Marlize Ferreira Cravo

Variação na disponibilidade de oxigênio e respostas antioxidantes no gastrópode *Helix aspersa*

Variation in oxygen disponibility and antioxidants responses in the gastropod *Helix aspersa*

São Paulo
2011

Marlize Ferreira Cravo

Variação na disponibilidade de oxigênio e respostas antioxidantes no gastrópode *Helix aspersa*

Variation in oxygen disponibility and antioxidants responses in the gastropod *Helix aspersa*

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientador: Marcelo Hermes Lima

São Paulo
2011

Ferreira Cravo, Marlize

Variação na disponibilidade de oxigênio e respostas antioxidantes no gastrópode *Helix aspersa*.

Número de páginas: 107.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Glutationa 2. Estresse Oxidativo 3. Anóxia I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão julgadora:

_____	_____
Prof (a). Dr. (a).	Prof (a). Dr. (a).
_____	_____
Prof (a). Dr. (a).	Prof (a). Dr. (a).

_____

Prof (a). Dr. (a).
Orientador (a)

Dedicatória

Para a minha mãe e para meu amado Deivid.

Epígrafe

The old believe everything; the middle-aged suspect everything: the young know everything.

Oscar Wilde

Agradecimentos

À minha família, pelo apoio dado nestes anos, por aguentar as minhas crises e me incentivar. Ao Deivid por ter estado perto, mesmo quando longe.

Às minhas amigas e amigos, que me abrigaram em São Paulo e em Brasília, pelas conversas, idas ao cinema, pelos sushis e hot roll e pelas pizzas, e também pela malhação conjunta, um animando o outro a perder as calorias adquiridas no fim de semana.

Ao "boss" Marcelo pela orientação. Agradeço ao doutor professor Alexis Welker, pelas dicas metodológicas. Ao doutorando, quase doutor Roberto, suas broncas sobre organização e limpeza sempre tiveram efeito. Aos colegas de laboratório, pela ajuda durante esses anos de pós-graduação. Daniel, Marcus e Susane, os bolsistas de iniciação científica "animais-radicais", o apoio dado não será esquecido. Ao técnico de laboratório Chiquinho, por todo nitrogênio líquido que sempre conseguiu nas horas mais difíceis e estressantes.

Aos dois dos integrantes do "trio maravilha", Marcos Bürger e Rafaella Franco, nem sei o que dizer para agradecer a diversão e a confusão.

Aos professores do Instituto de Biociências, pelas aulas e pelo aprendizado, especialmente agradeço as professoras Silvia, Gisele e Renata e ao professor Bicudo. À professora Alicia Kowaltowski, por me receber em seu laboratório. Agradeço também a sua equipe, Camille Caldeira, Eric, Bruno, Ariel e Fernandas. Aos colegas de pós-graduação, especialmente Danilo e Barbara.

Aos professores da banca por terem aceitado o convite, espero aprender e melhorar com as suas críticas.

Aos coordenadores do meu curso de pós-graduação, Gilberto Xavier e Zé Gui, e a secretária Roseli, um anjo de pessoa, que me salvou diversas vezes.

Às professoras Egle Siqueira e Sandra Arruda e equipe, por serem vizinhas de trabalho tão cordiais e prestativas.

Ao nosso fornecedor Carlos Funcia, pelos escargots, nosso modelo animal.

Agradeço enfim a todos que me ajudaram a concluir mais uma etapa de minha vida.

Obrigada!

Índice

Dedicatória……..……..... iii
Epígrafe……..... iv
Agradecimentos……..... v
Índice……..... vi
Lista de Figuras……..... vii
Lista de Tabelas……..... viii
Lista de Gráficos……..... x

Introdução Geral……..……..... 1

Capítulo 1– Respostas antioxidantes durante a anoxia e a reoxigenação em *Helix aspersa* com a síntese de glutationa diminuída……..…..... 16
Abstract/Resumo……..……...…….……... 16
1.1 Introdução……..……...……..……... 18
1.2 Materiais e Métodos……..……...…….……...… 20
1.3 Resultados……..……...…… 28
1.4 Discussão e Conclusões……...……..... 46

Capítulo 2 – Respiração e produção de ROS mitocondrial na glândula digestiva de *Helix aspersa* em estivação……..... 57
Abstract/Resumo……..……...…… 57
2.1 Introdução……..……...……. 58
2.2 Materiais e Métodos……..……...…… 59
2.3 Resultados……..……...…… 61
2.4 Discussão e Conclusões……...…… 65

Capítulo 3 – Aspectos fisiológicos e bioquímicos da dormência em gastrópodes terrestres…….. 70
3.1 Introdução……..……...…….… 70
3.2 Características fisiológicas ligadas à dormência……....…….… 70
3.3 Características bioquímicas ligadas à dormência……....……...…….… 71

Resumo (Geral)……..……..... 82
Abstract……...…..... 83
Referências bibliográficas……..…….. 85

Lista de Figuras

Figura 1: Produção de ROS pela enzima xantina oxidase. Extraído de Granger, 1988……... 4

Figura 2: Via de formação de espécies pró-oxidantes e vias de detoxificação pelo sistema de defesa antioxidante enzimático……... 4

Figura 3: Metabolismo da glutationa em células de fígado, extraído de Hermes-Lima, 2004……..…..… 7

Figura 4: Mecanismos da *S*- glutationilação e desglutationilação, extraído de Dalle-Donne et al., 2009…….…. 10

Figura 5: Reações do sistema glutaredoxina, extraído de Kalinina et al., 2008……... 10

Figura 6: Reações do sistema tioredoxina, extraído de Kalinina et al., 2008……... 6

Figura 7: Caixa plástica contendo exemplares de *Helix aspersa*…….…. 20

Lista de Tabelas

Tabela 1: Taxa metabólica de gastrópodes terrestres pulmonados em estado normal e deprimido (extraído e modificado de Guppy & Withers, 1999)…….. 2

Tabela 2: Estresse fisiológico e preparo para o estresse oxidativo em alguns animais, baseado em: Abele et al., 1998; Cooper et al., 2002; Ferreira et al., 2003; Hermes-Lima & Storey, 1993; Hermes-Lima & Storey, 1995; Hermes-Lima & Storey, 1996; Hermes-Lima & Storey, 1998; Joanisse & Storey, 1996; Lushchak et al., 2001; Lushchak et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Pannunzio & Storey, 1998; Ramos-Vasconcelos et al., 2005; Willmore & Storey, 1997a; Willmore & Storey, 1997b……. 15

Tabela 3: Composição da ração segundo Welker, 2009……..... 20

Tabela 4: Curva 1, contendo de 0 a 1,5 µM de GSH…….. 23

Tabela 5: Curva 2, contendo de 0 a 0,2 µM de GSH……..…. 23

Tabela 6: Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Otala lactea* estivante por 30 dias e 24 horas depois do despertar, retirado e modificado de Hermes Lima & Storey, 1995 e Hermes Lima et al., 1998……. 77

Tabela 7: Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix aspersa* estivante por 20 dias e 24 horas depois do despertar durante o inverno, retirado e modificado de Ramos-Vasconcelos & Hermes Lima, 2003..... 78

Tabela 8: Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix aspersa* estivante por 20 dias e 24 horas depois do despertar durante o verão, retirado e modificado de Ramos-Vasconcelos at al., 2005……. 78

Tabela 9: Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix pomatia* tórpidos e ativos no outono, retirado e modificado de Nowakowska et al., 2009a…….……... 78

Tabela 10: Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix pomatia* em vários estágios de hibernação (inverno), retirado e modificado de Nowakowska et al., 2009a……... 79

Tabela 11: Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix pomatia* tórpidos e ativos na primavera, retirado e modificado de Nowakowska et al., 2009a…….. 79

Tabela 12: Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix pomatia* estivantes (21 dias) e acordados em laboratório, retirado e modificado de Nowakowska et al., 2009b…….…… 80

Tabela 13: Respostas antioxidantes e conteúdo de GSH em *Helix pomatia* estivantes (21 dias) e acordados no campo, retirado e modificado de Nowakowska et al., 2010…… 81

Tabela 14: Respostas antioxidantes em *Achatina fulica* estivantes (28 dias) e acordados, retirado e modificado de Salway et al., 2010……..…… 81

Lista de Gráficos

Gráfico 1a: Eq-GSH em glândula digestiva de *Helix aspersa*……..…. 31

Gráfico 1b: Eq-GSH em músculo de pé de *Helix aspersa*…….. 31

Gráfico 2a: GSSG em glândula digestiva de *Helix aspersa*…….. 32

Gráfico 2b: GSSG em músculo de pé de *Helix aspersa*…….. 32

Gráfico 3a: GSSG/eq-GSH em glândula digestiva de *Helix aspersa*…….. 33

Gráfico 3b: GSSG/eq-GSH em músculo de pé de *Helix aspersa*…… 33

Gráfico 4a: Proteínas carboniladas em glândulas digestivas de *Helix aspersa*…… 34

Gráfico 4b: Proteínas carboniladas em músculo de pé de *Helix aspersa*…… 34

Gráfico 5a: TBARS em glândula digestiva de *Helix aspersa*…… 35

Gráfico 5b: TBARS em músculo de pé de *Helix aspersa*…….. 35

Gráfico 6a: Catalase em glândula digestiva de *Helix aspersa*…… 36

Gráfico 6b: Catalase em músculo de pé de *Helix aspersa*.…….. 36

Gráfico 7a: GST em glândula digestiva de *Helix aspersa*…….. 37

Gráfico 7b: GST em músculo de pé de *Helix aspersa*…… 37

Gráfico 8a: Se-GPx em glândula digestiva de *Helix aspersa*……. 38

Gráfico 8b: Se-GPx em músculo de pé de *Helix aspersa*…….. 38

Gráfico 9a: GR em glândula digestiva de *Helix aspersa*…… 39

Gráfico 9b: GR em músculo de pé de *Helix aspersa*……. 39

Gráfico 10a: G6PDH em glândula digestiva de *Helix aspersa*……. 40

Gráfico 10b: G6PDH em músculo de pé de *Helix aspersa*……... 40

Gráfico 11: Correlação entre GSSG/eq-GSH e TBARS no grupo 1 h de reoxigenação BSO em glândula digestiva de *Helix aspersa*…… 41

Gráfico 12: Correlação entre GSSG/eq-GSH e GSSG no grupo 1 h de reoxigenação BSO em glândula digestiva de *Helix aspersa*……. 41

Gráfico 13: Correlação entre GSSG/eq-GSH e TBARS no grupo 30 min de reoxigenação BSO em músculo de pé de *Helix aspersa*…….. 42

Gráfico 14: Correlação entre GSSG/eq-GSH no grupo 2 h de reoxigenação BSO em músculo do pé de *Helix aspersa*…… 42

Gráfico 15: Correlação entre GSSG e a catalase no grupo 30 min de reoxigenação BSO em glândula digestiva de *Helix aspersa*……. 43

Gráfico 16: Correlação entre GSSG e catalase no grupo 30 min de reoxigenação

BSO em músculo do pé de *Helix aspersa*…… 43

Gráfico 17: Correlação entre TBARS e catalase no grupo 30 min de reoxigenação BSO em glândula digestiva de *Helix aspersa*…….. 44

Gráfico 18: Correlação entre proteínas carboniladas e TBARS no grupo 30 min de reoxigenação BSO em músculo do pé de *Helix aspersa*…….. 44

Gráfico 19: Correlação entre proteínas carboniladas e TBARS no grupo 2 h de reoxigenação BSO em músculo do pé de *Helix aspersa*…….. 45

Gráfico 20: Correlação entre proteínas carboniladas e Se-GPx no grupo 2 h de reoxigenação BSO e salina (triângulos) em glândula digestiva de *Helix aspersa*……. 45

Gráfico 21: Consumo de O_2 em mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* controle (n=6) ou estivante (n=8)…….. 63

Gráfico 22: Consumo de O_2 em mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* controle (n=6) ou estivante (n=8)…….. 63

Gráfico 23: Controle respiratório de mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* controle (n=6) ou estivante (n=8)……. 64

Gráfico 24: Liberação de peróxido em mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* controle (n=6) ou estivante (n=8)……. 64

Gráfico 25: Porcentagem de oxigênio convertido a peróxido em mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* controle (n=6) ou estivante (n=8)……. 65

Introdução geral

Helix aspersa, dormência e depressão metabólica

O molusco gastrópode pulmonado terrestre *Helix aspersa* (Müller) também conhecido como *Cornu aspersum* é um herbívoro generalista, que habita a área mediterrânea e Europa Ocidental (Guiller & Madec, 2010). Sua reprodução ocorre até seis vezes por ano e demora dois anos para atingir a maturidade em seu ambiente natural (Bezemer & Knight, 2001). Seus centros neuroendócrinos responsáveis pela ovulação são dependentes de fotofase maior que nove horas, sendo que o gastrópode *Helix pomatia* também apresenta dependência de fotoperiodo para ovular (Stephens & Stephens, 1966; Bailey, 1981; Gomot, 1990; Jess & Marks, 1998).

Os gastrópodes terrestres em geral durante o inverno hibernam e durante períodos de calor e de baixa umidade estivam, formando uma membrana muco protéica, o epifragma, que proporciona um isolamento do meio e uma diminuição da perda de água (Barnhardt, 1983). Segundo Vorhaben e colaboradores (1984) o gastrópode *Helix aspersa* apresenta três fases de atividade: durante a noite, uma fase ativa e de procura de alimento; uma fase de torpor durante o dia, em que o consumo de oxigênio é reduzido em 50-60% em relação a fase ativa; e uma fase dormente de longa duração (estivação), em que o consumo de oxigênio é 80% menor que na fase ativa (Tabela 1). Outros gastrópodes como *Otala lactea* e *Bulimulus dealbatu*s também mostram este descréscimo de consumo de oxigênio em estado dormente (Herreid, 1977; Horne, 1973). A dormência (estivação/hibernação) nos gastrópodes terrestres é caracterizada por depressão metabólica, acidose extracelular, hipoxia, hipercapnia e ativação das defesas antioxidantes (Barnhart, 1986; Barnhart & McMahon, 1987; Barnhart & McMahon 1988; Hermes-Lima et al., 1998).

Além dos gastrópodes terrestres, outros organismos respondem com a diminuição da taxa metabólica quando as condições do ambiente são desfavoráveis a vida, fazendo com que a energia e a água sejam economizadas e haja condições de sobrevida (Storey & Storey, 1990). Desde o torpor diário visto em pequenos mamíferos, aves e gastrópodes, passando pela hibernação, estivação e diapausa programadas, até em momentos de falta de oxigênio que acometem organismos intermareais, mamíferos marinhos e tartarugas durante mergulho; e em organismos que toleram desidratação extrema e congelamento (Storey & Storey, 1990; Guppy & Withers, 1999). A anidrobiose, a osmobiose e a criobiose aliam a depressão metabólica a

um estado celular alterado hidricamente e com o acúmulo de solutos. Já a dormência é um estado menos extremo de inatividade, englobando: a hibernação, que é um torpor longo durante o inverno; o torpor diário; e a estivação, que é um torpor longo durante o verão (Withers & Copper, 2010).

Tabela 1. Taxa metabólica de gastrópodes terrestres pulmonados em estado normal e deprimido (extraído e modificado de Guppy & Withers, 1999).

Espécie	Massa (g)	Temp (°C)	Normal (µl/h)	Deprimido (µl/h)	Razão (D/N)	Referência
Sphincterochila boissieri	4	25	393	4,8	0,01	Schmidt-Nielsen *et al*., 1971
Rabdotus schiedeanus	4,5	25	563	27	0,05	Riddle, 1977
Rhagada tescorum	3	25	146	14,1	0,1	Withers et al., 1998
Bulinus dealbatus	1	22	120	20	0,17	Horne, 1973
Oreohelix spp.	0,3	25	55,1	9,42	0,17	Rees & Hand, 1990
Helix aspersa	5	27	500	100	0,2	Vorhaben et al., 1984, Pedler et al., 1996
Otala lactea	7	20	350	98	0,28	Herreid, 1977

Em endotermos, a depressão metabólica envolve uma mudança fisiológica na regulação da temperatura corporal, reduzindo o valor a ser defendido de temperatura e consequentemente reduzindo a produção de calor (Guppy & Withers, 1999; Withers & Copper, 2010). Já em ectotérmicos, a depressão metabólica que ocorre nos estados dormentes é intrínseca (Churchill & Storey, 1989; Storey & Storey, 1990; Rees & Hand, 1991; Storey, 2002). Durante a depressão metabólica em moluscos gastrópodes, os carboidratos são essenciais em longos períodos dormentes (Von Brand, 1944; Oudejans & van der Horst, 1974) e também durante o metabolismo normal (Livingstone & De Zwaan, 1983). Sendo que o principal metabólito acumulado nos tecidos e na hemolinfa em gastrópodes terrestes durante períodos de privação de oxigênio são o D-lactato e succinato (Wieser, 1981; Churchill and Storey, 1989, Michaelidis et al., 1999).

Em depressão metabólica, as células dos animais exibem diversas características comuns como: mudanças de pH, mudanças no estado de fosforilação protéica, diminuição de degradação protéica, mudanças na expressão gênica, manutenção dos gradientes iônicos e

regulação diferenciada da síntese protéica (Storey & Storey, 1990; Guppy et al., 1994; Hochachka & Lutz, 2001; Storey & Storey, 2004).

Despertar, estresse oxidativo e antioxidantes

Os gastrópodes terrestres e outros grupos animais quando saem de um estado dormente estão passando de um estado hipóxico ou anóxico para um estado transiente e relativo de hiperoxia para depois voltarem ao estado normóxico (Hermes-Lima et al., 1998). Durante este aumento de tensão e consumo de oxigênio no despertar, pode ocorrer um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas mitocôndrias (Turrens et al., 1982) levando a um quadro de possível estresse oxidativo (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002). Estes organismos respondem geralmente de três formas: aumentando as defesas de seu sistema antioxidante durante a depressão metabólica, antes da fase de recuperação do metabolismo basal (Hermes-Lima & Storey, 1993; Hermes-Lima & Storey, 1995; Lushchak et al., 2001; Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima, 2003); possuindo altos níveis constitutivos de antioxidantes (Willmore & Storey, 1997a; Willmore & Storey, 1997b); ou tolerando o estresse oxidativo (Grundy & Storey, 1998).

Dois fatores essenciais contribuem para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a hipóxia e depois durante a reoxigenação: a redução parcial do oxigênio na cadeia respiratória mitocondrial, produzindo, ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($^{\cdot}OH$) (Ruuge et al., 1991; Inoue et al., 1993; Fridovich, 2004; Murphy, 2009; Hamanaka & Chandel, 2010); e a geração de radicais livres de oxigênio pela enzima xantina oxidase (figura1) (Granger, et al., 1981; McCord, 1985; Yager et al., 1992).

Outras fontes de espécies reativas de oxigênio nos organismos seriam: o sistema citocromo P450 no retículo endoplasmático; a auto-oxidação de oxihemoglobina e oximioglobina; a enzima NADPH oxidase de fagócitos; a enzima superóxido dismutase e outras enzimas como as ciclo-oxigenases, lipo-oxigenases e amino-oxidases, entre outros (Hermes-Lima, 2004).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e agentes antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes, levando a uma perturbação na sinalização e no controle redox e/ou dano molecular (Sies & Jones, 2007). O estresse oxidativo tem potencialidade de danificar macromoléculas tais como: DNA, lipídios e proteínas. O controle do estresse oxidativo é realizado pelo sistema de defesa antioxidante

(figura 2), do qual participam enzimas e outros compostos de natureza não-enzimática (Storey, 1996; Hermes-Lima, 2004).

Figura 1. Produção de ROS pela enzima xantina oxidase. Extraído de Granger, 1988.

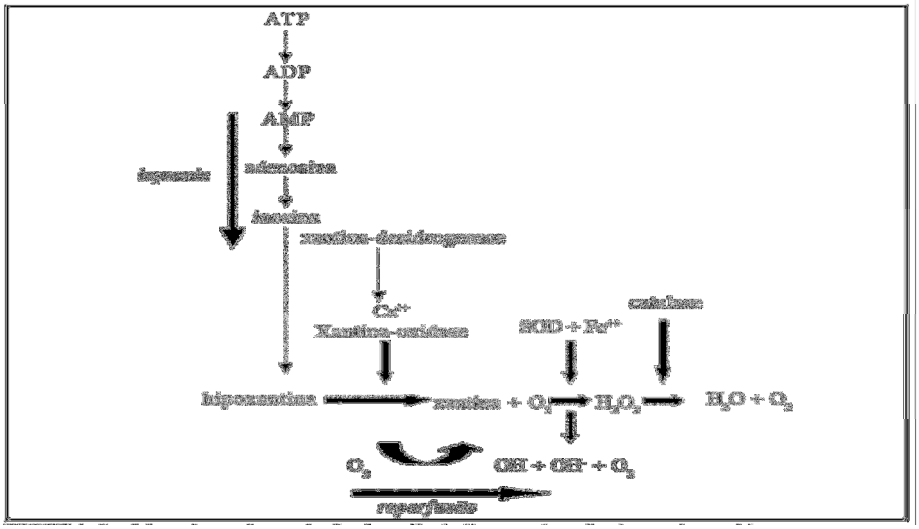
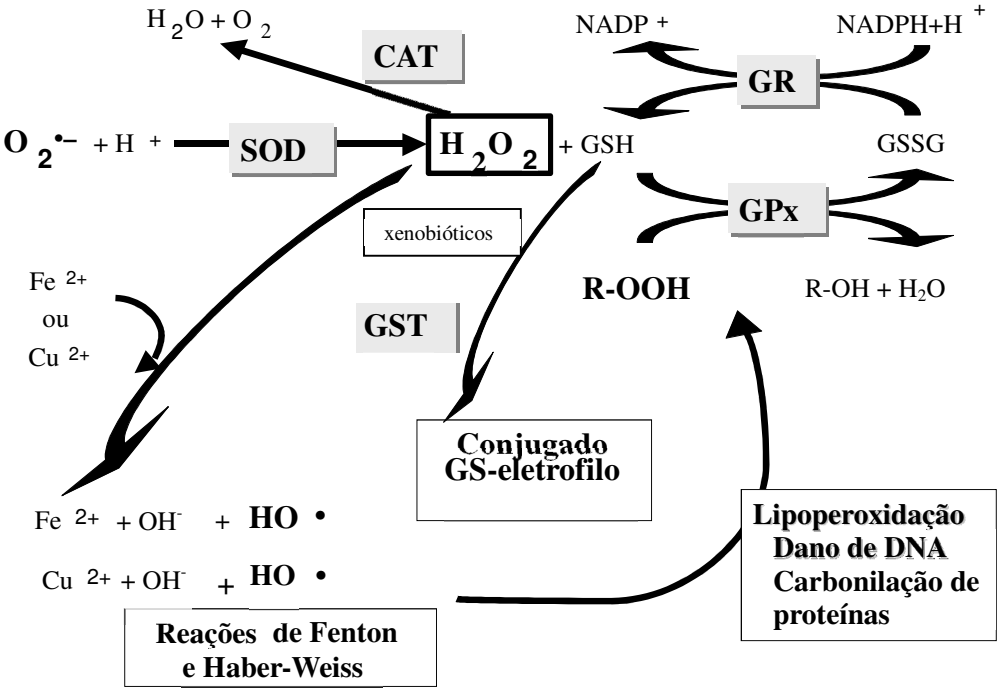


Figura 2. Via de formação de espécies pró-oxidantes e vias de detoxificação pelo sistema de defesa antioxidante enzimático.



Espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio podem ser não-radicalares e radicalares. As espécies

radicalares contêm pelo menos um elétron não-emparelhado, ou seja, o elétron está sozinho no orbital atômico ou molecular e estas spécies radicalares podem possuir cargas ou podem ser neutras (Slater, 1984; Cadenas, 1995; Halliwell & Gutteridge, 2007).

A molécula de oxigênio possui dois elétrons desemparelhados em spins paralelos, tornando difícil a redução destes elétrons ao mesmo tempo e facilitando a formação de outras ROS, como o ânion superóxido O_2^- (Gregory & Fridovich, 1973; Gregory et al., 1974; Fridovich, 1983; Fridovich, 1995) e em sequência o peróxido de hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie não-radicalar e também um fraco agente oxidante, mas é altamente estável e ultrapassa membranas biológicas com facilidade (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Já o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$) é altamente reativo em comparação , porém de meia vida baixa (Sies, 1988). Uma das grandes fontes do radical hidroxil seriam as reações de Fenton e Haber-Weiss, nas quais o peróxido de hidrogênio, o ânion superóxido e metais de transição participam (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Outras espécies reativas importantes são: as derivadas de ácidos graxos poliinsaturados (hidroperóxido de alquil, radical peroxil de alquil, radical alquoxil); o oxigênio singleto, espécie não-radicalar, com alto poder oxidante; o ozônio, espécie não-radicalar, altamente tóxica a vegetação, mas com efeito protetor contra os raios ultravioleta quando localizado em alta altitude; e outras espécies reativas com átomos de nitrogênio (óxido nítrico, dióxido de nitrogênio e peroxinitrito),carbono e enxofre, entre outros (Hermes-Lima, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Sistema de defesa antioxidante

Os possíveis danos oxidativos infligidos pelas espécies reativas em geral podem ser controlados nos organismos aeróbicos atuais por um sistema de defesa antioxidante. Este sistema foi classificado (Sies, 1997; Hermes-Lima, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007) em quatro sub-divisões: defesas primárias, tanto enzimáticas, como não-enzimáticas, que agem diretamente sobre as ROS; defesas auxiliares, que suportam as funções das defesas primárias; proteínas que complexam metais e outros compostos de baixo peso molecular que previnem ou minimizam a participação de metais na geração de ROS; e sistemas de reparação de biomoléculas danificadas, principalmente DNA.

A enzima superóxido dismutase (SOD) possui diversos tipos, tendo como co-fatores

cobre, zinco, ferro, manganês ou niquel (Tainer et al., 1983; Borgstahl et al., 1992; Barondeau et al., 2004). Ela catalisa a dismutação do O_2^- em H_2O_2 e O_2 (McCord & Fridovich, 1969). A CuZn-SOD está presente no citossol de eucariotos e em muitas bactérias. A MnSOD é encontrada em mitocôndrias tanto de eucariontes como em procariontes, é insensível a cianeto e a peróxido de hidrogênio (Prohaska & Sunde, 1993; Ahmad 1995). A FeSOD é encontada no citossol de bactérias e em cloroplastos de vegetais superiores (Hermes-Lima, 2004). Já a NiSOD é encontrada em procariontes (Barondeau et al., 2004).

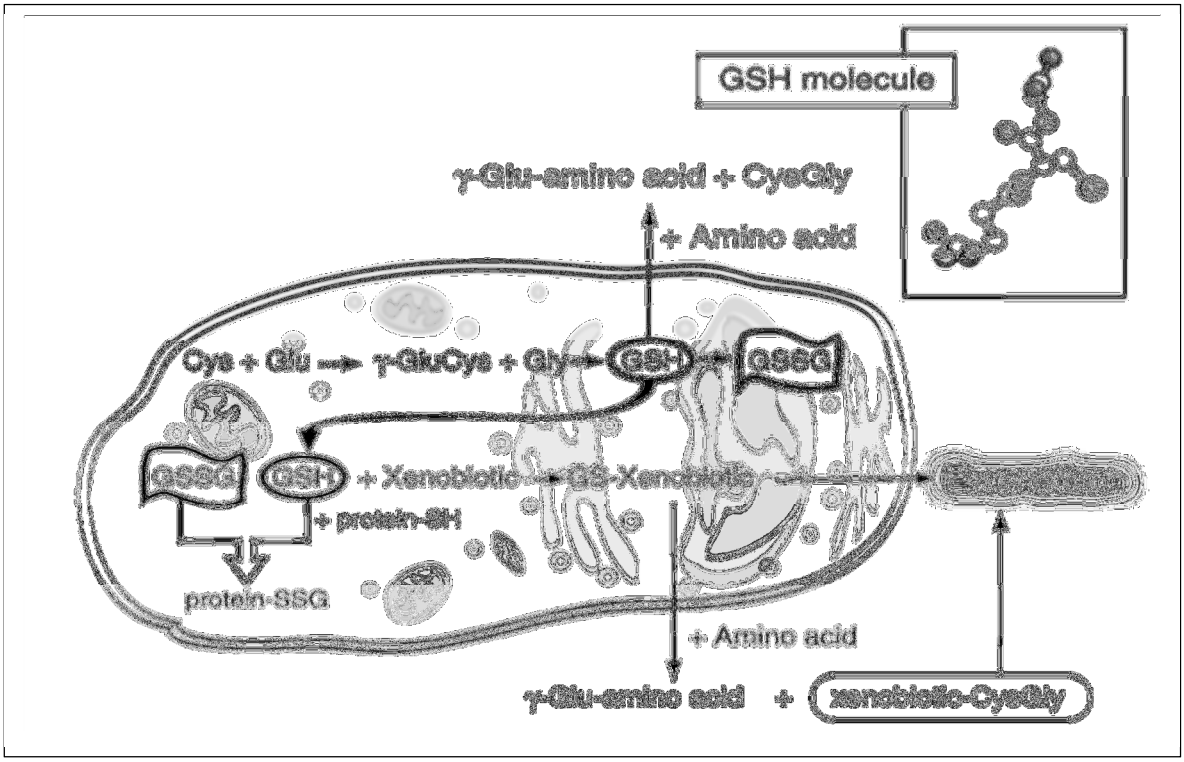
A catalase (CAT) em suas diversas formas possui o grupo prostético heme, que é geralmente acompanhando de uma molécula de NADPH (Fridovich, 1998). Decompõe o H_2O_2 em H_2O e O_2, e existe em muitos animais, plantas, bactérias e fungos. No cérebro de vertebrados sua atividade é baixa, já em fígado, rim, tecido adiposo e hemácias sua atividade é alta (Hermes-Lima, 2004). A enzima glutationa peroxidase (GPx) descorbeta em 1957 por Mills também possui diversos tipos, contendo selênio nos seus sítios ativos. Remove hidroperóxidos inorgânicos e orgânicos, reduzindo-os a H_2O ou a álcoois acoplado com a oxidação de glutationa reduzida, GSH (Halliwell & Gutteridge, 2007). A enzima glutationa redutase (GR) recicla a glutationa oxidada (GSSG) no processo de remoção de hidroperóxidos. Possui duas sub-unidades, cada uma com um FAD em seus sítios ativos. Para reduzir a GSSG, a GR utiliza o poder redutor de NADPH, que tem como principal fonte em animais a via das pentoses fosfato, onde o NADPH é catalisado pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase.

A família das enzimas glutationa-S-transferase (GST) utilizam primariamnete a GSH para conjugar xenobióticos ou material celular danificado. Algumas GSTs exibem atividade parecida com a GPx, mas apenas com hidroperóxidos orgânicos, não são capazes de reduzir H_2O_2, por isso são chamadas de GPx independentes de selênio (Halliwell & Gutteridge, 2007). A GSH é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina (figura 3), e está presente amplamente em animais, plantas, fungos e bactérias, mesmo em organismos que não possuem GPxs (Hermes-Lima, 2004). Além de participar como substrato para a GPx e GST, tem atividade antioxidante *per se* (Sies, 1993; Sies, 1999; Dickison & Forman, 2002). Agindo como um inativador de radicais livres, com grande importância para a preservação do status redox celular e como defesa contra ROS e xenobióticos (Meister, 1995). A GSH é sintetizada a partir de seus aminoácidos constituintes pela ação seqüencial da enzima dimérica *y*-glutamato-cisteína ligase (GCL) e GSH sintetase (Griffith, 1999).

Outros antioxidantes não enzimáticos importantes são: o ácido ascórbico, o ß-

caroteno, o α-tocoferol, a melatonina, a melanina, o ácido úrico e polifenóis em geral. Eles agem principalmente interrompendo a cadeia de propagação das reações radicalares (Cadenas, 1995).

Figura 3. Metabolismo da glutationa em células de fígado, extraído de Hermes-Lima, 2004.



Funções da glutationa e proteínas relacionadas

Uma classe de compostos orgânicos de enxofre é conhecida como tiol e possui como centro reacional pelo menos um grupo sulfidrila (-SH). Os tióis podem ter grande massa molecular (proteínas) ou ter pequena massa molecular (não proteicos). O estado redox dos tióis nas células está envolvido em diversos processos de sinalização e de transcrição e também nas vias mediadas pelas ROS (Dalle-Donne, 2009).

A GSH é o principal grupo sulfidrila não proteico encontrado em células de mamíferos. Esta normalmente em uma concentração de 1 a 10 mM, enquanto a GSSG é encontrada em uma concentração de 10 a 100 vezes menor (Rossi et al., 1995; Griffith, 1999). A GSH atua desativando radicais livres, preservando o status redox celular e defendendo o organismo contra xenobióticos (Meister, 1995a).

Segundo Dalle-Donne e colaboradores (2008) a GSH é mais resistente à oxidação do que a cisteína, sendo um composto mais apropriado para manter o potencial redox da célula. A distribuição da GSH nos compartimentos celulares é diferenciada. É encontrada no citosol, no

retículo endoplasmático rugoso, no núcleo e na mitocôndria (Lu, 2000; Circu & Aw, 2008).

A presença de GSH no núcleo celular protege o DNA da ação danosa da radiação ionizante (Cotgreave, 2003); mantém o ambiente em um estado redutivo, protegendo as proteínas envolvidas na transcrição de genes (Chen et al., 2003); e contribui para a síntese de DNA pela doação de hidrogênio na reação que reduz ribonucleotídeo a desoxirribonucleotídeo (Holmgren, 1977; Holmgren, 1989).

Na mitocôndria de murinos e de humanos não há síntese de GSH (Circu & Aw, 2008). A GSH encontrada na matriz mitocondrial é importada do citosol pelos transportadores dicarboxilato e 2-oxoglutarato que se encontram na membrana interna mitocondrial (Chen & Lash, 1998). Há uma correlação negativa entre o aumento da quantidade de GSH mitocondrial e o aumento de danos no DNA mitocondrial (De La Asuncion et al., 1996). Foi hipotetizado que o estado redox da GSH mitocondrial é um importante contribuinte para a integridade do DNA mitocondrial (Circu & Aw, 2008). E que combinados podem controlar a iniciação da apoptose e o destino da célula que passa por um desafio oxidativo (Circu & Aw, 2008).

A razão GSH/GSSG é amplamente reconhecida como um indicativo da situação redox celular. A equação de Nernst foi usada por Schafer & Buettner (2001) para determinar o potencial redox de GSH intracelular:

$$E= -240- (59.1/2)\ \log (([GSH]^2)/([GSSG])) = mV$$

Porém, Han e colaboradores (2006) sugeriram usando a equação que, quanto mais GSH celular, maior a capacidade redutora, mesmo quando a razão GSH/GSSG é a mesma em dois tipos celulares.

A GSH está em menor concentração que os grupos sulfidrilas proteicos (15-25 mM) encontrados em células de mamíferos, já as proteínas glutationiladas estão em pequenas concentrações (Gilbert, 1984; Niketic et al., 1992). A *S*-glutationilação é um mecanismo que liga de forma reversível a GSH a proteínas. Resulta de uma modificação pós traducional, formando dissulfetos mistos entre a GSH e grupos sulfidrilas proteicos (Rokutan, et al., 1989; Dalle-Donne et al., 2008).

A glutationilação proteica (PSSG) ocorre em condições basais, com papel provável na sinalização celular e regulação redox das funções proteicas (Giustarini et al., 2004; Ghezzi et al., 2005; Ghezzi, 2005). Em situações de estresse oxidativo, a glutationilação pode ocorrer também, funcionando como um reservatório de GSH e protegendo proteínas, pela prevenção da oxidação irreversível dos tióis proteicos (Lii et al., 1994; Maher, 2006).

Os mecanismos de formação das proteínas glutationiladas (figura 4) são muitos (Dalle-Donne et al., 2008; Dalle-Donne et al., 2009):

Oxidação do grupo sulfidrila da proteína ou da GSH por ROS, formando radical $PS^{\cdot}$ ou $GS^{\cdot}$ (catalisado por glutaredoxina), reagindo com GSH ou sulfidrila proteica respectivamente, formando proteína glutationilada, sem grandes mudanças na razão GSH/GSSG;

Oxidação do grupo sulfidrila da proteína por ROS, gerando intermediários de ácido sulfênico, reagindo com GSH e formando por fim proteínas glutationiladas;

Sulfidrilas proteicas reagindo com tióis nitrosilados, como glutationa nitrosilada (GSNO), glutationa ligada a ácido sulfênico (GSOH) e proteínas nitrosiladas (PSNO), formando proteínas glutationiladas por fim (Giustarini et al., 2004; Martinez-Ruiz & Lamas,2007);

E em menor escala, a presença de GSSG e sulfidrilas proteicas, levando a reações de troca tiol-dissulfeto. Gerando proteínas glutationiladas, quando o ambiente celular esta com uma razão GSH/GSSG baixa. Porém segundo Wang e colaboradores (2001) este mecanismo é improvável de acontecer *in vivo*.

