação do GSSG e/ou anteriormente existente é reduzida a GSH através da GR, e a GSH volta a reagir com DTNB (Welker, 2009).

2.3.3.1 Processamento das Amostras

As amostras de tecidos congeladas e pesadas eram homogeneizadas em homogeneizador de 3 mL (tubo e pistilo de vidro), mantido sempre em baixa temperatura (no gelo), numa diluição de 1:10 (peso/volume) para o tecido de anêmona. No homogeneizador, eram adicionados ácido tricloroacético (TCA) e a amostra, de forma que a concentração de TCA final fosse de 10%. O meio acidificado evita que a GSH seja oxidada e inativa as enzimas que a degradam. A concentração de 10% para o TCA foi escolhida por promover completa precipitação das proteínas e adequada estabilidade de glutathiona. Feito o homogenato, este era transferido para tubos Eppendorf, que eram centrifugados por 6 minutos a 10.000xg sob baixa temperatura (4°C). Seu sobrenadante era usado para a determinação da concentração de Eq-GSH e GSSG (Welker, 2009).

2.3.3.2. Solução padrão de GSH

Assim como Welker (2009): “a solução padrão de GSH passava pelas mesmas etapas que as amostras. Ela continha ácido e etanol nas mesmas concentrações finais das amostras (TCA 2,38%, etanol 4,76%). A solução padrão também poderia ser feita a partir de GSSG, porém o uso de GSH tem a vantagem da concentração exata de GSH na solução poder ser aferida de forma rápida e fácil. Era feita uma solução GSH 200 μ M em TCA 10%. Sua concentração exata era medida misturando-se em tubo Eppendorf 100 μ L da solução de GSH 200 μ M TCA 10% com 300 μ L de tampão fosfato 0,5 M (pH 7,0), 100 μ L de tampão fosfato 0,5 M, EDTA 5 mM (pH 7,0), 450 μ L de água deionizada e 50 μ L DTNB 2 mM (concentração final de 0,1 mM). O tubo era agitado e a absorbância em 412 nm era registrada após aproximadamente 10 minutos em leitor de microplaca utilizando volume de 200 μ L. Nos tubos brancos, a solução de GSH era substituída por TCA 10%. Para os cálculos, a leitura dos brancos era subtraída da leitura dos tubos testes e era usado o coeficiente de extinção milimolar do TNB 13,6 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A solução ácida de GSH passava então pelas mesmas etapas que as amostras: 100 μ L eram misturados com 300 μ L de tampão fosfato 0,5 M pH 7,0 e 20 μ L de etanol. Esta solução padrão de GSH era então diluída para as concentrações desejadas (próximas das encontradas nas amostras) usando-se solução de TCA neutralizada da mesma forma que nas amostras (TCA 2,38%; tampão fosfato 0,357 M; etanol 4,76%)”.

2.3.3.4. Curva-padrão e medição

O volume final nos poços era de 0,2 mL e as concentrações do meio reacional eram: tampão fosfato 100 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM, TCA 0,238%, GSH 0 a 1,5 μ M, NADPH 0,1 mM, DTNB 2 mM e GR 0,05 U/mL. Nos poços, os mesmos eram misturados na seguinte sequência de reagentes: tampão fosfato, EDTA, solução de TCA neutralizada (ou solução niveladora), solução padrão de GSH ou amostra neutralizada, NADPH e DTNB. A reação era se iniciava com GR, e as taxas (abs/min) em 412 nm variavam entre 0 a 0,035 abs/min (similares a encontradas por Welker, 2009).

As medições eram realizadas no mesmo dia em que as amostras eram homogeneizadas.

2.3.4. Dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem de peroxidação lipídica através de TBARS é de acordo com o clássico método de Buege e Aust (1978). Os produtos da peroxidação lipídica como malondialdeído (MDA) reagem com ácido tiobarbitúrico (TBA), que por espectrofotometria observa-se a formação do aduto MDA-TBA na faixa de comprimento de onda de 532 e 600 nm. Para isto, as amostras eram homogeneizadas em homogeneizador vidro-vidro constantemente em gelo, na presença de ácido tricloroacético (TCA), com concentração final de 10% de TCA. Em poços considerados testes, eram pipetados sequencialmente 66,66 μ L de homogeneizado em TCA 10%, 66,66 μ L de TCA 10% e 66,66 μ L de TBA (0,75%) em ácido clorídrico (HCL) 0,5 M, resultando em volume final de 200 μ L, a reação ocorre em pH extremamente ácido. Em poços brancos, no lugar do TBA eram adicionados 66,66 μ L de HCL 0,5 M. Posteriormente, os tubos eram agitados em agitador automático por 40 segundos, e levados para Banho Maria durante 15 minutos a temperatura de 95°C. A seguir os mesmos eram centrifugados por 6 minutos a 10.000xg. Depois o conteúdo superior dos tubos era lido em espectrofotômetro na faixa de 532 e 600 nm, e os valores eram registrados. Para efetuar os cálculos, subtraíam-se da leitura em 532 nm dos tubos testes tanto os valores encontrados em 600 nm como a diferença (532 nm – 600 nm) obtida dos tubos brancos. Utilizou-se o coeficiente de absorvidade MDA-TBA de 156 mM⁻¹ cm⁻¹, e multiplicou-se a concentração encontrada pelas diluições realizadas durante o ensaio.

2.3.5. Medição de atividade enzimática

2.3.5.1. Preparo do homogeneizado

As amostras de tecido das anêmonas congeladas e previamente pesadas eram homogeneizadas em homogeneizador de vidro, mantido sempre no gelo. Para medir a atividade enzimática, era feito homogeneizado em tampão KPi 0,5 M e EDTA 5 mM pH 7,2 na presença do inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM em etanol (0,1 μ mol/g de tecido). A

concentração final de tampão fosfato no extra cru era 50 mM pH 7,2 EDTA 0,5 mM, resultando em uma diluição final para o tecido de 1:10 (p/v).

Os homogeneizados eram transferidos para tubos eppendorf, que inicialmente eram centrifugados a 10.000g por 15 minutos. Porém em pré-testes iniciais de atividade enzimática de catalase, observou-se forte interferência de componentes na região do ultravioleta, de modo que as amostras passaram a ser centrifugadas por 15 minutos a 15.000g, o sobrenadante era utilizado para verificação das atividades enzimáticas. Esta centrifugação era similar a de Merle et al., (2007), onde os mesmos também trabalhavam com uma espécie de anêmona, ver figura 1 abaixo:

