

FELIPE DIEGO MEDEIROS DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO REDOX EM TARDÍGRADOS
DURANTE A ANIDROBIOSE**

Brasília (DF)
2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA MOLECULAR

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO REDOX EM TARDÍGRADOS
DURANTE A ANIDROBIOSE

Felipe Diego Medeiros de Sousa

Dissertação apresentada como requisito à
obtenção do grau de Mestre em Biologia
Molecular.

Orientador: Doutor Marcelo Hermes Lima

Brasília (DF)
2025

FOLHA DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha gratidão ao meu querido orientador, Prof. Marcelo Hermes Lima. Desde o início, quando eu ainda não sabia diferenciar uma pipeta de uma ponteira, o senhor me acolheu no laboratório e abriu portas para o meu crescimento. Obrigado por todo apoio, incentivo e por acreditar que tudo daria certo! Além de um grande profissional, sua generosidade e ensinamentos vão muito além do ambiente acadêmico. Agradeço também ao Daniel Moreira, uma das minhas maiores inspirações na ciência. Obrigado por sempre estar disposto a ensinar, acompanhar e instigar a pensar fora da caixinha. Você foi uma das pessoas que fizeram esse projeto acontecer. Minha gratidão se estende à Marina Minari, minha amiga de jornada e parceira de laboratório. Obrigado por me ouvir, compartilhar experiências, pelo seu companheirismo e por me ajudar a manter o foco sempre que precisei. Sou imensamente grato também ao LIMI, especialmente à Professora Kelly Grace, pelos ensinamentos, orientações e por permitir que uma parte essencial deste trabalho fosse realizada com seus alunos. Aos amigos do LIMI — Sarah, Pasquarelli, Sabrina, Helô, Calixto, Júlia, Nathalinha, Ramon e tantos outros —, meu sincero obrigado! Vocês me ajudaram, ensinaram, testaram experimentos com meus “tardigrinhos” e tornaram esse percurso muito mais leve e feliz. Grande parte dos resultados só foi possível graças a vocês. Aos meus amigos Igor, Nathália e Gabriel Ribeiro, que, mesmo não estando no mesmo laboratório, foram muito especiais ao longo desse processo, sou profundamente grato. Os conselhos e direcionamentos que compartilharam comigo serão sempre lembrados. Agradeço à Professora Élide, por sua paciência pra ouvir minhas dúvidas, por disponibilizar seu laboratório, compartilhar ideias e incentivar a seguir firme. E ao professor Carlos André Ricart, pela intenção e disponibilidade em colaborar com esse trabalho.

Sem esquecer da minha família e amigos de fora da academia. Obrigado, minha mãe, Ivete, meu pai, Lourivaldo e minha avó, Eloina, por serem exemplos de luta, por me proporcionarem uma boa educação e por me apoiarem incondicionalmente, mesmo sem compreenderem todos os detalhes da minha pesquisa. Obrigado por sempre me fazerem sentir amado e acreditado por vocês e pelos meus irmãos, Milena e Albert. Aos meus tios queridos, Esdras Maria e André, meus segundos pais, agradeço por todo amor, apoio e pela certeza de que sempre poderia contar com vocês. Meu grande amigo Tanus, obrigado por sua amizade, carinho e generosidade. Você é uma das minhas inspirações de vida e tornou esse percurso mais leve, sempre me ouvindo, me compreendendo e ajudando a enxergar o outro lado da moeda. Um agradecimento especial também aos seus doguinhos, Aloha e

Lordinho, que alegraram tantos momentos com muito amor e fofura. Agradeço aos meus amigos-irmãos Silvio Vicelli e Rayssa Oliveira. Obrigado por estarem ao meu lado desde sempre, me ouvindo, apoiando e acreditando, até mesmo quando eu duvidava. Obrigado ainda ao Pedro Lima, Tia Eli, Adê, Tia Wall, Naninha, vocês são amigos queridos com quem sei que posso contar sempre, além de tornar tudo mais leve e feliz.

Por fim, gostaria de agradecer à Universidade de Brasília, por viabilizar o meu projeto, por meio de espaço, equipamentos e conhecimento intelectual dos professores, alunos e corpo técnico da instituição. Agradecer ao Chiquinho, técnico do nosso departamento que estava sempre disposto a ajudar. E ainda às agências de fomento: CAPES, FAPDF e CNPq, pelo investimento no meu trabalho.

A todos vocês, minha eterna gratidão!

RESUMO

Os tardígrados são organismos extremófilos capazes de resistir a condições ambientais severas, como dessecação, pressão e temperaturas extremas, radiação e hipóxia. Esses animais conseguem sobreviver sob essas condições por meio do processo de anidrobiose, em que perdem quase toda a água do corpo, e entram no estado hipometabólico de *tun*. Durante a transição entre os estados ativo e *tun*, esses organismos enfrentam intenso estresse oxidativo devido à alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tornando os sistemas antioxidantes essenciais para a sobrevivência. O presente estudo investigou o papel da catalase e da glutathiona, antioxidantes da defesa primária, na regulação da homeostase redox em tardígrados *Paramacrobiotus cf. centesimus* submetidos ao processo de anidrobiose. Antes de entrarem no estado de *tun*, os animais foram tratados com aminotriazol (ATZ) e butionina sulfoximina (BSO), inibidores de catalase e glutathiona, respectivamente. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos da inibição farmacológica desses antioxidantes (CAT e GSH) na recuperação pós-reidratação em tardígrados *P. centesimus*, a fim de compreender a importância que essas moléculas têm no retorno do *tun*. A taxa de sobrevivência dos organismos foi avaliada, assim como a atividade de catalase e os níveis de glutathiona e a ocorrência de danos oxidativos a proteínas. Também foi monitorada a produção de EROs por meio de fluorescência com o marcador DCF-DA pelo sistema CELLCYTE e por microscopia confocal. Os resultados demonstraram que os tardígrados *P. centesimus* utilizam a estratégia de “preparo para o estresse oxidativo” (POS) para sair do estado de *tun*, aumentando os níveis de catalase e glutathiona. Também foi demonstrado que a inibição de ambos antioxidantes comprometem significativamente a recuperação dos tardígrados, possivelmente pelo acúmulo de peróxidos e proteínas carboniladas, indicativos de estresse oxidativo. A fluorescência do DCF-DA confirmou que os grupos submetidos à inibição combinada com *tun* apresentaram os maiores níveis de EROs, evidenciando que esses sistemas antioxidantes atuam de maneira interdependente para garantir a viabilidade celular. Esse estudo demonstra, pela primeira vez, que o mecanismo POS não é apenas um fator auxiliar, mas uma condição fundamental para a sobrevivência dos tardígrados submetidos à dessecação. A ativação antecipada das defesas antioxidantes durante a anidrobiose permite a retomada da atividade metabólica e evita danos irreversíveis. Os achados deste estudo reforçam a importância dos sistemas antioxidantes para a manutenção da vida em organismos extremófilos e contribuem para um melhor entendimento da adaptação de animais ao estresse oxidativo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH	Radical Hidroxila
°C	Celsius
ATP	Adenosina Trifosfato
ATZ	3-amino-1,2,4-triazol
BSO	Butionina Sulfoximina
CAHS	<i>Cytoplasmic Abundant Heat-Soluble Proteins</i>
CAT	Catalase
Cf.	<i>Confer</i> /Similaridade
CO₂	Dióxido de Carbono
COI	<i>Cytochrome c Oxidase Subunit</i>
CTRL	Grupo Controle
DCF-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNPH	2,4-dinitrofenil-hidrazina
Dsup	<i>Damage Suppressor Protein</i>
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESR	Ressonância de Spin Eletrônico
Fe	Ferro
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Dissulfeto
GST	Glutathione S-Transferase
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HCL	Ácido Clorídrico
HIF-1	Fator Induzido por Hipóxia 1
HSPs	Proteínas de Choque Térmico
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant</i>
MAHS	<i>Mitochondrial Abundant Heat-Soluble Proteins</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

Milli-Q	Água Ultrapura
mM	Milimolar
MT	Metalotioneínas
N	Tamanho da amostra
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NHEJ	Junção de Extremidades Não Homólogas
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2–related factor 2</i>
O₂	Oxigênio
O₂^{•-}	Ânion Superoxido
p	Valor de p
p/v	Peso/Volume
pH	Potencial de Hidrogênio
PM	Peso Molecular
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
POS	Preparo para o Estresse Oxidativo

PRX	Peroxirredoxinas
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	RNA de Interferência
rRNA	RNA ribossômico
SISBIO	Sistema de Autorização e Informações em Biodiversidade
SOD	Superóxido Dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
tGSH	Glutationa Total
TNB	5-tio-2- nitrobenzóico
Uv-Vis	Espectroscopia de Ultravioleta e Visível
γ-GCS	γ -glutamilcisteína sintetase
μL	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA FIGURAS E IMAGENS

- Figura 1: Evolução do conteúdo de oxigênio atmosférico da Terra ao longo do tempo.** A curva vermelha desbotada mostra uma visão clássica da evolução atmosférica (pO_2 , pressão parcial atmosférica de O_2) (Lyons et al. 2014). 17
- Figura 2 : Principais vias de geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio.** Diagrama ilustrando as vias da CAT, SOD e GSH envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo (Moreira 2018). 20
- Figura 3 : Estrutura da catalase:** a estrutura foi determinada com uma resolução de 3,2 Å, usando uma técnica chamada MicroED (Nannenga et al., 2014 modificado) 24
- Figura 4 : Ciclo de reação da catalase:** começa com o estado férrico (FeIII) de alto spin, que reage com uma molécula de peróxido para formar o intermediário Composto I, um radical cátion π de porfirina contendo FeIV. Um dos prótons da molécula de peróxido de hidrogênio é removido de uma extremidade da molécula e colocado na outra extremidade. O próton é transferido por meio de um resíduo de histidina no sítio ativo. Essa ação polariza e quebra a ligação O-O no peróxido de hidrogênio. Na etapa seguinte, uma segunda molécula de peróxido de hidrogênio é usada como redutora para regenerar a enzima, produzindo água e oxigênio. A oxidação de um doador de elétrons (aqui, o segundo H_2O_2) retorna o Composto I, uma espécie altamente oxidante de Fe(IV), ao estado de repouso nativo Fe(III) (Goyal and Basak 2010)... 25
- Figura 5 : 3-amino- 1,2,4-triazol** 27
- Figura 6: Reações entre a catalase e o aminotriazol:** As constantes de velocidade são: $k_1 = 6 \times 10^8 M^{-1} seg^{-1}$, $k_2 = 10^{-2} seg^{-1}$, $k_4 = 6 \times 10^{-4} seg^{-1}$, $k_4'' = 4 \times 10^{-2} seg^{-1}$, $K_d = 0,06 M$, $K_m = 0,16 M$, $k_4' = 4 \times 10^{-3} seg^{-1}$ estimado. A temperatura foi mantida a 20°C e o pH em 5,4. Adaptado de (Nicholls 1962) 27
- Figura 7 : Estrutura da Glutathione (GSH)** (El-Beltagi and Mohamed 2013) 30
- Figura 8: O mecanismo de ação da Glutathione.** (Jefferies et al. 2003) 31
- Figura 9 : Estrutura do BSO, de acordo com Griffith & Meister (1979)** 32
- Figura 10 : Metabolismo da glutathione em células hepáticas.** A figura mostra a biossíntese de GSH e os destinos de GSH e GSSG (Hermes-Lima 2004)..... 33
- Figura 11: Ligação de substratos e inibidores aos sítios ativos das sintetases** (Griffith 1989)... 34
- Figura 12: Apresentações pictóricas iniciais de tardígrados: (A)** O pequeno urso d'água. De Goeze (1773). **(B) O animalzinho-urso.** De Müller (1785). Adaptado de (Møbjerg et al. 2018). 35
- Figura 13 : Relações entre Ecdysozoa.** A linha pontilhada e o ponto de interrogação indicam o debate recente sobre a posição filogenética dos tardígrados. (Møbjerg et al. 2018). 36
- Figura 14 : Diversidade estrutural dos tardígrados:** microscopia eletrônica de varredura de representantes adultos selecionados de eutardígrados, equiniscoídeos e artrotardígrados. Note a diferença no tamanho geral, assim como na morfologia. (a) Vista ventral do eutardígrado semiterrestre *Richtersius coronifer* de Öland, Suécia. (b) Vista dorsal do tun anidrobiótico de *R. coronifer*. Depressões na cutícula indicam os locais de fixação dos músculos dorsais. (c) Vista ventrolateral do equiniscoídeo marinho *Isoechiniscoides sifae*. (d) Vista ventral do artrotardígrado marinho *Actinartetus cf. doryphorus*. Barra de escala = 100 μm . (Møbjerg et al. 2018) 37
- Figura 15 : Diversidade estrutural dos tardígrados:** Microscopia óptica de diferentes eutardígrados, com exemplos de espécies representando diversas famílias dentro das duas ordens de eutardígrados, *Parachela* e *Apocheila*. (a) Fêmea de *Ramazzottius cf. oberhaeuseri* (*Parachela*, Ramazzottiidae), um criptobionte altamente resistente, com tolerância extrema a

