

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

Resumo geral

O gastrópode terrestre *Helix aspersa* (Müller) é um herbíboro 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 H₂O₂ *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 sulphhydryl 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 H₂O₂ *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).

Introdução geral

Helix aspersa, dormência e depressão metabólica

O molusco gastrópode pulmonado terrestre *Helix aspersa* (Müller) também conhecido como *Cornu aspersum* é um herbíboro 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 fotoperíodo 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 dealbatus* 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 osmobilose 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 ($\mu\text{l/h}$)	Deprimido ($\mu\text{l/h}$)	Razão (D/N)	Referência
<i>Sphincterochila boissieri</i>	4	25	393	4,8	0,01	Schmidt-Nielsen <i>et al.</i> , 1971
<i>Rabdotus schiedeanus</i>	4,5	25	563	27	0,05	Riddle, 1977
<i>Rhagada tescorum</i>	3	25	146	14,1	0,1	Withers et al., 1998
<i>Bulinus dealbatus</i>	1	22	120	20	0,17	Horne, 1973
<i>Oreohelix</i> spp.	0,3	25	55,1	9,42	0,17	Rees & Hand, 1990
<i>Helix aspersa</i>	5	27	500	100	0,2	Vorhaben et al., 1984, Pedler et al., 1996
<i>Otala lactea</i>	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 terrestres 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 transitório 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 oximiglobina; 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 antioxidant (Storey, 1996; Hermes-Lima, 2004).

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

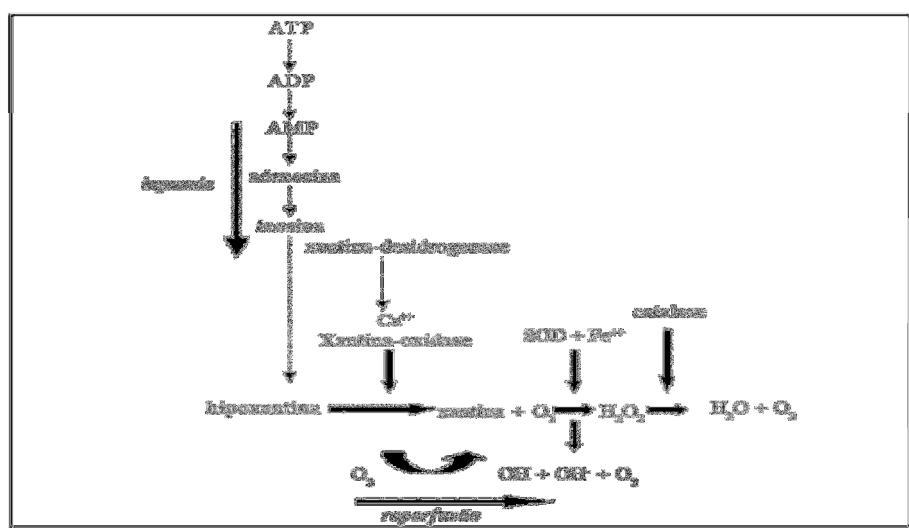
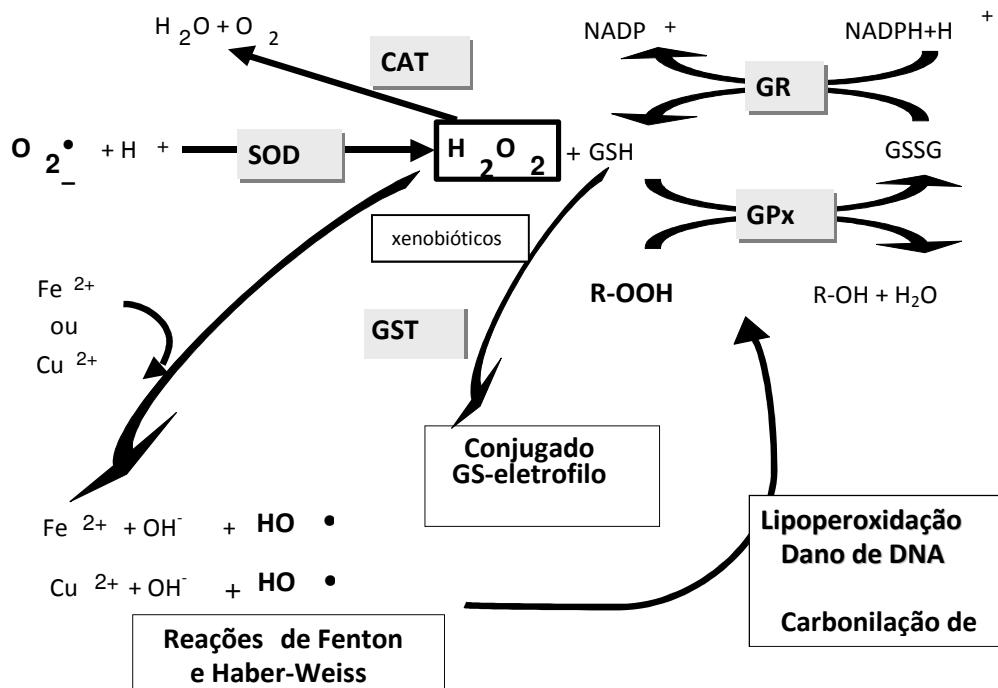