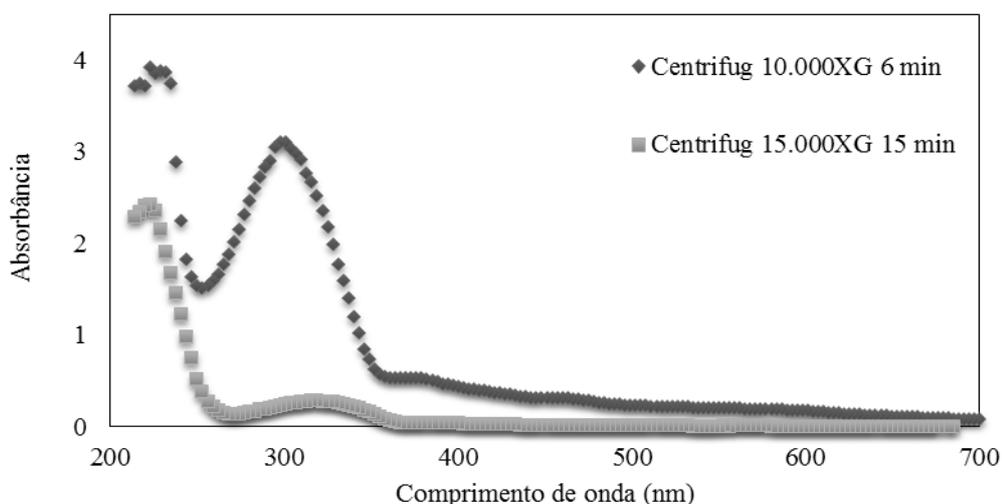


Figura 1. Varredura entre 200 e 700nm em extrato de anêmonas com diferentes centrifugações. Diluição 1:10, condições do extrato cru ou homogeneizado: feito com tampão fosfato 50 mM e EDTA 0,5 mM, inibidor de proteases (PMSF) 1 mM final, coquetel de inibidores de proteases diluído 1:1000 a partir da solução estoque.

2.3.5.2 Atividade de glutaciona redutase (GR)

A atividade enzimática de glutaciona redutase (GR) baseia-se no método de Carlberg e Mannervik (1975), acompanhando o consumo de NADPH através da queda da absorbância no comprimento de onda de 340 nm, onde a enzima converte o NADPH em NADP^+ , reciclando glutaciona oxidada (GSSG) em reduzida (GSH).

Após o preparo do homogenato, eram adicionados sequencialmente em poços: água miliQ (volume variável de forma a padronizar o volume final), 20 μL KPi 0,5 M, EDTA 5mM pH 7,0, 10 μL de GSSG 20 mM, 20 μL de sobrenadante de homogenato diluído 1:10, disparava-se a reação adicionando de 20 μL NADPH 1 mM, volume final de 200 μL . Após agitar a microplaca por 15 segundos, monitorava-se a variação da absorbância em 340 nm por 1

minuto, buscando-se taxas em torno de -0,03 abs/min. Uma unidade (U) de GR equivale à quantidade de enzima que oxida 1 μmol de NADPH por minuto ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.3.5.3. Atividade de glutathione S-transferase (GST)

Para dosar a atividade de GST, o reagente 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) reage com GSH formando um produto que pode ser observado na faixa de 340 nm. A presença de GST na amostra biológica acelera esta reação (Habig, 1974). Após o preparo do homogenato, eram adicionados sequencialmente em leitor de microplaca: água miliQ (volume variável de forma a padronizar o volume final), 20 μL de KPi 0,5 M, EDTA 5 mM, 12,5 μL de GSH 20 mM, 20 μL de homogeneizado diluído 1:40, 8 μL de CDBN 25 mM, volume final 200 μL . Para os cálculos, uma unidade (U) de GST equivale à quantidade de enzima que forma 1 μmol do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno por minuto ($\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), o valor encontrado era multiplicado pelas diluições feitas durante o experimento e dividido pela quantidade de proteínas totais.

2.3.5.4. Citrato sintase (CS)

A atividade de citrato sintase é geralmente determinada pelo monitoramento da velocidade de formação de CoA pela reação desta molécula com o 5,5-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) (Srere, 1969). O grupo tiol das moléculas de CoA reage com o DTNB formando o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), que absorve luz em 412 nm. Assim, a formação de CoA pode ser monitorada pela absorvância em 412 nm. Após o preparo do homogenato, eram adicionados sequencialmente em leitor de microplaca: água miliQ (volume variável de forma a padronizar o volume final), 20 μL de KPi 0,5 M, EDTA 5 mM, 20 μL de acetilcoenzima A (Acetil-CoA) 1 mM, 20 μL de extrato 1:20, 10 μL DTNB 10 mM e 10 μL oxaloacetato 5 mM. Uma unidade (U) de CS é definida como a quantidade de enzima que forma 1 μmol de TNB por minuto, utilizando o coeficiente de absorvância molar (ϵ_{412}) $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, o valor encontrado era multiplicado pelas diluições feitas durante o experimento e dividido pela quantidade de proteínas totais.

2.3.5.5. Atividade de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD)

A atividade de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) pode ser observada através da variação da absorvância de NADPH na faixa de comprimento de 340 nm por espectrofotometria (Kornberg, 1955). A homogeneização segue o descrito para a catalase. Eram adicionados sequencialmente em microplaca os seguintes reagentes: água miliQ (volume variável de forma a padronizar o volume final), 20 μL de KPi 0,5 M, EDTA 5 mM, 20 μL de cloreto de magnésio (MgCl_2) 50 mM, 10 μL de nicotinamida

adenina difosfato (NADP) 4 mM, 10 μ L de homogeneizado diluído 1:10, e 10 μ L de glicose-6-fosfato (G6P) 20 mM, volume final de 200 μ L. Esperava-se 100 segundos de reação, e acompanhava-se a reação por 80 segundos, valores de taxa eram anotados. Para os cálculos, uma unidade (U) de G6PD equivale à quantidade de enzima que forma 1 μ mol de NADPH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), o valor encontrado era multiplicado pelas diluições feitas durante o experimento e dividido pela quantidade de proteínas totais.

2.3.5.6. Atividade de catalase

A atividade enzimática de catalase foi medida através do método de Aebi (1984), onde por espectrofotometria monitora-se a variação da absorbância de H_2O_2 na faixa de comprimento de onda de 240 nm. O sobrenadante era separado e diluído para 1:200 com KPi 0,5 M, EDTA 5 mM para a realização dos testes. Eram adicionados sequencialmente em cubeta de quartzo: água ultrapura (miliQ), 0,1 mL de KPi 0,5 M, EDTA 5 mM, volume variável de homogeneizado, e a reação era disparada com 0,1 mL de H_2O_2 100 mM, resultando em volume final de 1 mL. O volume utilizado era, por exemplo, 10 μ L (diluição 1:10) no qual se encontra taxas em torno de -0,028 abs/min no comprimento de onda de 240nm. Taxas em torno de -0,030 (abs/min) evitam variações abruptas do substrato o que evita alterações na atividade enzimática. No caso do H_2O_2 , a sua concentração sempre era previamente conferida e utilizava-se o coeficiente de absorvidade molar de $0,04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Aebi, 1984) para corrigir a sua concentração. Para os cálculos de atividade enzimática, a taxa (abs/min) encontrada era multiplicada pelas diluições feitas durante o experimento e dividida pelo coeficiente de absorvidade molar, e também pela quantidade de proteínas solúveis totais.