uma variedade de condições adversas. A população partenogenética atual vive em sedimentos dentro de uma calha de telhado. Observe a coloração intensa do animal — uma característica típica de espécies semiterrestres. (b) Fêmea de *Hypsibius exemplaris* (*Parachela*, Hypsibiidae), linhagem *Sciento*. *H. exemplaris* é um tardígrado de água doce (límnico) com habilidades criptobióticas moderadas. Note a presença de algas (verdes) no intestino médio. (c) O grande e amarelo *Richtersius coronifer* (*Parachela*, Richtersiidae) é um criptobionte semiterrestre. Observe os coelomócitos, que conferem a essa espécie sua coloração amarelada característica. (d) Fêmea de *Milnesium tardigradum* (*Apocheila*, Milnesiidae). O grande *M. tardigradum* semiterrestre é carnívoro e um criptobionte altamente resistente. Abreviações: bu = tubo bucal, ce = coelomócito, ey = olho, mg = intestino médio, ph = bulbo faríngeo com placoides, st = estilete. Barras de escala: 100 µm. (Møbjerg et al. 2018).....38

Figura 16 : Distribuição geográfica das espécies do gênero *Paramacrobiotus*. (Kayastha et al. 2023).44

Figura 17 : Imagens da espécie em descrição: *Paramacrobiotus* cf. *centesimus* A: Habitus, indivíduo coletado para identificação; B: Ovo não-fecundado; C: Ovo em microscopia eletrônica de varredura. Imagens de A e B em microscopia de contraste de fase. Escalas de A e B: 100 µm e 50 µm respectivamente. Imagens obtidas em parceria com Victor Renan de Paula, integrante do Laboratório de Desenvolvimento e Metamorfose de Díptera, da UnB.....46

Figura 18 : *Paramacrobiotus* cf. *centesimus* em estado hidratado. DM500 microscope. Imagem obtida em parceria com o Laboratório de Desenvolvimento e Metamorfose de Díptera.47

Figura 19 : Local de coleta: Imagem planimétrica do Campus Darcy Ribeiro, com foco na região do Memorial Darcy Ribeiro (Beijódromo) e imagem horizontal das árvores (Latitude - 15°45'32.5850", Longitude -47°52'3.1310"). Fonte: SEMA/UnB e imagem do autor.....50

Figura 20 : Coleta de musgo para isolamento de tardígrados: (A) Etapa de raspagem do troco de árvores utilizando espátula metálica e (B) Musgo armazenados em sacos plásticos do tipo ziplock para transporte e posterior tratamento em laboratório. Imagens do autor.....51

Figura 21 : Imagens da etapa de triagem dos animais: (A e B) musgos sendo hidratados para posterior triagem; (C) tardígrados encontrados nos musgos após o período de hidratação, observação pelo estereoscópio (aumento de 30x). Imagens obtidas em nosso laboratório.52

Figura 22 : Protocolo de indução a anidrobiose:No laboratório, os musgos coletados eram hidratados em placas de Petri por 2 a 3 horas, permitindo o desprendimento dos tardígrados. Após remoção do musgo, a solução era analisada sob estereoscópio para triagem dos animais, que eram transferidos para lâminas côncavas com 200 µL de água filtrada. Em seguida, eram mantidos por 24 horas em um ambiente úmido (~99%), seguido da fase de desidratação em baixa umidade (~30-35%) por mais 24 horas, até entrarem em estado de *tun* (anidrobiose), logo em seguida eram reidratados.....53

Figura 23 : Tardígrados em diferentes etapas do protocolo experimental: (A) tardígrado ativo após a triagem; (B) tardígrados em anidrobiose (estado de *tun*); (C) tardígrados reidratados após a anidrobiose. Escalas de a: 100 µm, b e c: 50 µm respectivamente. Imagens do autor. .53

Figura 24 : Protocolo de tratamento com inibidores (ATZ 0,3mM e BSO 0,25mM) e indução à anidrobiose:Protocolo de tratamento com inibidores e indução à anidrobiose: animais expostos por 24 horas a inibidores (BSO ou ATZ), lavagem dos animais para remoção total dos inibidores, manutenção em ambiente úmido (~99%) por 24 horas, desidratação em baixa umidade (~30-35%) por 24 horas até a indução do estado de *tun* (anidrobiose), seguida da reidratação dos animais.54

Figura 25 : Sobrevivência de tardígrados em relação à concentração de BSO (butionina sulfóxina): A inibição da síntese de glutatona pelo BSO resulta em uma redução progressiva da sobrevivência conforme a concentração do inibidor aumenta. A diminuição da viabilidade

sugere a importância da glutathione na resposta antioxidante e na proteção celular contra o estresse oxidativo induzido pela anidrobiose. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n = 15). 61

Figura 26 : Sobrevivência de tardígrados em relação à concentração de ATZ: A inibição da catalase pelo ATZ impacta a sobrevivência dos organismos, indicando o papel dessa enzima na neutralização do peróxido de hidrogênio gerado durante a transição entre os estados hidratado e *tun*. No entanto, o efeito observado é menos pronunciado do que o do BSO, sugerindo que outros mecanismos antioxidantes podem compensar a inibição da catalase. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n = 15). 62

Figura 27 : Atividade da enzima catalase (CAT) em tardígrados submetidos a diferentes condições experimentais: No gráfico A, a comparação entre os grupos indica o efeito do ATZ (3-amino-1,2,4-triazol), um inibidor da catalase, antes e após a indução ao estado de *tun*. No gráfico B, a atividade da catalase é comparada entre os grupos controle e aqueles expostos ao BSO, que inibe a síntese de glutathione. Os grupos são: Ctrl: que não passou por anidrobiose, apenas 24 horas em água, Pós tun: animais que passaram por anidrobiose sem inibidor, 24h ATZ / 24h BSO: animais que ficaram 24 horas no inibidor, Pós Tun ATZ / BSO: que passaram por inibição, seguida de anidrobiose. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. 64

Figura 28 : Níveis de glutathione total (tGSH) em tardígrados sob diferentes condições experimentais: No gráfico A, observa-se o impacto da inibição da catalase (ATZ) sobre a regulação da glutathione antes e após a indução ao *tun*. No gráfico B, o efeito da inibição da síntese de glutathione pelo BSO é avaliado, com destaque para a resposta dos organismos à anidrobiose. Os grupos são: Ctrl: que não passou por anidrobiose, apenas 24 horas em água, Pós tun: animais que passaram por anidrobiose sem inibidor, 24h ATZ / 24h BSO: animais que ficaram 24 horas no inibidor, Pós Tun ATZ / BSO: que passaram por inibição, seguida de anidrobiose. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. 64

Figura 29 : Níveis de proteínas carboniladas em tardígrados expostos a diferentes condições experimentais: No gráfico A, a comparação entre os grupos evidencia o impacto da inibição da catalase (ATZ) sobre a oxidação proteica antes e após o *tun*. No gráfico B, a inibição da síntese de glutathione pelo BSO e sua influência na carbonilação proteica são analisadas. Os grupos são: Ctrl: que não passou por anidrobiose, apenas 24 horas em água, Pós tun: animais que passaram por anidrobiose sem inibidor, 24h ATZ / 24h BSO: animais que ficaram 24 horas no inibidor, Pós Tun ATZ / BSO: que passaram por inibição, seguida de anidrobiose. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. 65

Figura 30 : Perfil de fluorescência ao longo de 24 horas, indicando a produção de espécies reativas de oxigênio em tardígrados tratados com BSO 0,25 mM (linha rosa) e ATZ 0,05 mM (linha azul), comparados ao grupo Pós Tun (linha verde). A fluorescência foi monitorada utilizando o marcador DCF-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) e o sistema de imagem CELLCYTE XTM (CYTENA). A variação nas barras de erro pode estar associada ao movimento dos animais durante o despertar. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n = 20). 66

Figura 31 : Ensaio de fluorescência para validação dos padrões de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em tardígrados tratados com ATZ 0,3mM (linha rosa escura) e ou adição de inibidor (linha rosa clara; grupo CTRL, Tun): A fluorescência foi quantificada com DCF-DA e monitorada ao longo de 6 horas, reforçando a tendência observada no primeiro experimento. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n = 20). 67

Figura 32 : Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por microscopia confocal: Fluorescência do DCF-DA em tardígrados submetidos a diferentes condições experimentais,

detectada por microscopia confocal. Os grupos são: CTRL: que não passou por anidrobiose, apenas 24 horas em água, TUN: animais que passaram por anidrobiose sem inibidor, ATZ: animais que ficaram 24 horas no inibidor, ATZ *TUN*: que passaram por inibição, seguida de anidrobiose. A concentração de ATZ foi de 0,3 mM. A autofluorescência foi analisada no canal de 460 nm para maior precisão. As imagens foram obtidas por microscopia confocal a (n = 5). Imagens obtidas em parceria com com Sarah Pinho e Gabriel Calixto, integrante do Laboratório de Imunologia e Inflamação, UnB. 68

Figura 33 : Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após inibição da glutathione:

Fluorescência do DCF-DA em tardígrados submetidos a diferentes condições experimentais, detectada por microscopia confocal. A imagem em Brightfield confirmou a integridade tecidual, sem danos morfológicos evidentes. Os grupos são: CTRL: que não passou por anidrobiose, apenas 24 horas em água, TUN: animais que passaram por anidrobiose sem inibidor, BSO: animais que ficaram 24 horas no inibidor, BSO *TUN*: que passaram por inibição, seguida de anidrobiose. (n = 5). Imagens obtidas em parceria com com Sarah Pinho e Gabriel Calixto, integrante do Laboratório de Imunologia e Inflamação, UnB 70

Figura 34: Resumo dos locais de inibição nas via metabólicas e seus efeitos sobre os

tardígrados: O BSO inibe a síntese de GSH (glutathione), afetando o equilíbrio redox celular, enquanto o ATZ interfere na atividade da catalase, comprometendo a degradação de peróxido de hidrogênio. Essas inibições demonstram os efeitos moduladores sobre os sistemas antioxidantes celulares. 82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Metabolismo Redox	17
1.2	Preparo para o Estresse Oxidativo (POS)	21
1.3	Catalase e Aminotriazol.....	23
1.4	Glutathiona e Butionina sulfoximina	29
1.5	Tardígrados	34
1.6	Anidrobiose.....	41
2	ESPÉCIE DE TARDÍGRADO ESTUDADA	44
3	JUSTIFICATIVA	47
4	OBJETIVOS.....	49
5	METODOLOGIA	49
5.1	Local de coleta	49
5.2	Captura e triagem dos animais.....	51
5.3	Indução à anidrobiose.....	52
5.4	Preparo de Extrato Proteico para Catalase e Proteínas Totais	54
5.5	Preparo de Extrato para Glutathiona Total.....	55
5.6	Ensaio bioquímico.....	55
5.6.1	Catalase.....	55
5.6.2	Proteínas Carboniladas	56
5.6.3	Níveis de Glutathiona Total (tGSH).....	57
5.6.4	Quantificação de proteínas	58
5.6.5	Análises Estatísticas	58
5.7	Monitoramento de EROS por fluorescência	59
5.8	Deteção de EROS por microscopia confocal.....	59
6	RESULTADOS	60
6.1	Curva de sobrevivência	60
6.2	Ensaio bioquímico.....	62
6.2.1	Atividade de Catalase	63
6.2.2	Níveis de Glutathiona Total (tGSH).....	64

6.2.3	Proteínas carboniladas	65
6.3	Monitoramento de EROS por fluorescência	66
6.4	Detecção de EROS por Microscopia Confocal.....	67
6.4.1	Detecção de EROS por Microscopia Confocal com inibição de por ATZ 0,3 mM.....	67
6.4.2	Detecção de EROS por Microscopia Confocal com inibição de por BSO 0,25mM.....	69
7	DISCUSSÃO.....	70
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
9	CONCLUSÃO	82
10	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	83
11	REFERÊNCIAS	85
12	ANEXOS	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo Redox

A Grande Oxidação, ocorrida há cerca de 2,4 bilhões de anos, foi um evento fundamental para a evolução da vida na Terra, marcado por um aumento na concentração de oxigênio na atmosfera (Canfield et al., 2013; Kump et al., 2014). Esse processo foi impulsionado pela fotossíntese de cianobactérias, que começaram a liberar oxigênio como subproduto da fotossíntese (figura 1). Antes desse evento, a Terra tinha uma atmosfera com níveis muito baixos de oxigênio livre, sendo majoritariamente composta por gases como metano e dióxido de carbono (BLAUSTEIN, 2016).