Já o processo de desglutationilação (figura 4) pode ocorrer:

Por reações de troca direta do tiol/ dissulfeto com GSH, em uma condição redox celular (GSH/GSSG) adequada (Schafer & Buettner, 2001);

Ou por reações catalisadas pelo sistema glutaredoxina (Fernandes & Holmgren, 2004) e em menor grau por tioredoxina/tioredoxina redutase e outros compostos (Findlay et al., 2006; Holmgren et al., 2005). Sendo que a glutaredoxina é capaz também de glutationilar proteínas, mas por um mecanismo diferente da desglutationilação (Starke et al., 2003; Fernandes & Holmgren, 2004; Shelton et al., 2005).

A família das glutaredoxinas (Grxs) são oxiredutases dependentes de GSH. Isoformas de Grx estão presentes em praticamente todos os grupos taxonômicos e possuem alto grau de homologia em sua sequencia de aminoácidos (Fernandes & Holmgren, 2004). Reduzem dissulfetos e dissulfetos mistos, podendo formar GSSG e o grupo sulfidrila (mecanismo monotiol, usado na desglutationilação) ou formando apenas sulfidrilas reduzidas (Kalinina et al., 2008). A Grx oxidada é reduzida por duas moléculas de GSH (figura 5), esta redução é dependente de NADPH.

Figura 4. Mecanismos da *S*-glutationilação e desglutationilação, extraído de Dalle-Donne et al., 2009.

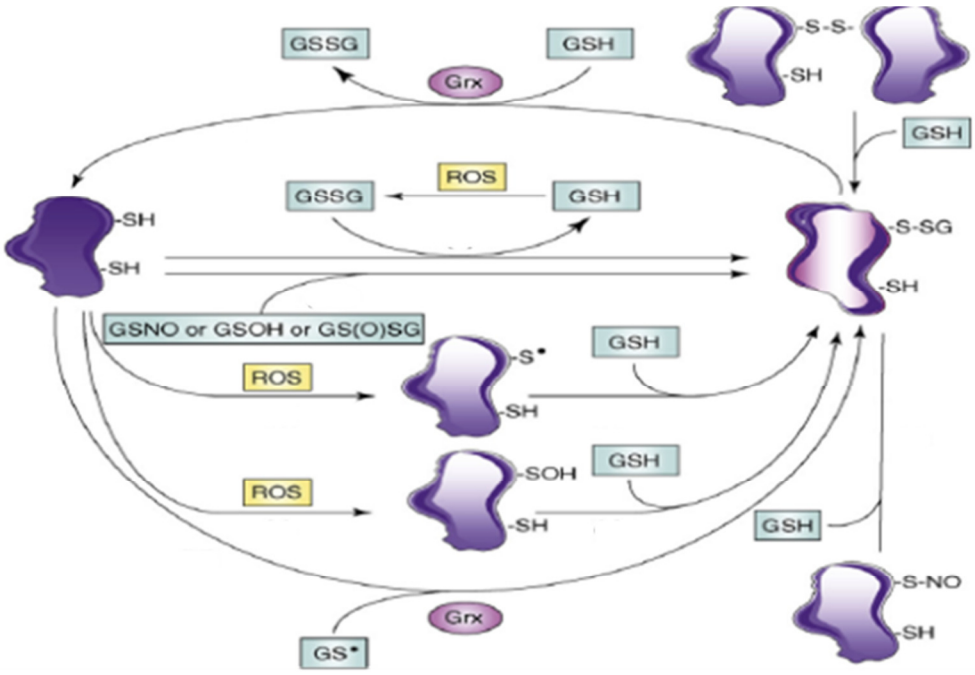
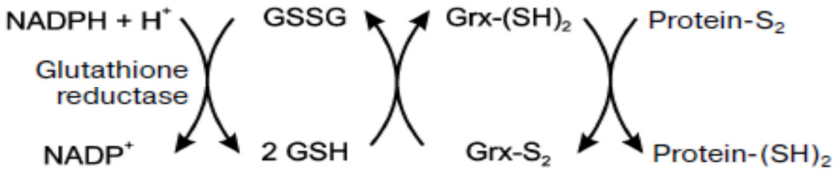


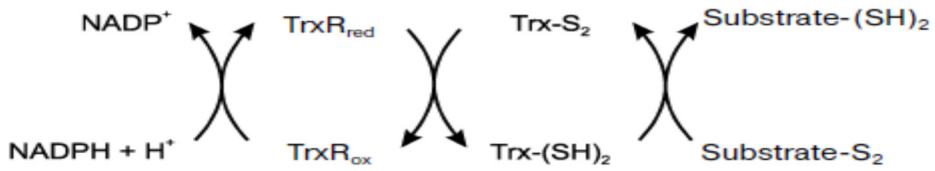
Figura 5. Reações do sistema glutaredoxina, extraído de Kalinina et al., 2008.



Trê isoformas de Grx são encontradas em mamíferos, uma citosólica e duas mitocondriais (Lundberg et al., 2001; Wingert et al., 2005). Duas isoformas são apenas encontradas em eucariotos inferiores (Kalinina et al., 2008).

As tioredoxinas (Trxs) são proteínas de baixo peso molecular, contendo um sítio ativo tiol/dissulfeto e atividade de oxirredução (figura 6) (Kalinina et al., 2008). São encontradas em procariontes e em eucariontes (Powis & Montfort, 2001) e existem mais de dez isoformas conhecidas. A Trx 1, citosólica e a Trx 2, mitocondrial, são capazes de reparar a atividade catalítica de peroxiredoxinas e GPxs (Rhee et al., 2001). A Trx 1 reduz diretamente H_2O_2 e GSSG (Norberg & Arner, 2001); e também é cofator de muitas enzimas (Arner & Holmgren, 2000) como as peroxiredoxinas, ribonucleotídeo redutases e metionina sulfóxido redutases e também esta envolvida no reparo de DNA (Powis & Montfort, 2001).

Figura 6. Reações do sistema tioredoxina, extraído de Kalinina et al., 2008.



As tioredoxina redutases (TrxRs) são enzimas dependentes de NADPH, reduzem primariamente os centros ativos dissulfetos nas Trxs oxidadas (Arner & Holmgren, 2000; Holmgren & Björnstedt, 1995; Holmgren, 1989; Gromer et al., 1999). Há três isoformas de TrxR em mamíferos: a TrxR 1, citoplasmática; a TrxR 2, mitocondrial; e a tioredoxina glutationa redutase (TGR) que reduz além de Trx, a GSSG (Miranda-Vizuete et al., 1999; Sun et al., 1999; Sun et al., 2001). A TrxR 1 reduz também hidroperóxidos lipídicos e H_2O_2 (Zhong & Holmgren, 2000; Bjornstedt et al., 1995). Em *Drosophila melanogaster* não há GR, a atividade de redução de GSSG é feita pela TGR (Kanzok et al., 2001) caracterizando uma sobreposição do sistema Trx e do sistema GSH (Kalinina et al., 2008).

A família das peroxiredoxinas (Prxs) são peroxidases independentes de selênio. Degradam H_2O_2, hidroperóxidos orgânicos e peroxinitrito (Hofmann et al., 2002; Wood et al., 2003). As isoformas de 1 a 5 usam Trx como agente redutor, já a isoforma Prx 6 usa GSH (Manevich & Fisher, 2005). A ação das Prxs sobre H_2O_2 forma ácido sulfênico, porém sua atividade catalítica é bem menor (10^5- 10^6 M^{-1}. sec^{-1}) que a atividade catalítica da GPx (10^8 M^{-1}. sec^{-1}) e mesmo assim tem um papel importante na detoxificação de H_2O_2 (Menshchikova et al., 2006).

A família das glutationas peroxidases dependentes de selênio (Se-GPxs) reduzem H_2O_2 e/ou hidroperóxidos orgânicos a água ou a álcool, usando primariamente GSH como agente redutor. Em mamíferos possuem quatro principais isoformas: a clássica GPx1, que reduz hidroperóxidos solúveis e alguns hidroperóxidos orgânicos (Forstrom et al., 1979); a GPx2, gastrointestinal, similar na ação à GPx1(Chu et al., 1993); a GPx3, plasmática, que reduz também hidroperóxidos lipídicos mais complexos (Yamamoto & Takahashi, 1993) e pode usar tioredoxina e glutaredoxina ao invés de GSH como tiol-agente redutor (26); e a GPx4, fosfolipídio hidroperóxido glutationa peroxidase, que reduz lipoproteínas, ésteres de colesterol e hidroperóxidos em membranas (Sattler et al., 1994; Thomas et al., 1990; Ursini & Bindoli, 1987). As GPxs 1-3 são homo tetrâmeras e a GPx4, um monômero (Brigelius-Flohé et al., 1994). A GPx5 não possui selenocisteína no sítio ativo (Ghyselinck et al., 1990); assim

como a GPx7, uma nova fosfolipídio hidroperóxido glutationa peroxidase (Utomo et al, 2004); e a GPx6 é achada no epitélio olfatório de humanos e porcos (Thisse et al., 2003).

Segundo Margis e colaboradores (2008) a família dos genes da GPx tomou caminhos evolucionários independentes e diferentes. As GPxs dos moluscos e cnidários são classificadas como do tipo 4 e são mais próximas das GPxs dos insetos do que das GPxs tipo 4 dos vertebrados (Margis et al., 2008).

Enzimas relacionadas à detoxificação de xenobióticos, como a família das glutationas transferases (GSTs), existem em procariontes e eucariontes por mais de 2,5 bilhões de anos (Nebert, 1994; Nebert & Dieter, 2000). E evoluíram de um ancestral parecido com a Trx, devido a pressões seletivas de estresse oxidativo (Koonin et al., 1994; Martin, 1995). As GSTs participam de forma decisiva na fase II de detoxificação (Sheehan et al., 2001). A fase I é de responsabilidade do sistema P450 (Guengerich, 1990). A fase II corresponde à conjugação de xenobióticos lipofílicos com substratos mais hidrofílicos, como a glutationa, neste caso a conjugação é catalisada por GSTs (Hayes & McLellan, 1999). E a fase III, corresponde à eliminação dos conjugados mais hidrofílicos formados para fora da célula.

Ação das ROS e danos oxidativos

Como já foi dito antes, a geração de espécies reativas de oxigênio mais rápida do que a produção de agentes antioxidantes para balancear esta equação pode promover danos nos componentes das células (Halliwell & Gutteridge, 2007).

As principais consequências dos danos oxidativos que ocorrem no material genético como as quebras simples ou duplas na fita do DNA e as modificações nas bases púricas e pirimidínicas são as mutagênicas e carcinogênicas (Halliwell e Gutteridge 1990; Aruoma e Halliwell 1995). O DNA danificado tanto nuclear quanto o mitocondrial pelas espécies reativas estão relacionados a muitas doenças e a muitas condições estressantes que os organismos enfrentam (Hermes-Lima, 2004).

A peroxidação lipídica foi definida como a deterioração oxidativa dos ácidos poliinsaturados (PUFAs). Os principais alvos da lipoperoxidaçao são as membranas biológicas, por conterem grande quantidade de PUFAs, as lipoproteínas e os lipídios provindos da dieta. O principal efeito da peroxidação lipídica é a diminuição da fluidez da membrana, aumentando a passagem de produtos que normalmente seriam impedidos de atravessar a membrana, levando a vários efeitos secundários importantes e comprometendo a

integridade da membrana. Outros efeitos seriam a produção de moléculas citotóxicas como alcanos, aldeídos, isoprostanas, cetonas e a peroxidação de lipoproteínas de baixo peso nuclear. (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A peroxidação de um PUFA pode começar pela a adição de uma única espécie reativa como o radical hidroxil, subtraindo um átomo de hidrogênio de um grupo metil, resultando em um radical de carbono. Este radical de carbono pode se rearranjar com outros iguais formando dienos conjugados ou se combinar com O_2, formando radical peroxil ($ROO^{\bullet}$) O radical peroxil pode então tomar um próton de um ácido graxo adjacente formando um hidroperóxido lipídico (ROOH) e um outro radical de carbono, iniciando a fase de propagação. Um única peroxidação pode gerar potencialmente vários peróxidos numa reação em cadeia (Halliwell & Gutteridge, 2007). Uma medida de peroxidação lipídica *in vivo* muito utilizada é a quantificação de aldeídos (TBARS), o malondialdeído (MDA) reage com o ácido tiobarbitúrico, formando um aduto MDA-TBA_2 (Buege & Aust, 1978).

As proteínas podem ser danificadas diretamente por espécies reativas ou por produtos gerados pela peroxidação lipídica, como os aldeídos. A nitrosilação, a nitração, a glutationilação, a formação de sulfóxido de metionina e a introdução de grupos carbonis são exemplos de danos protéicos. As proteínas carboniladas são vastamente aceitas como biomarcadores de estresse oxidativo (Lenz *et al*. 1989) e seu aumento está relacionado com o envelhecimento e várias doenças como artrite reumatóide, doença de Alzheimer, Parkinson, diabetes, fibrose cística (Hermes-Lima, 2004). Algumas das estratégias para lidar com estes danos são: o reparo do resíduo de aminoácido danificado ou remoção das proteínas danificadas pelos lisossomos e proteassomos (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A apoptose é uma morte celular programada (Lockshin & Williams, 1964; Kerr et al., 1972) e pode ser influenciada por ROS (Circu & Aw, 2010). Pela via extrínseca (Ashkenazi & Dixit, 1999) a apoptose pode ser iniciada a partir da ativação dos sistemas: Fas/FasL (ligante de Fas); TNFα/TNFR1 (receptor de fator de necrose tumoral); e TRAIL/TRAIL- R1 (receptor de ligante indutor de apoptose relacionado a TNF). E pela via intrínseca a ativação da apoptose pode ocorrer devido a danos no DNA mitochondrial ou por ROS, permeabilizando a membrana mitocondrial externa e liberando citocromo c e proteínas pró-apoptóticas (Ryter et al., 2007).

As ROS também podem ativar JNK (c-Jun quinase N- terminal), que por sua vez pode induzir a apoptose extrínseca ou intrínseca (Dhanasekaran & Reddy, 2008). Em um estudo, foi proposto que a Trx1 se liga a ASK1 (quinase reguladora de sinal apoptótico),

inibindo a ativação de ASK1 e a propagação do sinal apoptótico (Saitoh et al., 1998). Altos níveis de ROS induzem a oxidação de Trx1, permitindo que ASK1 fique ativa (Fujino et al., 2007). A ativação de ASK1 e outras proteínas ativam JNK (Fujino et al., 2006). Contdo, se a ativação de JNK for pequena, pode ao invés de ativar a sinalização apoptótica, ativar a via de sobrevivência celular por NF-KB, mas este tipo de ativação provavelmente não esta ligada a ASK1 (Liu et al., 2002; Deng et al., 2003). JNK ativado por ASK1 e encaminhado para o núcleo ativa AP-1 (proteína ativadora) que ativa TNFα, FasL e Bak (Fan et al., 2001). E na mitocôndria, JNK promove a liberação de citocromo c, iniciando a cascata de sinalização apoptótica (Kharbanda et al., 2000).

Preparo para o estresse oxidativo

A ativação do sistema de defesa antioxidante, incluindo aumento da atividade de enzimas antioxidantes, durante situações de depressão metabólica foi caracterizada como "preparo para o estresse oxidativo" (Hermes-Lima et al., 1998). Esta ativação protege o organismo durante o hipometabolismo e durante a reoxigenação/despertar de um possível estresse oxidativo. Já em animais sem esta proteção durante a isquemia-reperfusão ocorre um desequilíbrio nos gradientes iônicos, diminuição nos estoques de ATP e morte celular por apoptose (Lutz, 1992; Dong et al., 2000; Hochachka e Lutz, 2001).

O aumento da atividade de enzimas antioxidantes em mamíferos é proporcional ao aumento da taxa de sintese delas (via aumento da taxa de síntese de RNA mensageiro ou aumento da estabilidade deste) ou do decréscimo da sua degradação durante a isquemia-reperfusão (Singh et al., 1993). Fatores de transcrição como o HIF-1, e NfκB, e diversos genes envolvidos em transdução de sinal, glicólise, produção de energia, transporte de membrana, crescimento celular, entre outros são expressos e regulados pela hipoxia (Gassmann & Wenger, 1997; Li et al., 1999; Jiang et al., 2002).

Dos vários vertebrados e invertebrados com este tipo de resposta (tabela 2) muitos apresentaram um aumento da atividade da Se-GPx e aumento da quantidade de GSH, sendo que alguns modelos foram expostos a mais de um tipo de estresse fisiológico (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002). A enzima Se-GPx aparenta ter um papel chave na defesa contra o aumento de radicais livres durante o estresse fisiológico, evitando danos oxidativos (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002; Ferreira-Cravo et al., 2010).

Tabela 2. Estresse fisiológico e preparo para o estresse oxidativo em alguns animais, baseado

em: Abele et al., 1998; Cooper et al., 2002; Ferreira et al., 2003; Hermes-Lima & Storey, 1993; Hermes-Lima & Storey, 1995; Hermes-Lima & Storey, 1996; Hermes-Lima & Storey, 1998; Joanisse & Storey, 1996; Lushchak et al., 2001; Lushchak et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Pannunzio & Storey, 1998; Ramos-Vasconcelos et al., 2005; Willmore & Storey, 1997a; Willmore & Storey, 1997b.

Animal	Estresse fisiológico	Preparo para o estresse oxidativo
Serpente *Thamnophis sirtalis parietalis*	Anóxia por 10 h (5ºC)	↑ SOD e GSH
Anfíbio anuro *Rana pipiens*	Anóxia por 30 h (5ºC)	↑ catalase, Se-GPX e GST
Tartaruga *Trachemys scripta*	Anóxia por 20 h (5ºC)	↑ GR
Peixe *Carassius auratus*	Anóxia por 8 h	↑ catalase, G6PDH e Se-GPX
Caranguejo *Chasmagnathus granulata*	Anóxia por 8 h	↑ catalase e GST
Gastrópode aquático *Biomphalaria tenagophila*	Anóxia por 24 h (26-27ºC)	↑ Se-GPX e ↓ catalase
Gastrópode marinho *Littorina littorea*	Anóxia (6 dias)	↑ GSH-eq
Peixe *Cyprinus carpio*	Hipóxia por 5 h	↑ catalase e Se-GPX
Peixe *Leiostomus xanthurus*	Hipóxia por 12 h	↑ atividade de SOD
Poliqueto *Heteromastus filiformis*	Hipóxia	↑ catalase
Anuro *Rana pipiens*	Desidratação severa	↑ Se-GPX e catalase e ↓ SOD e GR
Anuro *Rana sylvatica*	Congelamento (24 h)	↑ Se-GPX e GST
Serpente *Thamnophis sirtalis parietalis*	Congelamento (5 h)	↑ catalase e Se-GPX
Gastrópode terrestre *Otala lactea*	Estivação (30 dias)	↑ catalase, Se-GPX, SOD e GST
Gastrópode aquático *Biomphalaria tenagophila*	Estivação (15 dias)	↑ Se-GPX e ↓ SOD
Gastrópode terrestre *Helix aspersa*	Estivação (20 dias)	↑ Se-GPX e ↑[GSH-eq]

Capítulo 1. Respostas antioxidantes durante a anóxia e a reoxigenação em *Helix aspersa* com a síntese de glutationa diminuída.

Abstract

The hypometabolism is an important strategy for survival in various animals that routinely face environmental stresses. The activation of the antioxidant defense system (ADS) during hypometabolism is called "preparation for oxidative stress". The aim of this study was to analyze the changes during a cycle of anoxia and reoxygenation on the ADS of *Helix aspersa* with reduced levels of total glutathione (GSH-eq). Low levels of GSH, 39% compared to controls in the digestive gland and 32% compared to controls in the muscle foot were achieved using buthionine sulfoximine (BSO).

In digestive gland, GSSG levels were augmented in BSO-injected snails during anoxia in relation to snails in normoxic conditions. Levels of GSSG were sustained in BSO-injected animals during anoxia and reoxygenation in relation of controls ones, despite of decreased GSH-eq levels. There was an increase in the ratio GSSG:GSH-eq during anoxia and 15 minutes of reoxygenation, signaling a more oxidized state in BSO-injected animals. TBARS and carbonylated proteins during anoxia and reoxygenation were unaltered. Catalase and GST activities in BSO-injected animals were diminished in 30 minutes of reoxygenation. GR activity was increased in BSO-injected animals during normoxia and diminished in 15 minutes and 30 minutes of reoxygenation. Se-GPx activity exhibited a tendency to increase in BSO-injected animals in 1h of reoxygenation, in saline-injected animals this increase was fulfilled.

In foot muscle, GSSG levels were diminished in BSO-injected animals in all groups, in contradiction to digestive glands results. But the ratio GSSG:GSH-eq was increased under anoxia in BSO-injected snails in comparison with saline-injected normoxic and anoxic snails, and in 1 hour of reoxygenation in BSO-injected snails in relation of saline one. As occurred in digestive gland, TBARS and carbonylated proteins did not change during anoxia and reoxygenation. Catalase activity in BSO-injected animals was diminished in 30 minutes of reoxygenation relative to saline-injected. But in 2 hours of reoxygenation in the BSO group occurred an augmented activity of catalase relative to 30 minutes of reoxygenation of BSO group. GST activity in 1 hour of reoxygenation in BSO-injected animals increased in relation to the saline group. GR activity was increased in BSO-injected animals 15 minutes of

reoxygenation. Se-GPx activity was unchanged during the process of anoxia and reoxygenation.

These results indicate a distinct regulation of GSH metabolism according the organ during anoxia and reoxygenation. Anoxia and reoxygenation induced a minor oxidative stress in *Helix aspersa* even with plenty of GSH-eq (32-29% of saline controls), despite of the injection of BSO. Thus, GSH appears to be a key component in the redox balance of *Helix aspersa*, dealing with the production of ROS during anoxia and reoxygenation.

Resumo

A depressão metabólica é uma estratégia importante para a sobrevivência em vários animais que normalmente enfrentam estresses ambientais. A ativação do sistema de defesa antioxidante (SDA), durante o hipometabolismo é chamado de "preparação para o estresse oxidativo". O objetivo deste estudo foi analisar as alterações durante um ciclo de anoxia e reoxigenação sobre o SDA de *Helix aspersa* com níveis reduzidos de glutationa total (eq-GSH). Níveis baixos de eq-GSH, 39% em relação aos controles na glândula digestiva e 32% em relação aos controles no músculo do pé foram alcançados utilizando butionina sulfoximina (BSO).

Na glândula digestiva, os níveis de GSSG estavam mais altos nos caramujos injetados com BSO durante a anoxia em relação aos caramujos em condições de normoxia. Os níveis de GSSG foram mantidos em animais injetados com BSO durante a anoxia e reoxigenação em relação aos animais injetados com salina, apesar da diminuição dos níveis de eq-GSH. Houve um aumento na razão GSSG/eq-GSH durante a anoxia e em 15 minutos de reoxigenação, sinalizando um estado mais oxidado em animais injetados com BSO. TBARS e proteínas carboniladas durante a anoxia e reoxigenação mantiveram-se inalterados. As atividades de catalase e GST em animais injetados com BSO foram menores em 30 minutos de reoxigenação em relação aos respectivos grupos salinas. A atividade da GR foi maior em animais injetados com BSO durante a normóxia e diminuiu em 15 minutos e 30 minutos de reoxigenação. A atividade de Se-GPx exibiu uma tendência de aumento nos animais injetados com BSO em 1h de reoxigenação, nos animais injetados com solução salina este aumento foi alcançado.

No músculo do pé, os níveis de GSSG foram diminuídos nos animais injetados BSO em todos os grupos, em contradição com os resultados das glândulas digestivas. Mas a razão

GSSG/eq-GSH foi aumentada sob anoxia em caramujos injetados com BSO em comparação com animais injetados com solução salina em normóxia e anoxia, e em 1 hora de reoxigenação em caramujos injetados com BSO em relação ao grupo salina. Como ocorreu na glândula digestiva, TBARS e proteínas carboniladas não se alteraram durante a anoxia e reoxigenação. A atividade da catalase nos animais injetado com BSO foi menor em 30 minutos de reoxigenação em relação ao grupo injetado com solução salina. Mas em 2 horas de reoxigenação no grupo BSO ocorreu um aumento de atividade na catalase em relação a 30 minutos de reoxigenação no grupo BSO. A atividade da GST em 1 hora de reoxigenação em animais injetados com BSO aumentou em relação ao grupo salina. A atividade da GR foi aumentada em animais injetados com BSO em 15 minutos de reoxigenação. A atividade da Se-GPx se manteve inalterada durante o processo de anoxia e reoxigenação.

Estes resultados indicam uma regulação distinta do metabolismo de GSH de acordo com o órgão durante a anoxia e reoxigenação. A anoxia e reoxigenação induziram um estresse oxidativo pequeno em *Helix aspersa*, mesmo com quantidades significativas (32-39% do controle salina) de eq-GSH, apesar da injeção de BSO. Assim, a GSH parece ser um componente fundamental para o equilíbrio redox de *Helix aspersa*, lidando com a produção de ROS durante a anoxia e reoxigenação.

1.1 Introdução

A inibição da síntese de GSH e consequente diminuição da quantidade intracelular é obtida principalmente utilizando L-Butionina-(S,R)- sulfoximina, BSO (Griffith, 1982). Este inibidor é irreversível e específico da glutamato cisteína ligase (GCL), primeiro passo para a formação de GSH. A GCL é um heterodímero que possui uma subunidade catalítica e uma unidade modulatória (Huang et al., 1993). A redução da quantidade de GSH *per se* ou juntamente com a excessiva produção de ROS levam a apoptose em alguns tipos de células (Walsh et al., 1995; Will et al., 1999; Coppola & Ghibelli, 2000; Haouzi et al., 2001; Armstrong & Jones, 2002; Nagai et al., 2002; Rahman et al., 2005; Circu & Aw, 2008; Marí et al., 2009).

O BSO em geral diminui os níveis de GSH intracelular a 10-20% do grupo sem tratamento com BSO, a porcentagem residual está localizada nas mitocôndrias (Griffith, 1982; Meredith & Reed, 1982). Já em culturas celulares o resultado é mais pronunciado, restando apenas 5% de GSH (Griffith, 1999). Algumas células e tecidos resistem à queda da

concentração de GSH por causa de uma falha na entrega de BSO, seja ela de origem técnica ou fisiológica, neste caso a barreira hemato-encefálica (Griffith & Meister, 1979).

Em camundongos injetados com BSO houve um rápido declínio dos níveis de GSH nos rins e logo restaurados 24 horas depois (Griffith & Meister, 1979). Em vários órgãos de coelho, a queda da concentração de GSH ocasionou danos oxidativos *in vivo* no DNA (Gokce et al, 2009). Em fígado de ratos, o BSO causou uma diminuição de 70% da quantidade de glutationa total, uma redução na relação GSH/GSSG, e aumento na atividade da GR (Brandsch et al., 2010). Exemplares de verdilhão (*Carduelis chloris* L.) administrados com BSO exibiram escurecimento das penas da cauda e aumento de peroxidação lipídica (Hõrak et al., 2010).

Já em fígado do peixe teleósteo *Ictalurus punctatus*, a administração de BSO (400 ou 1000 mg/kg) não diminuiu a quantidade de GSH (Gallagher et al., 1992). Em fibroblastos de brânquias de peixe tratados com BSO houve um aumento de sensibilidade a H_2O_2 (Babich et al., 1993). Na truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, o uso de BSO reduziu a quantidade de GSH no fígado, rins e plasma e foi correlacionada com o aumento da expressão gênica do citocromo 4501A (Otto et al., 1999). Em peixes dourados *Carassius auratus*, 1g/kg-1,5g/kg de BSO promoveu 50 e 80% de diminuição de glutationa total no cérebro e fígado depois de três dias, e não houve aumento de TBARS e proteínas carboniladas (Lushchak & Hermes-Lima, 2005). Em células adiposas de salmão cultivadas em meio rico em ácidos graxos insaturados, o tratamento com BSO causou uma diminuição da expressão de GPx2 e GPx3 e um aumento de TBARS (Todorčević et al., 2010).

O gastrópode *Helix aspersa* hiberna e estiva durante 20 dias sem que maiores danos oxidativos sobrevenham durante as fases de dormência e despertar (Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima, 2003; Ramos-Vasconcelos et al., 2005). O *Helix aspersa* também tolera períodos de anóxia e consequente reoxigenação (Ramos-Vasconcelos, 2005; Welker, 2009); nestes estudos, a atividade da catalase durante a anóxia e a fase de reoxigenação foi inibida por ATZ e não foram encontrados indícios de danos oxidativos significativos. Porém, um pequeno aumento (significativo) foi detectado na atividade da Se-GPx nos animais em anóxia, tanto com a atividade da catalase intacta (glândula digestiva e musculo do pé), quanto em animais com a atividade da catalase inibida (músculo do pé) em relação ao grupo controle (Welker, 2009).

No presente estudo, a utilização de BSO no gastrópode *Helix aspersa* e a sua exposição à anóxia e reoxigenação teve como objetivo analisar a importância da GSH e enzimas relacionadas na tolerância deste animal à geração de ROS e ao estresse oxidativo.

1.2 Materiais e métodos

1.2.1 Animais

Os exemplares utilizados como modelo experimental, *Helix aspersa maxima* (Müller, 1774) foram comprados de um criador do estado de São Paulo (www.escargots.com.br) pesando 15 g aproximadamente. No laboratório, os animais foram acondicionados em caixas plásticas transparentes (figura 7) que diariamente eram trocadas por caixas limpas (densidade máxima de 200 animais por m^2, Perea et al., 2007) com ração (tabela 3) e água a disposição. O fotoperíodo era de 12L:12E e a temperatura era mantida em torno de 23 ºC. Os animais passaram por 3 semanas de aclimatação antes do início dos experimentos.

Figura 7. Caixa plástica contendo exemplares de *Helix aspersa*.

Tabela 3. Composição da ração segundo Welker, 2009.

Componente	Porcentagem %
Fubá	41
Farelo de soja	20
Farelo de trigo	15
Carbonato de cálcio	20
Fosfato bicálcico	2,5
NaCl	0,5

Cevadilho	0,5
Suplemento de micronutrientes	0,5

1.2.2 Procedimento experimental

Os animais foram divididos em treze grupos diferentes:

Um grupo controle, sem injeção e mantido em normoxia por 96 horas até o sacrifício;

Um grupo com injeção de solução salina e mantido em normoxia por 96 horas até o sacrifício;

Um grupo com injeção de solução BSO e mantido em normoxia por 96 horas até o sacrifício;

Um grupo com injeção de solução salina, mantido em normoxia por 88,5 horas e depois colocado em anoxia por 5,5 horas e sacrificados;

Um grupo com injeção de solução BSO, mantido em normoxia por 88,5 horas e depois colocado em anoxia por 5,5 horas e sacrificados;

Um grupo com injeção de solução salina, mantido em normoxia por 88,5 horas e depois colocado em anoxia por 5,5 horas e 15 minutos de reoxigenação e depois sacrificados;

Um grupo com injeção de solução BSO, mantido em normoxia por 88,5 horas e depois colocado em anoxia por 5,5 horas e 15 minutos de reoxigenação e depois sacrificados;

Um grupo com injeção de solução salina, mantido em normoxia por 88,5 horas e depois colocado em anoxia por 5,5 horas e 30 minutos de reoxigenação e depois sacrificados;

Um grupo com injeção de solução BSO, mantido em normoxia por 88,5 horas e depois colocado em anoxia por 5,5 horas e 30 minutos de reoxigenação e depois sacrificados;

Um grupo com injeção de solução salina, mantido em normoxia por 88,5 horas e depois colocado em anoxia por 5,5 horas e 60 minutos de reoxigenação e depois sacrificados;

Um grupo com injeção de solução BSO, mantido em normoxia por 88,5 horas e depois colocado em anoxia por 5,5 horas e 60 minutos de reoxigenação e depois sacrificados;

Um grupo com injeção de solução salina, mantido em normoxia por 88,5 horas e depois colocado em anoxia por 5,5 horas e 120 minutos de reoxigenação e depois sacrificados;

Um grupo com injeção de solução BSO, mantido em normoxia por 88,5 horas e depois colocado em anoxia por 5,5 horas e 120 minutos de reoxigenação e depois

sacrificados;

Os animais injetados, depois de 88,5 horas de normoxia, eram colocados em um recipiente de vidro de 20cm x 19,5cm x 12,5cm, com uma tampa de vidro contendo dois orifícios. Foi posto um fluxo de nitrogênio gasoso de aproximadamente 2,5 L/m em um dos orifícios da tampa de vidro, com o excedente de gás saindo pelo segundo orifício da tampa. Após 30 minutos, todo o oxigênio havia sido retirado, os orifícios eram vedados e o tempo era contado por cinco horas (anoxia). Os 30 minutos em que o recipiente está sendo cheio de nitrogênio são qualificados como um período de hipóxia. Nosso modelo animal *Helix aspersa maxima* tolera até 15 horas em anóxia (Ramos-Vasconcelos, 2005). Os experimentos foram conduzidos nos meses de março e abril.

Os sacrifícios foram feitos por decapitação e seus orgãos (glândula digestiva e músculo do pé) foram retirados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80 ºC.

Para inibir a síntese de GSH, foi utilizado L-Butionina –(S,R)- sulfoximina (BSO), inibidor específico da enzima dimérica y-glutamato-cisteína ligase (GCL, anteriormente conhecida como γ- glutamilcísteina sintetase) primeiro passo para a produção de GSH. A reação catalisada pela GCL é limitante na síntese da GSH (Griffith, 1999; Sies, 1999)

A solução de BSO foi feita de modo que em um 1 kg de massa de animal (cáculo feito desconsiderando a massa da concha, 23%) fosse injetado 1 g de BSO em solução salina 0,9%. Esta concentração foi baseada em estudos feitos em mexilhões, anêmonas e peixe dourado (Canesi et al., 2000; Mitchelmore et al. 2003; Lushack & Hermes-Lima, 2005) e em testes preliminares que indicaram inibição entre 60% e 70% da síntese de GSH entre 72 horas e 96 horas após a injeção na glândula digestiva e no músculo do pé do caramujo. O volume de solução salina ou de BSO injetado na hemocele foi de 12,5 μL/g de animal.

1.2.3 Danos oxidativos

As amostras dos órgãos congelados foram usadas para medir glutationa total (eq-GSH), glutationa oxidada (GSSG), proteínas carboniladas e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A homogeneização foi feita em solução final de ácido tricloroacético 10%, sempre mantendo as amostras em gelo, usando um homogeneizador de vidro, em uma diluição de 1:40 para glândula digestiva e 1:20 para músculo do pé.

Eq-GSH e GSSG:

As medidas de glutationa total (eq-GSH = GSH + 2GSSG) foram obtidas através da formação do composto TNB (5-tio-2-ácido nitrobenzóico) e GSSG em 412 nm de absorbância. Além do DTNB (5-5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico), foi utilizado GR e NADPH para reduzir as moléculas de GSSG presentes (Akerboom & Sies, 1981; Welker, 2009). Nas medidas de GSSG foi utilizada 2-vinilpiridina (indisponibiliza a GSH reduzida, age lentamente), GR e NADPH (Griffith, 1980; Welker, 2009). O coeficiente de extinção molar do TNB é de 13,6 mM^{-1}. cm^{-1}. A razão entre a quantidade de GSSG e a quantidade de eq-GSH foi denominada como índice de oxidação.

Cada amostra homogeneizada foi centrifugada por 6 minutos a 10000xg a 4 ºC e depois o sobrenadante foi pipetado em dois tubos tipo eppendorf, em um tubo foi medido eq-GSH e em outro tubo foi medido GSSG. Nos tubos de eq-GSH foram colocados 100 µl de sobrenadante da amostra acidificada, 300 µl de tampão fosfato 500 mM pH 7 e 20 µl de etanol. Nos tubos de GSSG foram colocados 100 µl de sobrenadante da amostra acidificada, 300 µl de tampão fosfato 500 mM pH 7 e 20 µl de de 2- vinilpiridina 500mM em etanol. Os tubos foram agitados vigorosamente por um minuto e deixados no escuro por uma hora em temperatura ambiente (Griffith, 1980; Welker, 2009).

Foram feitas duas curvas-padrão e as soluções padrões de GSH eram tratadas da mesma forma que as amostras. Na cubeta, o volume final foi de 1 ml e continha as seguintes soluções em concentrações finais: tampão fosfato 100mM pH 7, EDTA 1mM, TCA 0,238%, etanol 0,476%, GSH (curva 1: de 0 a 1,5 µM; curva 2: de 0 a 0,2 µM) ou amostra deixada no escuro por 1 hora, NADPH 0,1mM, DTNB 0,1 mM e GR (curva 1: 0,05 U/ml, curva 2: 0,3 U/ml). A cinética foi lida por três minutos em 412 nm.

Tabela 4. Curva 1, contendo de 0 a 1,5 µM de GSH.

H_2O	KPi 0,5M EDTA 5mM pH 7,0	TCA 2,38% fosfato 0,357M etanol 4,76%	GSH 25µM (TCA 2,38% fosfato 0,357M etanol 4,76%)	NADPH 4mM	DTNB 2mM	GR 1U/mL
615	200	60	0	25	50	50
615	200	45	15	25	50	50
615	200	30	30	25	50	50
615	200	15	45	25	50	50
615	200	0	60	25	50	50

Tabela 5. Curva 2, contendo de 0 a 0,2 µM de GSH.