Figura 2. Via de formação de espécies pró-oxidantes e vias de detoxificação pelo sistema de defesa antioxidante enzimático.



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 espécies 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 ($\cdot OH$) 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 singlet, 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 níquel (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 encontrada no citossol de bactérias e em cloroplastos de vegetais superiores (Hermes-Lima, 2004). Já a NiSOD é encontrada em procariontes (Barondeau et al., 2004).

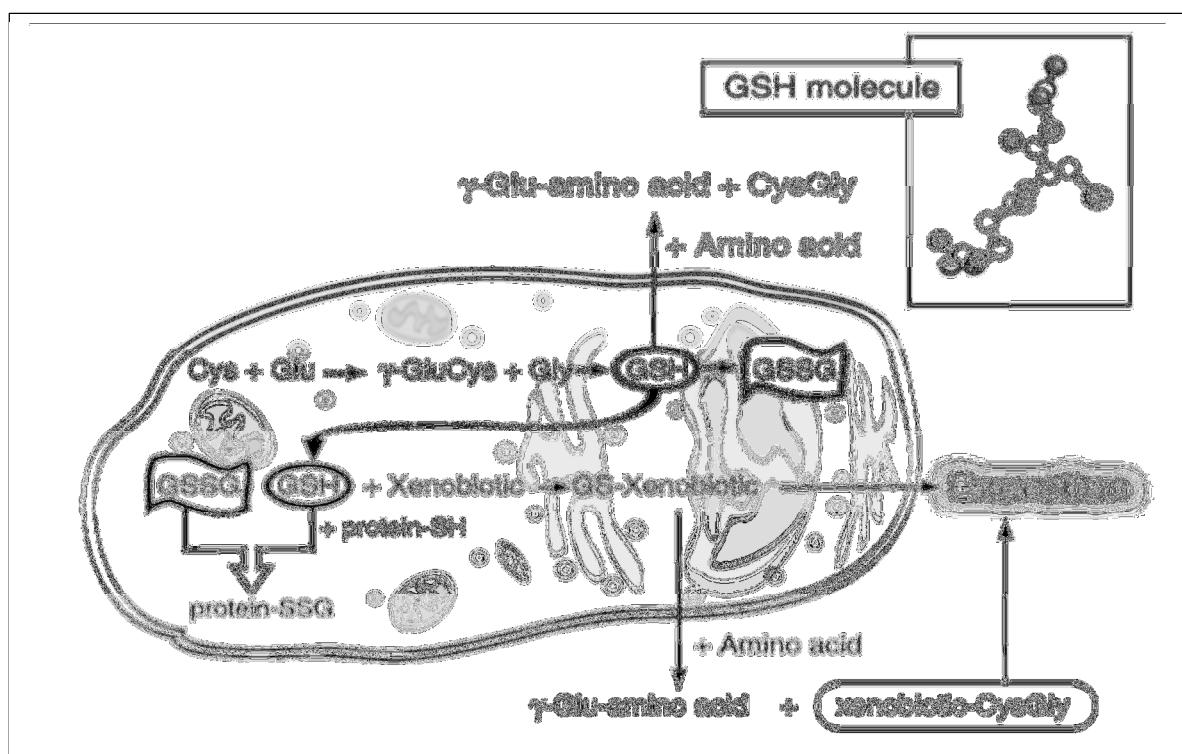
A catalase (CAT) em suas diversas formas possui o grupo prostético heme, que é geralmente acompanhando de uma molécula de NADPH (Fridovich, 1998). Decompõe o H_2O_2 em H_2O e O_2 , e existe em muitos animais, plantas, bactérias e fungos. No cérebro de vertebrados sua atividade é baixa, já em fígado, rim, tecido adiposo e hemácias sua atividade é alta (Hermes-Lima, 2004). A enzima glutationa peroxidase (GPx) descoberta 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 álcool 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 primariamente 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 H₂O₂, 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 γ -glutamato-cisteína ligase (GCL) e GSH sintetase (Griffith, 1999).