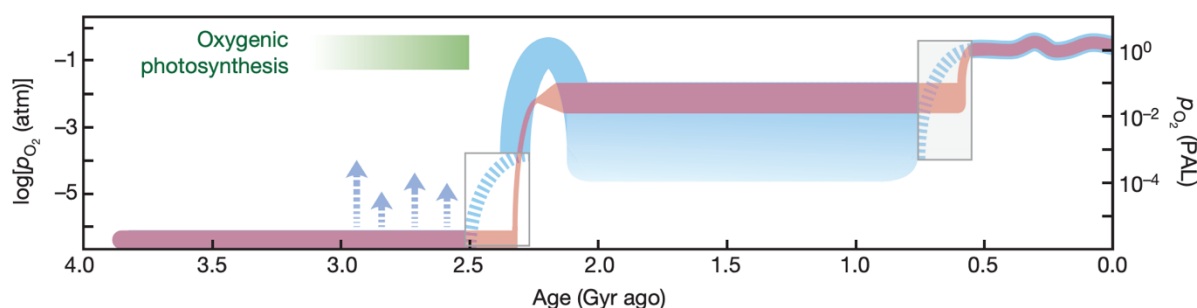


Figura 1: Evolução do conteúdo de oxigênio atmosférico da Terra ao longo do tempo. A curva vermelha suavizada representa o modelo clássico de evolução atmosférica em dois estágios, enquanto a curva azul mostra um modelo mais recente (pO_2 : pressão parcial atmosférica de O_2). O eixo direito indica pO_2 em relação ao nível atmosférico atual (PAL) e o eixo esquerdo, o log de pO_2 . As setas indicam possíveis episódios transitórios de oxigênio no final do Arqueano, cuja duração e magnitude ainda são incertas. As caixas azuis destacam mudanças importantes no pO_2 atmosférico entre o final do Arqueano e o início do Proterozoico, e entre o final do Proterozoico e o início do Fanerozoico. (LYONS; REINHARD; PLANAVSKY, 2014).

O oxigênio produzido pelas cianobactérias foi inicialmente consumido por minerais, como o ferro, formando óxidos de ferro, mas eventualmente, esses minerais ficaram saturados e o oxigênio começou a se acumular na atmosfera. Esse aumento na concentração de oxigênio teve várias implicações ambientais e biológicas, entre eles o desenvolvimento de formas de vida mais complexas (LYONS; REINHARD; PLANAVSKY, 2014). O aumento de oxigênio disponível permitiu a evolução de organismos eucarióticos, com células estruturalmente mais complexas, como o núcleo, mitocôndrias e outras organelas. Esses organismos foram capazes de realizar a respiração celular aeróbica, um processo mais eficiente para a produção de energia em comparação com a

respiração anaeróbica, o que possibilitou o desenvolvimento de organismos multicelulares e, eventualmente, levou à evolução de animais e plantas mais complexos, abrindo caminho para a diversidade biológica que conhecemos hoje (KNOLL, 2014; LYONS; REINHARD; PLANAVSKY, 2014).

Com isso, sabemos que o oxigênio (O_2) exerce uma função essencial na vida aeróbica, sendo fundamental para os processos bioquímicos que sustentam a maior parte das formas de vida complexas, incluindo os seres humanos, animais e muitas plantas. Sua importância está diretamente relacionada à forma como ele é utilizado nas células para a produção de energia, permitindo que organismos aeróbicos possam realizar suas funções vitais de maneira eficiente (LUO et al., 2016). O principal processo pelo qual o oxigênio é utilizado nas células é a respiração celular aeróbica, que ocorre nas mitocôndrias das células. Durante esse processo, o oxigênio atua como o aceptor final de elétrons na cadeia respiratória, permitindo a produção de adenosina trifosfato (ATP), a principal molécula de energia usada pelas células (BERNHARD K, 1986). O ATP é essencial para uma vasta gama de processos celulares, como síntese de proteínas, transporte ativo de substâncias e divisão celular.

Embora o oxigênio seja essencial para a sobrevivência e o metabolismo aeróbico dos animais, sua utilização também representa um grande desafio devido à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$). Essas moléculas são subprodutos inevitáveis da respiração celular, gerados principalmente pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, e podem causar danos oxidativos severos a biomoléculas essenciais, como proteínas, lipídios e DNA, resultando em disfunção celular, envelhecimento precoce e desenvolvimento de doenças crônicas (Halliwell, 1999; Halliwell & Gutteridge, 2015). Um dos principais alvos das EROs são os lipídios das membranas celulares. A peroxidação lipídica resulta na perda da integridade e fluidez da membrana, comprometendo funções celulares essenciais e podendo culminar em morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Além disso, as EROs podem oxidar proteínas, alterando sua estrutura e função, o que afeta processos enzimáticos e de sinalização celular (SIES, 2017). O DNA também é vulnerável às EROs, sofrendo quebras de fitas e modificações de bases nitrogenadas, o que pode levar a mutações e contribuir para o desenvolvimento de doenças como o câncer (TUDEK et al., 2010).

No entanto, os efeitos das EROs dependem diretamente da sua concentração. Enquanto níveis elevados promovem danos celulares, concentrações moderadas atuam como sinalizadores essenciais

para processos fisiológicos, caracterizando um fenômeno conhecido como hormese. Esse conceito descreve respostas celulares adaptativas a estímulos que, em doses altas, seriam prejudiciais, mas que, em doses controladas, ativam mecanismos protetores e regulatórios (CALABRESE et al., 2007). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por exemplo, é uma molécula neutra e pequena que se difunde facilmente através das membranas celulares, podendo atuar como um mensageiro intracelular em diversas vias de sinalização. Até o início dos anos 2000, as EROs, incluindo o H_2O_2 , eram consideradas exclusivamente como subprodutos tóxicos do metabolismo aeróbico. Estudos demonstram que, em baixas concentrações, o H_2O_2 regula processos celulares fundamentais, como a expressão gênica de muitas proteínas, a proliferação celular e a resposta a estímulos ambientais (RHEE et al., 2005). Um exemplo é o papel do H_2O_2 na regulação do transporte de água para o interior das células, mediado por aquaporinas, proteínas que formam canais específicos para a passagem de água. Estas proteínas facilitam o transporte de água e pequenas moléculas através das membranas celulares, sendo indispensáveis na expansão celular e na adaptação a variações osmóticas. A fosforilação das aquaporinas, mediada por H_2O_2 , pode resultar tanto na ativação quanto na inativação dessas proteínas, dependendo de diversos fatores, como o tipo específico de aquaporina, as quinases envolvidas e as condições celulares e ambientais. Por exemplo, sob condições salinas, a atividade das aquaporinas pode ser modulada para manter o equilíbrio osmótico e o turgor celular, essenciais para a expansão celular (ALEJANDRA LÓPEZ, 2017; GASPAR, 2011). Além disso, o H_2O_2 atua como um importante metabólito redox, regulando vias de sinalização que controlam a homeostase celular, a resposta ao estresse e a sobrevivência celular (SIES, 2017).

A produção de EROs nos organismos podem ser afetadas diretamente pelas variações ambientais enfrentadas pelos organismos. Fatores como variações de oxigenação, temperatura, radiação ultravioleta e salinidade podem aumentar o estresse oxidativo, desequilibrando a homeostase redox celular (HERMES-LIMA, 2005). Por exemplo, oscilações na disponibilidade de oxigênio, comuns em ambientes intermitentemente hipóxicos, podem intensificar a produção de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) durante a reoxigenação, devido ao escape eletrônico na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Da mesma forma, temperaturas elevadas podem aumentar a taxa metabólica e a fuga de elétrons na mitocôndria, elevando a formação de EROs. Já a radiação UV pode induzir a produção de espécies reativas ao interagir diretamente com biomoléculas, promovendo a fotoxidação de lipídios e proteínas. Para mitigar esses efeitos e manter a homeostase redox, os animais desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante, que incluem tanto sistemas enzimáticos quanto não enzimáticos. Entre as principais enzimas antioxidantes, destacam-se a superóxido dismutase

(SOD), que converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio menos reativo; a catalase (CAT), que degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio; e a glutathiona peroxidase (GPx), que reduz hidroperóxidos utilizando a glutathiona como cofator (Hermes-Lima, 2004). Além dessas enzimas, os animais também utilizam moléculas antioxidantes não enzimáticas, como a glutathiona reduzida (GSH) e o ácido ascórbico (vitamina C), que contribuem para a redução de radicais livres, impedindo o dano oxidativo exacerbado (STOREY; STOREY, 2019). O GSH, por sua vez, é substrato das enzimas GPx e GST, exercendo uma função indispensável na defesa antioxidante celular.

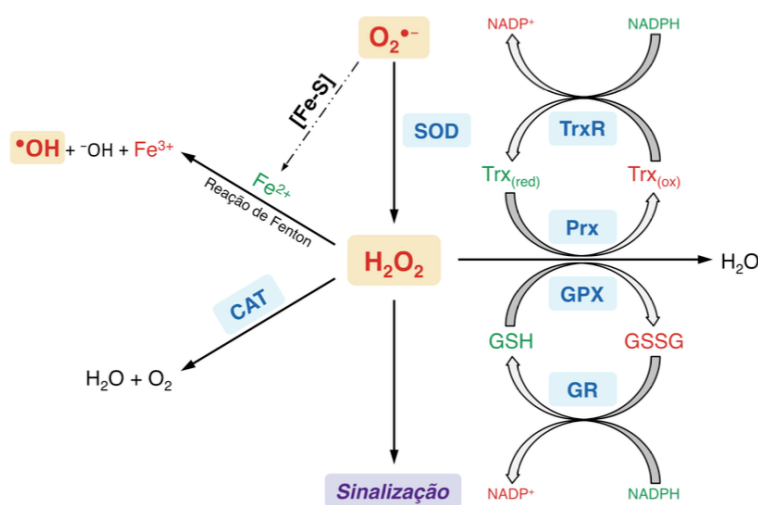


Figura 2 : Principais vias de geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio. Diagrama ilustrando as vias da CAT, SOD e GSH envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo (MOREIRA, 2018).

Além dos sistemas bioquímicos internos, muitos animais desenvolveram estratégias fisiológicas e comportamentais para minimizar o estresse oxidativo gerado por variações ambientais extremas. Estratégias fisiológicas incluem ajustes no metabolismo, como a redução da taxa metabólica e o aumento da eficiência antioxidante, permitindo uma resposta adaptativa a períodos de baixa oxigenação. Por exemplo, animais que enfrentam hipóxia intermitente, como aqueles que habitam ambientes aquáticos com variações acentuadas de oxigenação ou realizam mergulhos prolongados (como mamíferos marinhos), apresentam mecanismos que minimizam os danos oxidativos associados à reoxigenação dos tecidos (BICKLER; BUCK, 2007). Já as estratégias bioquímicas envolvem a modulação direta da produção e eliminação de EROs. O nematoide *Bursaphelenchus xylophilus*, por exemplo, sobrevive mais de 14 dias em condições anóxicas devido à sua capacidade de controlar a produção de EROs e manter um sistema antioxidante eficiente

(KITAZUME et al., 2018). Animais hibernantes utilizam um mecanismo similar, reduzindo o metabolismo e aumentando a defesa antioxidante para mitigar os efeitos da reoxigenação ao término da hibernação ((MOREIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2018). Já as aves migratórias, que experimentam altos níveis de consumo de oxigênio devido à intensa atividade muscular durante o voo, possuem um sistema antioxidante altamente eficiente para lidar com o aumento da produção de EROs (Constantini, 2014).