H_2O	KPi 0,5M	TCA 2,38%	GSH **2**µM (TCA	NADPH	DTNB	GR

	EDTA 5mM pH 7,0	fosfato 0,357M etanol 4,76%	2,38% fosfato 0,357M etanol 4,76%)	4mM	2mM	~13U/mL
600	200	100	0	25	50	25
600	200	87,5	12,5	25	50	25
600	200	75	25	25	50	25
600	200	50	50	25	50	25
600	200	0	100	25	50	25

TBARS:

Nas medidas de TBARS, um indicativo de peroxidação lipídica, foi utilizado o método de Buege & Aust, 1978, modificado levemente por Welker, 2009, que mede o aduto MDA-TBA_2. Os sobrenadantes das amostras homogeneizadas foram pipetados (400 µl) em dois tubos, um para o teste e o outro para o branco; depois foram colocados 400 µl de TCA 20% nos dois tubos e 400 µl de TBA 0,75% em HCL 500mM no tubo teste e 400 µl de HCL 500mM no tubo branco. As concentrações finais dos reagentes foram: TBA 0,25%, HCl 0,17 N e TCA 10%.

Os tubos foram agitados rapidamente, furados e levados ao banho a 96 ºC por 15 minutos. Depois os tubos foram centrifugados por 6 minutos a 10000xg. Os sobrenadantes das amostras foram transferidos para cubetas e lidos em 532nm e 600 nm. Para calcular o valor de TBARS (coeficiente de extinção molar é de 156 $mM^{-1}. cm^{-1}$) a leitura em 532 nm era subtraída da leitura em 600 nm, tanto do teste como do branco, e depois o valor do teste subtraído do valor do branco.

Proteínas carboniladas:

As medidas de proteínas carboniladas foram obtidas pela reação dem 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com o grupo carbonil, formando uma hidrazona lida em 370 nm. Este método mediu as proteínas totais resuspendidas com cloreto de guanidina (Levine et al., 1990; Welker, 2009).

Depois de homogeneizadas, 400 µl de cada amostra foi transferido para um tubo teste e para um tubo branco e imediatamente centrifugados por 6 minutos a 10000xg a 4 ºC. O sobrenadante foi retirado, o pellet resultante foi congelado em nitrogênio liquido e armazenado a -80 ºC. Para medir as proteínas carboniladas, os pellets foram descongelados a temperatura ambiente e logo depois foram adicionados aos tubos testes 500 µl de solução

10mM de DNPH em HCL 2M, e aos tubos brancos foram adicionados 500 µl de HCL 2M. Os pellets foram dissolvidos e os tubos foram mantidos no escuro e em temperatura ambiente por uma hora e agitados a cada 15 minutos (Reznick & Packer, 1994). Depois foi adicionado em cada tubo 500 µl de TCA 20% gelado, os tubos foram eram agitados e deixados no gelo por 10 minutos (Reznick & Packer, 1994). A próxima etapa foi repetida três vezes: centrifugação por 6 minutos a 10000xg a 4 ºC, descarte do sobrenadante, adição de de 1 ml de solução 1:1 de etanol/acetado de etila, agitação por 40 segundos. Depois do último descarte de sobrenadante, foi adicionado nos tubos 1 ml de cloreto de guanidina 6M feito em tampão fosfato 20 mM pH 2,3, os tubos foram novamente agitados para dissolução dos pellets e centrifugados por 6 minutos a 10000xg a 4 ºC. No espectrofotômetro, uma amostra de cloreto de guanidina serviu como padrão para zerar a máquina. As amostras foram lidas em 370 nm e os tubos brancos também foram lidos em 280 nm para medir a concentração de proteínas totais. O coeficiente de extinção molar é de 22000 $M^{-1}.cm^{-1}$ (Levine et al., 1990; Welker, 2009).

1.2.4 Enzimas

As amostras de tecidos congelados foram homogeneizadas usando um homogeneizador mecânico Ultraturrax em tampão fosfato 50mM/EDTA 0,5mM pH 7,2 concentração final e com PMSF 0,1 µmol/g de tecido. A diluição final do músculo de pé foi de 1:20 e a de glândula igestiva foi de 1:40. O homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos a 10.000xg a 4ºC e seu sobrenadante foi usado para a determinação de catalase, glutationa-S-transferase, glutationa redutase, glicose-6-fosfato-desidrogenase, glutationa peroxidase dependente de selênio (Se-GPx) e proteínas solúveis totais.

Na determinação das proteínas solúveis totais foi utilizado o método de Badford, 1976. No ensaio, a diluição final do sobrenadante de glândula digestiva foi de 1:200 e de 1:100 no músculo do pé.

Catalase:

A atividade da catalase foi medida pela degradação de H_2O_2 em 240 nm (Aebi, 1984). Utilizou-se as concentrações finais de: tampão fosfato 50 mM/EDTA 0,5 mM (pH 7,2) e H_2O_2 10 mM. Foi adotado o coeficiente de extinção molar para H_2O_2 de 0,04 $mM^{-1}.cm^{-1}$. A reação foi acompanhada por 40 segundos e o volume de cada amostra (sobrenadante) na

cubeta era calculado para que a taxa de absorbância fosse de aproximadamente -0,030 abs/minuto, limitando as variações de H_2O_2 e da atividade da catalase (Welker, 2009). Foi determinada que uma unidade (U) de catalase corresponde à quantidade de enzima que degrada 1 µmol de H_2O_2 por minuto. Foram utilizados entre 10 a 50 µl de sobrenadante de glândula digestiva em uma diluição 1:200 final; e de 20 a 100 µl de sobrenadante de músculo do pé em uma diluição 1:20 final.

GST:

A atividade da GST foi medida pela conjugação de CDNB com GSH em 340 nm (Habig & Jakoby 1981). As concentrações finais usadas foram: tampão fosfato 50 mM/EDTA 0,5 mM (pH 7,2), 1mM de GSH e 1mM de CDNB em etanol (Habig et al., 1974, Welker, 2009). Foi adotado o coeficiente de extinção molar para o conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno de 9,6 $mM^{-1}.cm^{-1}$. Foi determinada que uma unidade (U) de GST corresponde à quantidade de enzima que forma 1 µmol de conjugado. Foram utilizados aproximadamente: 20 µl de sobrenadante de glândula digestiva em uma diluição 1:200 final; e 40 µl de sobrenadante de músculo do pé em uma diluição 1:100 final.

GR:

A GR foi medida pela oxidação de NADPH em 340 nm (Carlberg & Mannervik, 1975; Carlberg & Mannervik, 1985). As concentrações finais foram: tampão fosfato 50 mM/EDTA 0,5 mM (pH 7,2), 1mM de GSSG e 0,1 mM de NADPH (Welker, 2009). Foi adotado o coeficiente de extinção molar para a oxidação do NADPH de 6,22 $mM^{-1}.cm^{-1}$. Foi determinada que uma unidade (U) de GR corresponde à quantidade de enzima que oxida 1µmol de NADPH por minuto. Foram utilizados aproximadamente: 70 µl de sobrenadante de glândula digestiva em uma diluição 1:40 final; e 100 µl de sobrenadante de músculo do pé em uma diluição 1:20 final.

G6PDH:

A G6PDH foi medida pela redução de NADP em 340 nm (Kornberg, 1950; Kornberg et al., 1955). As concentrações finais foram: tampão fosfato 50 mM/EDTA 0,5 mM (pH 7,2), 5 mM de $MgSO_4$, 0,2 mM de NADP e 1 mM G6P (Welker, 2009). Foi adotado o coeficiente

de extinção molar para a redução do NADPH de 6,22 $mM^{-1}.cm^{-1}$. Foi determinada que uma unidade (U) de G6PDH corresponde à quantidade de enzima que forma 1µmol de NADPH por minuto. Foram utilizados aproximadamente: 70 µl de sobrenadante de glândula digestiva em uma diluição 1:40 final; e 80 µl de sobrenadante de músculo do pé em uma diluição 1:20 final.

Se-GPx:

A Se-GPx foi medida pela oxidação de NADPH em 340nm (Paglia & Valentine, 1967). As concentrações finais foram: tampão fosfato 50 mM/EDTA 0,5 mM (pH 7,2), 4 mM de NaN_3; 5 mM de GSH; 0,1 U/mL de GR; 0,2 mM de NADPH e 0,073 mM de H_2O_2 (Welker, 2009). Foi adotado o coeficiente de extinção molar para a oxidação do NADPH de 6,22 $mM^{-1}.cm^{-1}$. Foi determinada que uma unidade (U) de Se-GPx corresponde à quantidade de enzima que oxida 1µmol de NADPH por minuto. Os seguintes reagentes eram colocados na cubeta e deixados incubados por três minutos: tampão fosfato/EDTA, NaN_3, GSH, GR e sobrenadante da amostra centrifugada, depois que a oxidação de NADPH ficasse estável a reação era iniciada com H_2O_2. Foram utilizados aproximadamente: 200 µl de sobrenadante de glândula digestiva em uma diluição 1:40 final; e 200 µl de sobrenadante de músculo do pé em uma diluição 1:20 final.

1.2.5 Análise estatística

Os dados foram testados quanto a sua normalidade e homocedasticidade, usando os testes de Shapiro-Wilks e Levene respectivamente (Zar, 1984). Após, foram feitos o teste de ANOVA ou teste t (não pareado, duas caudas), comparando-se as médias dos grupos amostrados. Se obtido um valor de P significativo, o teste de Tukey foi aplicado após o teste de ANOVA. Foi utilizado um nível de significância de 5% em todas as análises. Os resultados nos gráficos estão exibidos como média ± erro padrão da média. Correlações foram feitas por meio do coeficiente de Pearson, foram mostrados os gráficos com as correlações significativas mais importantes.

1.3 Resultados

Eq-GSH, GSSG e GSSG/eq-GSH:

Em animais injetados com BSO, a glutationa total (eq-GSH) da glândula digestiva foi inibida ($p < 0,05$) em média 61% (gráfico1a) em relação aos animais injetados com salina apenas; e em relação ao grupo controle também houve inibição ($p < 0,05$). Já no músculo do pé a inibição ($p < 0,05$) de eq-GSH foi de 68% em média (gráfico 1b) em relação aos animais injetados com salina; os eq-GSH dos grupos BSO do músculo do pé também foram diferentes ($p < 0,05$) do grupo controle.

A quantidade de GSSG no grupo normoxia BSO na glândula digestiva (gráfico 2a) foi de 30,34 nmol por g de tecido úmido, menor ($p < 0,05$) que as quantidades achadas no grupo controle (70,26 nmol/g), no grupo normoxia salina (68,81 nmol/g) e no grupo anoxia BSO (62,31 nmol/g).

A quantidade de GSSG no grupo normoxia BSO no músculo do pé (gráfico 2b) foi de 21,6 nmol/g, menor ($p < 0,05$) que as quantidades encontradas no grupo normoxia salina (59,45 nmol/g) e no grupo anoxia BSO (42,33 nmol/g). Os grupos BSO anoxia, reoxigenação 15 minutos e 1 hora também apresentaram médias de GSSG menores ($p < 0$-05) em relação aos seus respectivos grupos salinos (figura 1.3.4).

O índice de oxidação GSSG/eq-GSH na glândula digestiva (gráfico 3a) no grupo anoxia BSO (0,096) aumentou ($p < 0,05$) mais de duas vezes em relação ao grupo controle (0,04) e anoxia salina (0,04), e aumentou quase duas vezes em relação ao grupo normoxia BSO (0,05). Houve também um aumento ($p < 0,05$) no índice de oxidação no grupo reoxigenação 15 minutos BSO (0,098) em relação ao seu grupo salino (0,035). Embora não significativo estatisticamente ($p = 0,06$), ocorreu um aumento no índice de oxidação GSSG/eq-GSH de aproximadamente três vezes nos grupos reoxigenação 1h e 2h injetados com BSO em relação aos seus respectivos grupos injetados com salina.

O índice de oxidação GSSG/eq-GSH no músculo do pé (gráfico 3b) no grupo anoxia BSO (0,116) aumentou ($p < 0,05$) mais de duas vezes em relação ao grupo controle (0,049), e aumentou quase duas vezes em relação aos grupos anoxia salina (0,063) e normoxia BSO (0,061). Houve também um aumento ($p < 0,05$) do índice de oxidação no grupo reoxigenação 1 hora BSO (0,091) em relação ao seu grupo salino (0,054).

Danos oxidativos:

As quantidades de proteínas carboniladas na glândula digestiva (gráfico 4a) e no músculo do pé (gráfico 4b) de *Helix aspersa* não sofreram alterações em resposta a diminuição de GSH e também em resposta a variação de oxigênio.

As concentrações de TBARS na glândula digestiva (gráfico 5a) e no músculo do pé (gráfico 5b) de *Helix aspersa* não sofreram modificações em resposta a diminuição de GSH e também em resposta a variação de oxigênio.

Catalase:

A atividade da catalase na glândula digestiva (gráfico 6a) não variou nos grupos injetados com salina e nos grupos injetados com BSO durante a anoxia e reoxigenação. Porém, houve uma diminuição de 1,47 vezes ($p < 0,05$) de sua atividade em 30 minutos de reoxigenação no grupo BSO em relação ao seu respectivo grupo salina. Já a atividade da catalase no músculo do pé (gráfico 6b) variou ao longo dos grupos injetados com BSO; houve um aumento de 2,05 vezes ($p < 0,05$) no grupo reoxigenação 2 horas em relação ao grupo reoxigenação 30 minutos. Nos grupos injetados com salina (músculo do pé) não ocorreram variações na atividade da catalase. Assim como na glândula digestiva, no músculo do pé houve uma diminuição da atividade de catalase de 2,34 vezes ($p < 0,05$) em 30 minutos de reoxigenação no grupo BSO em relação ao seu respectivo grupo salina.

GST:

A atividade da GST na glândula digestiva (gráfico 7a) e no músculo do pé (figura 1.3.14) não foi alterada na anoxia e reoxigenação nos grupos injetados com salina e BSO. Entretanto, ocorreu uma redução de 1,54 vezes ($p < 0,05$) de sua atividade em 30 minutos de reoxigenação no grupo BSO em relação ao seu respectivo grupo salina na glândula digestiva. A atividade da GST no músculo do pé (gráfico 7b) foi modificada no grupo 1 hora de reoxigenação BSO, ocorreu um aumento e 1,67 vezes ($p< 0,05$) em relação ao grupo 1 hora de reoxigenação salina.

Se-GPx:

A atividade de Se-GPx na glândula digestiva (gráfico 8a) foi maior no grupo 1 hora de reoxigenação salina em relação a todos ($p < 0,05$) os grupos salina e em relação aos grupos BSO, exceto em relação ao seu respectivo grupo 1 hora de reoxigenação. O aumento da atividade enzimática no grupo 1 hora de reoxigenação salina em reação a grupo anoxia e normoxia salina foi de aproximadamente três vezes. Não houve diferenças significativas no músculo do pé em relação a atividade enzimática de Se-GPx (gráfico 8b).

GR:

A atividade da GR na glândula digestiva (gráfico 9a) aumentou 1,83 vezes ($p < 0,05$) no grupo normoxia BSO em relação ao grupo controle. Nos grupos 15 minutos e 30 minutos de reoxigenação BSO, a GR diminuiu aproximadamente duas vezes ($p < 0,05$) em relação ao grupo normoxia BSO. Já atividade da GR no músculo do pé (gráfico 9b) aumentou 1,55 vezes ($p < 0,05$) apenas no grupo 15 minutos reoxigenação BSO em relação ao seu respectivo grupo salina.

G6PDH:

A atividade da G6PDH na glândula digestiva (gráfico 10a) não variou significativamente nos grupos injetados com salina e nos grupos injetados com BSO durante a anoxia e reoxigenação, e também não ocorreram diferenças entre os grupos BSO e salina nos mesmos tempos de reoxigenação. Já a atividade da G6PDH no músculo do pé (gráfico 10b) variou nos grupos injetados com salina, mas não variou nos grupos injetados com BSO. Ocorreu uma diminuição de 1,7 vezes ($p < 0,05$) no grupo anoxia salina em relação ao grupo normoxia salina.

Gráficos:

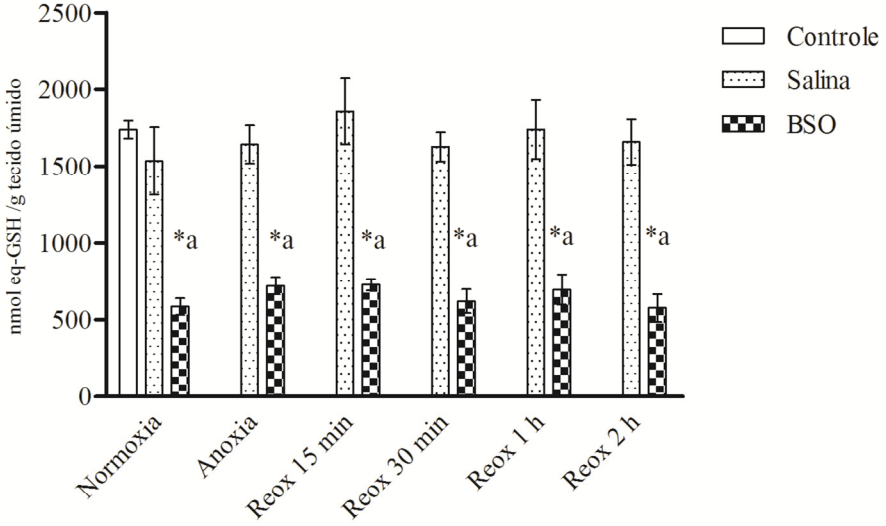


Gráfico 1a. Eq-GSH em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n= 4-8. * Significativamente diferente (p<0,05) do grupo contole. [a] Significativamente diferente (p<0,05) do seu respectivo grupo salina.

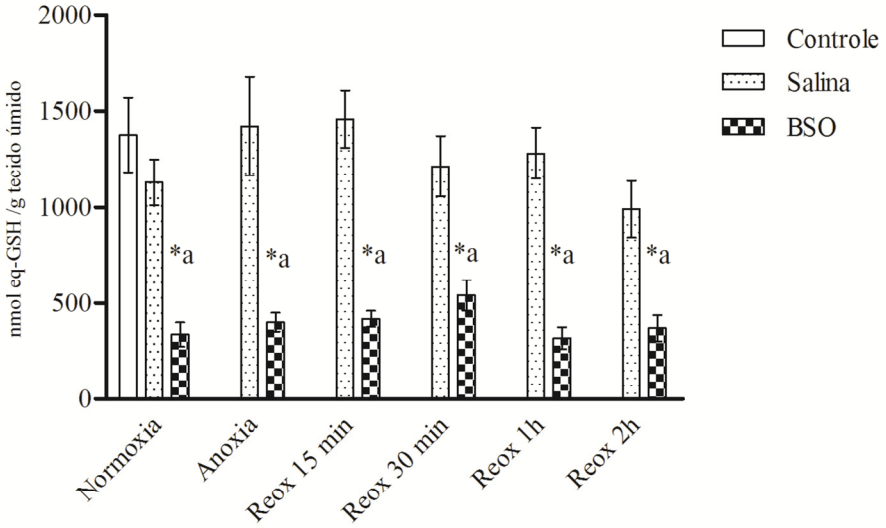


Gráfico 1b. Eq-GSH em músculo de pé de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n=4-7. * Significativamente diferente (p<0,05) do grupo controle. [a] Significativamente diferente (p<0,05) do seu respectivo grupo salina.

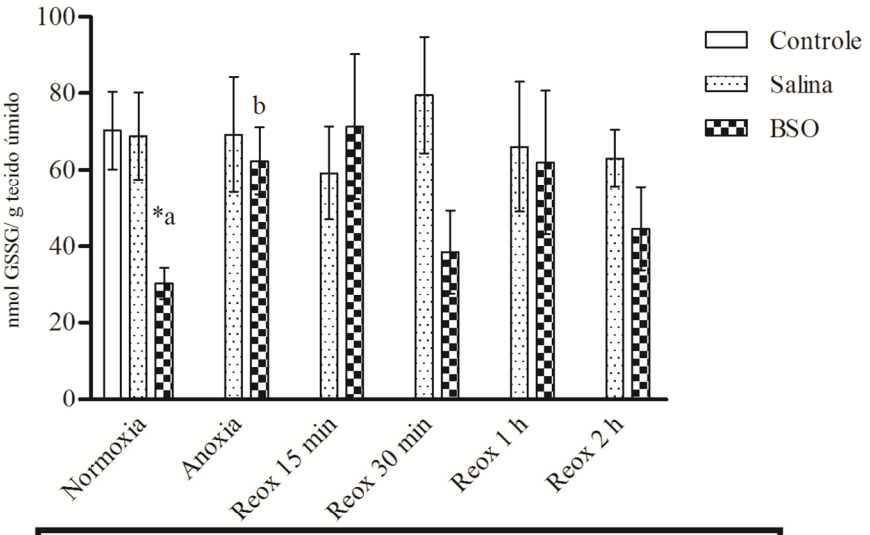


Gráfico 2a. GSSG em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n= 4-8. *Significativamente diferente (p<0,05) do grupo controle. [a] Significativamente diferente (p<0,05) do seu respectivo grupo salina. [b] Significativamente diferente (p<0,05) do grupo normoxia BSO.

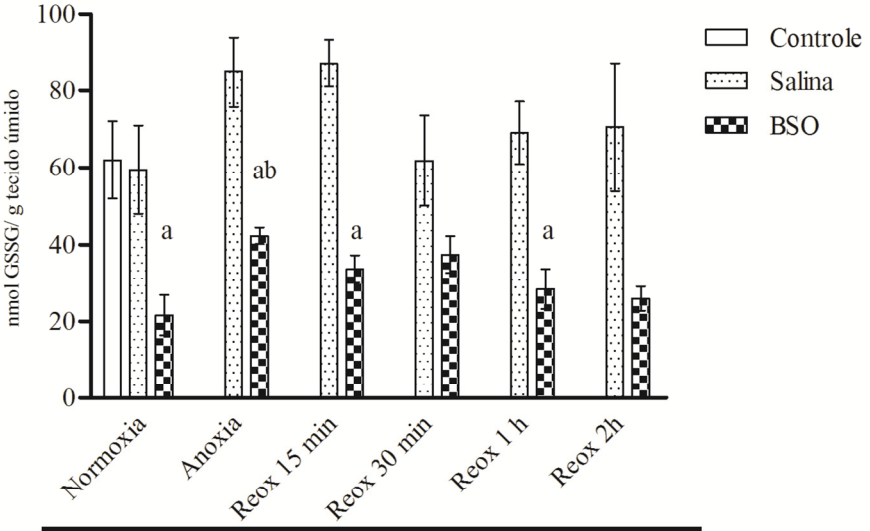


Gráfico 2b. GSSG em músculo de pé de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n=4-7. [a] Significativamente diferente (p< 0.05) do respectivo grupo salina. [b] Significativamente diferente (p < 0,05) do grupo normoxia BSO.

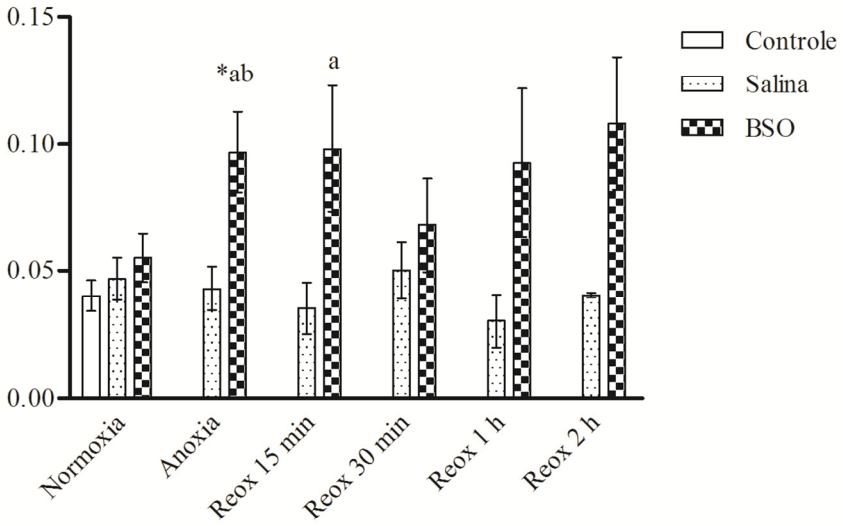


Gráfico 3a. GSSG/eq-GSH em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n= 4-8. * Significativamente diferente ($p<0,05$) do grupo controle. [a] Significativamente diferente ($p<0,05$) do seu respectivo grupo salina.[b]Significativamente diferente ($p<0,05$) do grupo normoxia BSO.

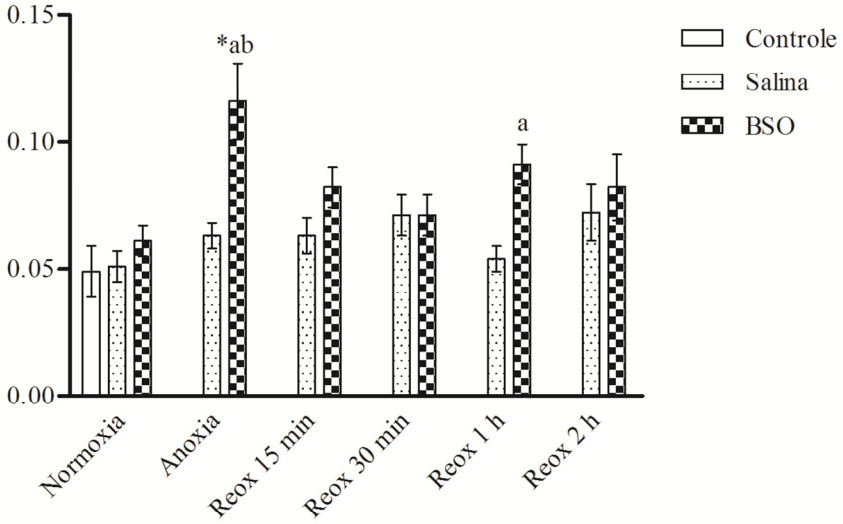


Gráfico 3b. GSSG/eq-GSH em músculo de pé de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n=4-7. *Significativamente diferente ($p<0,05$) do grupo controle. [a] Significativamente diferente ($p< 0.05$) do respectivo grupo salina. [b] Significativamente diferente ($p < 0,05$) do grupo normoxia BSO.

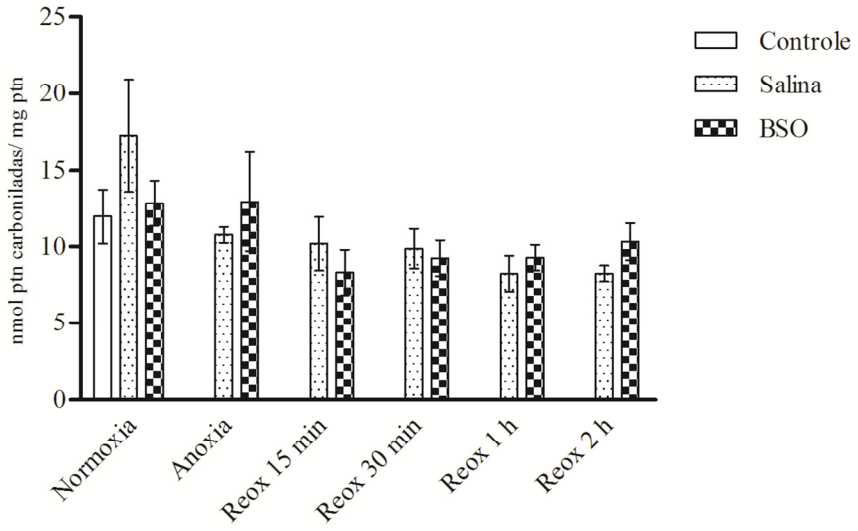


Gráfico 4a. Proteínas carboniladas em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n=4-8.Não houve diferenças significativas.

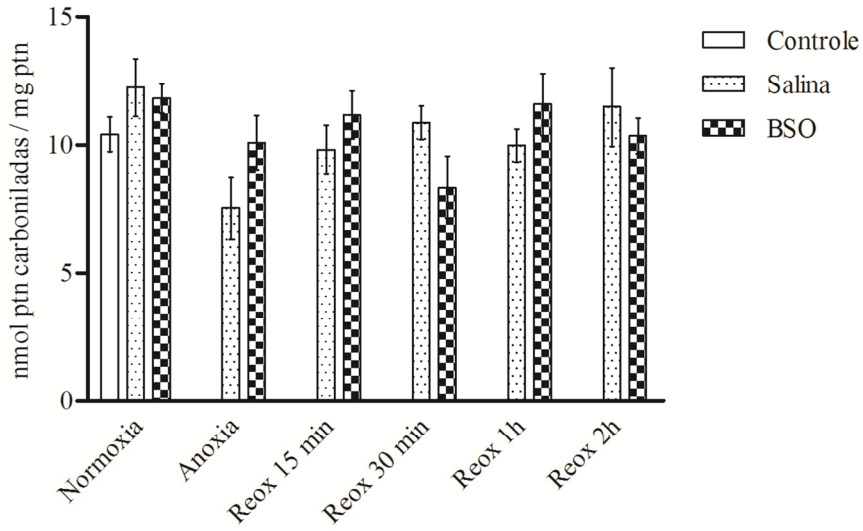


Gráfico 4b. Proteínas carboniladas em músculo de pé de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n=4-7.Não houve diferenças significativas.

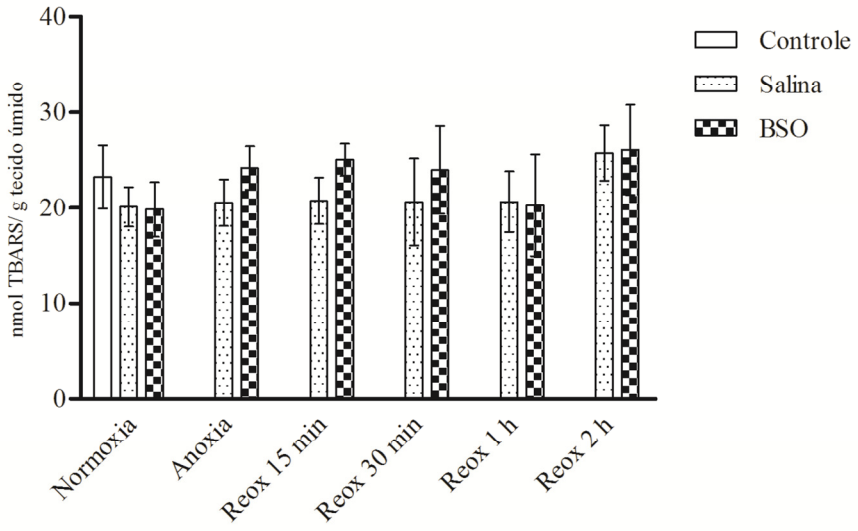


Gráfico 5a. TBARS em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n=4-8. Não houve diferenças significativas.

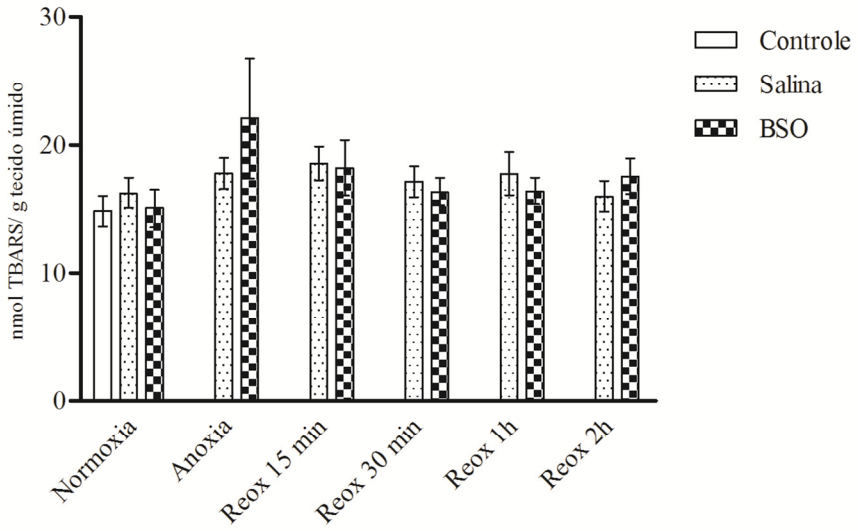


Gráfico 5b. TBARS em músculo de pé de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n=4-7. Não houve diferenças significativas.

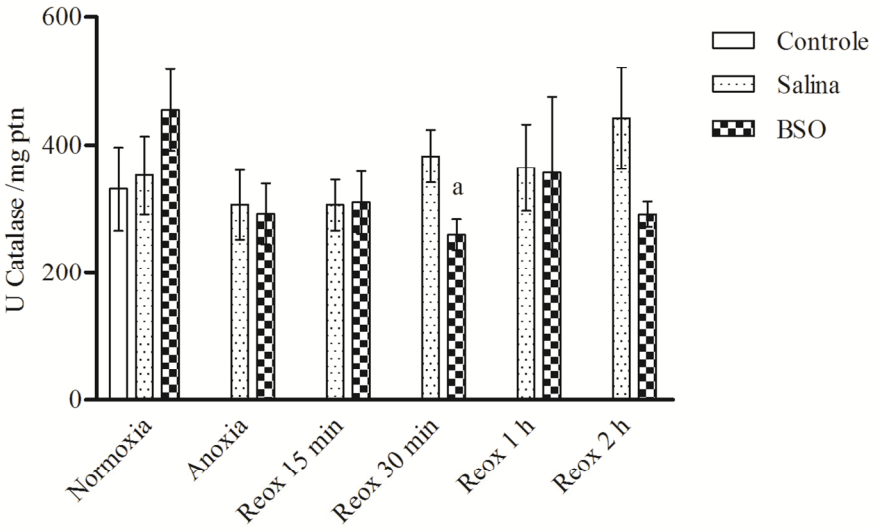


Gráfico 6a. Catalase em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n= 4-8. [a] Significativamente diferente ($p<0,05$) do respectivo grupo salina.

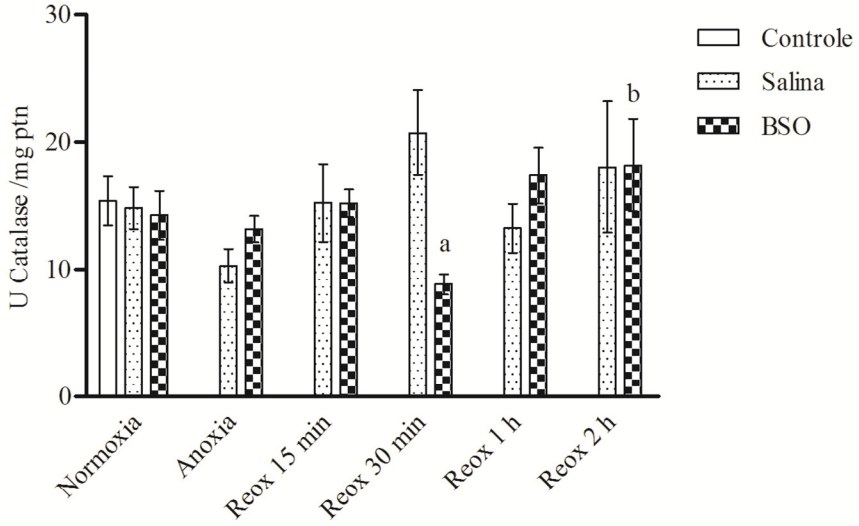


Gráfico 6b. Catalase em músculo de pé de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n=4-7. [a] Significativamente diferente ($p< 0.05$) do respectivo grupo salina. [b] Significativamente diferente ($p < 0,05$) do grupo reoxigenação 30 min BSO.

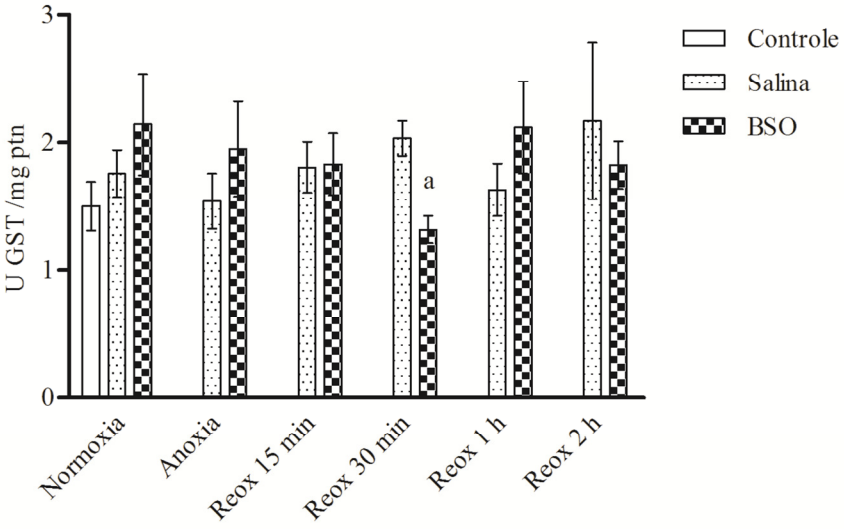


Gráfico 7a. GST em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n= 4-8. [a]Significativamente diferente ($p<0,05$) do respectivo grupo salina.