2.3.6. Medição de proteínas solúveis totais

A medição dos níveis de proteínas totais deu-se em sobrenadante de homogenatos nos quais tinham sido medidas as atividades enzimáticas. O reagente “Coomassie Brilliant Blue G-250” também conhecido como reagente de Bradford, liga-se com as proteínas da amostra promovendo uma troca do comprimento de onda de 365nm para 595nm (Bradford, 1976). É um método rápido e eficaz, possuindo reprodutibilidade e sensibilidade, de modo que dentro de 2 minutos o complexo corante-proteína apresenta estabilidade por até 1 hora. Para padronização, eram utilizados 1,4 mL de reagente de Bradford, um volume de sobrenadante de homogenato de 10 μ L em uma diluição variando entre 1:40 (nesta diluição, a concentração de proteínas varia em torno de 0,1 e 0,3 mg/mL), esperava-se 5 minutos e então as amostras eram lidas. As absorbâncias eram comparadas com uma curva-padrão feita com albumina soro bovino (BSA), onde a concentração variava entre 0,1 e 0,3

mg/mL de BSA, a concentração de BSA era sempre conferida em 280 nm segundo o coeficiente de absorvidade molar $\epsilon_{280}^{1\%}$: 6,6 (Bradford, 1976), onde 0,198 de absorbância equivale a uma concentração de 0,3 mg/mL de BSA (Welker, 2009).

2.3.7. Estatística

As diferenças estatísticas entre grupos foram avaliadas utilizando a análise de variância fator único (ANOVA) no software de estatística *GraphPad*. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. A quantidade de indivíduos ou (n) experimental foi de oito animais, com n experimental para o controle de dois indivíduos, e três para os outros grupos na exposição aérea.

2.4. RESULTADOS

Não houve diferença estatística nos níveis Eq-GSH (figura 2):

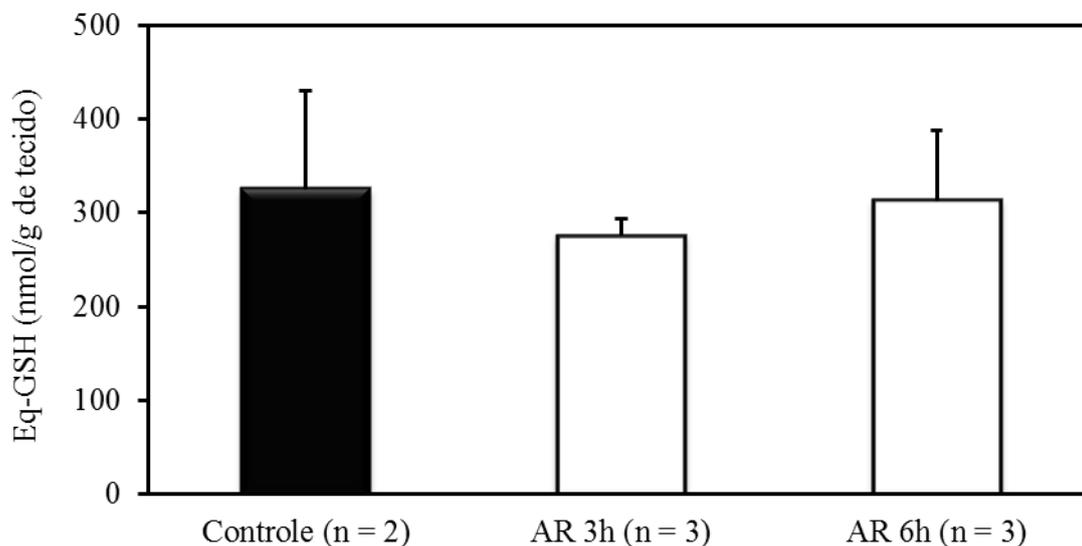


Figura 2. Níveis de equivalentes de glutatona (Eq-GSH) em espécimes de *Budonossoma caissarum* em exposição aérea por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$.

Não houve diferença estatística nos níveis de GSH ($P > 0,05$) (figura 3):

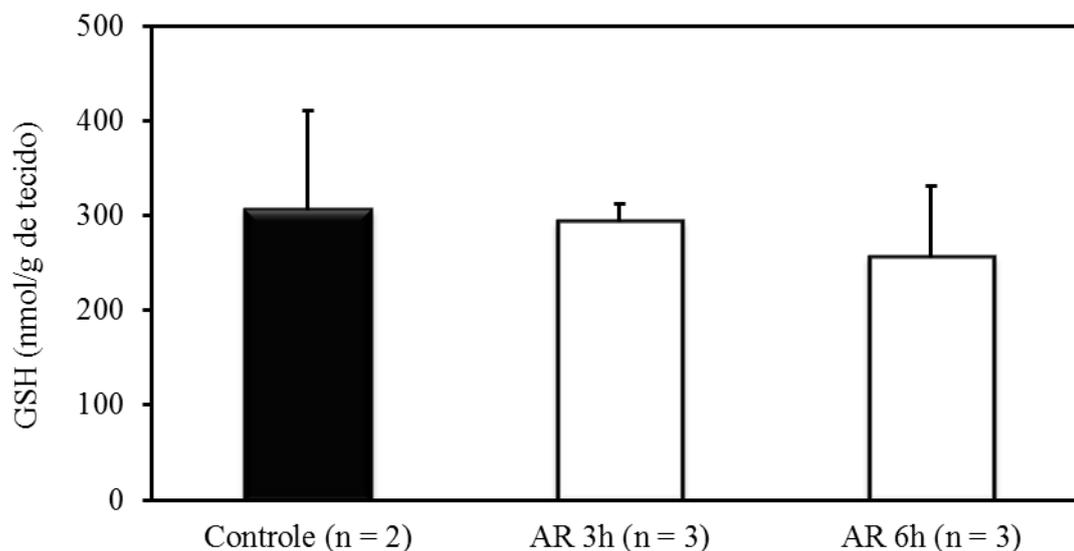


Figura 3. Níveis de glutatona (GSH) em espécimes de *Budonossoma caissarum* em exposição aérea por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$.