Além disso, alguns organismos desenvolveram estratégias comportamentais que auxiliam na regulação do estresse oxidativo em condições adversas. O ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus*, por exemplo, ao ser exposto ao ar durante a emersão, libera um fluido esofágico que forma um espaço aéreo dentro de sua estrutura interna. Esse espaço atua como um "pulmão facultativo", contribuindo para a oxigenação do fluido celômico e garantindo um suprimento mínimo de oxigênio aos órgãos, mesmo durante a exposição aérea prolongada. Essa adaptação reduz os impactos metabólicos da emersão e pode ser crucial para a manutenção do metabolismo aeróbico, especialmente quando os órgãos reprodutivos estão em desenvolvimento e demandam maior aporte energético (BURNETT et al., 2002).

1.2 Preparo para o Estresse Oxidativo (POS)

Alguns exemplos de respostas adaptativas de estresse à hipóxia são a alta expressão constitutiva de antioxidantes, a tolerância aos danos oxidativos, e o aumento de antioxidantes devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs); este último é denominado "*Preparation for Oxidative Stress*" (POS), ou "Preparo para o Estresse Oxidativo" (Hermes-Lima et al., 2015; Storey, 1996). O POS é uma resposta adaptativa crucial em organismos expostos a condições ambientais extremas, como hipóxia, anóxia, congelamento e dessecação. E propõe que, durante períodos de baixa disponibilidade de oxigênio, organismos tolerantes a essas condições aumentem a concentração e/ou atividade de suas defesas antioxidantes, em preparo ao estresse oxidativo agudo que ocorre durante a reoxigenação (HERMES-LIMA et al., 2015; STOREY, 1996). O POS é uma estratégia evolutivamente conservada, observada em uma ampla gama de espécies, desde invertebrados marinhos até vertebrados terrestres, e representa um mecanismo sobrevivência em ambientes extremos. Ocorre um aumento da atividade (e/ou expressão) de enzimas antioxidantes ou de GSH durante, por exemplo, o estresse de hipóxia, assim, danos oxidativos que poderiam ser gerados na reoxigenação são minimizados (Hermes-Lima et al., 2015). Esse mecanismo pode ser observado em mais de 120 espécies, como no camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) (Kniffin et al.,

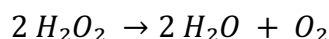
2014). Nesse estudo foi observado um aumento significativo da atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD) durante a hipóxia induzida nos tecidos branquiais e hepatopâncreas. Esse padrão também foi demonstrado em colônias de uma espécie de octocoral (*Veretillum cynomorium*) sob exposição aérea. As atividades das enzimas catalase e glutathione S-transferase (GST) aumentaram significativamente durante a exposição aérea, e nenhuma mudança significativa na concentração de produtos de peroxidação lipídica foi detectada (TEIXEIRA et al., 2013). Em anfíbios, como o sapo *Rana sylvatica*, a exposição ao congelamento induziu um aumento na atividade da GPX e nos níveis de glutathione reduzida (GSH) em vários tecidos, preparando o organismo para o estresse oxidativo associado ao descongelamento (Storey, 1996). Esses sistemas antioxidantes (catalase, GPX, GST e SOD) são responsáveis por regular a concentração de EROs no organismo, minimizando os danos oxidativos na reoxigenação (HALLIWELL, 1999).

Como exemplificado, a base bioquímica do POS está diretamente ligada à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são geradas principalmente pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Em condições normóxicas, as EROs são produzidas em baixas quantidades e são rapidamente controladas por sistemas antioxidantes, como SOD, CAT, GPX e GST (Halliwell, 1999). No entanto, sob hipóxia, a produção de EROs pode aumentar temporariamente devido ao acúmulo de elétrons nos complexos da cadeia respiratória, especialmente no complexo III (CHANDEL et al., 1998). Esse aumento transitório de EROs atua como um sinal molecular, induzindo a expressão de genes antioxidantes e a ativação de fatores de transcrição sensíveis ao estresse oxidativo, como o Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) e o HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) (Hermes-Lima et al., 2015).

O Nrf2 é um fator de transcrição que regula a expressão de várias enzimas antioxidantes, incluindo a SOD, CAT, GPX e GST. Em condições normais, o Nrf2 é mantido inativo no citoplasma pela proteína Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). No entanto, sob estresse oxidativo, o Nrf2 é liberado da Keap1, sendo translocado para o núcleo. Lá, o Nrf2 se liga a elementos de resposta antioxidante no DNA, promovendo a transcrição de genes antioxidantes (TONELLI; CHIO; TUVESON, 2018). Esse mecanismo é essencial para a resposta do POS, pois permite que o organismo aumente rapidamente suas defesas antioxidantes para o controle do estresse oxidativo associado à reoxigenação.

O HIF-1, por sua vez, é um fator de transcrição que regula a expressão de genes envolvidos na adaptação à hipóxia, incluindo aqueles que controlam o metabolismo energético e a angiogênese. O HIF-1 é estabilizado sob condições de baixo oxigênio e pode também induzir a expressão de enzimas antioxidantes, como a SOD e a CAT, contribuindo para a resposta do POS (SEMENZA, 2000)

Animais produzem EROs constantemente e têm sua concentração modulada pela ação de enzimas como GPX, peroxirredoxinas (PRX) e catalase. Esta última, por exemplo, responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SCHOONEN et al., 2010), sendo uma enzima antioxidante fundamental no metabolismo celular, pertencente à classe das oxidoredutases, e sua principal função é decompor o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2):



Essa reação é essencial porque o H_2O_2 é um subproduto potencialmente tóxico gerado durante processos metabólicos, como a respiração celular e a β -oxidação de ácidos graxos. Se não for removido, o H_2O_2 pode reagir com metais de transição, como ferro e cobre, formando o radical hidroxila ($\bullet OH$), um EROs extremamente prejudicial, capaz de danificar DNA, proteínas e lipídios, levando a mutações, morte celular e patologias como câncer e doenças neurodegenerativas (KIM et al., 2015; VALKO et al., 2006).

1.3 Catalase e Aminotriazol

A catalase (hidroperoxidases, E.C. 1.11.1.6) são enzimas ubíquas que previnem danos oxidativos celulares ao degradar o peróxido de hidrogênio com alta eficiência (ALFONSO-PRIETO et al., 2009; ZIDONI; KREMER, 1974). Sua estrutura é complexa e varia dependendo do organismo, mas geralmente é composta por quatro subunidades idênticas ou muito semelhantes, formando um tetrâmero (figura 3). Cada subunidade contém um grupo heme, que é o local ativo da enzima. O grupo heme é composto por um íon de ferro (Fe) ligado a uma molécula de porfirina, e é essencial para a atividade catalítica da enzima. Os íons ferro no grupo heme pode alternar entre os estados de oxidação Fe(III) e Fe(IV) (um estado de oxidação atípico e de curta duração) durante o ciclo catalítico, permitindo que a catalase decomponha o H_2O_2 de forma eficiente (figura 4) (ZÁMOCKÝ et al., 2001)

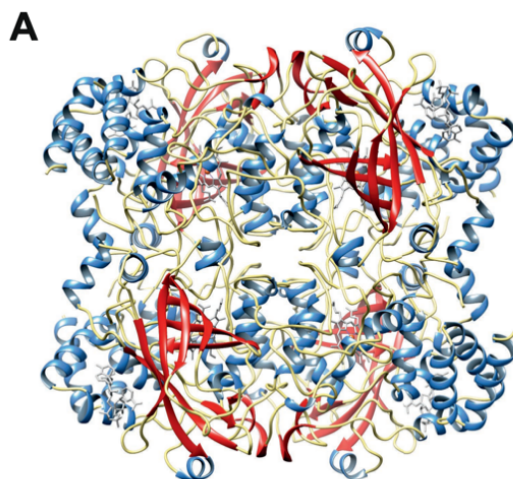


Figura 3 : Estrutura da catalase: a estrutura foi determinada com uma resolução de 3,2 Å, usando uma técnica chamada MicroED (Nannenga et al., 2014 modificado)

A catalase é encontrada em praticamente todos os organismos aeróbicos, presente em bactérias, plantas, fungos, protozoários, animais invertebrados e vertebrados. Em células eucarióticas, ela está localizada principalmente nos peroxissomos, organelas especializadas em processos oxidativos que geram H_2O_2 como subproduto. Além dos peroxissomos, a catalase também pode ser encontrada no citosol e, em alguns casos, nas mitocôndrias. Em organismos multicelulares, como mamíferos, a catalase é especialmente abundante em órgãos como fígado e rins, onde a produção de H_2O_2 é elevada devido ao alto metabolismo oxidativo (FERRO et al., 2010; PERCY, 1984). Nos eritrócitos (glóbulos vermelhos) a catalase está presente para decompor o H_2O_2 gerado em outros processos do organismo (AGAR et al., 1986; PERCY, 1984).

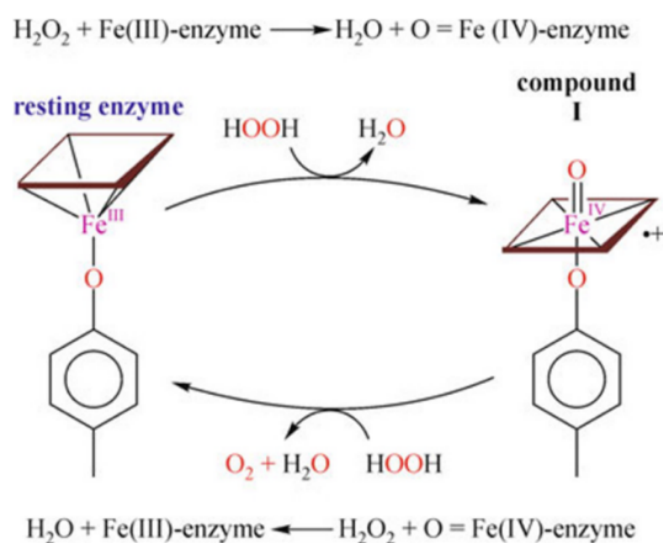


Figura 4 : Ciclo de reação da catalase: começa com o estado férrico (FeIII) de alto spin, que reage com uma molécula de peróxido para formar o intermediário Composto I, um radical cátion π de porfirina contendo FeIV. Um dos prótons da molécula de peróxido de hidrogênio é removido de uma extremidade da molécula e colocado na outra extremidade. O próton é transferido por meio de um resíduo de histidina no sítio ativo. Essa ação polariza e quebra a ligação O-O no peróxido de hidrogênio. Na etapa seguinte, uma segunda molécula de peróxido de hidrogênio é usada como redutora para regenerar a enzima, produzindo água e oxigênio. A oxidação de um doador de elétrons (aqui, o segundo H_2O_2) retorna o Composto I, uma espécie altamente oxidante de Fe(IV), ao estado de repouso nativo Fe(III) (GOYAL; BASAK, 2010)

A atividade da catalase é regulada por vários fatores, incluindo a concentração de H_2O_2 , o estado redox da célula e a presença de cofatores, como o NADPH. Em algumas catalases, o NADPH se liga à enzima e ajuda a prevenir a inativação por excesso de H_2O_2 , estabilizando a estrutura da enzima. Além disso, a expressão da catalase pode ser induzida em resposta ao estresse oxidativo, quando a produção de EROs aumenta (SWITALA; LOEWEN, 2002). Além disso, a catalase trabalha em conjunto com outras enzimas antioxidantes, como a SOD e a GPX, para manter o equilíbrio redox da célula. A SOD converte o radical superóxido (O_2^-) em H_2O_2 , que é então decomposto tanto pela catalase como pela GPX, esta última utilizando glutatona como cofator ((SWITALA; LOEWEN, 2002).