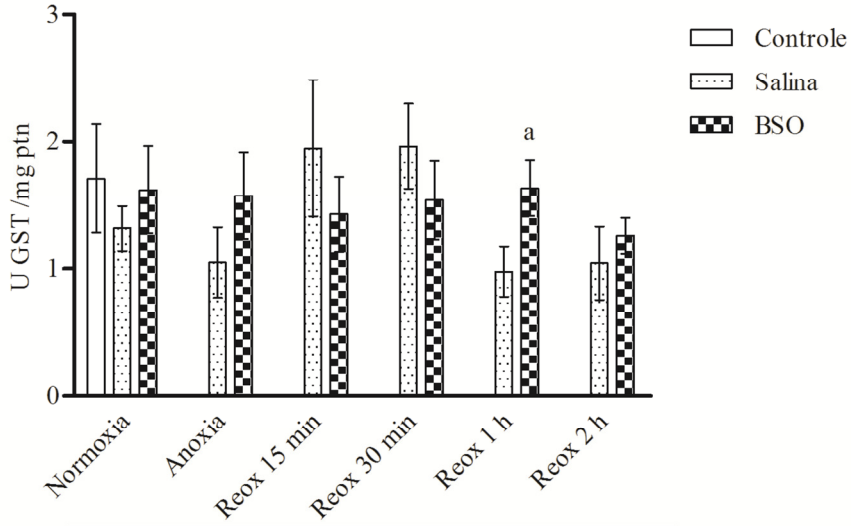


Gráfico 7b. GST em músculo de pé de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n=4-7. [a] Significativamente diferente ($p< 0.05$) do respectivo grupo salina.

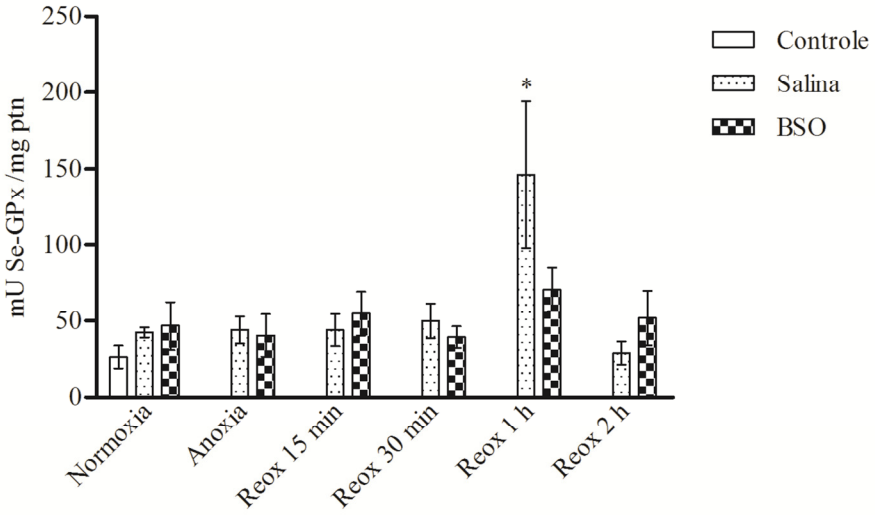


Gráfico 8a. Se-GPx em glândula digestiva de *Helix aspersa.* Média± erro padrão, n=4-8. *Significativamente diferente de todos os grupos, exceto do grupo BSO reoxigenação 1h.

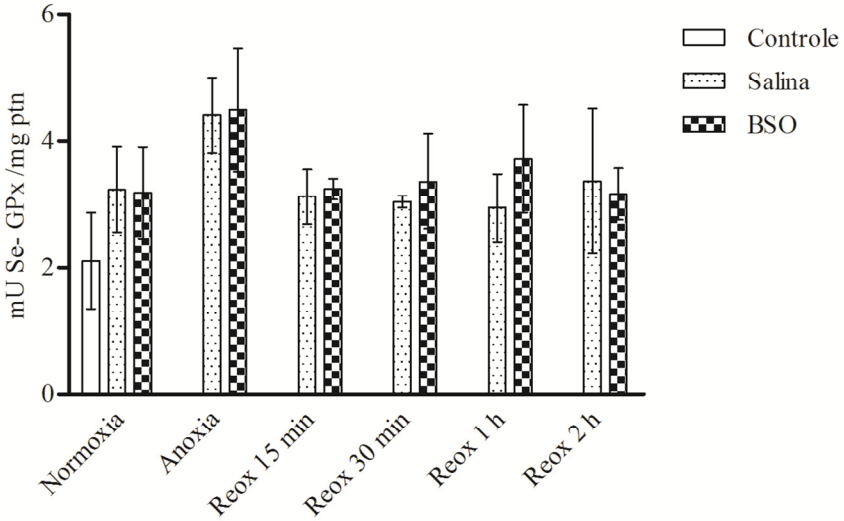


Gráfico 8b. Se-GPx em músculo de pé de *Helix aspersa.* Média ± erro padrão, n=4-7. Não houve diferenças estatísticas.

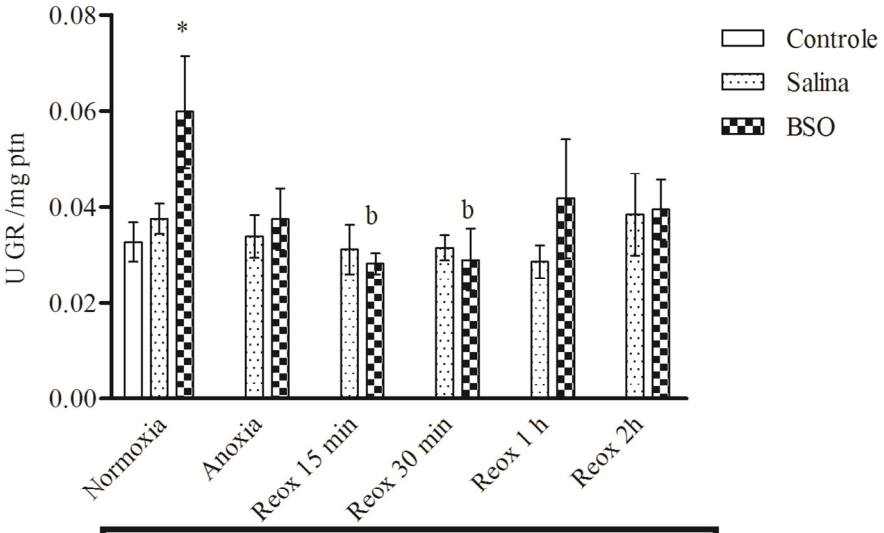


Gráfico 9a. GR em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n= 4-8. * Significativamente diferente (p<0,05) do controle. [b]Significativamente diferente (p<0,05) do grupo normoxia BSO.

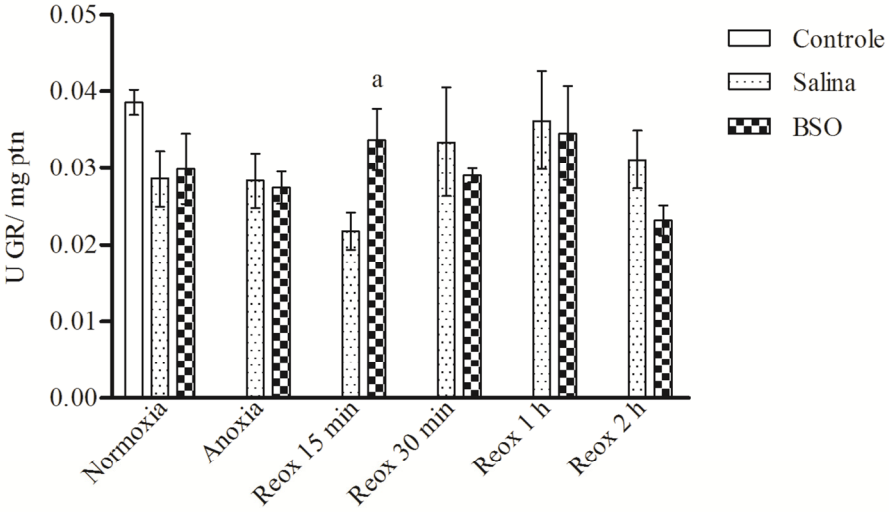


Gráfico 9b. GR em músculo de pé de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n=4-7. [a] Significativamente diferente (p< 0.05) do respectivo grupo salina.

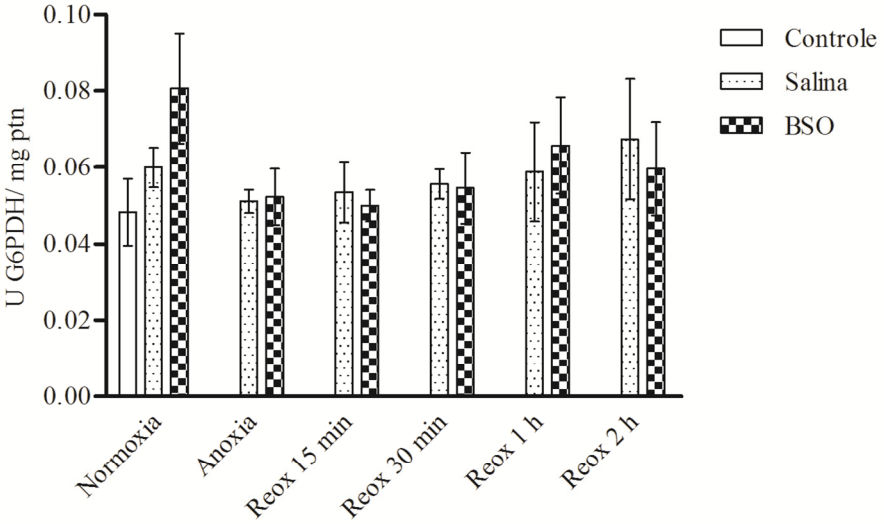


Gráfico 10a. G6PDH em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n= 4-8. Não houve diferenças significativas.

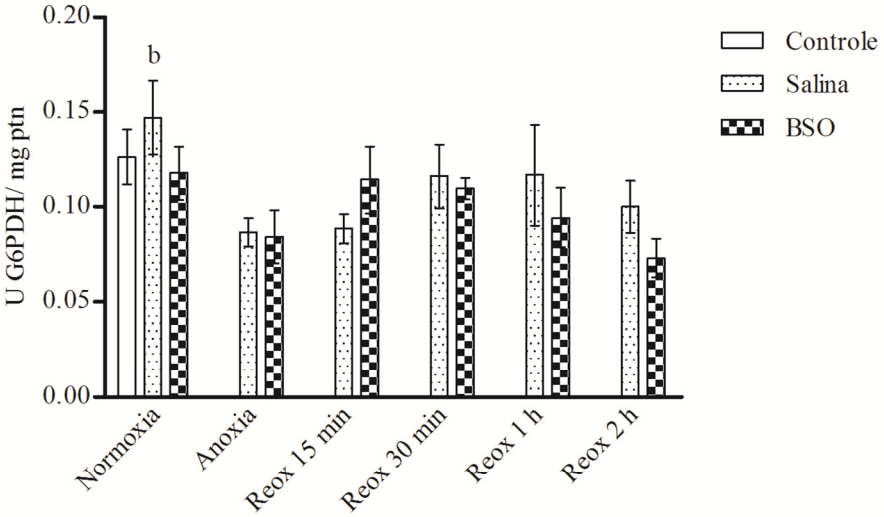


Gráfico 10b. G6PDH em músculo de pé de *Helix aspersa*. Média ± erro padrão, n=4-7. [b] Significativamente diferente ($p < 0.05$) dos grupos anoxia salina e BSO.

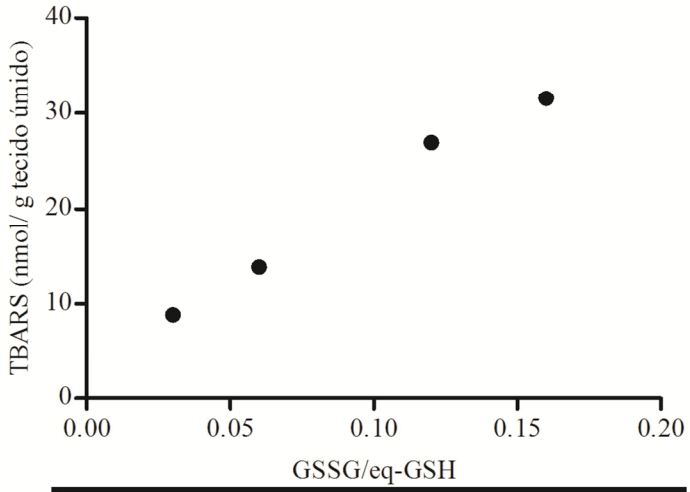


Gráfico 11. Correlação entre GSSG/eq-GSH e TBARS no grupo 1 h de reoxigenação BSO em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Pearson r= 0,9942, $p < 0,05$.

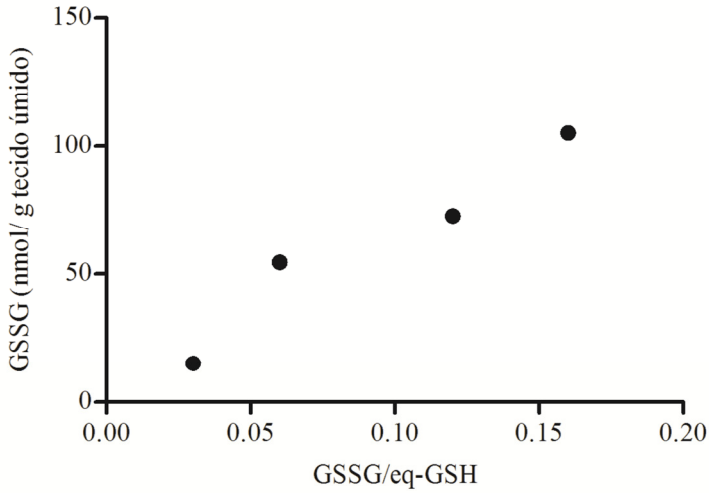


Gráfico 12. Correlação entre GSSG/eq-GSH e GSSG no grupo 1 h de reoxigenação BSO em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Pearson r= 0,9678, $p < 0,05$.

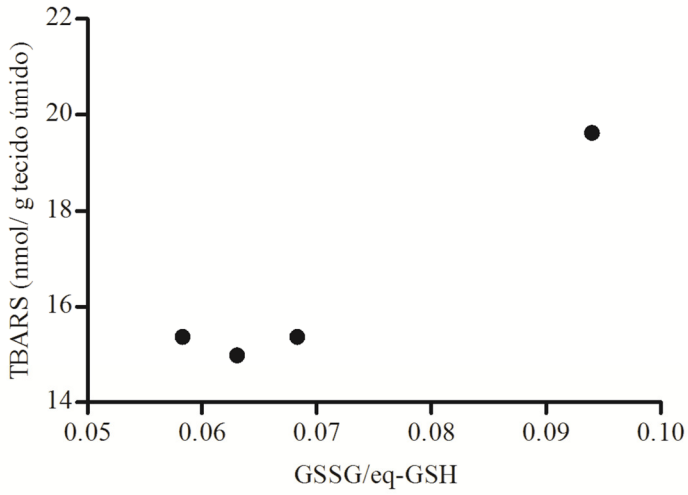


Gráfico 13. Correlação entre GSSG/eq-GSH eTBARS no grupo 30 min de reoxigenação BSO em músculo do pé de *Helix aspersa*. Pearson r= 0,9641, $p < 0,05$.

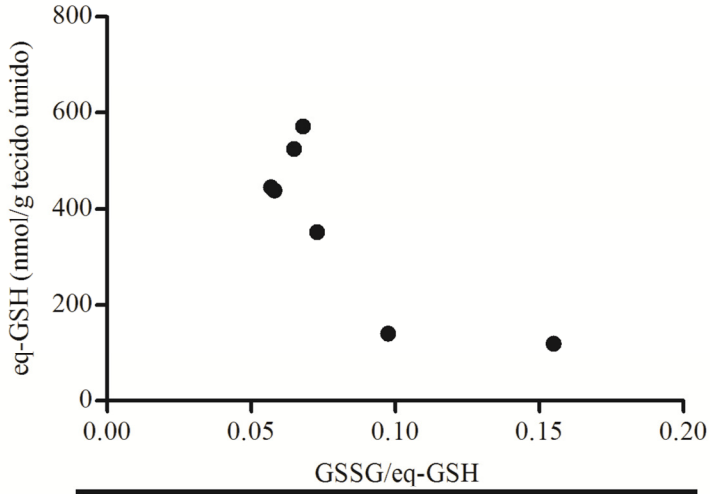


Gráfico 14. Correlação entre GSSG/eq-GSH e eq- GSH no grupo 2 h de reoxigenação BSO em músculo do pé de *Helix aspersa*. Pearson r= -0,8190, $p < 0,05$.

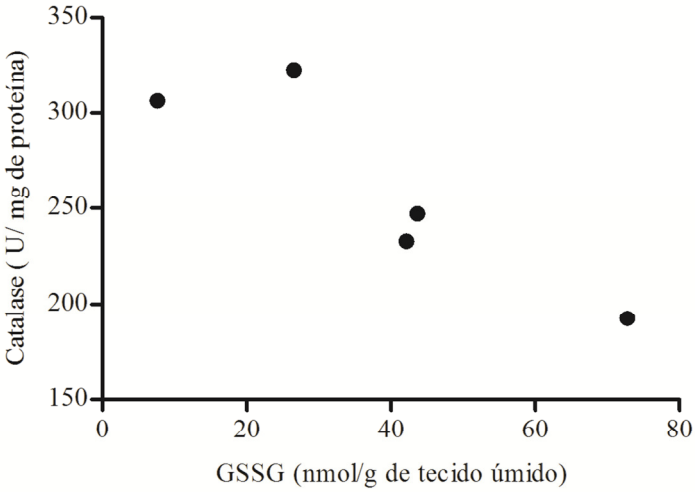


Gráfico 15. Correlação entre GSSG e catalase no grupo 30 min de reoxigenação BSO em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Pearson r= -0,9019, p < 0,05.

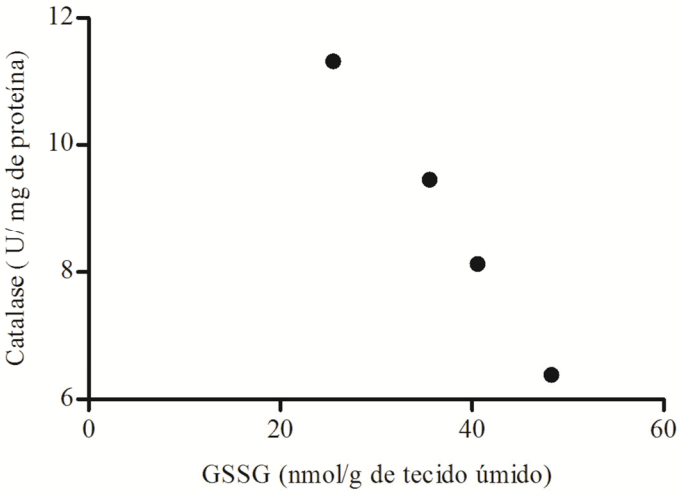


Gráfico 16. Correlação entre GSSG e catalase no grupo 30 min de reoxigenação BSO em músculo do pé de *Helix aspersa*. Pearson r= -0,9974, p < 0,05.

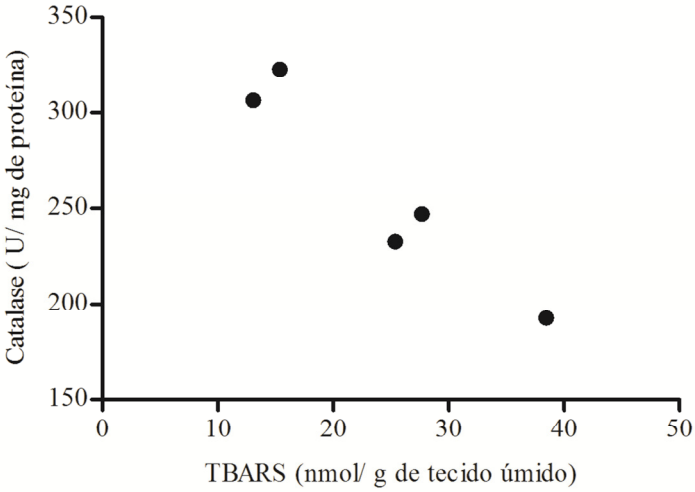


Gráfico 17. Correlação entre TBARS e catalase no grupo 30 min de reoxigenação BSO em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Pearson r= -0,9592, $p < 0,05$.

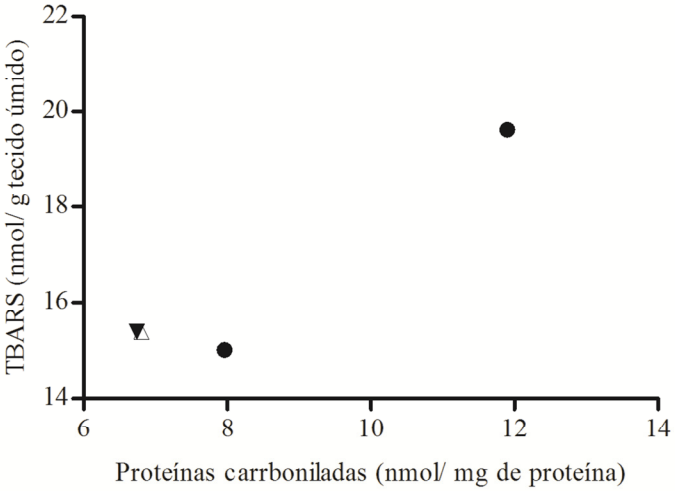


Gráfico 18. Correlação entre proteínas carboniladas e TBARS no grupo 30 min de reoxigenação BSO em músculo do pé de *Helix aspersa*. Pearson r= 0,9509, $p < 0,05$.

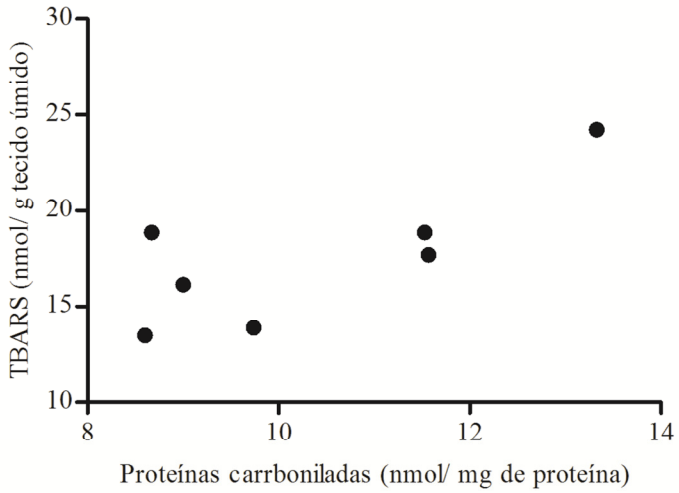


Gráfico 19. Correlação entre proteínas carboniladas e TBARS no grupo 2 h de reoxigenação BSO em músculo do pé de *Helix aspersa*. Pearson r= 0,7695, $p < 0,05$.

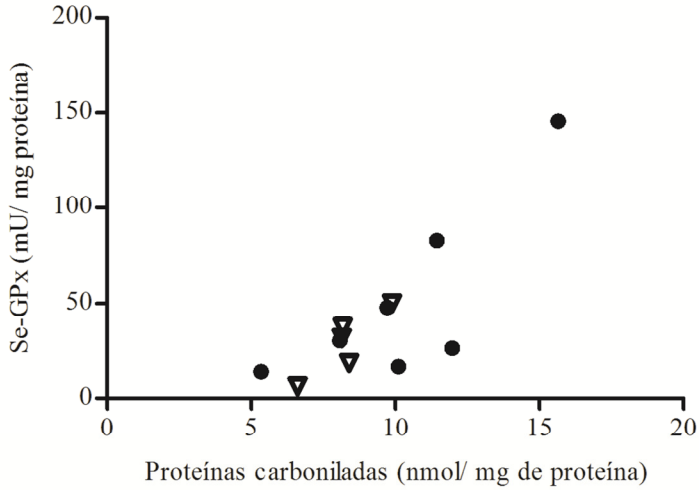


Gráfico 20. Correlação entre proteínas carboniladas e Se-GPx no grupo 2 h de reoxigenação BSO e salina (triângulos) em glândula digestiva de *Helix aspersa*. Pearson r= 0,8014 e 0,8798, $p < 0,05$.

1.4 Discussão e Conclusões

A injeção de BSO diminuiu satisfatoriamente, mas não completamente os níveis de GSH na glândula digestiva e no músculo do pé de *Helix aspersa* em relação ao grupo controle e aos grupos injetados com salina. Se a S-glutationilação de proteínas for um mecanismo existente em *Helix aspersa*, poderia atuar de modo a manter o balanço redox celular, criando um reservatório de GSH. Esta reserva seria utilizada (desglutationilada) quando os níveis de GSH fossem diminuídos por diversos fatores, como estresse oxidativo ou inibição da síntese de GSH por BSO, impedindo uma grande mudança no estado redox celular. Em mamíferos e em peixe dourado injetados com BSO a diminuição nos níveis de GSH variou de 50 a 90% em diferentes órgãos (Griffith, 1982; Meredith & Reed, 1982; Lushchak & Hermes-Lima, 2005). No peixe dourado *Carassius auratus* a diminuição de GSH no fígado e no cérebro ocorreu entre 72 horas e 120 horas na dose de 1g/kg de BSO (Lushchak & Hermes-Lima, 2005). Em *Helix aspersa* a diminuição aconteceu entre 72 horas e 96 horas na dose de 1g/kg de BSO.

A inibição da atividade da enzima GCL (glutamato cisteína ligase) por BSO além de levar a diminuição dos níveis de GSH intracelular, pode ao mesmo tempo ativar o transporte de GSH citosólica para a mitocôndria, resguardando os níveis de GSH mitocondrial (Mårtensson et al.,1990; Meister, 1995b; Ault & Lawrence, 2003). Danos irreversíveis podem ocorrer quando há o esgotamento de GSH mitocondrial (Ohara & Terasima, 1969). A GSH mitocondrial conserva a integridade da membrana mitocondrial externa agindo conjuntamente com a proteína antiapoptótica BCL-2 (Zimmermann et al., 2007) e ajuda na manutenção do estado reduzido de grupos tióis protéicos localizados na mitocôndria (Fleury et al., 2002). Uma diminuição nos níveis de GSH intracelular tem sido apontada como um evento precoce na sinalização da apoptose, induzida tanto por via extrínseca (ativação de receptores de morte) (Franco & Cidlowski, 2006), como por via intrínseca (sinalização apoptótica mitocondrial) (Hammond et al., 2007), como por exposição a drogas (Di Stefano et al., 2006; Han et al., 2008), como o BSO e por estresse oxidativo (Merad-Boudia et al., 1998; Lu & Armstrong, 2007). Em nosso trabalho a diminuição dos níveis de GSH pode ter sinalizado vias que podem levar a apoptose, porém em fibroblastos de murinos com níveis reduzidos de GSH induzidos por BSO não são levadas a apoptose (Lee et al., 2008). Estas células possuem um mecanismo adaptativo que ativa a via de Nrf2 (fator nuclear-eritróide 2 relacionado com fator 2-p45) ativando um aumento na expressão de enzimas antioxidantes, como as subunidades catalítica

e modulatória da GCL e de GST M3 (Lee et al., 2008). O mecanismo que ativa Nrf2 provavelmente está ligado a uma modificação em um tiol de Keap1, que é uma proteína citoplasmática inibidora de Nrf2, liberando Nrf2 para ir ao núcleo celular (Lee et al., 2008). Muitas das funções da Nrf2 e também de Nrf1 estão relacionadas com a habilidade de modular AP-1 (proteína ativadora) e NF-KB (fator nuclear kappa B) (Lu, 2009). É relatado que a GSH regula também o NF-KB e caspases envolvidas na morte celular via estado redox dos resíduos tióis destas proteínas (Lu, 2009; Garcia-Ruiz & Fernández-Checa, 2007). Em outro trabalho, a indução de Nrf2 e NF-KB por BSO apenas ocorre quando os níveis de GSH estão abaixo de 20% do controle (Chia et al., 2010). Existe uma variação muito grande na ativação de fatores de transcrição ligados a queda de GSH intracelular e a ativação de vias de sobrevivência ou morte programada dependendo do tipo de célula e condições experimentais (Armstrong & Jones, 2002; Fleury et al., 2002; Circu & Aw, 2008; Lee et al., 2008; Lu, 2009; Harvey et al., 2009; Chia et al. 2010).

No presente trabalho não foi observado nos grupos injetados com salina e BSO uma variação de eq-GSH (gráfico 1a, gráfico 1b) ao longo da anóxia e reoxigenação em relação aos grupos normoxia salina e BSO. No trabalho de Ramos-Vasconcelos e colaboradores, 2005, os caramujos *Helix aspersa* (experimentos realizados entre os meses de janeiro e março) em estivação por vinte dias (2664 nmol/ g de tecido) e 24 horas após o despertar (2511 nmol/g de tecido) não sofreram variações de eq-GSH na glândula digestiva; já no músculo do pé, os eq-GSH aumentaram nos animais estivantes (~1500 nmol/g de tecido), nos animais despertos há 5 minutos (~1700 nmol/g de tecido) e 30 minutos (~1800 nmol/g de tecido) em relação aos animais despertos há 24 horas (~900 nmol/g de tecido). No gastrópode *Otala lactea* tanto na estivação quanto no grupo 24 horas após o despertar não ocorreram mudanças na quantidade de eq-GSH na glândula digestiva e no músculo do pé (Hermes-Lima & Storey, 1995). Também não houve mudanças na quantidade de GSH durante a estivação, despertar e 24 horas depois do despertar (~2500 nmol/g de tecido) em *Helix pomatia* (Nowakowska et al., 2009b). Nos caramujos *Helix aspersa* injetados com ATZ (inibidor de catalase) ou injetados com solução salina e postos em anoxia por cinco horas e depois reoxigenados (Welker, 2009) também não foram encontradas variações na quantidade de eq-GSH, os níveis de GSH na glândula digestiva e no músculo de pé em normoxia salina foram de aproximadamente 2000 nmol/g de tecido e 800 nmol/g de tecido. No caramujo marinho *Littorina littorea* em anoxia por seis dias ocorre um aumento da quantidade de eq-GSH em sua glândula digestiva (909 nmol/g de tecido) e no músculo do pé (352 nmol/g de tecido) em relação aos respectivos grupos controle (320 nmol/g de tecido; 214 nmol/g de tecido), e também há um aumento de

eq-GSH na glândula digestiva e no músculo do pé durante a reoxigenação em 12 horas (676 nmol/g de tecido; 389 nmol/g de tecido) e 24 horas (1133 nmol/ g de tecido; 571 nmol/g de tecido) em relação aos grupos controle (Pannunzio & Storey, 1998).

Comparando as quantidades de eq-GSH em *Helix aspersa* desperto por 24 horas (janeiro-março, Ramos-Vasconcelos et al., 2005), em *Helix aspersa* em normoxia salina (experimentos realizados em novembro e dezembro, Welker, 2009) e nossos resultados de eq-GSH nos animais em normoxia salina, percebe-se uma homogeneidade na quantidade de eq-GSH na glândula digestiva e no músculo do pé.

Um fator que poderia estar modulando o sistema de defesa antioxidante é o tempo da condição estressante. As concentrações de eq-GSH nos animais injetados com BSO e salina parecem ser suficientes para defender o organismo no período de estresse anóxico (cinco horas) e durante a reoxigenação. Muito diferente do tempo de estivação (20 dias) sofrido por esta mesma espécie, e mesmo assim a resposta ao estresse, com o aumento de eq-GSH, só ocorre no músculo do pé durante a estivação e despertar da estivação.

A menor quantidade de GSSG no grupo normoxia BSO na glândula digestiva (gráfico 2a) em relação ao grupo controle e grupo normoxia salina provavelmente reflete a queda geral da quantidade de GSH no órgão, menos eq-GSH, menos GSSG. Porém ocorre um aumento da atividade da GR neste mesmo grupo em relação ao controle (gráfico 9a) e este aumento de atividade pode estar influenciando nos níveis de GSSG, já que esta enzima reduz GSSG a GSH. No músculo do pé (gráfico 2b) a quantidade de GSSG seguiu o padrão da glândula digestiva, em relação ao grupo normoxia BSO (21,6 nmol/g) e os grupos normoxia salina (59,45 nmol/g) e anoxia BSO (42,33 nmol/g) e a atividade da GR permaneceu constante nos grupos normoxia e controle (gráfico 9b). A diminuição dos níveis de GSSG pela ativação da GR via Nrf2-ARE (elemento responsivo antioxidante) é um fator determinante na sobrevivência de fibroblastos de embrião de camundongo durante o estresse oxidativo, inibindo a apoptose (Harvey et al., 2009). Em nosso estudo, o aumento da atividade da GR no grupo em normoxia com níveis baixos de GSH na glândula digestiva juntamente com a diminuição dos níveis de GSSG, pode estar baseado no mesmo mecanismo descrito por Harvey e colaboradores (2009), permitindo a inibição de vias relacionadas a apoptose.

O aumento da quantidade de GSSG no grupo anoxia BSO em relação ao grupo normoxia BSO na glândula digestiva e no músculo do pé pode ser uma consequência do pequeno período (30 minutos) de hipóxia que os animais sofreram antes de entrarem no período de anoxia. Durante a hipóxia muitos estudos relatam a ocorrência de um aumento na produção de ROS (Duranteau et al., 1998; Chandel et al., 1998; Wood et al., 1999; Killilea et

al., 2000; Liu et al., 2001) acompanhados de danos em DNA e aumento de proteínas carboniladas, entre outros danos oxidativos (Grishko et al., 2001; Dirmeier et al., 2002). Nos grupos injetados com BSO em anoxia e reoxigenação a quantidade de GSSG estava no mesmo patamar dos grupos injetados com salina na glândula digestiva, mostrando que realmente houve um aumento de oxidação, já que a quantidade de eq-GSH é menor nos grupos BSO. No músculo do pé, os grupos anoxia, reoxigenação 15 minutos e 1 hora injetados com BSO não aumentaram a quantidade de GSSG para os patamares dos seus respectivos grupos injetados com salina, mantendo os níveis de GSSG baixo; porém os grupos reoxigenação 30 minutos e 2 horas BSO alcançaram concentrações parecidas de GSSG em relação aos seus grupos injetados com salina, evidenciando um aumento de oxidação em alguns pontos da reoxigenação. Harvey e colaboradores (2009) demonstraram que apenas a elevação intracelular de GSSG pode induzir apoptose. Alterações induzidas por oxidantes na razão GSSG/GSH em favor da GSSG poderiam desencadear apoptose independente dos níveis de GSH e ROS (Pias & Aw, 2002a; Pias & Aw, 2002b). O acúmulo de GSSG pode regular o potencial de membrana mitocondrial, que por sua vez regula a liberação de citocromo c, iniciando a cascata de sinalização apoptótica (Filomeni et al., 2003). Em outro estudo quantidades de GSSG em níveis fisiológicos mediam a S-glutationilação da caspase-3 inibindo sua atividade em células HL60 (Huang et al., 2008), ligando a S-glutationilação e o estado redox de GSH a vias de sinalização apoptótica (Circu & Aw, 2010).

O aumento do índice de oxidação GSSG/eq-GSH na glândula digestiva (gráfico 3a) no grupo anoxia BSO em relação aos grupos controle, normoxia BSO e anoxia salina revela um possível estresse oxidativo, provocado pela combinação hipóxia/anóxia e diminuição da quantidade de GSH e aumento da GSSG. E sabe-se que uma das consequências do desbalanço na razão GSH/GSSG é a indução da apoptose celular (Circu & Aw, 2010). Em 15 minutos de reoxigenação no grupo BSO, a glândula digestiva continuava com o índice de oxidação mais alto que no grupo salina. E em 1 hora e 2 horas de reoxigenação nos grupos BSO houve um aumento de três vezes (tendência estatística) no índice de oxidação GSSG/eq-GSH, mostrando em geral um ambiente mais oxidado na glândula digestiva com quantidade de GSH diminuída durante a anoxia e a reoxigenação. O índice de oxidação GSSG/eq-GSH no músculo do pé (gráfico 3b) seguiu a mesma tendência da glândula digestiva, um aumento de GSSG/ eq-GSH no grupo anoxia BSO em relação aos grupos controle, anoxia salina e normoxia BSO. Porém nos grupos em reoxigenação BSO houve um aumento do índice de oxidação em apenas 1 hora em relação ao seu grupo salina, mostrando que o músculo do pé com níveis menores de GSH foi menos afetado pela oxidação que a glândula digestiva. Este

resultado indica que a manutenção do estado redox é regulada de forma diferenciada na glândula digestiva e no músculo do pé em *Helix aspersa*.