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

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

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 tradicional, 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· ou GS· (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 está 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 oxireduases dependentes de GSH. Isoformas de Grx estão presentes em praticamente todos os grupos taxonômicos e possuem alto grau de homologia em sua sequência 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.

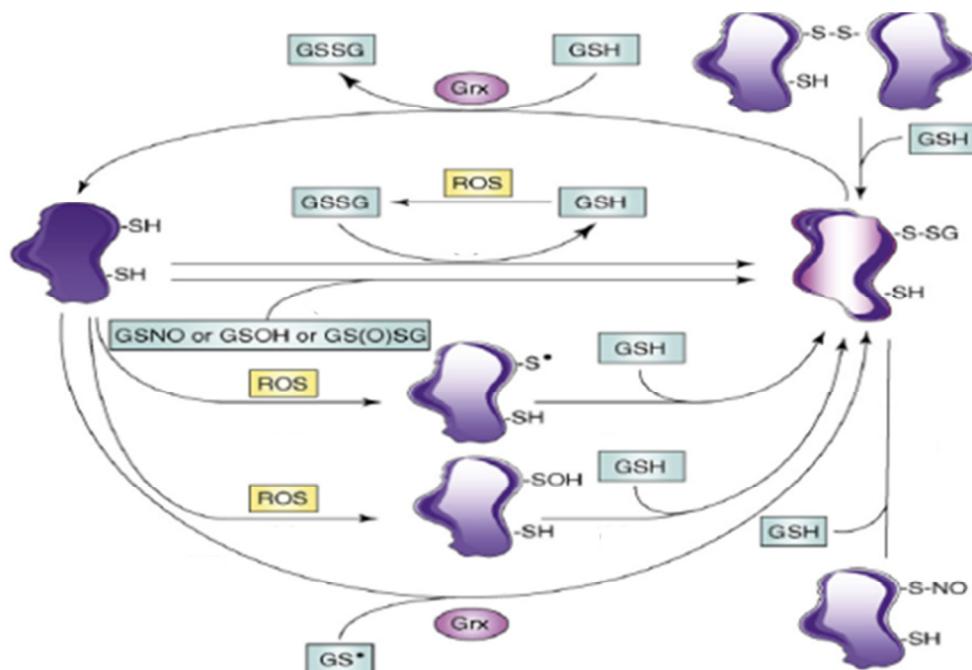
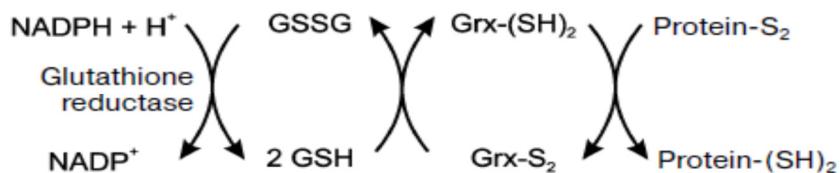


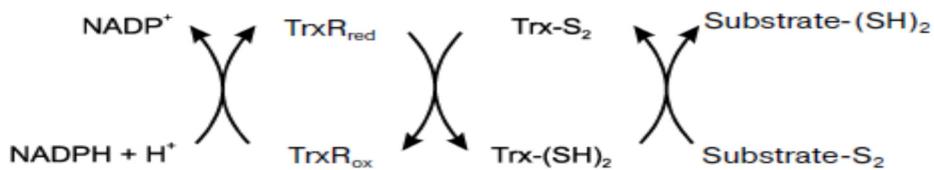
Figura 5. Reações do sistema glutaredoxina, extraído de Kalinina et al., 2008.