A importância da catalase na proteção contra o estresse oxidativo é evidenciada por estudos que mostram que a deficiência ou inibição dessa enzima pode levar ao acúmulo de H_2O_2 e ao aumento do dano oxidativo. Além disso, essa enzima é um importante componente do mecanismo POS, como demonstrado em estudo feito com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), uma espécie tolerante à hipóxia, Welker et al. 2016 investigou o papel da catalase na reoxigenação pós-hipóxica em tilápias utilizando duas abordagens. Primeiro, a atividade da catalase foi inibida em 90% pela injeção de 3-amino-1,2,4-triazol (ATZ), sem alterar os níveis de GSH hepático, marcadores de estresse oxidativo ou atividades de outras enzimas antioxidantes. Segundo, peixes com catalase inibida e controle foram submetidos à hipóxia severa (0,28 mg/L O_2 por 3 h) seguida de reoxigenação (0,5 a 24 h). A hipóxia não afetou os parâmetros analisados, mas a reoxigenação aumentou a atividade da superóxido dismutase, sem diferenças entre os grupos. O estresse oxidativo, medido por GSSG/GSH-eq e proteínas carboniladas, foi levemente alterado nos peixes com catalase inibida. Os resultados indicam a importância da catalase hepática para o equilíbrio redox na reoxigenação (DELANEY; KLESIUS, 2004; WELKER; MOREIRA; HERMES-LIMA,

2016a). Em estudos com cobras *Thamnophis sirtalis parietalis*, expostas a condições de congelamento, observou-se um aumento significativo na atividade da catalase no músculo e no pulmão. Esse aumento foi interpretado como uma resposta adaptativa para proteger os tecidos contra o estresse oxidativo gerado durante o descongelamento, quando a reoxigenação pode levar a um pico na produção de EROs (Hermes-Lima et al., 2015; Hermes-Lima & Storey, 1993).

Em outro estudo avaliamos o metabolismo redox no caracol terrestre tolerante à anóxia *Helix aspersa* após a inibição da catalase pela injeção de ATZ durante um ciclo de anóxia e reoxigenação (WELKER; MOREIRA; HERMES-LIMA, 2016b). A exposição à anóxia causou uma mudança em apenas um dos vários parâmetros relacionados ao metabolismo redox: um aumento na atividade da GPX no músculo de animais injetados com solução salina ou ATZ, indicando o mecanismo-POS nesses moluscos. A supressão da catalase por ATZ não teve efeito em animais sob normóxia ou anóxia, mas causou um retardo na desativação da GPX muscular na fase de reoxigenação. Os indicadores de estresse oxidativo se mantiveram inalterados na reoxigenação nos animais injetados com ATZ (Welker et al. 2016).

Como mencionado, a catalase pode ser inibida por meio de um composto farmacológico, o aminotriazol (figura 5) (3-amino-1,2,4-triazol, ATZ). É um composto heterocíclico amplamente conhecido por sua capacidade de inibir irreversivelmente a enzima catalase. O aminotriazol pertence à classe dos triazóis, compostos cíclicos contendo três átomos de nitrogênio no anel. Sua estrutura química lhe confere propriedades que possibilitam interações específicas com metais de transição e grupos funcionais em proteínas. Ele apresenta alta solubilidade em água e é frequentemente utilizado como herbicida, além de sua aplicação em estudos bioquímicos como inibidor da catalase (NICHOLLS, 1962). A ação inibitória do aminotriazol sobre a catalase foi inicialmente descrita por Heim, Appleman e Pyfrom (1955), que observaram uma redução significativa da atividade da enzima em fígado de animais tratados com esse composto (HEIM; APPLEMAN; PYFROM, 1955). Posteriormente, Margoliash e Novogrodsky (1960) demonstraram que a inibição ocorre devido à interação do aminotriazol com o intermediário catalítico da enzima, conhecido como composto I, resultando na formação de uma espécie inativa e irreversível (E. Margoliash et al., 1960).

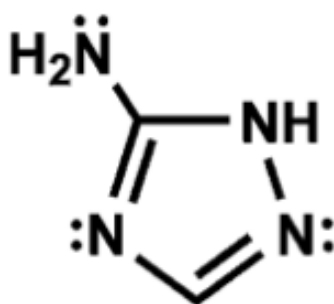


Figura 5 : 3-amino- 1,2,4-triazol

(Bayliak et al., 2008).

A inibição da catalase pelo ATZ é um processo complexo que envolve a interação do inibidor com diferentes estados da enzima (figura 6), especialmente com o composto I, um intermediário reativo formado durante o ciclo catalítico da catalase. A catalase, em sua forma ativa, contém um grupo heme com ferro no estado férrico (Fe^{3+}), que reage com H_2O_2 para formar o composto I, um intermediário oxoferril ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) com um radical catiônico na porfirina. O aminotriazol reage com o composto I, formando um complexo irreversivelmente inibido, conhecido como ATi-catalase, que perde a capacidade de decompor o H_2O_2 de forma eficiente (Margoliash et al., 1960; Nicholls, 1962).

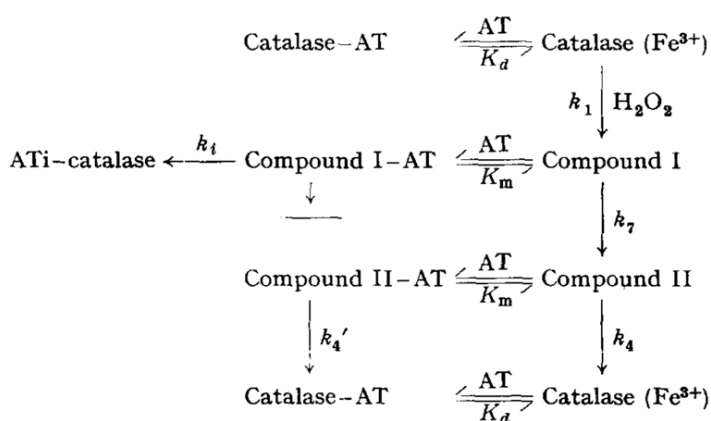


Figura 6: Reações entre a catalase e o aminotriazol: As constantes de velocidade são: $k_1 = 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$, $k_2 = 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$, $k_4 = 6 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$, $k_4' = 4 \times 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$, $K_d = 0,06 \text{ M}$, $K_m = 0,16 \text{ M}$, $k_4' = 4 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ (estimado). A temperatura foi mantida a 20°C e o pH em 5,4. Adaptado de (NICHOLLS, 1962)

O mecanismo de inibição começa com a formação de um complexo reversível entre o aminotriazol e a catalase no estado férrico (Fe^{3+}). No entanto, a inibição irreversível ocorre quando o aminotriazol reage com o composto I, formando um complexo estável que não pode mais participar do ciclo catalítico. Esse processo é facilitado pela presença de sistemas que geram H_2O_2 lentamente,

como a glicose oxidase, que mantém a catalase no estado de composto I por mais tempo, permitindo a reação com o aminotriazol (HEIM; APPLEMAN; PYFROM, 1955; NICHOLLS, 1962).

A formação do complexo irreversível (ATi-catalase) resulta em mudanças espectroscópicas significativas, como o deslocamento da banda α para 634 nm e o aumento da intensidade da banda em 540 nm. Além disso, a ATi-catalase apresenta uma atividade catalítica residual muito baixa, cerca de 3% da atividade original, devido à redução drástica na taxa de formação do composto I. A inibição também afeta a capacidade da catalase de reagir com outros ligantes, como cianeto, fluoreto e óxido nítrico, que normalmente formam complexos rapidamente com a catalase nativa (Margoliash et al., 1960; Nicholls, 1962).

Acredita-se que a inibição irreversível pelo aminotriazol envolva uma reação intramolecular que modifica a porção proteica da catalase, possivelmente através da formação de uma ligação covalente entre o inibidor e um resíduo de aminoácido próximo ao grupo heme. Essa modificação estrutural impede a formação eficiente do composto I e, conseqüentemente, a decomposição do H_2O_2 . A inibição pelo aminotriazol é, portanto, um exemplo de como a modificação de um resíduo específico na proteína pode afetar profundamente a função catalítica da enzima, destacando a importância da interação entre o grupo heme e a porção proteica na atividade da catalase (MARGOLIASH; NOVOGRODSKY; SCHEJTER, 1960; NICHOLLS, 1962).

A inibição da catalase pelo aminotriazol é amplamente utilizada para investigar a cinética de síntese e degradação da enzima em diferentes organismos. Em estudos com camundongos normais e acatalasêmicos, Ogata et. al (1975) demonstraram que a recuperação da atividade catalítica ocorre de maneira dependente da taxa de turnover da proteína. Após a administração de aminotriazol, a atividade da catalase hepática em camundongos normais apresentou um período de supressão inicial seguido por um retorno gradual, com uma meia-vida de recuperação estimada em 19 horas. Ao inibir essa enzima, o aminotriazol promove um aumento na concentração de H_2O_2 , tornando as células mais suscetíveis a danos oxidativos. Esse efeito pode ser particularmente prejudicial em tecidos metabolicamente ativos, como fígado e cérebro, onde a produção de peróxidos é constante devido à atividade mitocondrial e de outras organelas produtoras de radicais livres. (OGATA; MIZUGAKI; TAKAHARA, 1975)

Em estudos com peixes dourados (*Carassius auratus*) se verificou a inibição da catalase pelo aminotriazol no fígado e rim, com redução de 83% da atividade enzimática hepática após 24 horas,

mantendo-se reduzida por 168 horas. No rim, a atividade da catalase foi reduzida em 50% após 24 horas e 70% após 168 horas. Os níveis de carbonilas de proteína permaneceram inalterados no fígado, mas aumentaram em 2 vezes no rim após 168 h. Isso resultou em aumento transitório de produtos de peroxidação lipídica e elevação de proteínas carboniladas no rim, indicando estresse oxidativo. Houve também modulação de enzimas do metabolismo do glutatona, com aumento das atividades da GPX e GST no rim. Esses resultados indicam um mecanismo compensatório, onde a depleção da catalase leva à reorganização do sistema antioxidante para mitigar danos oxidativos (BAGNYUKOVA; STOREY; LUSHCHAK, 2005)

Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa (BAGNYUKOVA et al., 2005) focou nos efeitos da inibição da catalase no cérebro do peixe dourado. Foi observada uma redução progressiva da atividade da catalase ao longo de 72 horas com doses baixas de aminotriazol (0,1 mg/g), enquanto doses mais altas (0,5 ou 1,0 mg/g) reduziram a atividade em dois terços entre 5 e 10 horas. Esse efeito foi acompanhado por um aumento de 6,5 vezes nos níveis de peroxidação lipídica, e um aumento de 2 vezes nos níveis de proteínas carboniladas. Além disso, as atividades da GPX e GST aumentaram em 50% e 80%, respectivamente, sugerindo um mecanismo de compensação para a perda da atividade da catalase. A observação de uma correlação inversa entre a atividade da catalase e o acúmulo de proteínas carboniladas reforça o papel dessa enzima na proteção contra a modificação oxidativa de proteínas (BAGNYUKOVA et al., 2005). Esses estudos demonstram que a inibição da catalase desencadeia uma resposta compensatória envolvendo outras enzimas antioxidantes, mas pode não ser suficiente para prevenir completamente os danos oxidativos em tecidos altamente metabólicos.

1.4 Glutationa e Butionina sulfoximina

Outro composto que possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo, é a glutatona (GSH) (figura 7). Ela existe em duas formas principais dentro das células: a forma reduzida (GSH) e a forma oxidada (GSSG). A razão GSH/GSSG é um indicador importante do estado redox celular. Sob condições normais, a maior parte da GSH está na forma reduzida, mas sob estresse oxidativo, a GSH é oxidada para GSSG. A enzima glutatona redutase é responsável por reduzir o GSSG de volta para GSH, utilizando NADPH como doador de elétrons (TIETZE, 1969). Este tripeptídeo é encontrado intracelularmente em altas concentrações (0,5 a 10 mM), essencialmente em organismos aeróbicos (BACHHAWAT; YADAV, 2018). A GSH é composta por três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina. Sua estrutura molecular formada por uma ligação peptídica entre o grupo carboxila do ácido glutâmico e o grupo

amino da cisteína, formando uma ligação γ -glutâmica, o que confere resistência à hidrólise por peptidases comuns (HERMES-LIMA, 2004). A presença do grupo tiol (-SH) da cisteína confere à GSH propriedades antioxidantes, permitindo que ela atue como um dos principais agentes redutores intracelulares, reduzindo concentrações de espécies reativas de oxigênio e radicais livres (BUMP; BROWN, 1990).