A concentração de proteínas carboniladas na glândula digestiva (gráfico 4a) e no músculo do pé (gráfico 4b) de *Helix aspersa* não sofreram alterações significativas em todos os grupos. Assim como os níveis de TBARS na glândula digestiva (gráfico 5a) e no músculo do pé (gráfico 5b). Demonstra-se assim, que o sistema de defesa antioxidante do caramujo é altamente eficiente, pois mesmo com a diminuição da disponibilidade de GSH durante todo o processo de anoxia e reoxigenação, a quantidade remanescente conseguiu manter o balanço redox e inibir um possível estresse oxidativo causado pela hipóxia/anoxia e reoxigenação. Em comparação com os resultados encontrados por Welker, 2009 em *Helix aspersa*, nossos animais apresentaram uma quantidade duas vezes menor de TBARS na glândula digestiva, mas parecidos no músculo do pé; e quantidades parecidas de proteínas carboniladas nos dois órgãos.

No trabalho de Welker, 2009 os grupos em reoxigenação 1 hora e 12 horas com a atividade inibida de catalase mostraram um aumento de proteínas carboniladas na glândula digestiva em relação ao grupo normoxia com a atividade da catalase inibida, porém este aumento foi muito pequeno. Já os níveis de TBARS não foram afetados no mesmo estudo. Em *Otala lactea* (Hermes-Lima & Storey, 1995) houve um aumento de TBARS na glândula digestiva durante o despertar (20 minutos) da estivação em relação ao grupo estivante. Em *Helix aspersa* em estivação e despertando da estivação, tanto as proteínas carboniladas quanto os TBARS não variaram significativamente (Ramos-Vasconcelos et al., 2005). Já no caramujo *Helix pomatia*, um aumento gradativo e significativo durante a hibernação ocorreu nos níveis de TBARS no músculo do pé, enquanto os níveis de TBARS na glândula digestiva ficaram inalterados (Nowakowska et al., 2009a). E nesta mesma espécie (*Helix pomatia*), porém durante a estivação, houve uma diminuição dos níveis de TBARS em relação ao grupo controle na glândula digestiva, e no músculo do pé os níveis de TBARS se mantiveram inalterados (Nowakowska et al., 2009b).

A atividade da catalase se manteve constante durante a anoxia e reoxigenação na glândula digestiva dentro do grupo salina e dentro do grupo BSO (gráfico 6a) e no músculo do pé dos animais injetados com salina (gráfico 6b). Em *Otala lactea* não houve variações na atividade da catalase na glândula digestiva de animais estivantes em relação aos despertos por 24 horas (Hermes-Lima & Storey, 1995). E em *Helix aspersa* estivante e ativo por 24 horas não ocorreram mudanças na atividade da catalase no músculo do pé, mas há uma redução da atividade da catalase na glândula digestiva dos animais estivantes (Ramos-Vasconcelos et al.,

2005). Nos experimentos de Welker (2009) não aconteceram variações nas atividades de catalase nos animais injetados com salina e colocados em anoxia e reoxigenação, a atividade da catalase nos diferentes grupos (Welker, 2009) também foram parecidas com nossos resultados de atividade de catalase. Em *Helix pomatia* há um aumento gradativo da atividade da catalase na glândula digestiva durante o processo de hibernação (Nowakowska et al., 2009a). Neste mesmo animal, porém em estivação, há uma diminuição na atividade da catalase em relação ao grupo controle e recém–acordados (Nowakowska et al., 2009b). No caramujo africano gigante, *Achatina fulica* a estivação e o despertar não influenciaram na atividade da catalase na glândula digestiva (Salway et al., 2010). Estes resultados podem indicar que não há um padrão de resposta da catalase na glândula digestiva durante um estresse relacionado a disponibilidade de oxigênio e hipometabolismo.

Já no músculo do pé injetado com BSO (gráfico 6b), houve um aumento da atividade da catalase em 2 horas de reoxigenação em relação a 30 minutos de reoxigenação. De maneira diferente, em *Otala lactea* o aumento da atividade da catalase no músculo do pé se deu durante a estivação em relação aos animais despertos por 24 horas (Hermes-Lima & Storey, 1995). E em *Achatina fulica* o aumento da atividade da catalase no músculo do pé se dá depois de 4 horas do despertar em relação ao grupo controle e ao grupo 24 horas acordados (Salway et al., 2010).

Comparando os grupos BSO e salina em 30 minutos de reoxigenação na glândula digestiva e no músculo do pé de *Helix aspersa,* percebe-se uma redução da atividade da catalase nos grupos BSO. No gastrópode marinho *Littorina littorea* a atividade da catalase na glândula digestiva diminui durante a anoxia e reoxigenação em relação ao controle (Pannunzio & Storey, 1998). No gastrópode de água-doce *Biomphalaria tenagophila* a atividade de catalase também diminui na glândula digestiva durante a anoxia e reoxigenação em relação ao grupo controle (Ferreira et al., 2003). Talvez a diminuição da atividade da catalase em *Helix aspersa* durante a reoxigenação em um ambiente com menor disponibilidade de GSH indique um pequeno comprometimento da função desta enzima, logo recuperada em 1 hora de reoxigenação.

Nas correlações feitas usando o coeficiente de Pearson, nota-se que, quanto mais GSSG (gráfico 15) e TBARS (gráfico 17) na glândula digestiva dos animais em 30 minutos de reoxigenação com redução de GSH, menor era a atividade da catalase (Pearson r = -0,9019 e -0,9592). No músculo do pé, quanto mais GSSG (gráfico 16), menor a atividade da catalase em 30 minutos de reoxigenação em animais com redução de GSH (Pearson r = - 0,9974). Neste mesmo grupo (gráfico 13, gráfico 18), quanto maior o índice de oxidação (GSSG/eq

GSH) e maior a quantidade de proteínas carboniladas, maior a quantidade de TBARS (Pearson r = 0,9641 e 0,9509). Estas correlações indicam provavelmente a ocorrência de estresse oxidativo em 30 minutos de reoxigenação com menores concentrações de GSH, com o comprometimento da atividade da catalase. No músculo do pé em 2 horas de reoxigenação com redução de GSH, observamos as seguintes correlações: um aumento de GSSG/eq-GSH (gráfico 14) e uma diminuição de eq-GSH (Pearson r = -0,8190) e um aumento de proteínas carboniladas (gráfico 19) em correlação com o aumento de TBARS (Pearson r = 0,7695), mas não obtivemos correlações com a atividade da catalase. O aumento da atividade da catalase em 2 horas de reoxigenação em relação a 30 minutos de reoxigenação em um ambiente com presença reduzida de GSH, pode indicar uma resposta às correlações que indicam um aumento de possíveis danos oxidativos.

A atividade da GST se manteve constante durante a anoxia e reoxigenação na glândula digestiva (gráfico 7a) e no músculo do pé (gráfico 7b) dentro dos grupos salina e dentro dos grupos BSO. Em *Helix aspersa*, estivante e despertando da estivação (Ramos-Vasconcelos et al., 2005), ou em anoxia e reoxigenação (Welker , 2009) não ocorreram variações na atividade da GST na glândula digestiva e no músculo do pé. Em *Helix pomatia* ocorre um aumento na atividade da GST na glândula digestiva no meio do processo de hibernação em relação ao começo da hibernação (Nowakowska et al., 2009a). Na estivação de *Helix pomatia* ocorre um aumento da GST em relação ao grupo recém-acordado (Nowakowska et al., 2009b).

Do mesmo modo que a atividade da catalase diminuiu na glândula digestiva do grupo 30 minutos de reoxigenação BSO, a atividade da GST do grupo 30 minutos de reoxigenação BSO diminuiu em relação ao seu grupo salina. Em *Biomphalaria tenagophila* a atividade da GST diminui na glândula digestiva durante a reoxigenação em relação ao grupo controle e grupo anoxia (Ferreira et al., 2003). Já em *Littorina littorea* a atividade da GST aumentou em 12 horas de reoxigenação em relação ao grupo controle e ao grupo anoxia (Pannunzio & Storey, 1998). Já a atividade de GST no músculo do pé aumentou em 1 hora de reoxigenação BSO em relação ao grupo salina.

Não foram encontradas correlações entre GST e os outros parâmetros testados nos grupos 30 minutos e 1 hora de reoxigenação BSO, respectivamente na glândula digestiva e no músculo do pé. Entretanto, a diminuição da atividade da GST, junto com a diminuição da catalase e sua correlação negativa com GSSG e TBARS sugere a ocorrência de um estresse oxidativo, memso que pequeno na glândula digestiva durante a reoxigenação.

A atividade de Se-GPx no grupo 1 hora de reoxigenação salina na glândula digestiva

(gráfico 8a) foi maior em relação a todos ($p < 0,05$) os grupos salina e em relação a quase todos os grupos BSO, com exceção do seu respectivo grupo 1 hora de reoxigenação. Já no músculo do pé não ocorreram alterações nesta enzima (gráfico 8b). Em *Otala lactea* a atividade da Se-GPx na glândula digestiva (23 mU/mg de ptn) estava alta durante a estivação em relação aos animais acordados por 24 horas (10,6 mU/mg ptn); no músculo do pé (4,4 - 4,9 um/mg ptn) não houve alterações (Hermes-Lima & Storey, 1995). Em *Littorina littorea* a atividade da Se-GPx aumentou significativamente em 12 horas de reoxigenação (25,2 mU/mg ptn) e permaneceu alta em 24 horas de reoxigenação (24,5 mU/mg ptn) em relação aos grupos controle (13,6 mU/mg ptn) e anoxia (19,8 mU/mg ptn) na glândula digestiva (Pannunzio & Storey, 1998). Na glândula digestiva de *Biomphalaria tenagophila* a atividade da Se-GPx aumentou em anoxia (13,7 mU/mg ptn) em relação ao controle (9,8 mU/mg ptn) e 24 horas de reoxigenação(6,7 mU/mg ptn) (Ferreira et al., 2003). Já em *Achatina fulica* o aumento da atividade da Se-GPx na glândula digestiva se deu em 4 horas de despertar em relação ao grupo controle e grupo estivante, e no músculo do pé houve um aumento da atividade enzimática em 24 horas de reoxigenação em comparação com o grupo controle e estivação (Salway et al., 2010). Em muitos estudos a resposta da Se-GPx tem sido considerada importante para impedir estresse oxidativo relacionado com estados de depressão metabólica e posterior recuperação do metabolismo basal (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002). Mas não há uma homogeneidade temporal em relação à resposta, se esta ocorre durante o estado deprimido metabolicamente ou durante a recuperação do metabolismo normal.

No trabalho de Ramos-Vasconcelos e colaboradores (2005) a atividade da Se-GPx aumentou em *Helix aspersa* estivante (161 mU/mg ptn) em relação ao animais 24 horas acordados (43,8 mU/mg ptn), no músculo do pé não ocorreram mudanças. No trabalho de Welker (2009) foi mostrado um aumento na Se-GPx durante a anoxia salina na glândula digestiva (~14 mU/mg ptn) e no músculo do pé (~6 mU/mg ptn) em relação aos seus respectivos controles (6 mU/mg ptn e 3 mU/mg ptn). Nota-se que no fim da primavera (Welker, 2009) a atividade de Se-GPx na glândula digestiva de *Helix aspersa* ainda não está tão alta como encontrado no verão (Ramos-Vasconcelos et al., 2005) e neste trabalho (verão e começo de outono). Os resultados deste trabalho juntamente com os resultados de Welker (2009) reforçam os indícios que a sazonalidade modula a atividade de Se-GPx em *Helix aspersa* (Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima, 2003; Ramos Vasconcelos et al., 2005).

No presente estudo, o aumento da atividade da Se-GPx durante a anoxia (salina e BSO) em relação à normoxia (salina e BSO) provavelmente não foi necessário para lidar com o desiquilíbrio redox e/ou geração de ROS, como ocorrido no trabalho de Welker (2009).

Porque possivelmente os animais já apresentavam na glândula digestiva em normoxia (salina e BSO) uma atividade alta de Se-GPx (~40-45 mU/ mg ptn) em comparação aos animais em normoxia e anoxia salina do trabalho de Welker, 2009. Somente depois, durante a reoxigenação (1 hora) houve um aumento da atividade da Se-GPx de forma significativa no grupo salina. E mesmo não existindo diferenças estatísticas no grupo 1 hora reoxigenação BSO em relação aos outros grupos BSO, o aumento da atividade da Se-GPx foi de aproximadamente 1,5 vezes. A falta de diferença estatística entre os grupos 1 hora de reoxigenação salina (146, 1 mU/ mg ptn) e BSO (70, 7 mU/mg ptn) mostra uma tentativa de aumento da atividade da enzima do grupo BSO para os patamares do grupo salina. Mas provavelmente o ambiente mais oxidado, com menos GSH, poderia estar sinalizando de forma direta ou indireta uma menor expressão gênica da enzima Se-GPx ou sinalizando uma maior degradação de RNA mensageiro de Se-GPx. Há uma correlação positiva entre GSSG/eq-GSH (gráfico 11, gráfico 12) com TBARS (Pearson r = 0,9942) e GSSG (0,9678) em 1 hora de reoxigenação BSO. E também uma correlação positiva entre Se-GPx (gráfico 20) e proteínas carboniladas em 2 horas de reoxigenação (salina e BSO), mostrando provavelmente uma produção de ROS ainda indutora de danos oxidativos, sendo contrabalanceada pela atividade de Se-GPx.

No grupo normoxia BSO da glândula digestiva, a atividade da GR (gráfico 9a) estava maior que no grupo controle e a quantidade de GSSG (gráfico 2a) estava menor no grupo normoxia BSO que no grupo controle, indicando uma possível relação, aumento da GR, diminuição da GSSG. Em 15 minutos e 30 minutos de reoxigenação BSO ocorreu uma diminuição da atividade de GR em relação ao grupo normoxia BSO, provavelmente por isso as quantidades de GSSG destes grupos estavam iguais aos seus grupos reoxigenação salina, mesmo com os níveis de eq-GSH reduzidos. Esta condição refletiu no índice de oxidação (gráfico 3a) que estava mais alto nos 15 minutos de reoxigenação BSO e pode ter levado a diminuição da atividade da catalase e GST em 30 minutos de reoxigenação BSO e a falha de um aumento completo da Se-GPx em 1 h de reoxigenação.

No músculo do pé a GR (gráfico 9b) aumentou sua atividade em 15 minutos de reoxigenação BSO em comparação com o seu grupo temporal salina. Isso ocasionou uma resposta de redução de GSSG neste mesmo ponto e fez com que o índice de oxidação permanecesse no mesmo nível de seu grupo salina.

Em *Otala lactea* em estivação por 30 dias e acordado por 24 horas não ocorreram modificações na atividade da GR (Hermes-Lima & Storey, 1995). Já em *Littorina littorea* ocorreu um a diminuição da atividade da GR em anoxia em relação ao grupo controle e 12

horas em reoxigenação na glândula digestiva; no músculo do pé houve um aumento da atividade da GR em 24 horas de reoxigenação em relação ao grupo controle (Pannunzio & Storey, 1998). Em *Biomphalaria tenagophila* não ocorreram respostas na atividade da GR em anoxia e reoxigenação (Ferreira et al., 2003). Em *Helix aspersa* estivante também não houve resposta da GR (Ramos-Vasconcelos et al., 2005). Já no trabalho de Welker, 2009, ocorreu uma diminuição da atividade da GR no músculo do pé em 1 hora de reoxigenação salina em relação a 15 minutos de reoxigenação salina.

Neste trabalho, a atividade da G6PDH (gráficos 10a e 10b) não mostrou variações importantes em *Helix aspersa* em anoxia e reoxigenação. No músculo do pé ocorreu uma diminuição de atividade de G6PDH no grupo anoxia salina em relação ao grupo normoxia salina apenas. A diminuição de NADPH disponível para que a GR reduza a GSSG coopera para sustentar o estado oxidado celular, potencializando as vias apoptóticas (Pandolfi et al., 1995; Circu & Aw, 2010).

A diminuição da concentração da GSH via inibição da GCL por BSO foi satisfatória, mas não foi total. As concentrações de GSH restantes nos órgãos foram suficientes para impedir danos oxidativos importantes em *Helix aspersa* durante a anoxia e reoxigenação. A quantidade de eq-GSH encontrada nos animais injetados com BSO é parecida com a quantidade de GSH encontrada em *Littorina littorea*, que é tolerante a anoxia por dias e não apresenta danos oxidativos expressivos (Pannunzio & Storey, 1998). Talvez o processo de glutationilação de proteínas seja um mecanismo importante em *Helix aspersa*, uma forma de armazenamento de GSH, impedindo que haja uma baixa realmente comprometedora para as funções da célula. A baixa de GSH nos animais injetados com BSO pode ter ativado o mecanismo de desglutationilação, impedindo por fim uma redução drástica de GSH intracelular. A queda nas concentrações de GSH e o aumento das concentrações de GSSG, juntamente com o aumento da razão GSSG/eq-GSH em muitos tipos celulares iniciam a cascata de sinalização que leva a apoptose ou necrose (Lu, 2009; Garcia-Ruiz & Fernández-Checa, 2007; Circu & Aw, 2010). Mas existem tipos de células que ativam vias que aumentam a expressão e atividade de enzimas antioxidantes (incluindo a GCL) e levam a célula a inibir a geração exagerada de ROS e impedir a iniciação de vias que sinalizam a morte programada (Lee et al., 2008; Chia et al., 2010).

Por meio dos nossos resultados vimos que a GSH é um fator importante na manutenção do balanço redox do organismo e este balanço redox é regulado de forma diferencial em glândula digestiva e musculo do pé. A GSH possivelmente impede a produção exagerada de ROS, que pode levar a danos oxidativos em *Helix aspersa* durante um ciclo de

anóxia e reoxigenação e também poderia favorecer a ativação de vias de sinalização de morte celular programada.

Capítulo 2. Respiração e produção de ROS mitocondrial na glândula digestiva de *Helix aspersa* em estivação.

Abstract

The mitochondria is responsible for the most part of ATP synthesis, which occurs concomitantly with the generation of ROS during the function of the electron transport chain. Currently, low levels of ROS are considered necessary for normal function of the cell. The isolated mitochondria from *Helix aspersa* aestivating and control were rotenone-insensitive and antimycin A-sensitive. Respiratory control and oxygen consumption rates in different respiratory states showed that a great part of the respiration is uncoupled from ATP generation in isolated mitochondria from *Helix aspersa*. There was also a minor release of peroxide in the uncoupled respiratory state in aestivating and control animals. This frail coupling may be a strategy to inhibit the formation of ROS. We observed an increased release of peroxide in aestivating animals in the respiratory state 3 compared to controls. This increase may suggest the occurrence of increased mitochondrial ROS generation during estivation.

Resumo

A mitocôndria é responsável pela síntese da maior parte de ATP nos organismos, que ocorre juntamente com a geração de ROS durante o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons. Atualmente, níveis baixos de ROS são considerados necessários para o funcionamento normal da célula. As mitocôndrias isoladas de *Helix aspersa* estivante e controle foram insensíveis a rotenona e sensíveis a antimicina A. O controle respiratório e as taxas de consumo de oxigênio em diferentes estados respiratórios demonstraram que em mitocôndrias isoladas de *Helix aspersa* grande parte da respiração está desacoplada da geração de ATP. Ocorreu também uma menor liberação de peróxido nos estados respiratórios desacoplados em animais estivantes e controles. Este fraco acoplamento pode ser uma estratégia para inibir a formação de ROS. Foi observado um aumento na liberação de peróxido no estado respiratório 3 dos animais estivantes em relação aos animais controles. Este aumento pode sugerir a ocorrência de uma maior geração de ROS mitocondrial durante a estivação.

2.1 Introdução

O papel principal dado à mitocôndria é a síntese de ATP por meio do acoplamento do transporte de elétrons à fosforilação oxidativa (Mitchell & Moyle, 1965). A cadeia transportadora de elétrons é formada por quatro complexos (com muitas subunidades) ligados à membrana mitocondrial interna, e por dois carreadores de elétrons, coenzima Q e citocromo c; o aceptor final dos elétrons é o oxigênio, reduzido a H_2O (Campbell, 2000). Os complexos I, III e IV bombeiam prótons para o espaço intermembranoso, criando um gradiente de pH entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranoso. Por meio da ATP sintase ocorre o fluxo de prótons de volta a matriz mitocondrial e ao mesmo tempo a fosforilação do ADP (Campbell, 2000).

Outros papéis da mitocôndria além da produção de ATP são: a produção de calor no tecido adiposo marrom, por meio da redução da síntese de ATP e potencial de membrana e aumento da taxa respiratória (Smith, et al., 1966; Nicholls, 1976; Kowaltowski, 2000); a manutenção da homeostase de cálcio intracelular, indiretamente pela produção de ATP e diretamente pela capacidade de acúmulo de cálcio intra-mitocondrial; a ativação da morte celular, tanto por necrose como por apoptose (Friberg et al., 1998; Green & Reed, 1998; Kowaltowski, 2000); e a geração de ROS, pela redução incompleta do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons gerando ânion superóxido (Boveris et al., 1972; Fridovich, 2004).

Cerca de 0,1% a 2% da respiração normal celular *in vitro* resulta em formação de ânion superóxido (Fridovich, 2004; Murphy, 2009; Hamanaka & Chandel, 2010). Muitos estudos apontam para um aumento na produção de ROS (Duranteau et al., 1998; Chandel et al., 1998; Wood et al., 1999; Killilea et al., 2000) durante a hipóxia. Em células de mamíferos foi demonstrado que há formação de lesões no DNA durante a hipóxia (Grishko et al., 2001). Usando ressonância paramagnética eletrônica em artérias pulmonares de porco em hipóxia foi mostrada a formação de radicais hidroxil e alquil (Liu et al., 2001). E que o aumento de proteínas carboniladas durante a hipóxia foi ligada a formação de ROS na cadeia respiratória mitocondrial (Dirmeier et al., 2002). Porém outros estudos demonstraram uma diminuição de ROS durante a hipóxia (Fandrey et al., 1994; Vaux et al., 2001; Michelakis et al., 2002).

Hamanaka e Chandel (2010) propuseram que níveis baixos de ROS na mitocôndria são necessários ao funcionamento normal da célula e também durante episódios de estresse celular, desde que não leve a ativação de morte celular. O H_2O_2 foi apontado como a molécula sinalizadora necessária para a estabilização da proteína HIF-1α (Sanjuan-Pla et al., 2005). A

proteína HIF-1α estabilizada é indispensável para a ativação do fator de transcrição HIF, que acopla a diminuição de oxigênio com o aumento de transcrição de diversos genes (Bell et al., 2005).

O gastrópode terrestre *Helix aspersa* quando entra em estivação deprime seu metabolismo (animal inteiro) em 84% em relação a animais ativos (Pedler et al., 1996), o pH da hemolinfa diminui de 7,8 para 7,3 e pressão parcial de O_2 cai de 64 a 44 torr. Em células isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* estivante também ocorre depressão metabólica de 70 % (Guppy et al., 2000). Segundo Bishop & Brand (2000) o consumo de oxigênio não mitocondrial é o responsável pela oxiconformação nas células de glândula digestiva de *Helix aspersa* em estivação; já a respiração mitocondrial permanece constante mesmo com a mudança da pressão parcial de O_2, aumentando a eficiência metabólica durante a estivação. O objetivo deste trabalho foi examinar a liberação de ROS em mitocôndrias isoladas de *Helix aspersa* em estivação e em atividade normal.

2.2 Materiais e métodos

Os gastrópodes utilizados foram da espécie *Helix aspersa maxima* (Müller, 1774), comprados de um criador do estado de São Paulo (www.escargots.com.br) pesando 15 g aproximadamente. No laboratório os animais foram mantidos em caixas plásticas, a ração (tabela 3) e a água estavam disponíveis diariamente no período de aclimatação de 1 semana. O fotoperíodo era natural assim como a temperatura, os experimentos foram realizados entre os dias 21 de outubro e 20 de novembro em São Paulo.

Os animais selecionados para entrar em estivação (n=24) eram postos em caixas separadas sem ração e água, e a partir da formação do epifragma nos animais foi contado 20 dias de estivação. Depois dos 20 dias, os animais foram mortos por decapitação e suas mitocôndrias da glândula digestiva foram isoladas. Já os animais controles (n=18) receberam água e ração por 16 dias e após quatro dias em jejum foram mortos por decapitação e suas mitocôndrias da glândula digestiva foram isoladas.

As soluções utilizadas foram: 1M de succinato (pH = 7,2), 1 M de piruvato (pH = 7,2), 200 mM de ADP (pH = 7) e peroxidase de raiz forte (HRP, 200 U/ml) feitas em água deionizada. Já as soluções de 2mM de rotenona , 1mg/ml de antimicina A, 1 mg/ml de oligomicina, 2 mM de carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) e 20 mM de Amplex Red foram feitas com dimetilsulfoxido (DMSO).

O isolamento das mitocôndrias da glândula digestiva de *Helix aspersa* estivante ou controle foi feito sempre em baixa temperatura da seguinte forma:

De 2 a 3 animais eram decapitados e suas glândulas digestivas eram extraídas, lavadas e picadas em 75 mM de sacarose, 225 mM de manitol, 5 mM de HEPES, 1 mM de EGTA e 1 mg/ml de albumina bovina (BSA) em pH = 7,4 a 4 º C, este tampão geralmente é usado em isolamento de mitocôndrias cerebrais (Tahara et al., 2009) mas nossos testes indicaram este tampão como o mais adequado para isolar mitocôndrias de glândula digestiva de *Helix aspersa*. O preparado foi transferido para um potter de 15 mL e homogeneizado. O homogeneizado foi centrifugado a 1050g por 3 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e centrifugado a 11600g por 10 min. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o pellet resultante foi ressuspendido no mesmo tampão de isolamento e guardado em gelo. A quantidade de proteína foi medida pelo método de Bradford, 1976.

Com a suspensão de mitocôndrias foi medido o consumo de oxigênio e liberação de H_2O_2 (Tahara et al., 2009) usando o seguinte tampão: 250 mM de sacarose, 10 mM de HEPES, 2 mM de Na_2HPO_4, 2 mM de $MgCl_2$ e 0,01% em pH 7,2.

O consumo de oxigênio foi medido usando um eletrodo tipo Clark acoplado a um computador, em um volume final de 1 ml a 23ºC. No primeiro experimento foram testadas as respostas dos substratos ligados aos complexos mitocondriais I e II e os inibidores do complexo I e III. Nele foi usado aproximadamente 0,5 mg/ml de proteína e os reagentes foram adicionados na seguinte ordem: tampão, suspensão de mitocôndrias, 1 µl de piruvato, 1 µl de rotenona, 2 µl de succinato, 1 µl de antimicina. No segundo experimento o objetivo era medir o consumo de oxigênio nos estados respiratórios 3, 4 e desacoplado da mitocôndria e calcular o controle respiratório. Foi usado aproximadamente 0,5 mg/ml de proteína e os seguintes reagentes foram adicionados nesta ordem: tampão, 2 µl de succinato, 4 µl de ADP, suspensão de mitocôndrias, 1 µl de oligomicina e 0,5 µl de CCCP. Segundo Chance e Baltscheffsky (1958) o controle respiratório é definido como a razão entre o consumo de oxigênio na presença de excesso de substrato e ADP (estado 3) e o consumo de oxigênio depois que o ADP estiver sendo fosforilado em uma concentração estacionária (estado 4). Já para Pörtner e colaboradores (1999), o controle respiratório é calculado dividindo o estado 3 pelo estado 4+, que é caracterizado pela presença de oligomicina, inibindo a fosforilação do ADP. Calculamos o controle respiratório tal qual Pörtner et al., 1999.

A liberação de H_2O_2 pela mitocôndria foi medida utilizando um espectrofotômetro com fluorescência (563 nm de excitação/ 586 de emissão). O método se baseia na oxidação de Amplex Red na presença de HRP ligada a H_2O_2, gerando resorufina, que é detectada pelo

aparelho (Tahara et al., 2009). A calibração foi feita com H_2O_2, Amplex Red, HRP e tampão. Foi usado aproximadamente 0,125 mg/ml de proteína e os reagentes foram adicionados na seguinte ordem no volume final de 2 ml: tampão, 5 µl de Amplex Red, 10 µl de HRP, 4 µl de succinato, 8 µl de ADP, suspensão de mitocôndrias, 2 µl de oligomicina e 1 µl de CCP.

Os dados foram testados quanto a sua normalidade e homocedasticidade, usando os testes de Shapiro-Wilks e Levene respectivamente (Zar, 1984). Após, foram feitos o teste de ANOVA ou teste t (não pareado, duas caudas), comparando-se as médias dos grupos amostrados. Se obtido um valor de p significativo, o teste de Tukey foi aplicado após o teste de ANOVA. Foi utilizado um nível de significância de 5% em todas as análises. Os resultados nos gráficos estão exibidos como média ± erro padrão médio.

2.3 Resultados

Nas mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* em estivação ou em estado metabólico normal (controle) no estado respiratório 2 (sem ADP) não houve diferença no consumo de oxigênio usando piruvato (produtor de NADH, doador de elétrons para o complexo I) ou succinato (doador de elétrons para o complexo II) como substratos para a respiração mitocondrial (gráfico 21). Porém, as mitocôndrias de *Helix aspersa* se mostraram insensíveis ao inibidor do complexo I, rotenona e sensíveis ao inibidor do complexo III, antimicina A, tanto nos animais estivantes como nos animais controles (gráfico 21).

O próximo passo foi verificar o consumo de oxigênio nos estados respiratórios 3, 4^+ e desacoplado (gráfico 22). O substrato utilizado foi o succinato na concentração final de 2mM. O estado 3 nos animais controles apresentou taxa de consumo médio de 27,3 nmols de O_2 por minuto e por miligrama de proteína, o estado 4^+ apresentou taxa de consumo médio de 20,1 nmols de O_2 por minuto e por miligrama de proteína e o estado desacoplado apresentou taxa de consumo médio de 16,4 nmols de O_2 por minuto e por miligrama de proteína, sendo significativamente ($p < 0,05$) diferente do estado 3. O estado 3 é caracterizado por ter concentrações saturantes de ADP. O estado respiratório 4^+ reflete a taxa de escape de prótons (Brand et al., 1994) e subtraindo o consumo de O_2 no estado 3 pelo consumo de O_2 no estado 4^+ tem-se a respiração acoplada a formação de ATP (Abele et al., 2002), que é em média 7,13 nmols de O_2 por minuto e por miligrama de proteína. Já no estado desacoplado o potencial de membrana foi anulado por CCCP e os prótons passam livremente pela membrana mitocondrial interna, não ocorrendo formação de ATP.

No estado 3 nos animais estivantes a taxa de consumo médio foi de 24,04 nmols de O_2 por minuto e por miligrama de proteína, o estado 4^+ apresentou taxa de consumo médio de 17,8 nmols de O_2 por minuto e por miligrama de proteína e o estado desacoplado apresentou taxa de consumo médio de 15,48 nmols de O_2 por minuto e por miligrama de proteína. O estados 4^+ e o estado desacoplado das mitocôndrias nos animais estivantes consumiram significativamente ($p < 0,05$) menos oxigênio que o estado 3 das mitocôndrias nos animais estivantes. A respiração acoplada à formação de ATP nos animais estivantes foi em média 6,24 nmols de O_2 por minuto e por miligrama de proteína.

O controle respiratório indica que as mitocôndrias tanto dos animais estivantes como dos animais controles estão fracamente acopladas (gráfico 23).

A liberação de peróxido mitocondrial (gráfico 24) da glândula digestiva *de Helix aspersa* controle no estado 3 (0,36 nmol H_2O_2 por minuto e por miligrama de proteína) e no estado 4^+ (0,31 nmol H_2O_2 por minuto e por miligrama de proteína) foi significativamente ($p < 0,05$) maior que a liberação de peróxido mitocondrial da glândula digestiva *de Helix aspersa* controle no estado desacoplado (0,23 nmol H_2O_2 por minuto e por miligrama de proteína).

A liberação de peróxido mitocondrial (gráfico 24) da glândula digestiva *de Helix aspersa* estivante no estado 3 foi de 0,43 nmol H_2O_2 por minuto e por miligrama de proteína, no estado 4^+ foi de 0,35 nmol H_2O_2 por minuto e por miligrama de proteína e no estado desacoplado foi de 0,25 nmol H_2O_2 por minuto e por miligrama de proteína. O estado respiratório desacoplado libera significativamente ($p < 0,05$) menos peróxido que o estado respiratório 3 na glândula digestiva *de Helix aspersa* estivante.

Relativizando a liberação de peróxido pelo consumo de oxigênio (gráfico 25), obtém-se que 1,37% do oxigênio no estado respiratório 3; 1,68% do oxigênio no estado respiratório 4^+ e 1,53% do oxigênio no estado respiratório desacoplado são convertidos em peróxido nas mitocôndrias controles. Nas mitocôndrias estivantes 2,12% do oxigênio no estado respiratório 3; 1,98% do oxigênio no estado respiratório 4^+ e 1,66% do oxigênio no estado respiratório desacoplado são convertidos em peróxido (figura 25). A porcentagem de peróxido liberada no estado respiratório 3 dos animais estivantes é significativamente ($p < 0,05$) maior que a porcentagem liberada no estado 3 dos animais controles.

Gráficos:

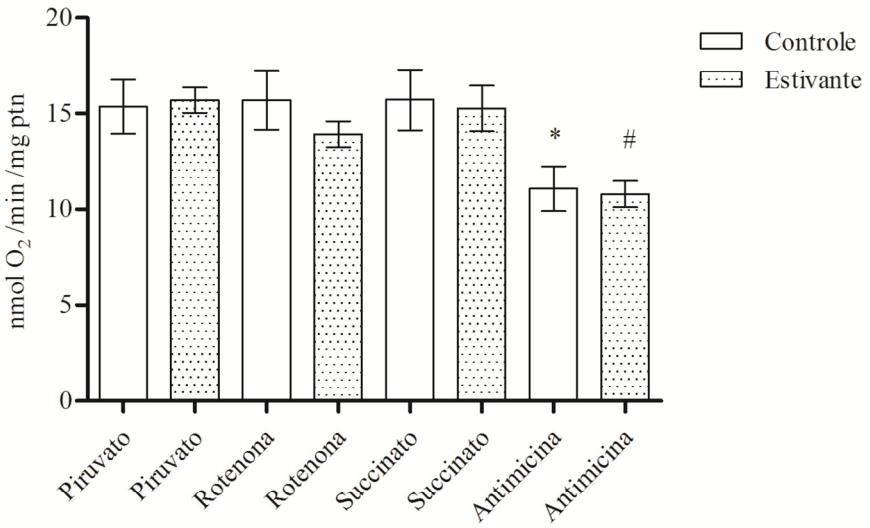


Gráfico 21. Consumo de O_2 em mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* controle (n=6) ou estivante (n=8). Valores são média ± erro padrão médio. * Significativamente diferente ($p<0,05$) de controle succinato. # Significativamente diferente ($p<0,05$) de estivante succinato.

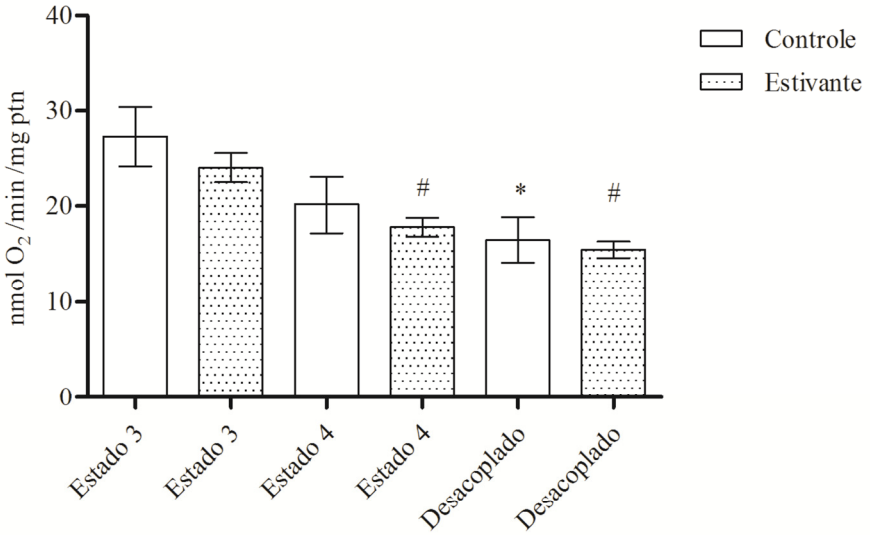


Gráfico 22. Consumo de O_2 em mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* controle (n=6) ou estivante (n=8). Valores são média ± erro padrão médio. # Significativamente diferente ($p<0,05$) de estivante estado 3. * Significativamente diferente ($p<0,05$) de controle estado 3.