Não houve diferença estatística nos níveis de GSH/GSSG (figura 4):

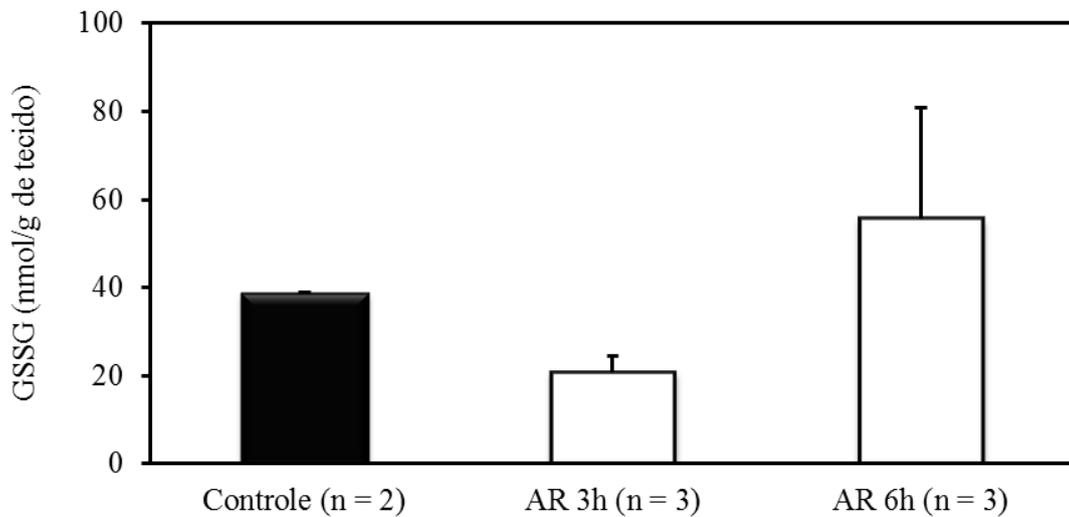


Figura 4. Níveis de glutathiona oxidada (GSSG) em espécimes de *Budonossoma caissarum* em exposição aérea por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$.

Não houve diferença estatística nos níveis de GSH/GSSG ($P > 0,05$) (figura 5):

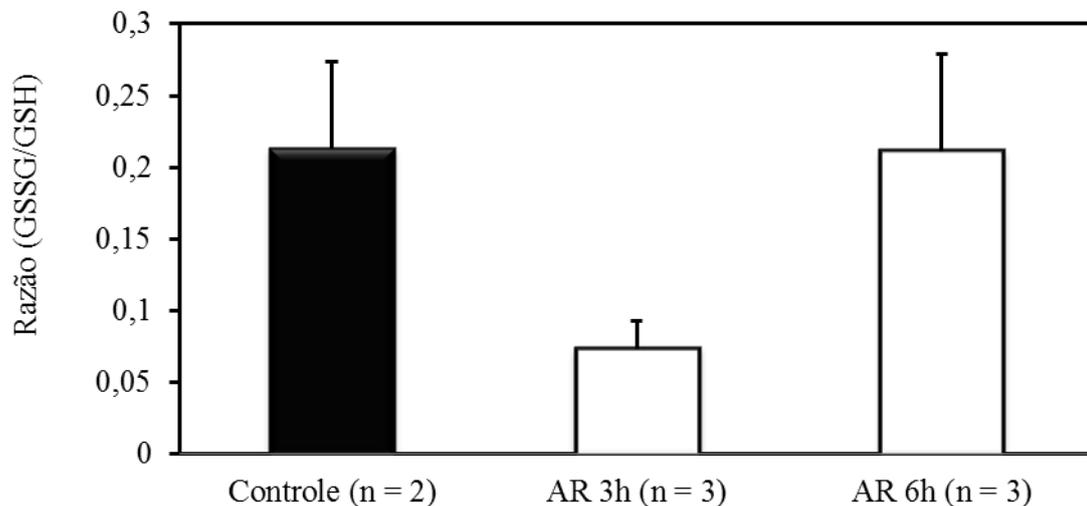


Figura 5. Razão GSSG/GSH em espécimes de *Budonossoma caissarum* em exposição aérea por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$.

Não houve diferença estatística nos níveis de atividade de catalase ($P > 0,05$) (figura 6):

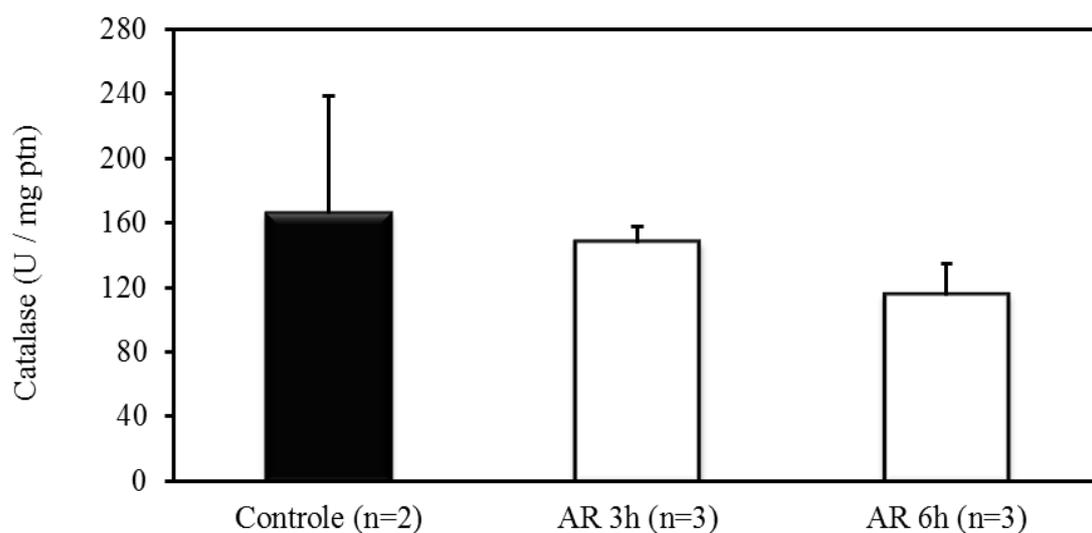


Figura 6. Níveis de atividade de catalase em espécimes de *Budonossoma caissarum* em exposição aérea por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$.

Não houve diferença estatística nos níveis de atividade de GR ($P > 0,05$) (figura 7):

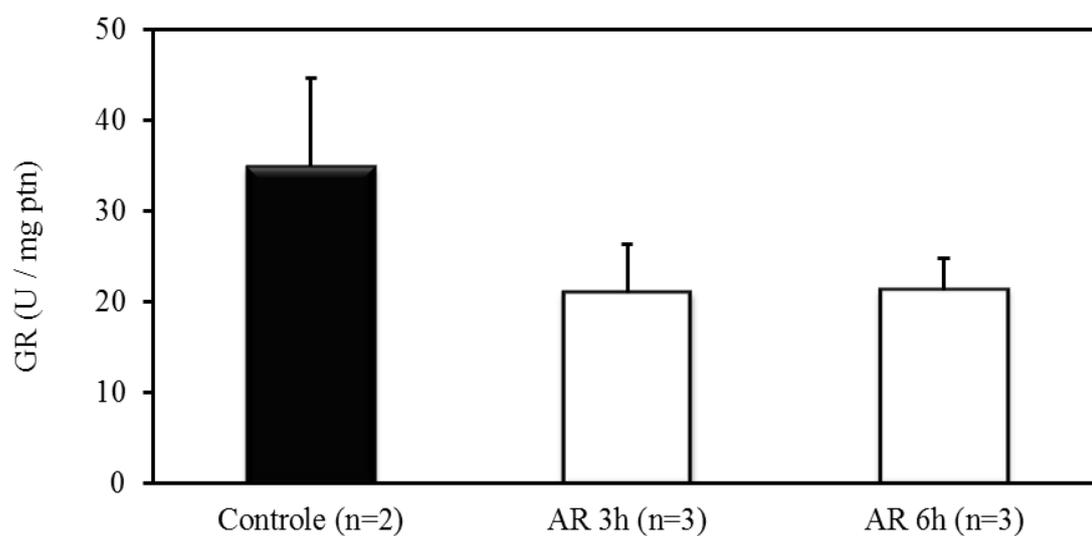


Figura 7. Níveis de atividade de glutathiona redutase (GR) em espécimes de *Budonossoma caissarum* em exposição aérea por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$.