Três 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 procariôntes e em eucariôntes (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 H₂O₂ 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 está 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 H₂O₂ (Zhong & Holmgren, 2000; Björnstedt 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 H₂O₂, 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ (Menshchikova et al., 2006).

A família das glutationas peroxidases dependentes de selênio (Se-GPxs) reduzem H₂O₂ 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 (Neber, 1994; Neber & 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 lipoperoxidação 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 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^\cdot). 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-TBA₂ (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); TNF α /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). Contudo, 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 está ligada a ASK1 (Liu *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2003). JNK ativado por ASK1 é encaminhado para o núcleo ativa AP-1 (proteína ativadora) que ativa TNF α , 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 síntese 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 NfkB, 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 <i>Thamnophis sirtalis parietalis</i>	Anóxia por 10 h (5°C)	↑ SOD e GSH
Anfíbio anuro <i>Rana pipiens</i>	Anóxia por 30 h (5°C)	↑ catalase, Se-GPX e GST
Tartaruga <i>Trachemys scripta</i>	Anóxia por 20 h (5°C)	↑ GR
Peixe <i>Carassius auratus</i>	Anóxia por 8 h	↑ catalase, G6PDH e Se-GPX
Caranguejo <i>Chasmagnathus granulata</i>	Anóxia por 8 h	↑ catalase e GST
Gastrópode aquático <i>Biomphalaria tenagophila</i>	Anóxia por 24 h (26-27°C)	↑ Se-GPX e ↓ catalase
Gastrópode marinho <i>Littorina littorea</i>	Anóxia (6 dias)	↑ GSH-eq
Peixe <i>Cyprinus carpio</i>	Hipóxia por 5 h	↑ catalase e Se-GPX

Animal	Estresse fisiológico	Preparo para o estresse oxidativo
Peixe <i>Leiostomus xanthurus</i>	Hipóxia por 12 h	↑ atividade de SOD
Poliqueto <i>Heteromastus filiformis</i>	Hipóxia	↑ catalase
Anuro <i>Rana pipiens</i>	Desidratação severa	↑ Se-GPX e catalase e ↓ SOD e GR
Anuro <i>Rana sylvatica</i>	Congelamento (24 h)	↑ Se-GPX e GST
Serpente <i>Thamnophis sirtalis parietalis</i>	Congelamento (5 h)	↑ catalase e Se-GPX
Gastrópode terrestre <i>Otala lactea</i>	Estivação (30 dias)	↑ catalase, Se-GPX, SOD e GST
Gastrópode aquático <i>Biomphalaria tenagophila</i>	Estivação (15 dias)	↑ Se-GPX e ↓ SOD
Gastrópode terrestre <i>Helix aspersa</i>	Estivação (20 dias)	↑ Se-GPX e ↑[GSH-eq]

Conclusões

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 músculo 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.

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-1 α .

O presente estudo demonstra que durante a estivação, as mitocôndrias de glândula digestiva de *Helix aspersa* liberam mais H₂O₂ *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*.

Referências bibliográficas

ABELE, D.; GROSSPIETSCH, H.; PORTNER, H. O. Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental PO₂, temperature, H₂O₂ and H₂S 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 epiphramg 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 CO₂ 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.; URSPINI, 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- κ B. **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 suppress 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.; CIRIOLI, 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.; SAITO, 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.; DUFRAURE, 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.; GUTTERIDGE, 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.; LÖNN, M. E.; HUDEMANN, C.; LILLIG, C. H. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. **Biochem Soc Trans**, v. 33, p. 1375-1377, 2005.

HÖRAK, 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. Catalytic and 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.; YOSHIDA, Y.; NISHIMURA, M.; KUROSAWA, K.; TAGAWA, K. Ca²⁺ 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-, peroxy-, 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 NfkB 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 sulphhydryls 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 silkworms. **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 intracellular 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-SKLABOUNOU, 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 sulphydryl 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. Hypometabolism, 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.; CARDIOLI, 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.

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

SCHAFFER, 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.; CHOKE, 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 aspersa*. **Nature**, v. 212, p. 1582, 1966.

STARKE, D. W.; CHOKE, 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.; URSPINI, 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.

URSPINI, 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 non-selenocysteine 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.