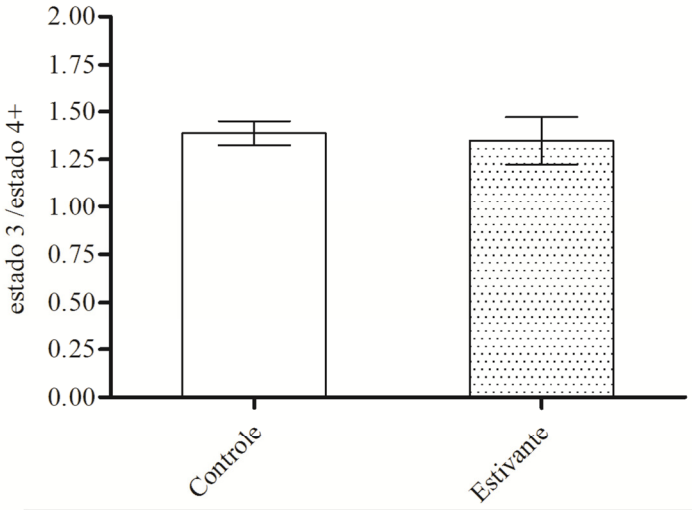


Gráfico 23. Controle respiratório de mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* controle (n=6) ou estivante (n=8). Valores são média ± erro padrão médio. Não há diferenças estatísticas.

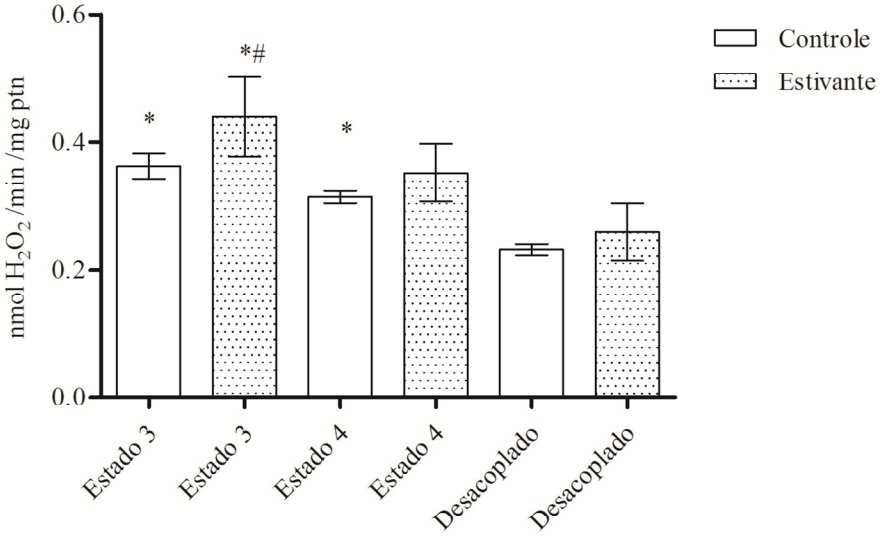


Gráfico 24. Liberação de peróxido em mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* controle (n=6) ou estivante (n=8). Valores são média ± erro padrão médio. * Significativamente diferente ($p<0,05$) de controle desacoplado. # Significativamente diferente ($p<0,05$) de estivante desacoplado.

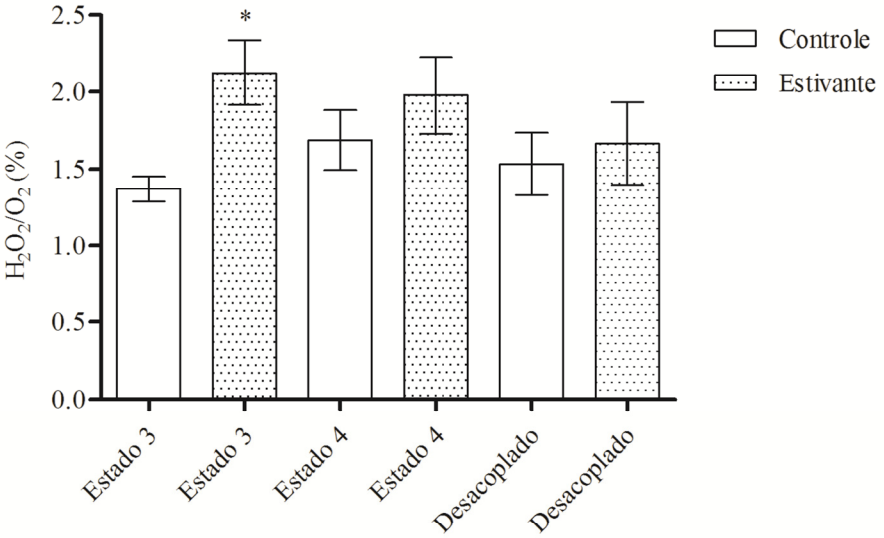


Gráfico 25. Porcentagem de oxigênio convertido a peróxido em mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* controle (n=6) ou estivante (n=8). Valores são média ± erro padrão médio. * Significativamente diferente (p<0,05) de controle estado 3.

2.4 Discussão e Conclusões

Utilizando piruvato e succinato como substratos para a respiração mitocondrial, observou-se que a taxa de consumo de oxigênio permaneceu na faixa de 15 nmol O_2. min^{-1}. mg ptn^{-1} tanto nos animais estivantes como nos animais controles (gráfico 21). Vorhaben e colaboradores (1984) mediram o consumo de oxigênio em mitocôndrias de glândula digestiva de *Helix aspersa* usando succinato (5mM) e manitol (10mM) como substratos e encontraram um decréscimo pequeno de 20-30% no consumo de O_2 nos animais estivantes utilizando succinato, mas nenhuma diferença utilizando manitol, apesar de relatarem que em um estudo prévio teriam observado um decréscimo no consumo de de O_2 nos animais estivantes utilizando manitol em relação ao grupo ativo.

As mitocôndrias tanto dos animais controles como dos animais estivantes se mostraram insensíveis à inibição por rotenona na concentração de 2 µM (gráfico 21). No entanto foi observando uma tendência estatística (p=0,08) nas mitocôndrias dos animais estivantes em diminuir o consumo de oxigênio na presença de rotenona. Utilizando uma maior concentração de rotenona provavelmente teríamos uma resposta inibitória satisfatória ($p < 0,05$). Em células isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* não houve inibição do consumo de oxigênio utilizando rotenona (Bishop & Brand, 2000) mesmo em concentração

conhecida por causar máxima inibição do complexo I, mas o experimento foi feito apenas uma vez, sem réplicas. Algumas NADH quinona oxiredutases (complexo I) são menos sensíveis a rotenona (Lenaz et al., 1995; Merlo-Pich et al., 1996) sendo necessário o uso de altas concentrações para conseguir inibição (Uyemura et al., 2004).

A rotenona reduz no complexo I da cadeia respiratória o centro de Fe-S e a flavina mono nucleotídeo (FMN), facilitando a formação de ânion superóxido no complexo I (Kowaltowski et al., 2009), embora reduza a formação de ROS pela transferência reversa de elétrons do complexo II para a ubiquinona e esta para o complexo I (Liu et al., 2002; Kowaltowski et al., 2009). Esta insensibilidade à rotenona é comum em mitocôndrias de bactérias, fungos, protozoários e plantas (Kerscher, 2000; Uyemura et al., 2004). Nestes grupos ocorre a presença de malato quinona oxiredutase (Cohn, 1958; Molenaar et al., 1998) e/ou de NADH quinona oxiredutase alternativa (Kerscher, 2000).

A malato quinona oxiredutase é dependente de FAD e não aceita NADH como doador de elétrons, estes provem da oxidação do malato a oxaloacetato (Molenaar et al., 1998). As NADH quinona oxiredutase alternativas são duas: a NADH-Q oxiredutase que transloca Na^+ ao invés de H^+, apenas encontrada em bactérias (Kerscher, 2000); e a NADH-Q oxiredutase que não transloca prótons, semelhante ao complexo II (Kerscher, 2000).

Ao contrário da resposta à rotenona, a antimicina A (1µg) em nosso estudo (gráfico 21) inibiu o consumo de O_2 nas mitocôndrias dos animais controles e estivantes em aproximadamente 30%. Esta resposta a antimicina A é condizente com os resultados de Bishop & Brand (2000) em que células de glândula digestiva diminuíram seu consumo de oxigênio em 27% quando expostas a antimicina A. O complexo III da cadeia respiratória é uma fonte importante de formação de ROS (Boveris et al., 1976; Turrens et al.,1985; Dröse & Brandt, 2008). O radical semiquinona é a fonte geradora de ROS especificamente, pois o inibidor mixotiazol bloqueia a formação da semiquinona, inibindo a geração de ROS no complexo III, apesar de aumentar a formação de ROS no complexo I (Kowaltowski et al., 2009). E a antimicina A faz com que ocorra um acúmulo de semiquinona, aumentando a geração de ROS no complexo III (Boveris & Cadenas, 1975; Turrens et al.,1985; Muller et al., 2004). Já o complexo II da cadeia respiratória não é um sítio formador de ROS importante, embora o succinato seja o iniciador da transferência reversa de elétrons do complexo II para o I, formando anion superóxido (Liu et al., 2002; Kowaltowski et al., 2009).

As taxas de consumo de oxigênio nos diferentes estados respiratórios (gráfico 22) e o controle respiratório (gráfico 23) mostraram que a maior parte da respiração está desacoplada da geração de ATP nas mitocôndrias de glândula digestiva de *Helix aspersa* estivante ou

controle. Proteínas desacopladoras (Echtay et al., 2002; Kowaltowski et al., 2009); canais mitocondriais de K^+ sensíveis a ATP (Facundo et al., 2007) e a oxidase alternativa (Czarna & Jarmuszkiewicz, 2005) podem ser responsáveis por este fraco acoplamento mitocondrial, que levam ao aumento do transporte de elétrons e a diminuição da eficiência da formação de ATP, diminuindo conjuntamente a formação de ROS pela mitocôndria (Kowaltowski et al., 2009).

O fraco acoplamento exibido pelas mitocôndrias no presente estudo pode ser de fato uma estratégia para inibir a formação de ROS, contudo grande parte deste desacoplamento pode ser um efeito apenas de ocorrência *in vitro*, não espelhando a realidade *in vivo*, pois o escape de prótons totalizou 75% da respiração mitocondrial. Bishop & Brand (2000) observaram que em células de glândula digestiva de *Helix aspersa* a respiração dita mitocondrial (geração de ATP + escape de prótons) não se alterava durante a estivação em relação ao grupo controle, sendo aproximadamente 50% da respiração celular total; 38% da respiração mitocondrial gerava ATP e o escape de prótons era responsável por 12%. Analisando os dados absolutos de Bishop & Brand (2000) vemos que 39% da respiração nas células de animais ativos foram classificados como escape de prótons e durante a estivação este escape diminui para 20% da respiração total. A diferença na porcentagem de escape de prótons do estudo de Bishop & Brand (2000) para o presente estudo pode ser: devido ao uso de mitocôndrias isoladas para medir o consumo de oxigênio mitocondrial, um meio mais artificial, ao invés de células isoladas, um meio menos artificial; e/ou devido ao nosso processo de isolamento de mitocôndrias, que pode ter gerado artificialmente maior escape de prótons. Vorhaben e colaboradores (1984) mediram o consumo de O_2 em mitocôndrias isoladas de glândula digestiva de *Helix aspersa* no estado respiratório 2 (apenas substrato, sem ADP) e as taxas foram semelhantes as taxas encontradas em nosso estudo (gráfico 21), infelizmente não mediram o consumo de O_2 nos estados respiratórios 3, 4^+ e desacoplado para compararmos a taxa de escape de prótons. Melhorias na técnica de isolamento de mitocôndrias de *Helix aspersa* e futuras medidas de atividades de enzimas ligadas à respiração mitocondrial poderão elucidar o porquê destas disparidades e suas possíveis causas e possíveis soluções.

Um fator muito importante que precisa ser salientado é que no presente estudo, assim como no estudo de Tahara e colaboradores (2009), medimos a liberação de H_2O_2 pelas mitocôndrias, a resultante entre a geração de ROS mitocondrial menos as atividades de vários antioxidantes. Por isso, as atividades de enzimas antioxidantes presentes afetam diretamente as medidas de liberação de H_2O_2 pelas mitocôndrias (Santiago et al., 2008). Quanto mais antioxidantes, provavelmente menores a medidas de liberação de H_2O_2 nas mitocôndrias de

glândula digestiva de *Helix aspersa* estivante ou controle.

Outro fator importante é que em mitocôndrias ou em células isoladas a tensão de oxigênio é bem maior do que em condições *in vivo* (Dröge, 2002; Gnaiger & Kuznetsov, 2002). Alguns estudos demonstram que altas tensões de oxigênio aumentam a liberação de ROS mitocondrial e baixas tensões de oxigênio tem o efeito oposto (Boveris & Chance, 1973; Costa et al., 1993). Porém outros estudos demonstram que há um aumento de formação de ROS durante a hipóxia (Duranteau et al., 1998; Chandel et al., 1998; Wood et al., 1999; Killilea et al., 2000). Outro fator importante que precisa ser lembrado quando utilizamos mitocôndrias isoladas é que não estão presentes várias substâncias citosólicas, como o óxido nítrico, que podem agir modulando a respiração e a produção de ROS (Brown, 1999; Tahara et al., 2009).

Nossos resultados apontaram uma menor liberação de peróxido nos estados respiratórios desacoplados tanto em animais estivantes como em animais controles (gráfico 24), indicando que provavelmente o estado desacoplado influencia nesta diminuição de liberação de peróxido e provável geração de ROS.

Quando as taxas de liberação de peróxido são relativizadas pelo consumo de O_2 (gráfico 25) observa-se um aumento da liberação de peróxido no estado respiratório 3 dos animais estivantes em relação aos animais controles. Isto pode indicar que durante a estivação há uma maior geração de ROS mitocondrial, mesmo que as taxas *in vitro* estejam superestimadas.

Esta geração de ROS aumentada durante a estivação por meio da liberação de H_2O_2 mitocondrial pode ativar o fator de transcrição HIF-1 e consequentemente acionar muitas vias e mecanismos importantes para a sobrevivência celular. Segundo Bell e colaboradores (2005) existem evidências genéticas definitivas que a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial regula durante a hipóxia a estabilização da proteína HIF-1α por meio da geração de ROS, especificamente H_2O_2. Quando as atividades da GPx e da catalase aumentam, ocorre uma diminuição da estabilidade de HIF-1α (precursor de HIF-1), mas a super expressão da Mn-SOD não afeta a estabilidade de HIF-1α durante a hipóxia (Bell et al., 2005). As vias de sinalização que o H_2O_2 ativa, inibem a hidroxilação de HIF-1α, impedindo que a proteína seja marcada para a degradação (Bell et al., 2005).

Vários estudos demonstram que em estados dormentes como a estivação e a hibernação em gastrópodes terrestres ocorre um aumento das atividades de enzimas antioxidantes, um “preparo para o estresse oxidativo” (Hermes-Lima & Storey, 1995; Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima, 2003; Ramos-Vasconcelos et al., 2005; Nowakowska et al.,

2009a; Nowakowska et al., 2009b; Nowakowska et al., 2010). Estas respostas enzimáticas podem ser em parte uma consequência da ação de HIF-1, juntamente com a fosforilação diferenciada e reversível de enzimas que ocorre durante a dormência (Storey, 2002). Porém, o aumento das atividades de enzimas peroxidases especificamente serviria como uma retroalimentação negativa, inibindo a continuidade da ação de HIF-1. Ou este aumento, principalmente de Se-GPx durante a estivação (Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima, 2003; Ramos-Vasconcelos et al., 2005) é compartimentado e não afeta a via de sinalização de estabilização de HIF-1α.

O presente estudo demostra que durante a estivação, as mitocôndrias de glândula digestiva de *Helix aspersa* liberam mais H_2O_2 *in vitro*. Estas ROS podem sinalizar vias que induzem a ativação de HIF-1 e sinalizar também por outras vias a ativação do sistema de defesa antioxidante, prevenindo um possível estresse oxidativo durante a estivação e durante o despertar no gastrópode terrestre *Helix aspersa*.

Capitulo 3. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da dormência em gastrópodes terrestres.

3.1 Introdução

A dormência é uma forma de inatividade associada a uma redução na taxa metabólica, sem grandes alterações no estado hídrico do animal (Withers & Cooper, 2010) e permite a sobrevivência do animal durante períodos em que as condições ambientais estão desfavoráveis. No caso dos caramujos terrestres, a redução na taxa metabólica chega a 70-80% em relação à taxa metabólica de animais ativos (Pedler et al., 1996, Guppy & Withers, 1999).

A dormência que ocorre em resposta a baixas temperaturas e falta de alimento é chamada de hibernação, já a dormência que ocorre em resposta a altas temperaturas, baixa umidade e falta de alimento é chamada de estivação (Withers & Cooper, 2010).

3.2 Características fisiológicas ligadas à dormência

A dormência é uma estratégia de defesa dos gastrópodes terrestres, que precede os estresses ambientais. Duas ações são essenciais para o sucesso da dormência, a conservação de água e a depressão metabólica, visando à economia das reservas energéticas endógenas (Rees & Hand, 1993; Storey, 2002).

A conservação de água nos caramujos terrestres se dá por diversos mecanismos: formação de uma barreira protetora, o epifragma (Barnhart, 1983); padrão apneico na respiração (Barnhart & McMahon, 1987); e aumento da concentração de ureia nos tecidos (Rees & Hand, 1993).

Caputa e colaboradores (2005) postularam que a hibernação de *Helix pomatia* e consequente hipometabolismo é iniciada e mantida apenas pelas baixas temperaturas, mas seu despertar envolve um mecanismo endógeno preciso. Já o decréscimo da pressão parcial de oxigênio e pH na hemolinfa e o aumento da pressão parcial de gás carbônico pela respiração intermitente são fatores extrínsecos responsáveis por grande parte da depressão metabólica em caramujos estivantes (Pedler et al., 1996; Barnhart & McMahon, 1988; Guppy et al., 2000; Bishop & Brand, 2000). Porém, 30% da depressão metabólica são devido a fatores intrínsecos (Pedler et al., 1996; Guppy et al., 2000; Bishop & Brand, 2000).

A depressão metabólica máxima atingida pela dormência pode levar muitos dias (Pedler et al., 1996). Mas o rápido despertar dos caramujos quando as condições estão favoráveis sugere que os mecanismos envolvidos na depressão metabólica durante a dormência sejam controles metabólicos intrínsecos e não adaptações moleculares a falta de oxigênio e falta de água (Withers & Cooper, 2010).

3.3 Características bioquímicas ligadas à dormência

Para que os animais em dormência consigam sobreviver a meses de inatividade é necessária a diminuição da taxa metabólica. Processos vitais como a manutenção do potencial de membrana e a manutenção da ciclagem de ATP (mesmo que em baixos níveis) são continuados; já a síntese proteica e outros processos como a expressão gênica são regulados diferencialmente e até inibidos (Storey, 2002; Storey & Storey, 2004; Storey & Storey, 2010). As alterações metabólicas em caramujos dormentes e/ou seus mecanismos reguladores são estudados em diversos trabalhos (Churchill & Storey, 1989; Whitwan & Storey, 1990; Hermes-Lima & Storey, 1995; Stuart et al., 1998; Storey, 2002; Pakay et al., 2002; Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima, 2003; Ramos-Vasconcelos et al., 2005; Ramnanan & Storey, 2006a; Ramnanan & Storey, 2006b; Ramnanan et al., 2007; Storey & Storey, 2007; Michaelidis et al., 2008; Ramnanan et al., 2009a; Nowakowska et al., 2009a; Nowakowska et al., 2009b; Nowakowska et al., 2010; Salway et al., 2010; Storey & Storey 2010). Falaremos a seguir de algumas mudanças ocorridas no hipometabolismo de gastrópodes dormentes, focando principalmente nas alterações ocorridas nas enzimas e proteínas, sejam estruturais ou cinéticas.

3.3.1 Regulação da expressão gênica

Os organismos que entram em depressão metabólica regulam suas atividades de transcrição de genes, diminuído a expressão de alguns genes e aumentando a expressão de outros genes e também preservando transcritos de RNA (para a volta do metabolismo normal). A modificação covalente em histonas; o controle da atividade de RNA polimerase II; a supressão da ação de fatores de transcrição e a ação de mecanismos pós-transcricionais silenciadores de genes são algumas das medidas que os organismos em depressão metabólica utilizam para diminuir a transcrição gênica (Storey & Storey, 2007; Storey & Storey, 2010).

Já o aumento da expressão de genes no hipometabolismo se dá no âmbito da proteção do metabolismo celular (chaperonas, serpinas, enzimas antioxidantes); e a preservação de transcritos de mRNA se dá pela sua associação com monosomos, que são uma fração inativa da maquinaria traducional (Storey & Storey, 2004; Storey & Storey, 2007).

Estudos sobre a regulação da expressão gênica e hipometabolismo têm sido feitos em diversos animais, como esquilos hibernantes (Morin & Storey, 2006; Morin et al., 2008), caramujos marinhos em anoxia (Larade & Storey, 2002) e rãs estivantes (Hudson et al., 2006; Hudson et al., 2008). Poucos estudos sobre regulação gênica e caramujos terrestres estivantes foram feitos até agora (Hobbs et al., 1994; Brooks and Storey 1995; Reuner et al., 2008; Ramnanan et al., 2009a). Muito há para ser investigado sobre gastrópodes terrestres estivantes e regulação gênica.

3.3.2 Alterações em enzimas e proteínas

Síntese e degradação proteica

Animais em depressão metabólica, como os caramujos terrestres, tendem a diminuir a síntese e a degradação de proteínas, pois são processos que gastam muito ATP (Storey & Storey, 2004).

Em *Helix aspersa* estivante por dois meses, houve uma diminuição da síntese proteica na glândula digestiva (23 % do controle) e no músculo do pé (53% do controle), esta diminuição da síntese foi responsável por 60% da depressão metabólica na glândula digestiva e por 28% da depressão metabólica do pé (Pakay et al., 2002). Em apenas dois dias de estivação, a síntese proteica de *Otala lactea* caiu para 20% do controle na glândula digestiva e no músculo do pé, e concomitantemente houve fosforilação diferenciada de fatores ribossomais de iniciação e elongação e do proteassoma 20S (inibição da atividade), indicando a diminuição da síntese e degradação proteica (Ramnanan et al., 2009a).

Bombas iônicas

A regulação das bombas iônicas que consomem ATP é vital para o sucesso da depressão metabólica durante a dormência (Storey & Storey, 2007). O potencial de membrana deve ser mantido, mas um novo balanço deve ser alcançado, diminuindo o gasto de ATP (Storey & Storey, 2007).

Em *Otala lactea* estivante por 10 dias (Ramnanan & Storey 2006a) a atividade máxima da bomba iônica de sódio-potássio dependente de ATP (NaK-ATPase) e sua afinidade por seus substratos foram diminuídas na glândula digestiva e no músculo do pé. Também foi visto uma maior fosforilação desta enzima durante a estivação, causada provavelmente pelas proteínas quinases: dependente de adenosina monofosfato (PKA); dependente de guanosina monofosfato cíclica (PKG) e dependente de Ca^{2+}/fosfolipídio (PKC) (Ramnanan & Storey 2006a). A bomba iônica de cálcio sarcoendoplasmática dependente de ATP (SERCA) teve a sua atividade atenuada pela metade no músculo do pé e glândula digestiva do gastrópode estivante e também teve a sua afinidade pelos seus substratos diminuída (Ramnanan & Storey 2008). A SERCA também se encontrava mais fosforilada durante a estivação; a PKA e PKG atuavam na glândula digestiva e a PKG e a proteína quinase Ca^{2+}/calmodulina (CaMK) atuavam no músculo do pé (Ramnanan & Storey, 2008).

Quinases e sinalização

A proteina quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) pode ser acionada por estresses que interferem na produção de ATP ou por estresses que aumentam o consumo de ATP (Hardie, 2003). Em *Otala lactea* estivante, AMPK se encontra fosforilada, provavelmente pela PKG e também apresenta um aumento de atividade (Ramnanan et al., 2009b). A AMPK desliga processos que em curto prazo não são essenciais para a célula estressada, como a síntese de macromoléculas (Hardie, 2003). A AMPK no caramujo estivante inibiu a atividade da enzima acetil-CoA carboxilase, que é ligada a síntese de lipídios, facilitando a inibição de pelo menos uma via anabólica (Ramnanan et al., 2009b).

A proteína quinase B (Akt) está envolvida em vias de sinalização de proliferação e crescimento (Cross et al., 1995; Proud, 2006) ativando respostas de mTOR (um regulador da tradução protéica) e GSK-3 (um inibidor da síntese de glicogênio); e também inibi por fosforilação os fatores FOXO e BAD, envolvidos com apoptose e parada no ciclo celular (Datta et al., 1999; Burgering & Medema, 2003). Um estudo tendo como alvo a Akt em caramujos estivantes por 10 dias, mostrou que sua atividade estava elevada, havia uma maior afinidade pelo seu substrato e ela se encontrava mais fosforilada (Ramnanan et al. 2007). Porém mTOR e GSK-3b nos caramujos estivantes não estavam ativadas, estando desacopladas da influência de Akt, consequentemente ocorrendo a não ativação de vias anabólicas; já os fatores BAD e FOXO3a estavam fosforilados e inibidos, promovendo a

sobrevida dos animais estivantes em uma condição de baixo metabolismo (Ramnanan et al. 2007).

Atividades de enzimas ligadas ao metabolismo energético

A enzima G6PDH foi analisada em *Otala lactea* estivante por 10 dias, e foi demostrado que esta tem sua V_{max} aumentada em 50% e seu K_m para G6P diminuído em 50% na estivação (Ramnanan & Storey 2006b). A enzima é regulada pela PKG e pela proteína fosfatase 1 (PP1) e se encontra mais fosforilada na estivação (Ramnanan & Storey 2006b). Esta enzima participa da via das pentoses fosfato e sustenta os níveis de NADPH, um poderoso agente redutor usado no sistema de defesa antioxidante durante a estivação em caramujos terrestres (Hermes-Lima et al. 1998; Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima, 2003; Ramos-Vasconcelos et al., 2005).

Durante a estivação (três dias e 22 dias) em *Otala lactea* ocorreram alterações no metabolismo da via glicolítica (Churchill & Storey, 1989). No começo da estivação, as mudanças ocorridas nos níveis de intermediários da glicólise sugeriram que as enzimas fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK) foram ativadas no músculo do pé e a PK na glândula diestiva; já na estivação prolongada a taxa glicolítica foi diminuída nos dois órgãos, indicando uma diminuição geral das atividades enzimáticas (Churchill & Storey, 1989).

Medindo as V_{max} e as propriedades cinéticas de PK e PFK de *Otala lactea* (Whitwam & Storey 1990; Whitwam & Storey, 1991) e de PK em *Helix aspersa* (Fields, 1992), constatou-se que estas enzimas no músculo do pé e no manto estão de fato inibidas durante a estivação. Em *Otala lactea* foi verificado que a PKG, a PKA e a PKC estão envolvidas na inibição da PK e PFK por fosforilação reversível durante a estivação (Whitwam & Storey 1990; Whitwam & Storey, 1991). Já a PK em glândula digestiva de *Otala lactea* e *Helix aspersa* se mostrou mais ativa durante a estivação (Whitwam & Storey 1990; Fields, 1992). Mostrando que em um mesmo animal a regulação da via glicolítica durante a dormência é diferenciada nos órgãos.

No gastrópode terrestre *Cepaea nemoralis* foi mostrado que os efeitos da estivação prolongada (42 dias) não alteraram as atividades máximas de várias enzimas do metabolismo energético (Stuart et al., 1998). Apenas a citrato sintase diminuiu 40% na glândula digestiva durante a estivação, no coração e no nefrídio ela se mostrou inalterada (Stuart et al., 1998). Já em *Helix lucorum* hibernante por quatro meses houve um aumento das atividades da PFK, da aldolase, da fosfoglicerato quinase (PGK) e lactato desidrogenase (LDH) no músculo do pé e

no manto em relação aos animais pré-hibernantes (Michaelidis et al., 2008), porém, a hexoquinase (HK) e a PK não tiveram suas atividades aumentadas aos 4 meses de hibernação em relação aos animais pré-hibernantes. No entanto, em um estudo prévio foi mostrado que a atividade da PK no ventrículo de *Helix lucorum* aumenta após hibernação prolongada (Michaelidis & Pardalidis, 1994).

Estes estudos demonstram que as respostas das enzimas do metabolismo energético à dormência são diversificadas. São dependentes do órgão analisado, do tempo de dormência e talvez até do tipo de dormência (estivação e hibernação). Mas a fosforilação reversível protéica parece ser um mecanismo comum envolvido na depressão metabólica de gastrópodes terrestres e em outros grupos animais (Storey 2002; Storey & Storey, 2004; Storey & Storey, 2007).

3.3.3 Sistema de defesa antioxidante e dormência

Na metade dos anos 90, pesquisadores começaram a perceber um padrão na atividade de enzimas antioxidantes em animais (répteis, anfíbios, moluscos) submetidos a diversos estresses, como anóxia, hipóxia, congelamento, desidratação e estivação, entre outros (Hermes-Lima & Storey, 1993; Hermes-Lima & Storey, 1995; Hermes-Lima & Storey, 1996; Joanisse & Storey, 1996; Hermes-Lima & Storey, 1998; Pannunzio & Storey, 1998). A partir daí, foi cunhado a hipótese do "preparo para o estresse oxidativo", em que ocorre uma ativação do sistema de defesa antioxidante durante o período de baixo consumo de oxigênio e hipometabolismo, antes da volta dos níveis normais de oxigênio (Hermes-Lima et al., 1998; Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002). Revisaremos aqui se o "preparo para o estresse oxidativo" é um padrão recorrente em várias espécies de gastrópodes terrestres dormentes.

No gastrópode *Otala lactea* estivante (tabela 6) há um aumento da atividade de SOD e Se-GPx durante a estivação na glândula digestiva; já no músculo do pé ocorre um aumento da catalase, da SOD e da GST durante a estivação (Hermes-Lima & Storey, 1995). Em *Helix aspersa* estivante durante o inverno (tabela 7) há um aumento na atividade da Se-GPx na glândula digestiva e no músculo do pé; e um aumento nos níveis de GSH total e nos marcadores de danos lipídicos na glândula digestiva e nos níveis de proteínas carboniladas no músculo do pé (Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima, 2003), indicando um possível estresse oxidativo e um contra-ataque do sistema antioxidante durante a estivação. Estes estudos estão alinhados à hipótese do "preparo para o estresse oxidativo".

Em outro estudo feito em *Helix aspersa* estivante, porém durante o verão (tabela 8) foi mostrado que a sazonalidade modula o sistema de defesa antioxidante (Ramos-Vasconcelos at al., 2005). Há um aumento na atividade da Se-GPx apenas da glândula digestiva dos animais estivantes, porém este aumento é muito pronunciado e vem acompanhado de uma diminuição nas atividades da catalase e SOD (Ramos-Vasconcelos at al., 2005). Mostrando que nem sempre todas as enzimas antioxidantes são ativadas ou mantidas em seus níveis normais de atividade durante a depressão metabólica para proteger o animal de uma produção de ROS exagerada durante a dormência e durante o despertar.

Em estudos conduzidos com *Helix pomatia*, uma espécie europeia de clima temperado, foi mostrado que na hibernação (tabela 9-11) há um aumento gradativo da atividade da catalase, da GR e da GST na glândula digestiva à medida que a dormência avança; no músculo do pé há uma aumento da atividade da GPx e dos níveis de TBARS no meio e no fim da hibernação em relação ao início; e no nefrídio ocorre aumento das atividades de catalase e GPx e nos níveis de TBARS nos estágios mais profundos da hibernação, com posterior queda da catalase e aumento da GPx nos animais saindo da hibernação na primavera (Nowakowska et al., 2009a). Isto mostra que na hibernação, uma dormência ligada a queda de temperatura em gastrópodes terrestres (Caputa et al., 2005) há também uma aumento das defesas antioxidantes, uma resposta diferenciada destas enzimas à depressão metabólica.

Em *Helix pomatia* estivante, as respostas antioxidantes diferem dependendo se a dormência ocorre em laboratório (tabela 12) ou em meio natural (tabela 13). Em animais estivantes em laboratório, a atividade da catalase diminui em relação aos animais controles e recém-acordados na glândula digestiva, já a atividade da GST apresenta uma queda durante o despertar em relação à estivação e grupo controle (Nowakowska et al., 2009b); no nefrídio, a atividade da catalase cai na estivação e continua diminuída nos animais acordados e a GPx aumenta durante o despertar do animais em relação a estivação (Nowakowska et al., 2009b). As respostas da catalase e da GPx nestes animais não se encaixam como "preparo para o estresse oxidativo", apenas a GST durante a dormência se encontra aumentada em relação aos animais acordados. Já nos animais estivantes em campo, a atividade da GST na glândula digestiva está aumentada na estivação e no grupo acordado, porém a atividade da GR se encontra diminuída durante a estivação na glândula digestiva e no nefrídio (Nowakowska et al., 2010). A temperatura e o fotoperíodo utilizados nas condições laboratoriais podem ter influenciado decisivamente nas respostas diferenciadas que estes gastrópodes apresentaram em relação aos animais no meio natural. A quantidade de GSH nos animais controles em condições laboratoriais é visivelmente menor. E as atividades de algumas enzimas nestes

mesmos animais estão bem acima das atividades das enzimas dos animais em ambiente natural. Indicando que possivelmente os animais em laboratório se encontravam mais estressados que seus similares em campo, causando estas repostas distintas para o mesmo fenômeno. Novos experimentos com estes gastrópodes poderão provavelmente esclarecer estas diferenças nas respostas antioxidantes durante a estivação dependente do meio.

No estudo de Salway e colaboradores (2010) utilizando o gastrópode africano gigante *Achatina fulica* em estivação, a ativação das respostas antioxidantes ocorrem durante o despertar em vários órgãos (tabela 14). Os autores avaliam que a conclusão geral de que uma grande diversidade de tecidos responde ativando suas enzimas antioxidantes durante a estivação em gastrópodes terrestres não é possível de ser feita. Que o mais provável seria uma ativação transiente das atividades enzimáticas durante as primeiras horas de despertar, talvez em reposta a sinalizações mediadas por ROS (Salway et al., 2010).

Porém, analisando os estudos já feitos em gastrópodes terrestres dormentes, as respostas em sua maioria indicam uma antecipação ao estresse oxidativo. A ativação do sistema de defesa antioxidante provavelmente está ligada: a diminuição de oxigênio e a ativação do fator de transcrição HIF-1, responsável pelo aumento da transcrição de diversos genes (Bell et al., 2005); e a regulação diferenciada das atividades de diversas enzimas, pela fosforilação reversível (Storey 2002; Storey & Storey, 2004; Storey & Storey, 2007).

O "preparo para o estresse oxidativo" é uma via de ação em muitos outros animais (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002). Na dormência em gastrópodes terrestres, o "preparo para o estresse oxidativo" parece se confirmar na maioria dos estudos, embora haja resultados em que a ativação do sistema de defesa antioxidante só ocorra durante a volta do metabolismo normal.

Tabela 6. Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Otala lactea* estivante por 30 dias e 24 horas depois do despertar, retirado e modificado de Hermes Lima & Storey, 1995 e Hermes Lima et al., 1998.

	Glândula digestiva		Músculo do pé	
	Estivante	Acordado	Estivante	Acordado
Catalase (U/mg)	174 ± 18	196 ± 15	5,5 ± 0,6	3,4 ± 0,1 *
SOD (U/mg)	84 ± 12	50 ± 6 *	41 ± 6	25 ± 2 *
Se-GPx (mU/mg)	23 ± 4	10,6 ± 1,6 *	4,4 ± 0,7	4,9 ± 0,4
GR (mU/mg)	16 ± 2	19 ± 2	6,2 ± 0,7	6,2 ± 1,2
GST (um/mg)	1282 ± 215	1140 ± 83	223 ± 40	115 ± 20*
Eq-GSH (nmol/g)	3099 ± 317	2834 ± 118	998 ± 153	918 ± 45
GSSG (nmol/g)	461 ± 36	251 ± 24*	177 ± 20	94 ± 9*
Eq-GSH/GSSG	6,7	11,3	5,6	9,8
TBARS (nmol/g)	~26	~29	----------	----------

*Significativamente (p< 0,05) diferente dos animais estivantes. Quando mostrados, os valores são média ± erro padrão médio. As enzimas estão em unidades ou mili-unidades divididas por miligramas de proteínas. As medidas de GSH, GSSG e TBARS forma divididas por g de tecido fresco.

Tabela 7. Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix aspersa* estivante por 20 dias e 24 horas depois do despertar durante o inverno, retirado e modificado de Ramos-Vasconcelos & Hermes Lima, 2003.