Não houve diferença estatística nos níveis de atividade de GST ($P > 0,05$)(figura 8):

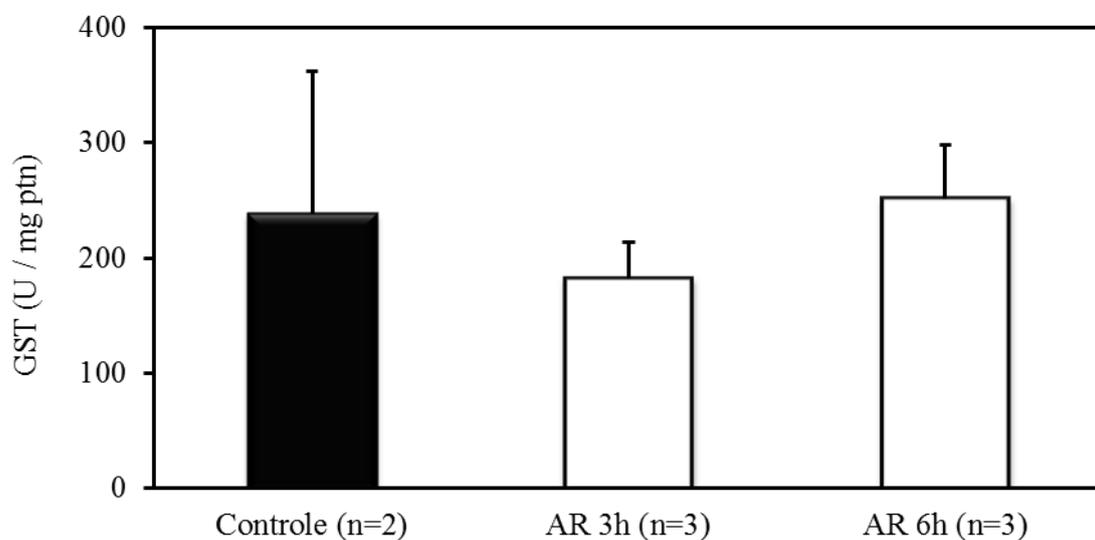


Figura 8. Níveis de atividade de glutathiona S-transferase (GST) em espécimes de *Budonossoma caissarum* em exposição aérea por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$.

Não houve diferença estatística nos níveis de atividade de CS ($p > 0,05$) (figura 9):

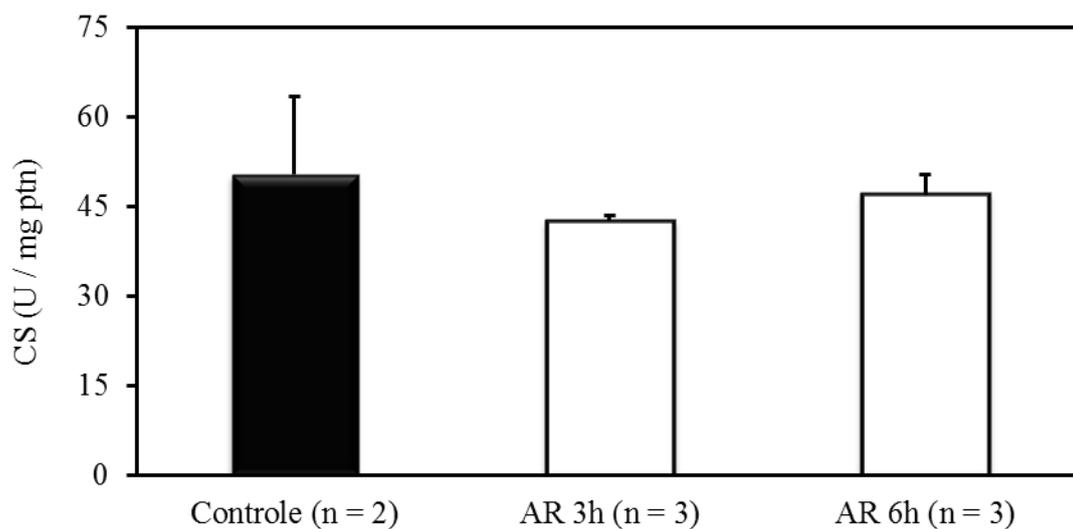


Figura 9. Níveis de atividade de citrato sintase (CS) em espécimes de *Budonossoma caissarum* em exposição aérea por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$.

Não houve diferença estatística nos níveis de atividade de G6PD ($P > 0,05$) (figura 10):

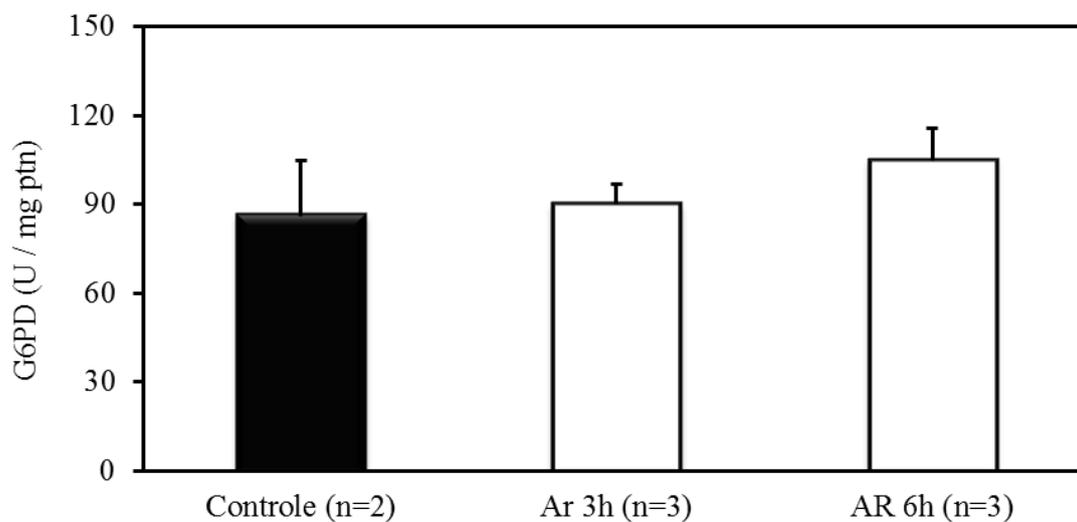


Figura 10. Níveis de atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em espécimes de *Budonossoma caissarum* em exposição aérea por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$.