Figura 7 : Estrutura da Glutathione (GSH) (EL-BELTAGII; MOHAMED, 2013)

A GSH tem um papel essencial na manutenção do equilíbrio redox celular, protegendo as células contra danos oxidativos, ela atua como um ‘tampão redox’ que resiste a alterações redox. Além disso, a GSH está envolvida em processos como a detoxificação de xenobióticos, a síntese de DNA e proteínas, e a regulação de vias de sinalização celular (MEREDITH; REED, 1982). A GSH também atua como cofator para enzimas como a glutathione peroxidase, que catalisa a redução de peróxidos, e a glutathione S-transferase, que conjuga GSH a compostos eletrofílicos, facilitando sua excreção (GRIFFITH, 1989). Entretanto, em condições de produção excessiva de EROs, a taxa de formação de GSSG supera a capacidade de redução pela GR e tal desequilíbrio pode resultar em dano oxidativo celular (HERMES-LIMA, 2004).

A síntese de GSH ocorre em duas etapas principais, conforme figura 8, ambas dependentes de ATP. A primeira etapa é catalisada pela enzima γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), que liga o ácido glutâmico à cisteína, formando γ -glutamylcysteine. A segunda etapa é catalisada pela glutathione synthetase, que adiciona glicina à γ -glutamylcysteine, formando GSH. A γ -GCS é a enzima limitante da via de síntese de GSH, sendo alvo de regulação tanto em nível transcricional quanto pós-traducional (Hermes-Lima, 2004).

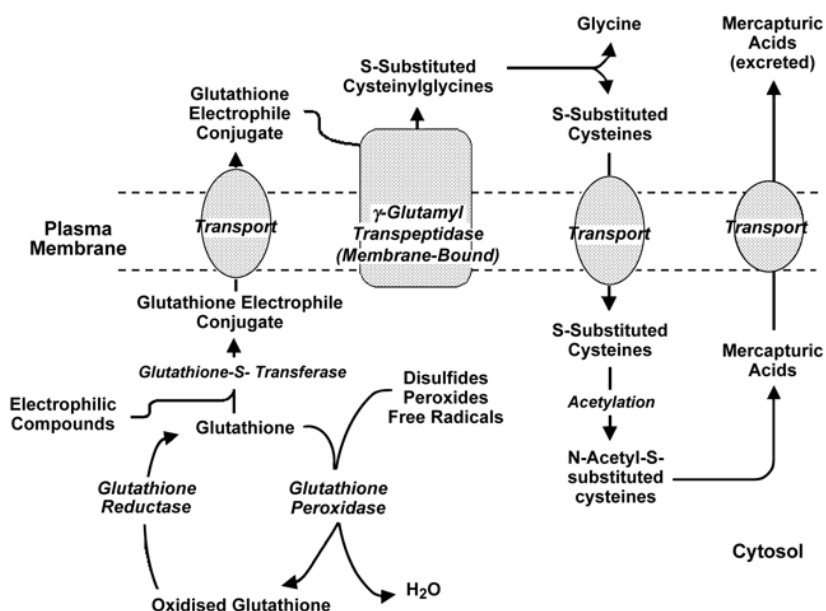


Figura 8: O mecanismo de ação da Glutathiona. (JEFFERIES et al., 2003)

Como visto, a GSH apresenta um papel importante na proteção celular contra o estresse oxidativo, funcionando como um dos principais antioxidantes intracelulares. Sua capacidade de reduzir a concentração de EROs é crucial para a sobrevivência celular em condições adversas, como mudanças de temperatura, hipóxia, salinidade e exposição a toxinas ambientais (JEFFERIES et al., 2003; LUSHCHAK; HERMES-LIMA, 2005). Vários trabalhos mostram que a depleção de GSH está diretamente associada ao aumento da produção de EROs devido a essa sua função central na defesa antioxidante celular. Por exemplo, a inibição farmacológica da síntese de GSH, por meio de compostos como o butionina sulfoximina (BSO) (GRIFFITH, 1989), compromete a capacidade antioxidante da célula e resulta em um aumento significativo do estresse oxidativo. Yoshida et al. (2005) demonstraram que a depleção de GSH reduz a capacidade de eliminação de radicais livres no fígado de ratos. O estudo utilizou espectroscopia de ressonância de spin eletrônico (ESR) para avaliar a capacidade antioxidante hepática após tratamento com BSO e jejum. Observou-se que a redução dos níveis de GSH levou a um declínio na taxa de eliminação de radicais livres, indicando que o GSH é um dos principais antioxidantes no fígado e que sua depleção exacerba o estresse oxidativo. No entanto, a presença de metalotioneínas (MT) pode atuar como uma segunda linha de defesa antioxidante, compensando parcialmente a redução de GSH (YOSHIDA et al., 2005).

No estudo de Denniss et al. (2011), a administração crônica de butionina sulfoximina (BSO), representada na figura 9, em ratos resultou em um aumento significativo na concentração de ROS, embora o impacto funcional sobre a vasodilatação mediada pelo óxido nítrico (NO) tenha variado. O BSO reduziu os níveis de GSH no fígado e na aorta em aproximadamente 55% e 30%, respectivamente, e aumentou os níveis de H₂O₂ plasmático e hepático. Esses resultados indicam que a depleção de GSH, além de aumentar a produção de EROs, pode influenciar a bioatividade de NO e a sinalização endotelial, dependendo das condições experimentais (DENNISS; LEVY; RUSH, 2011). Abalenikhina et al. (2022) investigaram o impacto da depleção de GSH induzida por BSO em células Caco-2 e demonstraram que a deficiência de GSH leva a um aumento dose-dependente na produção de ROS. O aumento da produção de H₂O₂ foi acompanhado por uma ativação do fator induzido por hipóxia 1α (HIF-1α), que pode atuar na resposta ao estresse oxidativo. Além disso, o fator nuclear eritroide 2 (Nrf2) foi ativado, sugerindo uma resposta compensatória ao estresse oxidativo. O estudo destaca que a ativação de HIF-1α está associada à redução da viabilidade celular em condições de depleção severa de GSH, indicando que a perda de GSH pode ser um fator crítico para a regulação da resposta celular ao estresse oxidativo (ABALENIKHINA et al., 2022).

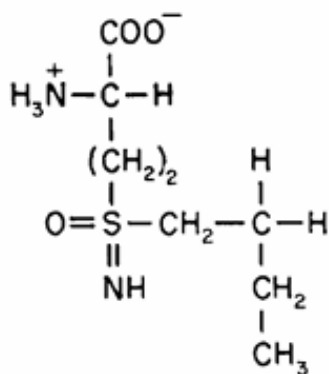


Figura 9 : Estrutura do BSO, de acordo com Griffith & Meister (1979)

Como indicado em estudos, a depleção de GSH pode levar a um aumento na produção de EROs devido à perda de umas das mais importantes defesas antioxidantes das células. Esse aumento no estresse oxidativo pode ser parcialmente compensado por outros mecanismos, como a ativação de metalotioneínas, Nrf2 e HIF-1α, dependendo do contexto biológico. No entanto, em condições de depleção severa, o aumento da produção de EROs pode exceder a capacidade adaptativa da célula,

levando a danos celulares e morte celular programada. Nesse contexto, a butionina sulfoximina (BSO) se destaca como uma das principais ferramentas farmacológicas de inibição da GSH. O BSO é um análogo sintético da metionina sulfoximina (GRIFFITH; MEISTER, 1979), que foi originalmente identificada como um agente tóxico em grãos que foram contaminados por um fungo chamado *Phytophthora infestans* (GRIFFITH, 1989). O BSO é um inibidor específico da γ -glutamylcisteína sintetase (γ -GCS), a enzima chave na síntese de GSH. A estrutura do BSO consiste em uma cadeia lateral de butil (S-n-butil) ligada a um grupo sulfoximina, que é essencial para sua atividade inibitória (Griffith & Meister, 1979).

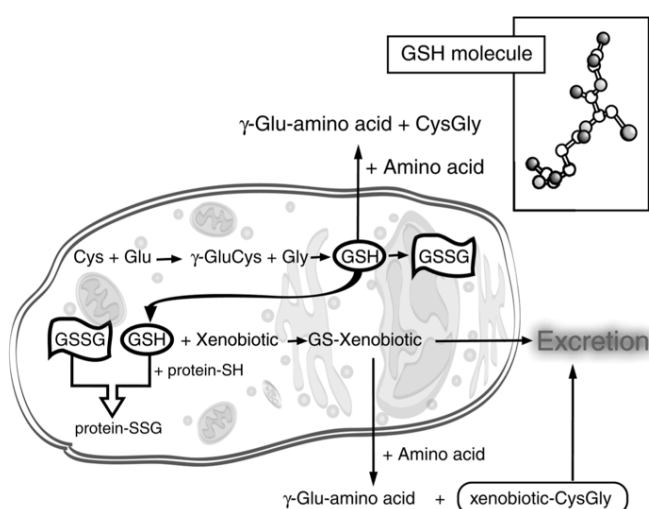


Figura 10 : Metabolismo da glutatona em células hepáticas. A figura mostra a biossíntese de GSH e os destinos de GSH e GSSG (HERMES-LIMA, 2004).

O mecanismo de ação do BSO envolve sua fosforilação pela γ -GCS (figura 11), utilizando ATP como doador de fosfato. Esse processo resulta na formação de um complexo estável entre a enzima e o BSO fosforilado, que inibe irreversivelmente a atividade da γ -GCS (GRIFFITH, 1989). A inibição da γ -GCS leva à depleção dos níveis intracelulares de GSH, tornando as células mais suscetíveis a danos oxidativos e à morte celular induzida por agentes quimioterápicos ou radiação (BUMP; BROWN, 1990). Em um estudo com *Helix aspersa* (atualmente renomeado como *Cornu aspersum*), um caracol terrestre conhecido por sua tolerância a longos períodos de anóxia, Ferreira-Cravo et al. (2023) investigaram os efeitos da depleção de glutatona induzida por BSO durante a anóxia e reoxigenação. Os autores observaram que a injeção de BSO reduziu os níveis de glutatona total (tGSH) em 59-75% no músculo do pé e hepatopâncreas. Além disso, a depleção de glutatona

antes da exposição à anóxia aumentou a razão GSSG/tGSH em 84-90% em ambos os tecidos, indicando um desequilíbrio redox significativo durante a anóxia em animais tratados com BSO. No entanto, esse desequilíbrio foi revertido durante a reoxigenação, sugerindo que a glutathione é essencial para lidar com danos oxidativos induzidos pela hipóxia e reoxigenação em *H. aspersa*. Esses resultados destacam a importância da glutathione na manutenção da homeostase redox em condições de baixo oxigênio e reforçam o papel do sistema antioxidante na tolerância à anóxia em invertebrados.

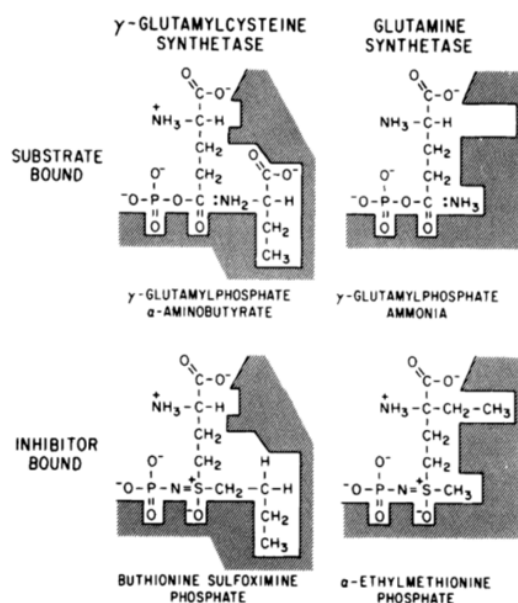


Figura 11: Ligação de substratos e inibidores aos sítios ativos das sintetases (GRIFFITH, 1989).