	Glândula digestiva		Músculo do pé	
	Estivante	Acordado	Estivante	Acordado
Catalase (U/mg)	183 ± 24,4	183 ± 31,2	11,7 ± 1,8	7,9 ± 1,6
SOD (U/mg)	112 ± 7,7	134 ± 28,9	78,4 ± 20,7	85,9 ± 19,2
Se-GPx (mU/mg)	26,5 ± 5,4	5,4 ± 2,1 *	12,5 ± 2,3	4,2 ± 0,7*
GR (mU/mg)	56,8 ± 6,9	43,9 ± 5,7	19,9 ±3,1	15,9 ± 1,3
GST (um/mg)	718 ± 42	661 ± 64	688 ± 176	533 ± 39
G6PDH (mU/mg)	76,8 ±7,5	57,9 ± 18,4	64,2 ± 4,4	65 ± 4,9
Eq-GSH (nmol/g)	2892 ± 163	1585 ± 197*	1546 ± 299	1207 ± 113
GSSG (nmol/g)	302 ± 36	184 ± 11*	4,47 ± 0,26	4,64 ± 0,25
GSSG/ eq-GSH	0,104	0,116	0,0028	0,0038
TBARS (nmol/g)	~50	~30 *	~25	~20
Hidroperóxidos lipídicos (µmol eq-cumeno/g)	4,99 ± 0,94	1,08 ± 0,16*	----------	----------
Ptns carboniladas (nmol/g)	172 ± 15	135 ± 19	226 ± 25	145 ± 18*

*Significativamente (p< 0,05) diferente dos animais estivantes. Quando mostrados, os valores são média ± erro padrão médio. As enzimas estão em unidades ou mili-unidades divididas por miligramas de proteínas. As medidas de GSH, GSSG e TBARS forma divididas por g de tecido fresco.

Tabela 8. Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix aspersa* estivante por 20 dias e 24 horas depois do despertar durante o verão, retirado e modificado de Ramos-Vasconcelos at al., 2005.

	Glândula digestiva		Músculo do pé	
	Estivante	Acordado	Estivante	Acordado
Catalase (U/mg)	244 ± 21,8	360 ± 41*	23,9 ± 5,6	39,9 ± 14,6
SOD (U/mg)	235 ± 52,7	384 ± 55,8*	44,1 ± 8,4	51,1 ± 15
Se-GPx (mU/mg)	161 ± 39,3	43,8 ± 9*	9,1 ±1,5	6,9 ± 1
GR (mU/mg)	32,1 ± 4,3	38,3 ± 5,8	9,6 ±1,5	8,5 ± 0,9
GST (um/mg)	499 ± 28,5	562 ± 69,5	646 ± 39,5	514 ±117,8
G6PDH (mU/mg)	38,2 ± 6,2	43,4 ± 8	42,1 ± 6,6	51,1 ± 0,4
Eq-GSH (nmol/g)	2664 ± 185	2511 ± 298	~1500	~1000*
GSSG (nmol/g)	931 ± 145	696 ± 68	----------	----------
GSSG/ eq-GSH	0,365	0,291	----------	----------
TBARS (nmol/g)	20,1 ± 0,4	20,6 ± 1,6	8,9 ± 1,6	6,1 ± 0,9
Hidroperóxidos lipídicos (µmol eq-cumeno/g)	990 ± 154	694 ± 114	----------	----------
Ptns carboniladas (nmol/g)	98,2 ± 15,6	116,4 ± 12,8	99,4 ± 9,2	107 ± 17,1

*Significativamente (p< 0,05) diferente dos animais estivantes. Quando mostrados, os valores são média ± erro padrão médio. As enzimas estão em unidades ou mili-unidades divididas por miligramas de proteínas. As medidas de GSH, GSSG e TBARS forma divididas por g de tecido fresco.

Tabela 9. Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix pomatia* tórpidos e ativos no outono, retirado e modificado de Nowakowska et al., 2009a.

	Glândula digestiva		Músculo do pé		Nefrídio	
	Tórpido	Ativo	Tórpido	Ativo	Tórpido	Ativo
Cat (U/g)	~3,0	~3,5	~0,5	~0,5	~3,0	~2,0
GPx (µmol/g)	~0,10	~0,10	~0,30	~0,30	~0,15	~0,20
GR (µmol/g)	~0,005	~0,016*	~0,010	~0,020	~0,017	~0,012
GST (µmol/g)	~3,5	~0,9*	~0,7	~1,2	~3,5	~3,6
GSH (µmol/g)	~1,8	~1,5	~0,25	~0,25	~0,8	~1,0
TBARS (mmol/g)	~0,040	~0,065	~0,045	~0,060	~0,065	~0,035*

*Significativamente (p< 0,05) diferente dos animais tórpidos. As enzimas estão divididas por gramas de proteínas e por minuto. As medidas de GSH estão dividas por grama de tecido fresco. As medidas de TBARS foram divididas por grama de proteína.

Tabela 10. Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix pomatia* em vários estágios de hibernação (inverno), retirado e modificado de Nowakowska et al., 2009a.

	Glândula digestiva			Músculo do pé			Nefrídio		
	Início	Meio	Fim	Início	Meio	Fim	Início	Meio	Fim
Cat (U/g/min)	~3,1	~5,8*	~8,7*[a]	~0,4	~0,9	~1,5	~2,8	~7,0*	~8,5[a]
GPx(µmol /g)	~0,11	~0,10	~0.19	~0,09	~0,3*	~0,37[a]	~0,18	~0,25	~0,32[a]
GR(µmol/g)	~0,005	~0,017*	~0,015[a]	~0,011	~0,018	~0,016	~0,016	~0,02	~0,022
GST(µmol/ g)	~3,4	~7,0*	~7,2	~2,8	~4,6	~1,7	~3	~4,1	~3,6
GSH (µmol/g)	~1,7	~1,8	~2,0	~0,25	~0,3	~0,4	~0,75	~0,80	~0,70
TBARS (mmol/g)	~0,04	~0,09	~0,07	~0,04	~0,12*	~0,14[a]	~0,06	~0,09	~0,13[a]

*Significativamente (p< 0,05) diferente dos animais do estágio anterior. [a]Significativamente (p< 0,05) diferente dos animais do início da hibernação. As enzimas estão divididas por gramas de proteínas e por minuto. As medidas de GSH estão dividas por grama de tecido fresco. As medidas de TBARS foram divididas por grama de proteína.

Tabela 11. Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix pomatia* tórpidos e ativos na primavera, retirado e modificado de Nowakowska et al., 2009a.

	Glândula digestiva		Músculo do pé		Nefrídio	
	Tórpido	Ativo	Tórpido	Ativo	Tórpido	Ativo
Cat (U/g)	~9,1	~3,8*	~0,9	~0,7	~8,8	~6,8*
GPx (µmol/g)	~0,15	~0,13	~0,33	~0,30	~0,31	~0,75*

GR (µmol/g)	~0,15	~0,12	~0,17	~0,14	~0,21	~0,18
GST (µmol/g)	~7,5	~3,7*	~1,5	~1,4	~3,5	~2,0
GSH (µmol/g)	~1,75	~1,9	~0,4	~0,35	~0,8	~0,45
TBARS (mmol/g)	~0,075	~0,055	~0,14	~0,12	~0,13	~0,075

*Significativamente (p< 0,05) diferente dos animais tórpidos. As enzimas estão divididas por gramas de proteínas e por minuto. As medidas de GSH estão dividas por grama de tecido fresco. As medidas de TBARS foram divididas por grama de proteína.

Tabela 12. Respostas antioxidantes e danos oxidativos em *Helix pomatia* estivantes (21 dias) e acordados em laboratório, retirado e modificado de Nowakowska et al., 2009b.

Glândula digestiva				
	Controle	Estivante	Acordado	Acordado por 24 h
Cat (U/g)	~6,5	~2,0*	~3,5*[a]	~3,2*
GPx (mmol/g)	~0,09	~0,13	~0,10	~0,11
GR (µmol/g)	~17	~10	~9	~12
GST (mmol/g)	~7,2	~4	~1,7*[a]	~3
GSH (µmol/g)	~1,7	~2,5	~2,5	~2,6
TBARS (mmol/g)	~0,15	~0,045*	~0,05	~0,07
Músculo do pé				
Cat (U/g)	~0,9	~0,5	~0,6	~0,5
GPx (mmol/g)	~0,1	~0,09	~0,11	~0,04
GR (µmol/g)	~21	~21	~22	~26
GST (mmol/g)	~2,5	~0,7	~1,4	~1,7
GSH (µmol/g)	~0,5	~0,4	~0,5	~0,3
TBARS (mmol/g)	~0,13	~0,11	~0,09	~0,09
Nefrídio				
	Controle	Estivante	Acordado	Acordado por 24 h
Cat (U/g)	~7,8	~0,7*	~0,5*	~0,6*
GPx (mmol/g)	~0,36	~0,22	~0,32[a]	~0,16[a]
GR (µmol/g)	~16	~17	~15	~20
GST (mmol/g)	~5	~2,6	~3	~3,2
GSH (µmol/g)	~0,6	~0,8	~0,9	~1,8[b]
TBARS (mmol/g)	~0,09	~0,09	~0,05	~0,075

*Significativamente (p< 0,05) diferente dos animais controles. [a]Significativamente (p< 0,05) diferente dos animais do grupo anterior. [b]Significativamente (p< 0,05) diferente dos outros grupos. As enzimas estão divididas por gramas de proteínas e por minuto. As medidas de GSH e TBARS estão dividas por grama de tecido fresco.

Tabela 13. Respostas antioxidantes e conteúdo de GSH em *Helix pomatia* estivantes (21 dias) e acordados no campo, retirado e modificado de Nowakowska et al., 2010.

	Glândula digestiva			Nefrídio		
	Controle	Estivante	Acordado	Controle	Estivante	Acordado
GPx (mmol /g)	~0,022	~0,032	~0,029	~0,023	~0,025	~0,020
GR (µmol/g)	~15	~4*	~15[a]	~4	~3	~12*[a]
GST (mmol/g)	~2,2	~3,8*	~4,1*	~0,7	~0,8	~0,9
GSH (µmol/g)	~3,5	~2,8	~3,6	~1,1	~0,9	~1,2

*Significativamente ($p< 0,05$) diferente dos animais controles. [a]Significativamente ($p< 0,05$) diferente dos animais do grupo anterior. As enzimas estão divididas por gramas de proteínas e por minuto. As medidas de GSH estão dividas por grama de tecido fresco.

Tabela 14. Respostas antioxidantes em *Achatina fulica* estivantes (28 dias) e acordados, retirado e modificado de Salway et al., 2010.

Glândula digestiva				
	Ativo	Estivante	4h de despertar	24 h de despertar
Cat (nmol/min/mg)	859,5 ± 163,3	830, 3 ± 135	596,4 ± 90,8	573,4 ± 112,1
Se-GPx (nmol/min/mg)	1012 ± 42,1	1003 ± 64,9	1156 ± 25,4*[a]	946,9 ± 46,4
GR (nmol/min/mg)	36,07 ± 2,9	29,04 ± 2,5	29,61 ± 2,7	34,2 ± 4,4
Mn SOD (U/mg)	~0,8	~1,4	~1,2	~1,2
CuZn SOD (U/mg)	~4,7	~4,7	~4,5	~4,5
Músculo do pé				
	Ativo	Estivante	4h de despertar	24 h de despertar
Cat(nmol/min/mg)	----------	----------	----------	----------
Se-GPx (nmol/min/mg)	1531 ± 72,1	1477 ± 84,3	1590 ± 92,7	1864 ± 30,4*[a]
GR (nmol/min/mg)	9,27 ± 0,9	10,55 ± 1,2	14,7 ± 1,8*[b]	9,64 ± 0,4
Mn SOD (U/mg)	~1	~1,5	~1	~0,9
CuZn SOD (U/mg)	~3,5	~4[b]	~3	~2,5
Nefrídio				
	Ativo	Estivante	4h de despertar	24 h de despertar
Cat (nmol/min/mg)	1652 ± 163,3	1601 ± 129,2	1653 ± 90,8	1484 ± 99,5
Se-GPx (nmol/min/mg)	982 ± 143,1	1287 ± 61,7	1061 ± 107	108 ± 110,1
GR (nmol/min/mg)	28,7 ± 2,3	25,9 ± 2,7	25,8 ± 3,1	24 ± 2,1
Mn SOD (U/mg)	~4	~3	~4,5	~4
CuZn SOD (U/mg)	~10	~9	~10	~10
Coração				
	Ativo	Estivante	4h de despertar	24 h de despertar

Cat (nmol/min/mg)	6,97 ± 2,4	5,39 ± 0,6	5,86 ± 0,3	6,1 ± 1,6
Se-GPx (nmol/min/mg)	2078 ± 48,9	2093 ± 73,1	2383 ± 12,3*[a]	2098 ± 118,7
GR (nmol/min/mg)	8,26 ± 1,1	10,89 ± 1,1	12,08 ± 0,8*[b]	7,28 ± 0,2
Mn SOD (U/mg)	~15	~17	~16	~14
CuZn SOD (U/mg)	~5,5	~9	~9	~6

*Significativamente ($p < 0,05$) diferente dos animais ativos. [a]Significativamente ($p < 0,05$) diferente dos animais estivantes. [b]Significativamente ($p < 0,05$) diferente dos animais do grupo 24 h despertos. Quando mostrados, os valores são média ± erro padrão médio. As enzimas estão divididas por miligramas de proteínas.

Resumo geral

O gastrópode terrestre *Helix aspersa* (Müller) é um herbívoro generalista, que habita a região mediterrânea. Os gastrópodes terrestres em geral entram em estados dormentes durante o seu ciclo de vida. A dormência é uma forma de inatividade associada a uma redução na taxa metabólica, sem grandes alterações no estado hídrico do animal (Withers & Cooper, 2010). Os gastrópodes terrestres quando saem de um estado dormente podem apresentar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas mitocôndrias (Turrens et al., 1982) levando a um quadro de possível estresse oxidativo (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002). Cerca de 0,1% a 2% da respiração normal celular *in vitro* resulta em formação de ânion superóxido (Fridovich, 2004; Murphy, 2009; Hamanaka & Chandel, 2010). Muitos estudos apontam para um aumento na produção de ROS (Duranteau et al., 1998; Chandel et al., 1998; Wood et al., 1999; Killilea et al., 2000) durante a hipóxia. O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e agentes antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes, levando a uma perturbação na sinalização e no controle redox e/ou dano molecular (Sies & Jones, 2007). A GSH é o principal grupo sulfidrila não proteico encontrado em células de mamíferos. Esta normalmente em uma concentração de 1 a 10 mM, enquanto a GSSG é encontrada em uma concentração de 10 a 100 vezes menor (Rossi et al., 1995; Griffith, 1999). A GSH atua desativando radicais livres, preservando o status redox celular e defendendo o organismo contra xenobióticos (Meister, 1995a). A ativação do sistema de defesa antioxidante, incluindo aumento da atividade de enzimas antioxidantes, durante situações de depressão metabólica foi chamada de "preparo para o estresse oxidativo" (Hermes-Lima et al., 1998). Esta ativação protege o organismo durante o hipometabolismo e durante a reoxigenação/despertar de um possível estresse oxidativo.

Os objetivos deste estudo foram: analisar as possíveis respostas durante um ciclo de anoxia e reoxigenação do sistema de defesa antioxidante de *Helix aspersa* com níveis reduzidos de glutationa total (eq-GSH); e examinar a liberação de ROS em mitocôndrias isoladas de *Helix aspersa* em estivação. O metabolismo de GSH mostrou-se em nosso estudo como importante fator na manutenção do equilíbrio redox de *Helix aspersa* durante a anoxia e reoxigenação, lidando com um provável aumento de produção de ROS durante a reoxigenação. E durante a estivação, foi demonstrado que as mitocôndrias de glândula digestiva de *Helix aspersa* liberam mais H_2O_2 *in vitro*. Este aumento na liberação de ROS na mitocôndria pode estar relacionado com a indução de respostas antioxidantes, que ocorrem durante a estivação em gastrópodes terrestres em diversos estudos (Hermes-Lima & Storey, 1995; Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima, 2003; Ramos-Vasconcelos et al., 2005).

Abstract

The gastropod *Helix aspersa* (Müller) is a generalist herbivore that inhabits the Mediterranean region. The terrestrial gastropods generally go into dormant states during their life cycle. Dormancy is a form of inactivity associated with a reduction in metabolic rate, without major changes in the water status of the animal (Withers & Cooper, 2010). The terrestrial gastropods when they leave a dormant state may experience an increased production of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria (Turrens et al., 1982) leading to a potential oxidative stress (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002). About 0.1% to 2% of the normal cellular respiration *in vitro* results in formation of superoxide anion (Fridovich, 2004; Murphy, 2009; Hamanaka & Chandel, 2010). Many studies point to an increased production of ROS (Duranteau et al. 1998; Chandel et al., 1998, Wood et al. 1999; Killilea et al., 2000) during hypoxia. Oxidative stress is defined as the imbalance between pro-oxidant agents and antioxidants in favor of pro-oxidants, leading to a disruption of redox signaling and redox control and/or molecular damages (Sies & Jones, 2007). GSH is the main non-protein sulfhydryl group found in mammalian cells. It´s usually in a concentration of 1 to 10 mM, whereas GSSG is found at a concentration of 10 to 100 times lower (Rossi et al. 1995; Griffith, 1999). GSH acts by disabling free radicals, maintaining the cellular redox status and defending the body against xenobiotics (Meister, 1995a). The activation of the antioxidant defense system, including increased activity of antioxidant enzymes, during situations of metabolic depression is called "preparation for oxidative stress (Hermes-Lima et al., 1998).

This activation protects the body during hypometabolism and during recovery of a possible situation of oxidative stress. The objectives of this study were: to analyze the possible response during a cycle of anoxia and reoxygenation of the antioxidant defense system of *Helix aspersa* with reduced levels of total glutathione (GSH-eq) and to examine the release of ROS in isolated mitochondria from *Helix aspersa* in aestivation. The metabolism of GSH presented itself in our study as an important factor in maintaining the redox balance of *Helix aspersa* during anoxia and reoxygenation, dealing with a probable increase in ROS production during reoxygenation. And during aestivation, it was demonstrated that the digestive gland mitochondria of *Helix aspersa* released more H_2O_2 *in vitro*. This increased release of ROS in mitochondria may be related to induction of antioxidant responses that occur during aestivation in terrestrial gastropods in several studies (Hermes-Lima & Storey, 1995; Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima, 2003, Ramos- Vasconcelos et al., 2005).

Referências bibliográficas

ABELE, D.; GROSSPIETSCH, H.; PORTNER, H. O. Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental PO_2, temperature, H_2O_2 and H_2S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the capitellid worm *Heteromastus filiformis*. **Mar Ecol Prog Ser**, v. 163, p. 179-191, 1998.

ABELE, D.; HEISE, K.; PÖRTNER, H.O.; PUNTARULO, S. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. **J Exper Biol**, v. 205, p. 1831–1841, 2002.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Method Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AHMAD, S. Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins. In: AHMAD, S. (Ed.) **Oxidative stress and antioxidant defenses in biology**. New York: Chapman & Hall, 1995. p. 238-272.

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

ARMSTRONG, J. S.; JONES, D. P. Glutathione depletion enforces the mitochondrial permeability transition and causes cell death in Bcl-2 overexpressing HL60 cells. **FASEB J**, v. 16, p. 1263-1265, 2002.

ARNER, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Eur J Biochem**, v. 267, p. 6102-6109, 2000.

ARUOMA, A. I.; HALLIWELL B. DNA damage by free radicals: carcinogenic implications. In: BALKE, D.; WINYARD, P. G. (Eds.). **Immunopharmacology of free radical species**. Londres: Academic Press, 1995. p. 199-214.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Apoptosis control by death and decoy receptors. **Curr Opin Cell Biol**, v. 11, p. 255–260, 1999.

AULT, J. G.; LAWRENCE, D. A. Glutathione distribution in normal and oxidatively stressed cells. **Experimental Cell Research**, v. 285, p. 9–14, 2003.

BABICH, H.; PALACE, M. R.; STERN, A. Oxidative stress in fish cells: in vitro studies. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 24, p. 173-178, 1993.

BAILEY, S. E. R. Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. **Journal of Comparative Physiology**, v. 142, p. 89-94, 1981.

BARNHARDT, M. C. Gas permeability of the epiphragm of a terrestrial snail, *Otala lactea*. **Physiol Zool**, v. 56, p. 436-444, 1983.

BARNHART, M. C. Respiratory gas tensions and gas exchange in active and dormant land snails, *Otala lactea*. **Physiol Zool**, v. 59, p. 733-745, 1986.

BARNHART, M. C.; MCMAHON, B. R. Discontinuous CO_2 release and metabolic depression in dormant land snails. **J Exp Biol**, v. 128, p. 123-138, 1987.

BARNHART, M. C.; MCMAHON, B. R. Depression of aerobic metabolism and intracellular pH by hypercapnia in land snails, *Otala lactea*. **J Exp Biol**, v. 138, p. 289-299, 1988.

BARONDEAU, D. P.; KASSMANN, C. J.; BRUNS, C. K.; TAINER, J. A.; GETZOFF, E. D. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. **Biochemistry,** v. 43 (25), p. 8038–8047, 2004.

BELL, E. L.; EMERLING, B. M.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial regulation of oxygen sensing. **Mitochondrion**, v. 5, p. 322–332, 2005.

BEZEMER, T. M.; KNIGHT. K. J. Unpredictable responses of garden snail (*Helix aspersa*) populations to climate change. **Acta Oecol**, v. 22, p. 201–208, 2001.

BISHOP, T.; BRAND, M. D. Processes contributing to metabolic depression in hepatopancreas cells from the snail *Helix aspersa*. **J Exp Biol** v. 203, p. 3603–3612, 2000.

BJORNSTEDT, M.; HAMBERG, M.; KUMAR, S.; XUE, J.; HOLMGREN, A. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. **J Biol Chem**, v. 270, p. 11761-11764, 1995.

BORGSTAHL, G. E.; PARGE, H. E.; HICKEY, M. J.; BEYER JR, W. F.; HALLEWELL, R. A.; TAINER J. A. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. **Cell**, v. 71 (1), p. 107–118, 1992.

BOVERIS, A.; OSHINO, N.; CHANCE, B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochem J**, v. 128, p. 617– 630, 1972.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, v.134, p. 707–716, 1973.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. **FEBS Lett**, v. 54, p. 311–314, 1975.

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; STOPPANI, A. O. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem J**, v. 156, p. 435–444, 1976.

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

BRAND, M. D.; CHIEN, L.-F.; AINSCOW, E. K.; ROLFE, D. F. S.; PORTER, R. K. The causes and functions of the mitochondrial proton leak. **Biochim Biophys Acta**, v. 1187, p.132–139, 1994.

BRANDSCH, C.; SCHMIDT, T.; BEHN, D.; WEIßE, K.; MUELLER, A. S.; STANGL, G. I.

Glutathione deficiency down-regulates hepatic lipogenesis in rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 9:50, p. 1-8, 2010.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; AUMANN, K. D.; BLÖCKER, H.; GROSS, G.; KIESS, M.; KLÖPPEL, K. D.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; SCHUCKELT, R.; URSINI, F.; WINGENDER, E.; FLORÉ, L. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence. **J Biol Chem**, v. 269, p. 7342-7348, 1994.

BROOKS, S. P. J.; STOREY, K. B. Evidence for aestivation specific proteins in *Otala lactea*. **Mol Cell Biochem**, v. 143, p. 15–20, 1995.

BROWN, G. C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, p. 351-369, 1999.

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

BURGERING, B. M.; MEDEMA, R. H. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. **J Leukoc Biol**, v. 73, p. 689–70, 2003.

CADENAS, E. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: AHMAD, S. (Ed.). **Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology**. New York: Chapman & Hall, 1995.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 520-545.

CANESI, L.; CIACCI, C.; BETTI, M.; GALLO, G. Growth factor-mediated signal transduction and redox balance in isolated digestive gland cells from *Mytilus galloprovincialis* Lam. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 125 (C), p. 355–363, 2000.

CAPUTA, M.; NOWAKOWSKA, A.; ROGALSKA, J.; WENTOWSKA, K. Winter torpor in *Helix pomatia*: regulated defence mechanism or forced inactivity? **Can J Zool**, v. 83, p. 1608–1613, 2005.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **J Biol Chem**, v. 250, p. 5475-5480, 1975.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-490, 1985.

CHANCE, B.; BALTSCHEFFSKY, M. Spectroscopic effects of adenosine diphosphate upon the respiratory pigments of rat-heart-muscle sarcosomes. **Biochem J**, v. 68 (2), p. 283–295, 1958.

CHANDEL, N. S.; MALTEPE, E., GOLDWASSER, E., MATHIEU, C. E., SIMON, M. C., SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 5015–5019, 1998.

CHEN, J.; DELANNOY, M.; ODWIN, S.; HE, P.; TRUSH, M. A.; Yager, J.D. Enhanced

mitochondrial gene transcript, ATP, bcl-2 protein levels, and altered glutathione distribution in ethinyl estradiol-treated cultured female rat hepatocytes. **Toxicol Sci**, v.75, p. 271-278, 2003.

CHEN, Z.; LASH, L. H. Evidence for mitochondrial uptake of glutathione by dicarboxylate and 2-oxoglutarate carriers. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 285, p.608-618, 1998.

CHIA, A. J. L.; GOLDRING, C. E.; KITTERINGHAM, N. R.; WONG, S. Q.; MORGAN, P.; PARK, B. K. Differential effect of covalent protein modification and glutathione depletion on the transcriptional response of Nrf2 and NF-kB. **Biochem Pharm**, v. 80, p. 410-421, 2010.

CHU, F. F.; DOROSHOW, J. H.; ESWORTHY, R. S. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSH-Px-GI. **J Biol Chem**, v. 268, p. 2571-2576, 1993.

CHURCHILL, T. A.; STOREY, K. B. Intermediary Energy Metabolism during Dormancy and Anoxia in the Land Snail *Otala lactea*. **Physiological Zoology**, v. 62 (5), p. 1015-1030, 1989.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Glutathione and apoptosis. **Free Radical Research**, v. 42(8), p. 689-706, 2008.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Rad Biol Med**, v. 48, p. 749–762, 2010.

COHN, D. V. The enzymatic formation of oxalacetic acid by nonpyridine nucleotide malic dehydrogenase of *Micrococcus lysodeikticus*. **J Biol Chem**, v. 233, p. 299–304, 1958.

COOPER R. U.; CLOUGH, L. M.; FARWELL, M. A.; WEST., T. L. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. **J Exp Mar Biol Ecol**, v. 279, p. 1-20, 2002.

COPPOLA, S.; GHIBELLI, L. GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. **Biochem Soc Trans,** v. 28, p. 56–61, 2000.

COSTA, L. E.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Active oxygen species in the liver of rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 264, p. 1395–1400, 1993.

COTGREAVE, I. A. Analytical developments in the assay of intra and extracellular GSH homeostasis: specific protein S- glutathionylation, cellular GSH and mixed disulphide compartmentalisation and interstitial GSH redox balance. **Biofactors**, v.17, p. 269-277, 2003.

CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B. A.; Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, p. 785–789, 1995.

CZARNA, M.; JARMUSZKIEWICZ,W. Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. **FEBS Lett**, v. 579, p. 3136–3140, 2005.

DALLE-DONNE, I.; MILZANI A.; GAGLIANO, N.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.;

ROSSI, R. Molecular Mechanisms and Potential Clinical Significance of S-Glutathionylation. **Antioxidants & redox signaling**, v.10 (3), p. 445-473, 2008.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, G.; GIUSTARINI, D.; MILZANI A. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 34 (2), p. 85-96, 2009.

DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev**, v. 13, p. 2905–2927, 1999.

DE LA ASUNCION, J. G.; MILLAN, A.; PLA, R.; BRUSEGHINI, L.; ESTERAS, A.; PALLARDO, F. V.; SASTRE, J.; VINA, J. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. **Faseb J**, v.10, p. 333-338, 1996.

DENG, Y.; REN, X.; YANG, L.; LIN, Y.; WU, X. A JNK-dependent pathway is required for TNF alpha-induced apoptosis. **Cell**, v. 115, p. 61-70, 2003.

DICKISON, D. A.; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochem Pharm**, V. 64, p. 1019-1026, 2002.

DIRMEIER, R.; O'BRIEN, K. M.; ENGLE, M.; DODD, A.; SPEARS, E.; POYTON, R. O. Exposure of yeast cells to anoxia induces transient oxidative stress. Implications for the induction of hypoxic genes. **J Biol Chem**, v. 277, p. 34773–34784, 2002.

DI STEFANO, A.; FROSALI, S.; LEONINI, A.; ETTORRE, A.; PRIORA, R.; DI SIMPLICIO, F. C.; DI SIMPLICIO, P. GSH depletion, protein S-glutathionylation and mitochondrial transmembrane potential hyperpolarization are early events in initiation of cell death induced by a mixture of isothiazolinones in HL60 cells**. Biochim Biophys Acta**, v. 1763, p. 214-225, 2006.

DHANASEKARAN, D. N.; REDDY, E. P. JNK signaling in apoptosis. **Oncogene**, v. 27, p. 6245-6251, 2008.

DONG, Z.; SAIKUMAR, P.; PATEL, Y.; WEINBERG, J. M.; VENKATACHALAM, M. A. Serine protease inhibitors supress cytochrome c-mediated caspase-9 activation and apoptosis during hypoxia-reoxygenation. **Biochem J**, v. 347, p. 669-677, 2000.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, p.47-95, 2002.

DRÖSE, S.; BRANDT, U. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. **J Biol Chem**, v. 283, p. 21649–21654, 2008.

DURANTEAU, J.; CHANDEL, N. S.; KULISZ, A.; SHAO, Z.; SCHUMACKER, P. T. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. **J Biol Chem**, v. 273, p. 11619-11624, 1998.

ECHTAY, K. S.; ROUSSEL, D.; ST-PIERRE, J.; JEKABSONS, M. B.; CADENAS, S.; STUART, J. A.; HARPER, J. A.; ROEBUCK, S. J.; MORRISON, A.; PICKERING, S.;

CLAPHAM, J. C.; BRAND, M. D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. **Nature**, v. 415, p. 96–99, 2002.

FACUNDO, H. T. F.; DE PAULA, J. G.; KOWALTOWSKI, A. J. Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. **Free Radic Biol Med**, v.42, p.1039–1048, 2007.

FAN, M.; GOODWIN, M. E.; BIRRER, M. J.; CHAMBERS, T. C. The c-Jun NH(2)-terminal protein kinase/AP-1 pathway is required for efficient apoptosis induced by vinblastine. **Cancer Res**, v. 61, p. 4450-4458, 2001.

FANDREY, J.; FREDE, S.; JELKMANN, W. Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. **Biochem J**, v. 303, p. 507–510, 1994.

FERNANDES A. P.; HOLMGREN, A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system**. Antioxid Redox Signal**, v. 6, p. 63–74, 2004.

FERREIRA, M. V. R.; ALENCASTRO, A. C. R.; HERMES-LIMA, M. Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in fresh-water snails *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). **Can J Zool**, v. 81, p. 1239-1248, 2003.

FERREIRA-CRAVO, M.; WELKER, A. F.; HERMES-LIMA, M. The connection between oxidative stress and estivation in gastropods and anurans. **Prog Mol Subcell Biol**, v. 49, p. 47-61, 2010.

FIELDS, J. H. A. The effects of aestivation on the catalytic and regulatory properties of pyruvate kinase from *Helix aspersa*. **Comp Biochem Physiol**, v.102 (B), p. 77–82, 1992.

FILOMENI, G.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. **FASEB J**, v. 17, p. 64–66, 2003.

FINDLAY, V. J.; TOWNSEND, D. M.; MORRIS, T. E.; FRASER, J. P.; HE, L.; TEW, K. D. A novel role for human sulfiredoxin in the reversal of glutathionylation. **Cancer Res**, v. 66, p. 6800–6806, 2006.

FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J.L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**, v. 84, p. 131–141, 2002.

FORSTROM, J. W.; STULTS, F. H.; TAPPEL, A. L. Rat liver cytosolic glutathione peroxidase: reactivity with linoleic acid hydroperoxide and cumeno hydroperoxide. **Arch Biochem Biophys**, v. 193, p. 51-55, 1979.

FRANCO, R.; CIDLOWSKI, J.A. SLCO/OATP-like transport of glutathione in FasL-induced apoptosis: glutathione efflux is coupled to an organic anion exchange and is necessary for the progression of the execution phase of apoptosis. **J Biol Chem**, v. 281, p. 29542-29557, 2006.

FRIBERG, H.; FERRAND-DRAKE, M.; BENGTSSON, F.; HALESTRAP, A.P.; WIELOCH, T. Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. **Journal of**

Neuroscience, v.18, p. 5151-5159, 1998.

FRIDOVICH, I. 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 23, p. 239-257, 1983.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 97-112, 1995.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J Exp Biol**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

FRIDOVICH, I. Mitochondria: are they the seat of senescence? **Aging Cell**, v. 3, p. 13–16, 2004.

FUJINO, G.; NOGUCHI, T.; TAKEDA, K.; ICHIJO, H. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. **Semin Cancer Biol**, v. 16, p. 427–435, 2006.

FUJINO, G.; NOGUCHI, T.; MATSUZAWA, A.; YAMAUCHI, S.; SAITOH, M.; TAKEDA, K.; ICHIJO, H. Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. **Mol Cell Biol**, v. 27, p. 8152–8163, 2007.

GALLAGHER, E. P.; HASSPIELER, B. M.; DI GIULIO, R. T. Effects of buthionine sulfoximine and diethyl maleate on glutathione turnover in the channel catfish. **Biochem Pharmacol**, v. 43 (10), p. 2209-15, 1992.

GARCIA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. Redox regulation of hepatocyte apoptosis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, p. 38-42, 2007.

GASSMANN, M.; WENGER, R.H. HIF-1, a mediator of the molecular response to hypoxia. **News Physiol Sci**, v. 12, p. 214-218, 1997.

GHEZZI, P.; BONETTO, V.; FRATELLI, M. Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, p. 964–972, 2005.

GHEZZI, P. Regulation of protein function by glutathionylation. **Free Radic Res**, v. 39, p. 573–580, 2005.

GHYSELINCK, N. B.; JIMENEZ, C.; LEFRANCOIS, A. M.; DUFAURE, J. P. Molecular-cloning of a cDNA for androgenregulated proteins secreted by the mouse epididymis. **J Mol Endocrinol**, v. 4, p. 5–12, 1990.

GILBERT, H. J. Redox control of enzyme activities by thiol/disulfide exchange. **Methods Enzymol**, v. 107, p. 330-351, 1984.

GIUSTARINI, D.; ROSSI, R.; MILZANI, A.; COLOMBO, R.; DALLE–DONNE, I. S-Glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. **J Cell Mol Med**, v. 8, p. 201–212, 2004.

GNAIGER, E.; KUZNETSOV, A. V. Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and

cytochrome c. **Biochem Soc Trans**, v. 30, p. 252-258, 2002.

GOKCE, G.; OZSARLAK-SOZER, G.; OKTAY, G.; KIRKALI, G.; JARUGA, P.; DIZDAROGLU, M.; KERRY, Z. Glutathione Depletion by Buthionine Sulfoximine Induces Oxidative Damage to DNA in Organs of Rabbits in Vivo. **Biochemistry**, v. 48, p. 4980–4987, 2009.

GOMOT, A. Photoperiod and temperature interaction *Helix pomatia*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 581-585, 1990.

GRANGER, D. N.; RUTILI, G.; MCCORD, J. M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. **Gastroenterology**, v. 81, p. 22-29, 1981.

GRANGER, D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol** , v. 255, p. 1269-1275, 1998.

GREGORY, E. M.; FRIDOVICH, I. Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. **J Bacteriol**, v. 114, p. 543-548, 1973.

GREGORY, E. M.; GOSCIN, S. A.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eukaryote. **J Bacteriol**, v. 117, p. 456-460, 1974.

GREEN D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.

GRIFFITH, O. W.; MEISTER, A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 76, p. 5606–5610, 1979.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem**, v. 106, p. 207-212, 1980.

GRIFFITH, O. W. Mechanism of action, metabolism and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione biosynthesis. **J Biol Chem**, v. 257, p.13704– 13712, 1982.

GRIFFITH, O. W. Biological and pharmacological regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Rad Biol Med**, v. 27, p. 922-925, 1999.

GRISHKO, V.; SOLOMON, M.; BREIT, J. F.; KILLILEA, D. W.; LEDOUX, S. P.; WILSON, G. L.; GILLESPIE, M. N. Hypoxia promotes oxidative base modifications in the pulmonary artery endothelial cell VEGF gene. **FASEB J**, v. 15, p. 1267–1269, 2001.

GROMER, S.; SCHIRMER, R. H.; BECKER, K. News and views on thioredoxin reductases. **Redox Rep**, v. 4, p. 221-228, 1999.

GRUNDY, J. E.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*. **J Comp Physiol** , v. 168 (B), p. 132-142, 1998.

GUENGERICH, F. P. Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. **CRC Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 25, p. 97-153, 1990.

GUILLER, A.; MADEC L. Historical biogeography of the land snail *Cornu aspersum*: a new scenario inferred from haplotype distribution in the Western Mediterranean basin. **BMC Evol Biol**, v. 10:18, p. 1-20, 2010.

GUPPY, M.; FUERY, C. J.; FANIGAN, J. E. Biochemical principals of metabolic depression. **Comp Biochem Physiol**, v. 109 (B), p. 175-189, 1994.

GUPPY, M.; WITHERS, P. C. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalization. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v. 74 (1), p. 1-40, 1999.