Não houve diferença estatística nos níveis de TBARS ($P > 0,05$) (figura 11):

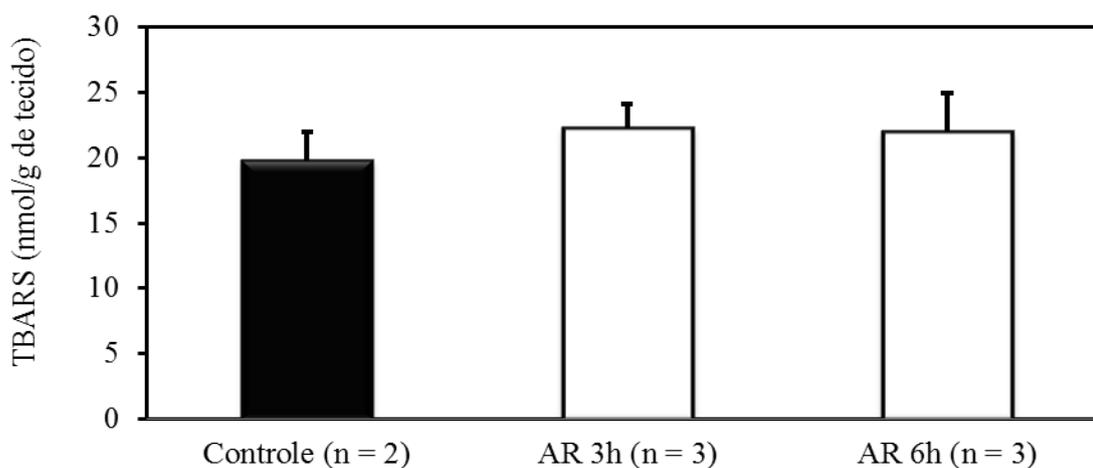


Figura 11. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em espécimes de *Budonossoma caissarum* em exposição aérea por três e seis horas. Dados representados como média e erro padrão, $P > 0,05$.

2.5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A sobrevivência a anóxia, hipóxia e reoxigenação tem sido algo de grande investigação (Hermes-Lima et al., 1998; Hermes-Lima e Zenteno-Savín, 2002; Welker et al., 2012; Welker et al., 2013). É comum em espécies ancoradas a rochas no ambiente costeiro a privação de O₂ devido às descidas e subidas diárias das marés, assim como flutuações de salinidade, temperatura (Freire et al., 2011a e 2011b, Amado et al., 2011). Mesmo nestas condições a anêmona *B. caissarum* prospera. Este estudo piloto avaliou inicialmente a resposta do sistema antioxidante, marcador molecular de dano em lipídeos e atividade mitocondrial desta espécie submetida a um potencial estresse oxidativo quando em exposição aérea, mas não se observou alterações no status redox a partir dos parâmetros analisados.

É impressionante a não alteração da atividade das enzimas antioxidantes, níveis de TBARS, e os parâmetros de GSH. Na espécie marinha de síri *Callinectes ornatus*, houve aumento da atividade de GPX, GST e catalase na exposição aérea por três horas (Freire et al., 2011a).

Em trabalhos com o gênero da espécie (*Budonossoma cavernata*), a exposição aérea nos mesmos tempos propostos por este trabalho, mostrou que o metabolismo aeróbio permanece contínuo mesmo durante a exposição aérea (Ellington, 1981; Ellington, 1982). Talvez isto explique que provavelmente os animais continuem respirando oxigênio, como observado pela manutenção dos níveis de citrato sintase, mesmo após seis horas de exposição aérea. A produção de substância mucosa também contribui para evitar a perda de água, durante a exposição aérea, sendo evidenciada durante os experimentos laboratoriais, ao contrário de *A. sargassensis* que não possui esta capacidade (Amado et al., 2011).

Por outro lado, dados da literatura mostram que a anêmona do mesmo gênero, *B. cavernata* sofre uma forte depressão metabólica quando exposto por longos períodos de anóxia (96 horas), com forte queda da produção de ATP, aumento da relação ADP/ATP, e aumento de adenosina monofosfato (AMP), baixa produção de CO₂ (quase zero), evidenciando a depressão metabólica (Ellington, 1981). Poderia se esperar o efeito *Pasteur*, aumento de lactato, consumo do NADH acumulado na cadeia respiratória e oxidação de NADH por lactato desidrogenase, produzindo NAD⁺, entretanto os níveis de lactato produzidos continuaram baixíssimos e inalteráveis ao longo da prolongada anóxia (Ellington, 1981).

Neste gênero e entre outros animais marinhos, tem-se aumento da produção de aminoácidos (p.ex. alanina, glutamato) relacionados com a respiração anaeróbia, e enzimas comuns em organismos marinhos, que produzem metabólitos correspondentes ao acúmulo de lactato durante

anaerobiose (Ellington, 1981; Ellington, 1982; Fields, 1981). A alanina é convertida em alanopino por alanopino desidrogenase, produzindo NAD^+ , este é importante para que a via glicolítica siga na direção da formação de ATP durante a profunda anaerobiose (Fields, 1981).

Assim, pode-se concluir que esta espécie tem uma alta capacidade de sobreviver privada de oxigênio da água sem alterar parâmetros do sistema antioxidante analisado e manutenção do status redox sem aumento de danos oxidativos em lipídeos. Não se pode ainda concluir que estes animais não possuem um preparo para o estresse oxidativo sem medir outros antioxidantes importantes como ascorbato peroxidase, Se-GPX e GPX total, SODs, Prxs; assim como outros marcadores moleculares de dano oxidativo em lipídeos (p.ex. peróxidos lipídicos) e proteínas (p.ex. proteínas carboniladas), o que pode dar uma visão global do sistema antioxidante na homeostasia do status redox de *B. caissarum*.

2.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este projeto faz parte de um plano piloto para investigar o metabolismo redox de *B. caissarum* quando exposto ao ar. Talvez dentro do seu ambiente natural na praia, as respostas adaptativas fiquem mais claras devido aos diferentes fatores abióticos que podem potencializar um maior nível de estresse oxidativo na espécie, como observado por Gracey et al., (2008) e Connor e Gracey (2011), tendo o laboratório com um controle destas variáveis. Esta espécie pode dar respostas iniciais sobre as origens em animais da tolerância a privação de oxigênio, de grande importância, por exemplo, para evitar danos oriundos da produção de radicais livres em excesso durante um acidente vascular encefálico, mediado por uma isquemia e reperfusão em humanos.

2.7. REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AKERBOOM, T.P., SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymology**, v. 77, p. 373-382, 1981.

AMADO, E.M., VIDOLIN D., FREIRE C.A., SOUZA M.M. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. **Comparative Biochemistry and Physiology A Molelar Integrative Physiology**, v. 158, p. 542–551, 2011.

AYENE, I.S., BIAGLOW, J.E., KACHUR, A.V., STAMATO, T.D., KOCH, C.J. Mutation in G6PD gene leads to loss of cellular control of protein glutathionylation: mechanism and implication. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 103, p. 123–135, 2008.

BEDARD, K., KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 245–313, 2007.