1.5 Tardígrados

Os tardígrados, também conhecidos como "ursos-d'água", são organismos microscópicos que pertencem ao filo Tardigrada. Eles são amplamente reconhecidos por sua capacidade de sobreviver em condições extremas, o que os torna um dos organismos mais resistentes do planeta. A descoberta dos tardígrados remonta ao século XVIII, quando os primeiros microscópios ópticos permitiram a observação desses pequenos animais. O sacerdote alemão J.A.E. Goeze foi o primeiro a descrevê-los em 1773, chamando-os de "Kleine Wasser Bär" (pequeno urso-d'água) devido à sua aparência e movimento lentos (figura 12) (GREVEN, 2015). Outros pesquisadores, como C.C. Eichorn e Lazzaro Spallanzani, também contribuíram para o estudo inicial desses organismos, observando sua capacidade de reviver após a desidratação (Bartels et al., 2016; Kaczmarek et al., 2015). Esses animais são encontrados em uma grande variedade de habitats, desde ambientes marinhos até terrestres úmidos. Eles fazem parte da meiofauna, um grupo de organismos bentônicos que variam em tamanho

de 45 μm a 500 μm (MØBJERG et al., 2018). Sua distribuição é irregular, podendo ser encontrados em sedimentos marinhos, algas e até em profundidades abissais. Algumas espécies são comensais de outros invertebrados, como holotúrias e briozoários (Kaczmarek et. al 2015).



Figura 12: Apresentações pictóricas iniciais de tardígrados: (A) O pequeno urso d'água. De Goeze (1773). (B) O animalzinho-urso. De Müller (1785). Adaptado de (MØBJERG et al., 2018).

A classificação taxonômica dos tardígrados tem sido objeto de debate ao longo da história. Inicialmente, foram confundidos com aracnídeos, insetos ou crustáceos, mas atualmente são classificados no clado Ecdysozoa, entre Nematoda, Arthropoda e cinco outros filos (figura 13). Anteriormente, alguns autores consideravam os tardígrados como intimamente relacionados aos artrópodes, enquanto outros os consideravam membros dos aschelminthes, devido às suas semelhanças com os nematoides (faringe trirradiada, estiletes bucais e anidrobiose). Dentro dos ecdysozoa, os tardigrada pertencem ao superfilo Panarthropoda e, de acordo com vários autores, são considerados um filo irmão de Arthropoda (MØBJERG et al., 2018). Estudos moleculares recentes têm ajudado a esclarecer sua posição filogenética.

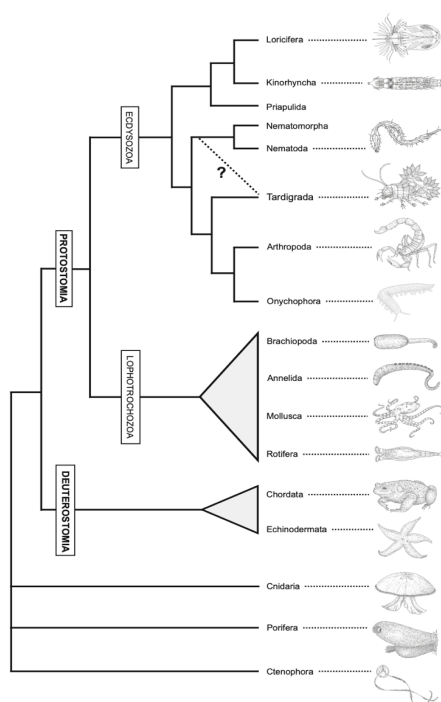


Figura 13 : Relações entre Ecdysozoa. A linha pontilhada e o ponto de interrogação indicam o debate recente sobre a posição filogenética dos tardígrados. (MØBJERG et al., 2018).

Apesar de sua ampla distribuição, acredita-se que apenas 11% das espécies de tardígrados sejam verdadeiramente cosmopolitas (Kaczmarek et al. 2015a). Muitas espécies apresentam uma ampla variedade de comportamentos, muitos dos quais estão diretamente relacionados ao ambiente em que vivem. São conhecidos por sua capacidade de entrar em estados de dormência, como a anidrobiose, em resposta a condições ambientais adversas, permitindo sua sobrevivência em períodos de dessecação extrema (HALBERG; JØRGENSEN; MØBJERG, 2013). Durante a locomoção, utilizam seus quatro pares de patas para se movimentar sobre superfícies sólidas ou em meio aquoso, com um padrão de deslocamento que lembra o de artrópodes primitivos. Além disso, diferentes espécies exibem estratégias alimentares variadas, sendo capazes de perfurar células vegetais e predação organismos menores, como rotíferos e nematoides (HYRA et al., 2016).

Os tardígrados podem ser encontrados em uma ampla gama de habitats, desde ambientes marinhos até ecossistemas terrestres úmidos. Apesar de sua distribuição global, apenas uma fração das espécies é considerada verdadeiramente cosmopolita (Kaczmarek et al. 2015a). A maioria das espécies apresenta adaptações a habitats específicos, como musgos, líquens, sedimentos marinhos e até mesmo organismos vivos, como algas e cracas. Os ambientes semiterrestres, nos quais a umidade

varia ao longo do tempo, são particularmente importantes para algumas espécies de eutardígrados (MØBJERG et al., 2018).

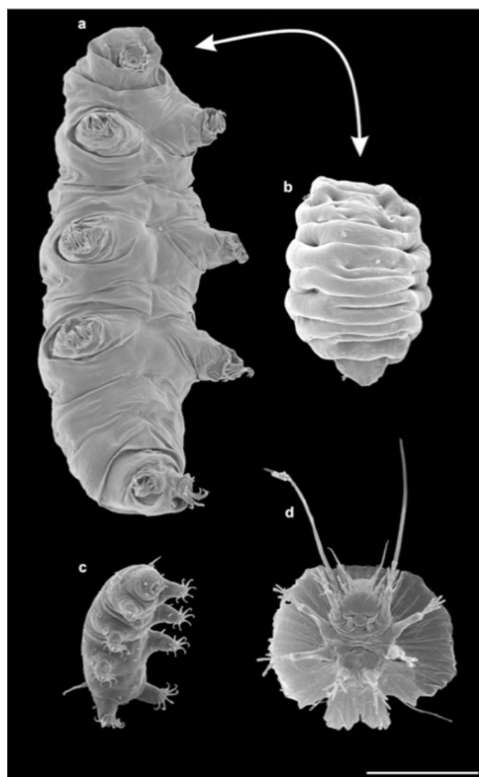


Figura 14 : Diversidade estrutural dos tardígrados: microscopia eletrônica de varredura de representantes adultos selecionados de eutardígrados, equiniscoídeos e artrotardígrados. Note a diferença no tamanho geral, assim como na morfologia. (a) Vista ventral do eutardígrado semiterrestre *Richtersius coronifer* de Öland, Suécia. (b) Vista dorsal do tun anidrobiótico de *R. coronifer*. Depressões na cutícula indicam os locais de fixação dos músculos dorsais. (c) Vista ventrolateral do equiniscoídeo marinho *Isoechiniscoides sifae*. (d) Vista ventral do artrotardígrado marinho *Actinartus cf. doryphorus*. Barra de escala = 100 μ m. (MØBJERG et al., 2018)

A morfologia dos tardígrados reflete sua diversidade ecológica e funcional. Esses organismos microscópicos apresentam um corpo segmentado, com uma cabeça e um tronco que contém quatro pares de patas, cada uma terminada em garras ou discos adesivos, utilizados para fixação ao substrato (figura 15) (MØBJERG et al., 2018). A cutícula, que reveste externamente o corpo, pode variar em textura e ornamentação, sendo lisa, verrugosa ou composta por placas e estrias, adaptações que podem estar associadas à proteção contra predadores e condições ambientais adversas. Na cabeça, encontram-se estruturas sensoriais especializadas, como cirros e clavas, que possuem funções quimiorreceptoras e mecanorreceptoras, auxiliando na percepção do ambiente (MØBJERG et al., 2018).

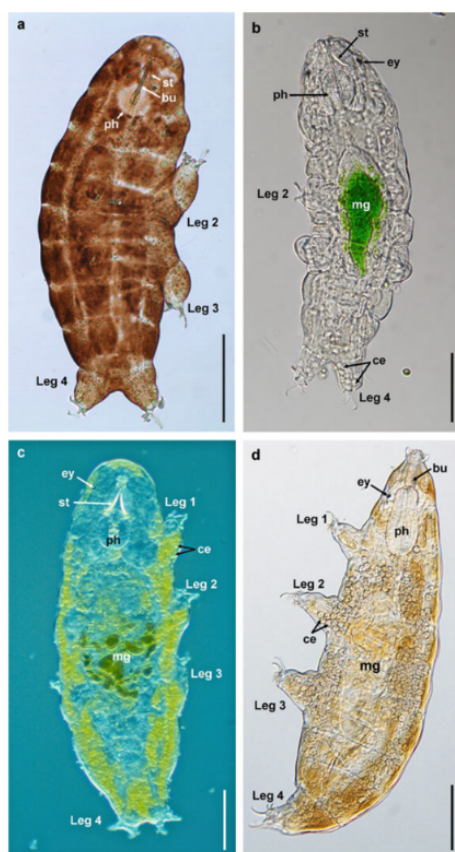


Figura 15 : Diversidade estrutural dos tardígrados: Microscopia óptica de diferentes eutardígrados, com exemplos de espécies representando diversas famílias dentro das duas ordens de eutardígrados, *Parachela* e *Apochela*. (a) Fêmea de *Ramazzottius cf. oberhaeuseri* (*Parachela*, Ramazzottiidae), um criptobionte altamente resistente, com tolerância extrema a uma variedade de condições adversas. A população partenogenética atual vive em sedimentos dentro de uma calha de telhado. Observe a coloração intensa do animal — uma característica típica de espécies semiterrestres. (b) Fêmea de *Hypsibius exemplaris* (*Parachela*, Hypsibiidae), linhagem *Sciento*. *H. exemplaris* é um tardígrado de água doce (límnico) com habilidades criptobióticas moderadas. Note a presença de algas (verdes) no intestino médio. (c) O grande e amarelo *Richtersius coronifer* (*Parachela*, Richtersiidae) é um criptobionte semiterrestre. Observe os coelomócitos, que conferem a essa espécie sua coloração amarelada característica. (d) Fêmea de *Milnesium tardigradum* (*Apochela*, Milnesiidae). O grande *M. tardigradum* semiterrestre é carnívoro e um criptobionte altamente resistente. Abreviações: bu = tubo bucal, ce = coelomócito, ey = olho, mg = intestino médio, ph = bulbo faríngeo com placoides, st = estilete. Barras de escala: 100 µm. (MØBJERG et al., 2018)

A reprodução dos tardígrados é um processo diversificado, variando entre espécies e ambientes. Eles podem se reproduzir tanto sexualmente quanto assexuadamente, dependendo das condições ambientais e da disponibilidade de parceiros. A reprodução sexual ocorre principalmente em espécies gonocóricas, onde há machos e fêmeas distintos. Nesses casos, a fertilização pode ser interna ou externa, e os ovos são frequentemente depositados em locais protegidos, como dentro da exúvia (a cutícula velha que o tardígrado descarta durante a muda) (ALTIERO; SUZUKI;

REBECCHI, 2018). Por outro lado, a reprodução assexuada, como a partenogênese, é comum em espécies unissexuais, onde apenas fêmeas estão presentes. Nesse processo, os ovos se desenvolvem sem fertilização, resultando em clones da mãe. Essa estratégia reprodutiva é particularmente vantajosa em ambientes instáveis, onde a disponibilidade de parceiros pode ser limitada. Além disso, algumas espécies de tardígrados são hermafroditas, possuindo tanto órgãos reprodutivos masculinos quanto femininos. Isso permite que um único indivíduo produza tanto espermatozoides quanto óvulos, aumentando as chances de reprodução em ambientes onde a densidade populacional é baixa (ALTIERO; SUZUKI; REBECCHI, 2018)