GUPPY, M.; REEVES, D. C.; BISHOP, T.; WITHERS, P.; BUCKINGHAM, J. A.; BRAND, M. D. Intrinsic metabolic depression in cells isolated from the hepatopancreas of estivating snails. **The FASEB Journal**, v. 14, p.999-1004, 2000.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Glutathione s-transferases (rat and human). **Methods Enzymol**, v. 77, p. 218-231, 1981.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione s-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Meth Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HAMANAKA, R. B.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, p. 505–513, 2010.

HAMMOND C. L.; MARCHAN R.; KRANCE S. M.; BALLATORI, N. Glutathione export during apoptosis requires functional multidrug resistance-associated proteins. **J Biol Chem**, v. 282, p. 14337-14347, 2007.

HAN, D.; HANAWA, N.; SABERI, B.; KAPLOWITZ, N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 29, p. 1–7, 2006.

HAN, Y. H.; KIM, S. H.; KIM, S. Z.; PARK, W. H. Intracellular GSH levels rather than ROS levels are tightly related to AMA- induced HeLa cell death. **Chem Biol Interact**, v. 171, p. 67-78, 2008.

HAOUZI, D.; LEKEHAL, M.; TINEL, M.; VADROT, N.; CAUSSANEL, L.; LETTÉRON, P.; MOREAU, A.; FELDMANN, G.; FAU, D.; PESSAYRE, D. Prolonged, but not acute, glutathione depletion promotes Fas-mediated mitochondrial permeability transition and apoptosis in mice. **Hepatology**, v. 33, p. 1181–1188, 2001.

HARDIE, D. G. Minireview: The AMP-Activated Protein Kinase Cascade: The Key Sensor of Cellular Energy Status. **Endocrinology**, v. 144 (12), p. 5179-5183, 2003.

HARVEY, C. J.; THIMMULAPPA, R. K.; SINGH, A.; BLAKE, D. J.; LING, G.; AKABAYASHI, N.; FUJII, J.; MYERS, A.; BISWAL, S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. **Free Rad Biol Med**, v. 46, p. 443–453, 2009.

HAYES, J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radical Res**, v. 31, p. 273-300, 1999.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Role of antioxidants in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. **Am J Physiol**, v. 265, p. 646-652, 1993.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. **Am J Physiol**, v. 268, p. 1386-1393, 1995.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in the frog *Rana pipiens*. **Am J Physiol**, v. 271, p. 918-925, 1996.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Role of antioxidant defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*. **Mol Cell Biochem**, v. 189, p. 79-89, 1998.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comp Biochem Physiol**, v. 120 (B), p. 437-448, 1998.

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comp Biochem Physiol**, v. 133 (C), p. 537-556, 2002.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. (Ed.). **Functional metabolism: regulation and adaptation**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p. 319-368.

HERREID, C. F. Metabolism of land snails (*Otala lactea*) during dormancy, arousal, and activity. **Comp Biochem Physiol**, v. 56 (A), p. 211-215, 1977.

HOBBS, A.; ATTWOOD, J.; GUPPY, M. Polysome profiles in awake and aestivating snails (*Otala lactea*). Comp Biochem Physiol, v. 108 (B), p. 431–436, 1994.

HOCHACHKA, P. W.; LUTZ, P. L. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. **Comp Biochem Physiol**, v. 130 (B), p. 435-459, 2001.

HOFMANN, B.; HECHT, H.J.; FLOHE, L. Peroxiredoxins. **J Biol Chem**, v. 383, p. 347-364, 2002.

HOLMGREN, A. The function of thioredoxin and glutathione in deoxyribonucleic acid synthesis. **Biochem Soc Trans**, v. 5, p. 611-612, 1977.

HOLMGREN, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. **J Biol Chem**, v. 264, p. 13963-13966, 1989.

HOLMGREN, A.; BJÖRNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Meth Enzymol**, v. 252, p. 199-208, 1995.

HOLMGREN, A.; JOHANSSON, C.; BERNDT, C.; LONN, M. E.; HUDEMANN, C.; LILLIG, C. H. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxina systems. **Biochem Soc Trans**, v. 33, p. 1375–1377, 2005.

HÕRAK, P.; SILD, E.; SOOMETS, U.; SEPP, T.; KILK, K. Oxidative stress and information content of black and yellow plumage coloration: an experiment with greenfinches. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, p. 2225-2233, 2010.

HORNE, F. R. The utilization of foodstuffs and urea production by a land snail during estivation. **Biol Bull**, v. 144, p. 321-330, 1973.

HUANG, C. S.; CHANG, L. S.; ANDERSON, M. E.; MEISTER, A. Catalyticand regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. **J Biol Chem**, v. 268, p. 19675-19680, 1993.

HUANG, Z.; PINTO, J.T.; DENG, H.; RICHIE JR., J. P. Inhibition of caspase-3 activity and activation by protein glutathionylation. **Biochem Pharmacol**, v. 75,p. 2234–2244, 2008.

HUDSON, N. J.; LEHNERT, S. A.; INGHAM, A. B.; SYMONDS, B.; FRANKLIN, C. E.; HARPER, G. S. Lessons from an aestivating frog: sparing muscle protein despite starvation and disuse. **Am J Physiol**, v. 290, p. 836–843, 2006.

HUDSON, N. J.; LONHIENNE, T. G.; FRANKLIN, C. E.; HARPER, G. S.; LEHNERT, S. A. Epigenetic silencers are enriched in dormant desert frog muscle. **J Comp Physiol**, v. 178 (B), p.729–734, 2008.

INOUE T.; YOUSHIDA, Y.; NISHIMURA, M.; KUROSAWA, K.; TAGAWA, K. Ca^{2+} induced phospholipase-independent injury during reoxygenation of anoxic mitochondria. **Biochem Biophys Acta**, v. 1140, p. 313-320, 1993.

JESS, S.; MARKS, R. J. Effect of temperature and photoperiod on growth and reproduction of *Helix aspersa* var. *Maxima.* **J Agric Science**, v. 130, p. 367-372, 1998.

JIANG, C.; LU, H.; VINCENT, K. A.; SHANKARA, S., BELANGER, A. J.; CHENG, S. H.; AKITA, G. Y.; KELLY, R. A.; GOLDBERG, M. A.; GREGORY, R. J. Gene expression profiles in human cardiac cells subjected to hypoxia or expressing a hybrid form of HIF-1a. **Physiological Genomics**, v. 8, 23-32, 2002.

JOANISSE, D. R.; STOREY, K. B. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze tolerant wood frog. **Am J Physiol**, v. 271, p. 545- 553, 1996.

KALININA, E. V.; CHERNOV, N. N.; SAPRIN, A. N. Involvement of thio-, peroxi-, and glutaredoxins in cellular redox-dependent processes. **Biochemistry (Mosc)**, v. 73, p. 1493-1510, 2008.

KANZOK, S. M.; FECHNER, A.; BAUER, H.; ULSCHMID, J. K.; MULLER, H. M.; BOTELLA-MUNOZ, J.; SCHNEUWLY, S.; SCHIRMER, R.; BECKER, K. 2001. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 291, p. 643-646, 2001.

KERR, J. F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 6, p. 239-257, 1972.

KERSCHER, S. J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1459 (2-3), p. 274–283, 2000.

KHARBANDA, S.; SAXENA, S.; YOSHIDA, K.; PANDEY, P.; KANEKI, M.; WANG, Q.; CHENG, K.; CHEN, Y. N.; CAMPBELL, A.; SUDHA, T.; YUAN, Z. M.; NARULA, J.; WEICHSELBAUM, R.; NALIN, C.; KUFE, D. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. J Biol Chem, v. 275,p. 322-327, 2000.

KILLILEA, D. W.; HESTER, R.; BALCZON, R.; BABAL, P.; GILLESPIE, M. N. Free radical production in hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, p. 408-412, 2000.

KORNBERG, A. Enzymatic synthesis of triphosphopyridine nucleotide. **J Biol Chem**, v. 182, p. 805-813, 1950.

KORNBERG, A.; HORECKER, B. L.; SMYRNIOTIS, P. Z. Glucose-6- phosphate dehydrogenase - 6-phosphogluconic dehydrogenase. **Method Enzymol**, v. 1, p. 323-327, 1955.

KOONIN, E. V.; MUSHEGIAN, A. R.; TATUSOV, R. L.; ALTSCHUL, S. F.; BRYANT, S. H.; BORK, P.; VALENCIA, A. Eukaryotic translation elongation factor 1c contains a glutathione transferase domain - Study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. **Protein Sci**, v. 3, p. 2045-2054, 1994.

KOWALTOWSKI, A. J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 241-250, 2000.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Rad Biol Med**, v. 47, p. 333–343, 2009.

LARADE, K.; STOREY, K. B. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. In: STOREY, K.B.; STOREY, J.M. (Eds.) **Cell and molecular responses to stress**, v. 3. Amsterdam: Elsevier, 2002, p. 27–46.

LEE, H.-R.; CHO, J.-M.; SHIN, D.-H.; YONG, C. S.; CHOI, H.-G.; WAKABAYASHI, N.; KWAK, M.-K. Adaptive response to GSH depletion and resistance to L-buthionine-(S,R)-sulfoximine: involvement of Nrf2 activation. **Mol Cell Biochem**, v. 318, p. 23–31, 2008.

LENZ, A. G.; COSTABEL, U.; SHALTIEL, S.; LEVINE, R. L. Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. **Anal Biochem**, v. 177, p. 419-425, 1989.

LENAZ, G.; FATO, R.; GENOVA, M. L.; FORMIGGINI, G.; PARENTI-CASTELLI, G.; BOVINA, C. Underevaluation of complex I activity by the direct assay of NADH-coenzyme Q reductase in rat liver mitochondria. **FEBS Lett**, v. 366, p. 119–121, 1995.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LI, C.; BROWDER, W.; KAO, R. L. Early activation of transcription factor NfκB during ischemia in perfused rat heart. **Am J Physiol**, v. 276, p. 543-553, 1999.

LII, C. K.; CHAI, Y. C.; ZHAO, W.; THOMAS, J. A.; HENDRICH, S. S-thiolation and irreversible oxidation of sulfhydryls on carbonic anhydrase III during oxidative stress: a method for studying protein modification in intact cells and tissues. **Arch Biochem Biophys**, v. 308, p. 231–239, 1994.

LIU, Q.; KUPPUSAMY, P.; SHAM, J. S.; SHIMODA, L. A.; ZWEIER, J. L.; SYLVESTER, J. T. Increased production of reactive oxygen species (ROS) by pulmonary arterial smooth muscle is required for hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV). **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, p. 395, 2001.

LIU, H.; LO, C. R.; CZAJA, M. J. NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun. **Hepatology**, v. 35, p. 772-778, 2002.

LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **J Neurochem**, v. 80, p. 780–787, 2002.

LIVINGSTONE, D. R.; DE ZWAAN, A. Carbohydrate metabolism in gastropods. In: WILBUR, K. M. (Ed.). **The Mollusca**. Vol 1. New York: Academic Press, 1983.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmonths. **J Insect Physiol**, v. 10, p.643-649, 1964.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis**. Curr Top Cell Regul**, v. 36, p. 95–116, 2000.

LU, C.; ARMSTRONG, J. S. Role of calcium and cyclophilin D in the regulation of mitochondrial permeabilization induced by glutathione depletion. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 363, p. 572-577, 2007.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 42–59, 2009.

LUNDBERG, M.; JOHANSSON, C.; CHANDRA, J.; ENOKSSON, M.; JACOBSSON, G.; LJUNG, J.; JOHANSSON, M.; HOLMGREN, A. Cloning and Expression of a Novel Human Glutaredoxin (Grx2) with Mitochondrial and Nuclear Isoforms. **J Biol Chem**, v. 276, p. 26269-26275, 2001.

LUSHCHAK, V. I.; LUSHCHAK, L. P.; MOTA, A. A.; HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. **Am J Physiol**, v. 280, p. 100-107, 2001.

LUSHCHAK V. I.; BAGNYUKOVA, T. V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, J. M.; STOREY, K.B. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. **Int. J Biochem Cell Biol**, v. 37, p. 1319-1330, 2005.

LUSHCHAK, V. I.; HERMES-LIMA, M. The effect of buthionine sulfoximine on the glutathione level in goldfish tissues. **Ukr Biokhim Zh**, v. 77, p. 35-38, 2005.

LUTZ, P. L. Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain. **Annu Rev Physiol**, v. 54, p. 601-618, 1992.

MAHER, P. Redox control of neural function: background, mechanisms, and significance. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, p. 1941–1970, 2006.

MANEVICH, Y.; FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. **Free Radic Biol Med**, v. 38 (11), p. 1422-1432, 2005.

MARGIS, R.; DUNAND, C.; TEIXEIRA, F. K.; MARGIS-PINHEIRO, M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. **FEBS Journal**, v. 275, p. 3959–3970, 2008.

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.

MÅRTENSSON, J.; LAI, J.C. K.; MEISTER, A. High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, p. 7185–7189, 1990.

MARTIN, J. L. Thioredoxin - a fold for all reasons. **Structure**, v. 3, p. 245-250, 1995.

MARTINEZ-RUIZ, A.; LAMAS, S. Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: Convergences and divergences. **Cardiovasc Res**, v. 75, p. 220–228, 2007.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocuprein (Hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, p. 6049–6055, 1969.

MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **New Engl J Med**, v. 312, p. 159-163, 1985.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Meth Enzimol**, v. 251, p. 3-7, 1995a.

MEISTER, A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. **Bioch Bioph Acta**, v. 1271, p. 35-42, 1995b.

MENSHCHIKOVA, E. B.; LANKIN, V. Z.; ZENKOV, N. K.; BONDAR, I. A.; KRUGOVYKH, N. F.; TRUFAKIN, V. A. Oxidative Stress. **Prooxidants and Antioxidants**.

Moscow: Slovo, 2006.

MERAD-BOUDIA, M.; NICOLE, A.; SANTIARD-BARON, D.; SAILLE, C.; CEBALLOS-PICOT, I. Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease. **Biochem Pharmacol**, v. 56, p. 645-655, 1998.

MEREDITH, M. J.; REED, D. J. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. **J Biol Chem**, v. 257, p. 3747– 3753, 1982.

MERLO-PICH, M.; BOVINA, C.; FORMIGGINI, G.; COMETTI, C.G.; PARENTI-CASTELLI, G.; GENOVA, M. L.; MARCHETTI, M.; SEMERARO, S.; LENAZ, G. Inhibitor sensitivity of respiratory complex I in human platelets: A possible biomarker of ageing. **FEBS Lett,** v. 380 (1), p. 176–178, 1996.

MICHAELIDIS, B.; PARDALIDIS, T. Regulation of pyruvate kinase (PK) from the ventricle of the land snail *Helix lucorum* L. during early and prolonged estivation and hibernation. **Comp Biochem Physiol**, v. 107(B), p. 585–591, 1994.

MICHAELIDIS, B.; PALLIDOU, A.; VAKOUFTSI, P. Effects of anoxia on the extra and intracelular acid-base status in the land snail *Helix lucorum* (L.): Lack of evidence for a relationship between pyruvate kinase down-regulation and acid-base status. **The Journal of Experimental Biology**, v. 202, p. 1667–1675, 1999.

MICHAELIDIS, B.; KYRIAKOPOULOU-SKLAVOUNOU, P.; STAIKOU, A.; PAPATHANASIOU, I.; KONSTANTINOU, K. Glycolytic adjustments in tissues of frog *Rana ridibunda* and land snail *Helix lucorum* during seasonal hibernation. **Comp Biochem Physiol**, v.151 (A), p. 582–589, 2008.

MICHELAKIS, E. D.; HAMPL, V.; NSAIR, A.; WU, X.; HARRY, G.; HAROMY, A.; GURTU, R.; ARCHER, S. L. Diversity in mitochondrial function explains differences in vascular oxygen sensing. **Circ Res**, v. 90, p. 1307–1315, 2002.

MILLS, G. C. Hemoglobin catabolism: I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. **J Biol Chem**, v. 229, p.189-197, 1957.

MIRANDA-VIZUETE, A.; DAMDIMOPOULOS, A. E.; SPYROU, G. cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene(1). **Biochim Biophys Acta**, v. 1447 (1), p. 113-118, 1999.

MITCHELL, P.; MOYLE, J. Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria. **Nature**, v. 208, p. 147-151, 1965.

MITCHELMORE, C. L.; RINGWOOD, A. H.; WEIS, V. M. Differential accumulation of cadmium and changes in glutathione levels as a function of symbiotic state in the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. **J Exp Marine Biol Ecol**, v. 284, p. 71– 85, 2003.

MOLENAAR, D.; VAN DER REST, M. E.; PETROVIC, S. Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from

Corynebacterium glutamicum. **Eur J Biochem**, v. 254, p. 395–403, 1998.

MORIN P.; STOREY, K. B. Evidence for a reduced transcriptional state during hibernation in ground squirrels. **Cryobiology**, v. 53, p. 310–318, 2006.

MORIN, P.; DUBUC, A.; STOREY, K. B. Differential expression of microRNA species in organs of hibernating ground squirrels: a role in translational suppression during torpor. **Biochim Biophys Acta**, v. 1779, p. 628–633, 2008.

MULLER, F. L.; LIU, Y.; VAN REMMEN, H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane**. J Biol Chem**, v. 279, p. 49064–49073, 2004.

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

NAGAI, H.; MATSUMARU, K.; FENG, G.; KAPLOWITZ, N. Reduced glutathione depletion causes necrosis and sensitization to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in cultured mouse hepatocytes. **Hepatology,** v. 36, p. 55–64, 2002.

NEBERT, D. W. Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. **Biochem Pharmacol**, v. 47, p. 25-37, 1994.

NEBERT, D. W.; DIETER, M. Z. The evolution of drug metabolism. **Pharmacology**, v. 61, p. 124-135, 2000.

NICHOLLS, D. G. The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondria. **FEBS Letters**, v. 61, p. 103-110, 1976.

NIKETIC, V.; BESLO, D.; RAICEVIC, S.; SREDIC, S.; STOJKOVIC, M. Glutathione adduct of hemoglobin (Hb ASSG) in hemolysates of patients on long-term antiepileptic therapy. **Int J Biochem**, v. 24, p. 503-507, 1992.

NORBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOWAKOWSKA, A.; ŚWIDERSKA-KOŁACZ, G.; ROGALSKA, J.; CAPUTA, M. Effect of winter torpor upon antioxidant defence in Helix pomatia snails. **Can J Zool**, v. 87, p. 471-479, 2009a.

NOWAKOWSKA, A.; ŚWIDERSKA-KOŁACZ, G.; ROGALSKA, J.; CAPUTA, M. Antioxidants and oxidative stress in Helix pomatia snails during estivation. **Comp Biochem Physiol**, v. 150 (C), p. 481-485, 2009b.

NOWAKOWSKA, A.; CAPUTA, M.; ROGALSKA, J. Natural aestivation and antioxidant defence in *Helix pomatia*: effect of acclimation to various external conditions. **Journal of Molluscan Studies**, v. 76, p.354-359, 2010.

OHARA, H.; TERASIMA, T. Variations of cellular sulfhydryl content during cell cycle of HeLa cells and its correlation of cyclic change of x-ray sensitivity. **Exp Cell Res**, v. 58, p. 182–185, 1969.

OLIVEIRA, U. O.; ARAUJO, A. S. D.; BELLO-KLEIN, A.; DA SILVA, R. S. M.; KUCHARSKI, L. C. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **Comp Biochem Physiol**, v. 140 (B), p. 51-57, 2005.

OTTO, D. M.; SEN, C. K.; CASLEY, W. L.; MOON, T. W. Regulation of cytochrome P4501A metabolism by glutathione. **Pharmacol Toxicol**, v. 84 (5), p. 201-10, 1999.

OUDEJANS, R. C. H. M.; VAN DER HORST, D. J. Aerobic–anaerobic biosynthesis of fatty acids and other lipids from glycolytic intermediates in the pulmonate land snail *Cepea nemoralis* (L.). **Comp Biochem Physiol**, v. 47 (B), p. 139–147, 1974.

PAGLIA, D. E.; VALENTIN, W. N. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Labor Clin Med**, v. 70, p. 158-&, 1967.

PAKAY, J. L.; WITHERS, P. C.; HOBBS, A. A.; GUPPY, M. In vivo downregulation of protein synthesis in the snail *Helix aspersa* during estivation. **Am J Physiol**, v. 283, p. 197–204, 2002.

PANDOLFI, P. P.; SONATI, F.; RIVI, R.; MASON, P.; GROSVELD, F.; LUZZATTO, L. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. **EMBO** J, v. 14, p. 5209–5215, 1995.

PANNUNZIO, T. M.; STOREY , K. B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. **J Exp Mar Biol Ecol**, v. 221, p. 277-292, 1998.

PEDLER, S.; FUERY, C. J.; WITHERS, P. C.; FLANIGAN, J.; GUPPY, M. Effectors of metabolic depression in an estivation snail (*Helix aspersa*): whole animal and *in vitro* studies**.** **J Comp Physiol**, v. 166, p. 375-381, 1996.

PEREA, J.; GARCIA, A.; GOMEZ, G.; ACERO, R.; PENA, F.; GOMEZ, S. Effect of light and substratum structural complexity on microhabitat selection by the snail *Helix aspersa* muller. **J Mollus Stud**, v. 73, p. 39-43, 2007.

PIAS, E. K.; AW, T. Y. Early redox imbalance mediates hydroperoxide-induced apoptosis in mitotic competent undifferentiated PC-12 cells. **Cell Death Differ**, v. 9, p. 1007–1016, 2002a.

PIAS, E. K.; AW, T. Y. Apoptosis in mitotic competent undifferentiated cells is induced by cellular redox imbalance independent of reactive oxygen species production. **FASEB J**, v. 16, p. 781–790, 2002b.

PÖRTNER, H. O.; HARDEWIG, I.; LLOYD, S. P. Mitochondrial function and critical temperature in the Antarctic bivalva, *Laternula elliptica*. **Comp Biochem Physiol**, v. 124, p. 179-189, 1999.

POWIS, G.; MONTFORT, W. R. Properties and biological activities of thioredoxins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 261-295, 2001.

PROHASKA, J. R.; SUNDE, R. A. Comparison of liver glutathione peroxidase activity and mRNA in female and male mice and rats. **Comp Biochem Physiol**, v. 105 (B), p. 111-116, 1993.

PROUD, C. G. Regulation of protein synthesis by insulin. **Biochem Soc Trans**, v. 34, p. 213–216, 2006.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; JIMENEZ, L. A.; TORRES, M.; FORMAN, H. J. Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, p. 42-59, 2005.

RAMNANAN, C. J.; STOREY, K. B. Suppression of Na+K+-ATPase activity during estivation in the land snail *Otala lactea*. **J Exp Biol**, v. 209, p.677–688, 2006a.

RAMNANAN, C. J.; STOREY, K. B. Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation during hypometabolism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 339, p.7–16, 2006b.

RAMNANAN, C. J.; GROOM, A. G.; STOREY, K. B. Akt and its downstream targets play key roles in mediating dormancy in land snails. **Comp Biochem Physiol**, v. 148 (B), p. 245–255, 2007.

RAMNANAN, C. J.; STOREY, K. B. The regulation of thapsigargin-sensitive sarcoendoplasmic reticulum Ca2+-ATPase activity in estivation. **J Comp Physiol**, v.178 (B), p. 33–45, 2008.

RAMNANAN, C .J.; ALLAN, M. E.; GROOM, A. G.; STOREY, K. B. Regulation of global protein translation and protein degradation in aerobic dormancy. **Mol Cell Biochem**, v. 323, p. 9–20, 2009a.

RAMNANAN, C. J.; MCMULLEN, D. C.; GROOM, A. G.; STOREY, K. B. The regulation of AMPK signaling in a natural state of profound metabolic rate depression. **Mol Cell Biochem**, v. 335, p. 91-105, 2009b.

RAMOS-VASCONCELOS, G. R.; HERMES-LIMA, M. Hypometalism, antioxidant defenses and free radiacl metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. **J Exp Biol**, v. 206, p. 675-685, 2003.

RAMOS-VASCONCELOS, G. **Metabolismo de radicais livres em gastrópodes terrestres**. 2005. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade de Brasília, 2005.

RAMOS-VASCONCELOS, G. R.; CARDOSO, L. A.; HERMES-LIMA, M. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. **Comp Biochem Physiol** , v. 40 (C), p. 165-174, 2005.

REES, B. B.; HAND, S. C. Heat dissipation, gas exchange and acid-base status in the land sanil *Oreohelix* during short-term estivation. **J Exp Biol**, v. 152, p. 77-92, 1990.

REES, B. B.; HAND, S. C. Regulation of glycolysis in the land snail *Oreohelix* during estivation and artificial hypercapnia. **J Comp Physiol**, v. 161 (B), p. 237-246, 1991.

REES B.B.; HAND, S. C. Biochemical correlates of estivation tolerance in the mountainsnail *Oreohelix* (Pulmonata: Oreohelicidae). **Biol Bull**, v. 184, p. 230–242, 1993.

REUNER, A.; BRÜMMER, F.; SCHILL, R. O. (2008) Heat shock proteins (Hsp70) and water content in the aestivating Mediterranean grunt snail (*Cantareus apertus*). **Comp Biochem Physiol**, v. 151(B), p. 28–31, 2008.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-363, 1994.

RHEE, S. G.; KANG, S. W.; CHANG, T. S.; JEONG, W.; KIM, K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. **IUBMB Life**, v. 52, p. 35-41, 2001.

RIDDLE, W. A. Comparative respiratory physiology of a desert snail *Rabdotus schiedeanus* and a garden snail *Helix aspersa*. **Comp Bioch Physiol**, v. 56 (A), p. 369-373, 1977.

RYTER, S. W.; KIM, H. P.; HOETZEL, A.; PARK, J. W.; NAKAHIRA, K.; WANG, X.; CHOI, A. M. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxid Redox Signaling**, v. 9, p. 49–89, 2007.

ROKUTAN, K.; THOMAS, J. A.; SIES, H. Specific S-thiolation of a 30-kDa protein from rat liver under oxidative stress. **Eur J Biochem**, v. 179, p. 233–239, 1989.

ROSSI, R.; CARDAIOLI, E.; SCALONI, A.; AMICONI, G.; DI SIMPLICIO, P. Thiol groups in proteins as endogenous reductants to determine glutathione-protein mixed disulphides in biological systems. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 230-238, 1995.

RUUGE, E. K.; LEDENEV, A. N.; LAKOMKIN, V. L.; KONSTANTINOV, A. A.; KSENZENKO, M. Y. Free radical metabolities in myocardium during ischemia and reperfusion. **Am J Physiol**, v. 261, p. 81-86, 1991.

SAITOH, M.; NISHITOH, H.; FUJII, M.; TAKEDA, K.; TOBIUME, K.; SAWADA, Y.; KAWABATA, M.; MIYAZONO, K.; ICHIJO, H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. EMBO J, v. 17, p. 2596–2606, 1998.

SALWAY K. D.; TATTERSALL, G. J.; STUART, J. A. Rapid upregulation of heart antioxidant enzymes during arousal from estivation in the Giant African snail (*Achatina fulica*). **Comp Biochem Physiol**, v.157: 3 (A), p. 229-236, 2010.

SANJUAN-PLA, A.; CERVERA, A. M.; APOSTOLOVA, N.; GARCIA-BOU, R.; VICTOR, V. M.; MURPHY, M. P.; MCCREATH, K. J. A targeted antioxidant reveals the importance of mitochondrial reactive oxygen species in the hypoxic signaling of HIF-1 alpha. **FEBS Lett**, v. 579, p. 2669–2674, 2005.

SANTIAGO, A. P. S. A.; CHAVES, E. A.; OLIVEIRA, M. F.; GALINA, A. Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: Correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. **Biochimie**, v. 90 (10), p. 1566-1577, 2008.

SATTLER, W.; MAIORINO, M.; STOCKER, R. Reduction of HDL and LDL associated

cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and ebselen (PZ51). **Arch Biochem Biophys**, v. 309, p. 214-221, 1994.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med**, v. 30, p. 1191-1212, 2001.

SCHMIDT-NIELSEN, K.; TAYLOR, C. R.; SHKOLNIK, A. Desert snails: problems of heat water and food. **J Exp Biol**, v. 105, p. 320-334, 1971.

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M., DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem J**, v. 360, p. 1-16, 2001.

SHELTON, M. D.; CHOCK, P. B.; MIEYAL, J. J. Glutaredoxin: role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, p. 348-366, 2005.

SIES, H. Formation of reactive oxygen species: Introductory review. **Cryobiol**, v. 25 (6), p. 530, 1988.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur J Biochem**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic Biol Med**, v. 27, p. 916-921, 1999.

SIES, H.; JONES, D. Oxidative stress. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of Stress**. 2. ed. USA: Elsevier, Academic Press, vol 3, 2007. p. 45-48.

SINGH, I.; GULATI, S.; ORAK, J. K.; SINGH, A. K. Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury. **Moll Cell Biochem**, v. 125, p. 97-104, 1993.

SLATER, T. F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochem J**, v. 222, p. 1-15, 1984.

SMITH, R. E.; ROBERTS, J. C.; HITTELMAN, K. J. Nonphosphorylating respiration of mitochondria from brown adipose tissue of rats. **Science**, v. 154, p. 653-654, 1966.

STEPHENS, G. J.; STEPHENS, G. C. Photoperiodic stimulation of egg laying in the land snail *Helix aspers*a. **Nature**, v. 212, p. 1582, 1966.

STARKE, D. W.; CHOCK, P. B.; MIEYAL, J. J. Glutathione-thiyl radical scavenging and transferase properties of human glutaredoxin (thioltransferase). Potential role in redox signal transduction. **J Biol Chem**, v. 278, p. 14607-14613, 2003.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Metabolic Rate Depression and Biochemical Adaptation in Anaerobiosis, Hibernation and Estivation. **The Quarterly Review of Biology**, v. 65 (2), p. 145-174, 1990.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz J Med Biol Res**, v. 29, p. 1715-1733, 1996.

STOREY, K.B. Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. **Comp Bioch Phys**, v. 133 (A), p. 733-754, 2002.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. **Biol Ver**, v. 79, p. 207–233, 2004.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Putting life on 'pause' – molecular regulation of hypometabolism. **J Exp Biol**, v. 210, p. 1700–1714, 2007.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Metabolic regulation and gene expression during aestivation. **Prog Mol Subcell Biol**, v. 49, p. 25-45, 2010.

STUART, J. A.; OOI, E.-L.; BALLANTYNE, J. S. Maximal activities of enzymes of intermediary metabolism in the estivating terrestrial snail *Cepaea nemoralis*. **Comp Biochem Physiol** v. 120 (B), p. 417–423, 1998.

SUN, Q. A.; WU, Y.; ZAPPACOSTA, F.; JEANG, K. T.; LEE, B. J.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. **J Biol Chem**, v. 274 (35), p. 24522-24530, 1999.

SUN, Q. A.; KIRNARSKY, L.; SHERMAN, S.; GLADYSHEV, V. N. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 3673-3678, 2001.

TAINER, J. A.; GETZOFF, E. D.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. **Nature**, v. 306 (5940), p. 284–287, 1983.

TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D.; KOWALTOWSKI, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radic Biol Med**, v. 46 (9) p. 1283-1297, 2009.

THISSE, C.; DEGRAVE, A.; KRYUKOV, G. V.; GLADYSHEV, V. N.; OBRECHT-PFLUMIO, S.; KROL, A.; THISSE, B.; LESCURE, A. Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. **Gene Expr Patterns**, v. 3, p. 525-532, 2003.

THOMAS, J. P.; MAIORINO, M.; URSINI, F.; GIROTTI, A. W. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. **J Biol Chem**, v. 265, p. 454-461, 1990.

TODORČEVIĆ, M.; ŠKUGOR, S.; RUYTER, B. Alterations in oxidative stress status modulate terminal differentiation in Atlantic salmon adipocytes cultivated in media rich in n−3 fatty acids. **Comp Biochem Physio**, v. 156 (B), p. 309–318, 2010.

TURRENS, J. F.; FREEMAN, B. A.; LEVITT, J. G.; CRAPO, J. D. The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. **Arch Biochem Biophys**, v.

217, p. 401-410, 1982.

TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, v. 237, p. 408–414, 1985.

URSINI, F.; BINDOLI, A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. **Chem Phys Lipids**, v. 44, p. 255-276, 1987.

UTOMO, A.; JIANG, X. Z.; FURUTA, S.; YUN, J.; LEVIN, D. S.; WANG Y. C. J.; DESAI, K. V.; GREEN, J. E.; CHEN, P. L.; LEE, W. H. Identification of a novel putative nonselenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells**. J Biol Chem**, v. 279, p. 43522-43529, 2004.

UYEMURA, S. A.; LUO, S.; VIEIRA, M.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. Oxidative Phosphorylation and Rotenone-insensitive Malate- and NADH-Quinone Oxidoreductases in *Plasmodium yoelii yoelii* Mitochondria in Situ. **J Biol Chem**, v.279, p. 385–393, 2004.

VAUX, E. C.; METZEN, E.; YEATES, K. M.; RATCLIFFE, P. J. Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. **Blood**, v. 98, p. 296–302, 2001.

VON BRANT, T. Occurrence of anaerobiosis among invertebrates. **Biodynamica**, v. 4, p. 185–328, 1944.

VORHABEN, J. E.; KLOTZ, A. V.; CAMPBELL, J. W. Activity and Oxidative Metabolism of the Land Snail Helix aspersa. **Physiological Zoology**, v. 57 (3), p. 357-365, 1984.

WALSH, A. C.; MICHAUD, S. G.; MALOSSI, J. A.; LAWRENCE, D. A. Glutathione depletion in human T lymphocytes: analysis of activation associated gene expression and the stress response. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 133, p. 249–261, 1995.

WANG, J.; BOJA, E. S.; TAN, W.; TEKLE, E.; FALES, H. M.; ENGLISH, S.; MIEYAL, J. J; CHOCK, P. B. Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. **J Biol Chem**, v. 276, p. 47763-47766, 2001.

WELKER, A. F. **Efeito da flutuação da disponibilidade de oxigênio e da privação alimentar sobre o metabolismo de radicais livres**. 2009. 279 f. Tese (Doutorado em Ciências: Fisiologia Geral) - Universidade de São Paulo, 2009.

WIESER, W. Responses of *Helix pomatia* to anoxia: changes of solute activity and other properties of the haemolymph. **J Comp Physiol**, v.141 (B), p. 503–509, 1981.

WILL, O.; MAHLER, H. C.; ARRIGO, A. P.; EPE, B. Influence of glutathione levels and heat-shock on the steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 333-337, 1999.

WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle, *Trachemys scripta elegans*. **Mol Cell Biochem**, v. 170, p. 177-185, 1997a.

WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Glutathione systems and anoxia tolerance in turtles. **Am J Physiol**, v. 133 (C), p. 527-536, 1997b.

WINGERT, R. A.; GALLOWAY, J. L.; BARUT, B.; FOOTT, H.; FRAENKEL, P.; AXE, J. L.; WEBER, G. J.; DOOLEY, K.; DAVIDSON, A. J.; SCHMID, B.; PAW, B. H.; SHAW, G. C.; KINGSLEY, P.; PALIS, J.; SCHUBERT, H.; CHEN, O.; KAPLAN, J.; ZON, L. I. Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe–S clusters are required for vertebrate haem synthesis. **Nature**, v. 436, p. 1035-1039, 2005.

WITHERS, P. C.; PEDLER, S.; GUPPY, M. Physiological adjustments during aestivation by the Australian land snail, *Rhagada tescorum* (Mollusca, Pulmonata, Camaenidae). **Australian J Zool**, v. 45, p. 599-611, 1998.

WITHERS, P. C.; COOPER, C. E. Metabolic depression: a historical perspective. **Prog Mol Subcell Biol,** v. 49, p. 1-23, 2010.

WHITWAM, R. E; STOREY, K. B. Pyruvate kinase from the land snail *Otala lactea*: regulation by reversible phosphorylation during estivation and anoxia. **J Exp Biol, v.** 154, p.321–337, 1990.

WHITWAM R. E.; STOREY, K. B. Regulation of phosphofructokinase during estivation and anoxia in the land snail *Otala lactea*. **Physiol Zool**, v. 64, p. 595–610, 1991.

WOOD, J. G.; JOHNSON, J. S.; MATTIOLI, L. F.; GONZALEZ, N. C. Systemic hypoxia promotes leukocyte-endothelial adherence via reactive oxidant generation. **J Appl Physiol**, v. 87, p. 1734- 1740, 1999.

WOOD, Z. A.; SCHRODER, E.; HARRIS, J. R.; POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci**, v. 28(1), p. 32-40, 2003.

YAGER, J. Y.; BRUCKLACHER, R. M.; VANNUCI, R. C. Cerebral enrgy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in immature rats. **Am J Physiol**, v. 262, p. 672-677, 1992.

YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, K. Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. **Arch Biochem Biophys**, v. 305, p. 541-545, 1993.

ZAR, J. H. **Biostatistical analyses**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1984. 718 p.

ZHONG, L.; HOLMGREN, A. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations. **J Biol Chem**, v. 275, p. 18121-18128, 2000.

ZIMMERMANN, A. K.; LOUCKS, F. A.; SCHROEDER, E. K.; BOUCHARD, R. J.; TYLER, K. L.; LINSEMAN, D. A. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. **J Biol Chem**, v. 282, p. 29296-29304, 2007.