BENNETT, A.F. Experimental evolution and the Krogh principle: generating biological novelty for functional and genetic analyses. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 76(1), p. 1–11, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND, M. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. **Experimental Gerontology**, v. 45, 466–472, 2010.

BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 250, p.5475-5480, 1975.

DREW, K.L., RICE, M., KUHN, T.B., SMITH, M.A. Neuroprotective adaptations in hibernation: therapeutic implications for ischemia-reperfusion, traumatic brain injury and neurodegenerative diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31:(5), p. 563–573, 2001.

ELLINGTON, W.R. Effect of Anoxia on the Adenylates and the Energy Charge in the Sea Anemone, *Bunodosoma cavernata* (BOSC) **Physiological Zoology**, v.54:(4), p. 415-422, 1981.

ELLINGTON, W.R. Metabolic responses of the sea anemone *Bunodosoma cavernata* (Bosc) to declining oxygen tensions and anoxia. **Physiological Zoology**, v. 55:(3), p. 240-249, 1982.

ELTZCHIG, H.K., ECKLE, T. 2011. Ischemia and reperfusion – from mechanism to translation. **Nature Medicine**, v. 17:(11), p. 1391–1401.

FIELDS, J.H.A., QUINN, J.F. Some theoretical considerations on cytosolic redox balance during anaerobiosis in marine invertebrates. **Journal of Theoretical Biology**, v. 88, p. 35-45, 1981.

FREIRE, C.A., TOGNI, V.G., HERMES-LIMA, M. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. **Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular Integrative Physiology**, v. 160, p. 291–300, 2011a.

FREIRE, C.A., WELKER, A.F., STOREY, J.M., STOREY K.B, HERMES-LIMA, M. Oxidative stress in estuarine and intertidal species. **Oxidative stress in aquatic ecosystems**. First Edition. In Abele, D., Vázquez-Medina J.P., Zenteno-Savín T. (Eds). Wiley Blackwell, New York, p. 41–57, 2011b.

FRERICHS, K.U., HALLENBECK, J.M. Hibernation in ground squirrels induces state and species-specific tolerance to hypoxia and aglycemia: an in vitro study in hippocampal slices. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 18, p. 168–175, 1998.

GRACEY, A.Y., CHANEY, M.L., BOOMHOWER, J.P., TYBURCZY, W.R., CONNOR, K., SOMERO, G.N. Rhythms of gene expression in a fluctuating intertidal environment. **Current Biology**, v.18, p. 1501–1507, 2008.

GRIFFITH, O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 922–935, 1999.

HALL, A., KARPLUS, P.A. E POOLE, L.B. Typical 2-Cys peroxiredoxins – structures, mechanisms and functions. **FEBS Journal**, v. 276, p. 2469–2477, 2009.

HABIG, G, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130–7139, 1974.

- HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, 1609-1623, 1992.
- HAMANAKA, R.B., CHANDEL, N.S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, 505–513, 2010.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: K.B. Storey; (Ed.). **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004, p. 319-368.
- HERMES-LIMA, M., STOREY, J.M., STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry Molecular Biology**, v. 120, p. 437–448, 1998.
- HERMES-LIMA, M., ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology and Pharmacology**, v. 133, p. 537–556, 2002.
- HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annual Review Biochemistry**, v. 54, p. 237–71, 1985.
- HONDA, H.M., KORGE, P.E., WEISS, J.N. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1047, p. 248–258, 2005.
- HOSSAIN, P., KAWAR, B.E.L., NAHAS, M. Obesity and diabetes in the developing world — a growing challenge. **The New England Journal of Medicine**, v. 356:(3), p. 213–215, 2007.
- HOU, WEN-CHI., LIANG, H.J., WANG, C.C., LIU, D.Z. Detection of glutathione reductase after electrophoresis on native or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 25, p. 2926–2931, 2004.
- HUR, W., GRAY, N.S. Small molecule modulators of antioxidant response pathway. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, p. 1–12, 2010.
- JR KERWIN, J.F. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38:(22), p. 4343–4362, 1995.
- JONES, D.P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signals**, v. 8, 1865-1879, 2006.

KORNBERG, A., HORECKER, B.L., SMYRNIOTIS, P.Z. Glucose-6-phosphate dehydrogenase - 6-phosphogluconic dehydrogenase. **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 323-327, 1955.

KOWALTOWSKI, A.J., SOUZA-PINTO, N.C., CASTILHO, R.F., VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 333–343, 2009.

KURTZ, C.C., LINDELL, S.L., MANGINO, M.J., CAREY, H.V. Hibernation confers resistance to intestinal ischemia-reperfusion injury. **American Journal Physiology –Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 291, p. G895–G901, 2006.

LEFER D.J., GRANGER, D. Oxidative stress and cardiac disease. **American Journal of Medicine**, v. 109, p. 315–323, 2000.

LI, H., LIU, T., CHEN, W., JAIN, M.R., VATNER, D.E., VATNER, S. F., KUDEJ, R.K., YAN, L. Proteomic Mechanisms of Cardioprotection during Mammalian Hibernation in Woodchucks, *Marmota Monax*. **Journal of Proteome Research**, v. 12, p. 4221–4229, 2013.

MARÍ, M., MORALES, A., COLELL, A., GARCÍA-RUIZ, C., FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11:(11), p. 2685–2700 , 2009.

MERLE, P.L., SABOURAULT, C., RICHIER, S., ALLEMAND, D., FURLA, P. Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic sea anemone. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 236–246, 2007.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Methods in Enzymology**, v. 251, pp. 3-7, 1995.

MORENO-SANCHEZ R., HERNANDEZ-ESQUIVEL, L., RIBERO-SEGURA, N.A., MARIN-HERNANDEZ, A., NEUZIL, RALPH, J.S., RALPH, J., RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S. Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II – evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I. **FEBS Journal**, v. 280, 927–938, 2013.

MURPHY, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, p. 1–13, 2009.

OGINO, K., WANG, D.H. Biomarker of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. **Acta Medica Okayama**, v. 61:(4), p.181–189, 2007.

ORR, A.L., LOHSE, L.A.L., DREW, K.L., HERMES-LIMA, M. Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in arctic ground squirrel. **Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular Integrative Physiology**, v. 153:(2), p. 213–221, 2009.

QUINLAN, C.L., ORR, A.L., PEREVOSHCHIKOVA, I.V., TREBERG, J.R., ACKRELL, B.A. E BRAND, M.D. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287:(32), p. 27255–27264, 2012.

RAZA, D. Localization of Glutathione S-Transferase in the Cytosol and Mitochondria: Implications in Oxidative Stress, Toxicity and Disease. **FEBS Journal**, v. 278(22), p. 4243–4251, 2011.

RIGOULET, M., YOBOUE, E.D., DEVIN, A. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H₂O₂ signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14(3), p. 459–469, 2011.

SRERE, P.A. Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. **Methods in Enzymology**, v. 13, p. 3–11, 1969.

SALMINEN, A., KAARNIRANTA, K. Genetics vs. entropy: longevity factors suppress the NF-κB-driven entropic aging process. **Ageing Research Reviews**, v. 9, p. 298–314, 2010.

SEO, M.S., KANG, S.W., KIMI, K., BAINES, I.C., LEE, T. H., RHEE, S.G. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction Intermediate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275:(27), p. 20346–20354, 2000.

STOCKER, R., KEANEY, J.F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 1381–1478, 2004.

STOREY, K.B, STOREY, J.M. Oxygen limitation and metabolic rate depression. **In Functional metabolism: regulation and adaption**. Editor: Kenneth B. Storey. Wiley-liss, Inc., Hoboken, New Jersey, p. 415 – 442, 2004.

SUGAWARA, T., LEWÉN, A., NOSHITA, N., GASCHÉ, Y., CHAN, P.H. Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 19:(1), p. 85–98, 2002.

TOIEN, O., DREW, K.L., CHAO, M.L., RICE, M.E. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. **American Journal Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, p. R572–R583, 2001.

TAKASHI, E., ASHRAF, M. Pathologic Assessment of Myocardial Cell Necrosis and Apoptosis after Ischemia and Reperfusion with Molecular and Morphological Markers. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 32, p. 209–224, 2000.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552.2, pp. 335–344, 2003.

WANG, L.C.H. E LEE, T.F. Torpor and hibernation in mammals: metabolic, physiological, and biochemical adaptations. In **Handbook of Physiology: Environmental Physiology**. Section 4, Vol. 1 (ed. M. J. Fregley e C. M. Blatteis), p. 507–532, 1996. New York: Oxford University Press.

WELKER, A.F. Efeito da flutuação da disponibilidade de oxigênio e da privação alimentar sobre o metabolismo de radicais livres. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Brasil, 2009.

WELKER, A.F., CAMPOS, E.G., CARDOSO, L.A., HERMES-LIMA, M. Role of catalase on the hypoxia/reoxygenation stress in the hypoxia-tolerant Nile tilapia. **American Journal Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, p. R1111–R1118, 2012.

WELKER, A.F., MOREIRA, D.C., CAMPOS, É.G., HERMES-LIMA, M. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. **Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular Integrative Physiology**, v. 165:(4), p. 384–404, 2013.

WELKER, A.F., RAMOS-VASCONCELOS, G.R., PHILIPP, E., HERMES-LIMA, M. Vida animal en ambientes extremos, papel de los radicales libres y los antioxidantes. In: Konigsberg Fainstein, M. **Radicales Libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas**. México: Manual Moderno. 2008.

ZAMOCKY, M., FURTMULLER, P.G., OBINGEN, C. Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10:(9), p. 1527–1547, 2008.

ZELKO, I.N., MARIANI, T.J., FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), AND EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33:(3), p. 337–349, 2002.

ZWEIER, J.L., KUPPUSAMY, P., LUTTY, G.A. Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in post ischemic tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 4046–4050, 1988.

ANEXO

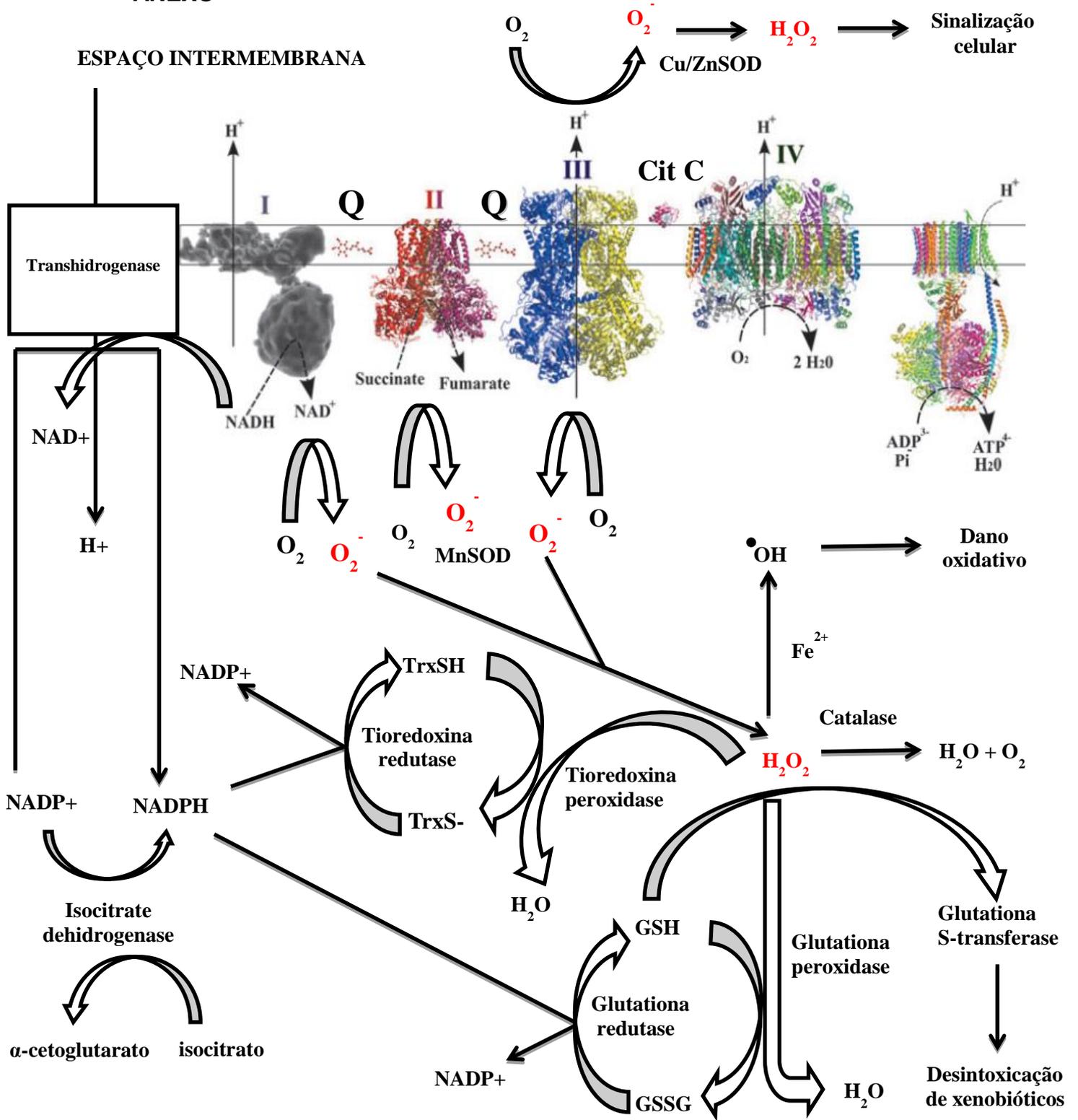


Figura 12. Status redox da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na mitocôndria. Figura adaptada de: Turrens, 2003; Kowaltowsky et al., 2009; Raza, 2011; Rigoulet et al., 2011. Legenda: Q: ubiquinona, Cit C: citocromo C.