A além da diversidade de processos reprodutivos, os tardígrados possuem uma capacidade que chama bastante atenção, são criptobiontes. A criptobiose é um estado de latência que os tardígrados e outros organismos podem entrar para sobreviver a condições ambientais extremas. Durante a criptobiose, o metabolismo é drasticamente reduzido ou até mesmo completamente paralisado, permitindo que o organismo resista a situações que seriam letais em condições normais. Existem diferentes tipos de criptobiose, cada um induzido por um tipo específico de estresse ambiental, e os tardígrados são capazes de entrar em todos, independente do tipo de estresse. A criobiose é o estado de criptobiose induzido por temperaturas extremamente baixas, geralmente abaixo do ponto de congelamento da água. Durante a criobiose, os tardígrados são capazes de sobreviver à formação de gelo dentro de seus corpos, algo que seria fatal para a maioria dos organismos. Eles toleram temperaturas tão baixas quanto -196°C , a temperatura do nitrogênio líquido (SCHILL; HENGHERR, 2018a). Nesse estado, os tardígrados produzem proteínas anticongelantes e acumulam açúcares como a trealose, que ajudam a proteger as células contra danos causados pelo gelo. A trealose, em particular, estabiliza as membranas celulares e as proteínas, evitando que se desnaturem durante o congelamento e o descongelamento (SCHILL; HENGHERR, 2018a). A anoxibiose ocorre em resposta à falta de oxigênio. Em ambientes onde o oxigênio é escasso, como em sedimentos aquáticos ou em locais com alta densidade de matéria orgânica, os tardígrados podem entrar em anoxibiose para sobreviver (HAGELBÄCK; JÖNSSON, 2023). Durante esse estado, o metabolismo é reduzido ao mínimo, e o organismo pode permanecer inativo por longos períodos até que o oxigênio seja restaurado (SCHILL; HENGHERR, 2018a). A anoxibiose é particularmente importante para tardígrados que habitam ambientes aquáticos ou semi-aquáticos, onde flutuações nos níveis de oxigênio são comuns. Nesse estado, os tardígrados podem sobreviver por semanas ou até meses sem oxigênio, dependendo da espécie e das condições ambientais. A osmobiose é induzida por

altas concentrações de sais ou outros solutos no ambiente. Esse tipo de criptobiose é comum em tardígrados que habitam ambientes salinos, como estuários ou zonas intertidais. Durante a osmobiose, os tardígrados perdem água rapidamente devido ao processo de osmose, o que pode levar à dessecação parcial (MØBJERG et al., 2018). Para sobreviver a esse estresse, os tardígrados produzem moléculas protetoras, como a trealose. Além disso, eles podem entrar em um estado de "tun", onde reduzem sua superfície corporal, minimizando a perda de água e protegendo-se dos efeitos nocivos da alta salinidade e a anidrobiose, que é o estado de criptobiose mais estudado e conhecido nos tardígrados, e é o foco principal deste trabalho. Ela ocorre em resposta à dessecação, ou seja, à perda de água do corpo.

Quando o ambiente seca, os tardígrados perdem a maior parte da água corporal e se enrolam em uma forma conhecida como "tun". Nesse estado, o metabolismo é reduzido a níveis quase indetectáveis, e o organismo pode sobreviver por anos, até décadas, sem água (HENGHER; SCHILL, 2018). Durante a anidrobiose, os tardígrados produzem uma série de moléculas protetoras, como as proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*). Essas moléculas ajudam a proteger as células contra danos causados pela perda de água, estabilizando membranas e proteínas e prevenindo a formação de agregados proteicos prejudiciais (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2024). A anidrobiose é particularmente importante para tardígrados que habitam ambientes terrestres, como musgos e líquens, onde a disponibilidade de água pode variar drasticamente. A capacidade de entrar em anidrobiose permite que os tardígrados sobrevivam em ambientes extremamente áridos e colonizem habitats que seriam inóspitos para a maioria dos outros organismos.

Além de sua resistência a condições extremas, os tardígrados também são importantes para a ecologia dos ambientes em que vivem. Eles desenvolvem funções ecológicas significativas, como a decomposição de matéria orgânica e a regulação de populações de microrganismos (NELSON; BARTELS; GUIL, 2018). Em ambientes marinhos, os tardígrados são frequentemente encontrados associados a algas e sedimentos, onde contribuem para a ciclagem de nutrientes e a manutenção da biodiversidade. Apesar de sua importância ecológica e bioquímica, os tardígrados ainda são pouco estudados em comparação com outros grupos de organismos. Muitas espécies permanecem desconhecidas, e sua taxonomia e filogenia ainda são temas de pesquisa ativa (NELSON; BARTELS; GUIL, 2018).

1.6 Anidrobiose

O termo "anidrobiose" foi cunhado por Alfred Giard em 1894 para descrever a capacidade de certos organismos de resistir à dessecação extrema, pesquisadores observaram que organismos aparentemente mortos voltavam à vida após a reidratação (Hengherr and Schill 2018; Keilin, 1959; Watanabe, 2006). Ou seja, é um estado de animação suspensa no qual os tardígrados podem sobreviver à ausência de água. Durante esse estado, os tardígrados reduzem drasticamente seu metabolismo e algumas espécies substituem a água corporal por açúcares como a trealose (HENGHERR; SCHILL, 2018; SCHILL; HENGHERR, 2018b). Esse processo, conhecido como “*tun*” ou vitrificação, protege as células dos danos causados pela perda de água. Os tardígrados podem sobreviver em estado de anidrobiose por anos, resistindo a condições extremas como falta de oxigênio, congelamento e altas doses de radiação (HENGHERR; SCHILL, 2018).

O processo de anidrobiose envolve três estágios principais: desidratação, dessecação e estado seco. Durante a desidratação, os tardígrados perdem gradualmente a água corporal, mas mantêm as macromoléculas hidratadas. Nessa fase, ocorrem alterações na concentração intracelular de solutos, no pH e na viscosidade da célula, o que pode afetar a estabilidade de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membrana (SCHILL; HENGHERR, 2018b). No estágio de dessecação, a quantidade de água na célula cai, e o metabolismo é interrompido (SCHILL et al., 2009). Nessa fase, os dissacarídeos acumulados anteriormente formam ligações de hidrogênio com as macromoléculas, substituindo a água e prevenindo danos estruturais (HIBSHMAN; CLEGG; GOLDSTEIN, 2020). Esse mecanismo é indispensável para a estabilização das membranas celulares e das proteínas durante a desidratação. No estado seco, os tardígrados entram em estado de *tun*, que é a anidrobiose propriamente dita. Nessa fase, o citoplasma é substituído por uma matriz sólida amorfa, conhecida como biovidro, que impede a difusão molecular e mantém a integridade celular (NEUMANN et al., 2009). A trealose, em algumas espécies, pode cumprir um papel fundamental na formação do biovidro, atuando como um estabilizador cinético que impede a difusão molecular e aumenta a viscosidade do meio (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2024). No entanto, a trealose não é o único fator envolvido, pois alguns organismos anidrobióticos, como os rotíferos bdeloides, não acumulam trealose, indicando que outros mecanismos moleculares também estão em agindo ((MØBJERG et al., 2018; SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2024).

Além da acumulação de dissacarídeos, os tardígrados possuem sistemas de reparo de DNA e proteínas de choque térmico que ajudam a proteger as células dos danos causados pela desidratação e reidratação (BOOTHBY et al., 2017). Esses mecanismos de proteção são ativados em resposta ao estresse hídrico e são essenciais para a sobrevivência dos tardígrados em condições extremas. Estudos recentes indicam que tardígrados possuem vias de reparo de DNA altamente eficientes, incluindo junção de extremidades não homólogas (NHEJ), recombinação homóloga, reparo de excisão de nucleotídeos e reparo de excisão de bases (HASHIMOTO et al., 2016b). Essas vias são essenciais para a sobrevivência em ambientes hostis, onde o DNA pode ser danificado por radiação ou estresse oxidativo. Uma das descobertas mais interessantes é a presença de proteínas únicas em tardígrados, como a Dsup (*Damage Suppressor Protein*), que protege o DNA contra danos causados por radicais hidroxila e radiação UV (HASHIMOTO et al., 2016a). A Dsup se liga ao DNA nuclear, formando uma barreira física que reduz a fragmentação do DNA e a formação de quebras de fita dupla. Outra proteína importante é a TDR1, que também se liga ao DNA e forma agregados que protegem contra danos oxidativos (ANOUD et al., 2024). Além disso, a expressão de proteínas de choque térmico (HSPs) e proteínas LEA tem sido observada em resposta à dessecação em tardígrados e outros organismos anidrobióticos, sugerindo que essas proteínas podem estar envolvidas na proteção e reparo celular durante a anidrobiose (HESGROVE; BOOTHBY, 2020; SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2024; SCHILL et al., 2009).

A capacidade de reparo de DNA em tardígrados é complementada por um sistema antioxidante robusto, que inclui enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase e peroxidase, além de antioxidantes de baixo peso molecular, como glutathiona (Sadowska et. al 2024). Durante a anidrobiose, se acredita que a produção de EROs aumente, mas os tardígrados são capazes de controlar as EROs através da ativação de enzimas antioxidantes. Já foi evidenciado que os tardígrados estão entre os animais que usam do mecanismo do Preparo para o Estresse Oxidativo (POS) como estratégia para lidar com os desafios da anidrobiose. Durante a formação do *tun*, no estado de anidrobiose, os tardígrados aumentam a expressão de enzimas antioxidantes, como SOD, catalase e peroxirredoxinas (SCHOKRAIE et al., 2010). Um dos exemplos é o tardígrado *Milnesium tardigradum*. Schokraie et al. (2010) realizaram uma análise proteômica comparativa de *M. tardigradum* em diferentes estados. Os resultados mostraram um aumento significativo na expressão de proteínas antioxidantes, como SOD e GST durante o estado de *tun*. Além disso, o estudo identificou a presença de proteínas como as LEA, que ajudam a proteger as estruturas celulares contra

danos oxidativos. Outro exemplo, é um estudo realizado por Rizzo et al. (2010), onde os autores investigaram as defesas antioxidantes do tardígrado *Paramacrobiotus richtersi* em dois estados fisiológicos: hidratado (ativo) e desidratado (anidrobiótico) (RIZZO et al., 2010). Os resultados mostraram que os tardígrados aumentam suas defesas antioxidantes durante a desidratação, especialmente através da ativação da SOD e GPx, e do aumento dos níveis de glutathione (GSH). No entanto, a peroxidação lipídica ainda ocorre durante a anidrobiose, indicando que os tardígrados desidratados são mais vulneráveis a danos oxidativos, especialmente em períodos prolongados de anidrobiose. Em outro estudo, pesquisadores investigaram a resposta antioxidante durante a cinética da anidrobiose em duas espécies de tardígrados, *Paramacrobiotus spatialis* e *Acutuncus antarcticus*. Os resultados mostraram que a atividade da catalase aumentou significativamente durante o processo de desidratação em *P. spatialis*, atingindo o pico nos animais desidratados, e diminuiu durante a reidratação, retornando aos níveis basais após 24 horas. Esse aumento na atividade da catalase sugere a importância dessa enzima na proteção contra o estresse oxidativo gerado pela desidratação, atuando no controle do H_2O_2 intracelular (GIOVANNINI et al., 2022b).

A literatura também tem mostrado evidências da ausência de metabolismo durante a anidrobiose em tardígrados e em outros invertebrados. Essas evidências sugerem que os tardígrados entram em um estado de ametabolismo, no qual todas as atividades metabólicas são suspensas. Isso foi demonstrado em experimentos com nematoides anidrobiontes, que sobreviveram em ambientes completamente desprovidos de oxigênio por longos períodos (Eisenback et al., 2013; Shatilovich et al., 2023). Durante a anidrobiose ocorre a cessação de processos biológicos como crescimento, reprodução e replicação do DNA, o que configura o ametabolismo (MØBJERG et al., 2011). Apesar das evidências que sustentam o ametabolismo durante a anidrobiose, os mecanismos moleculares exatos que permitem essa suspensão metabólica ainda não são completamente compreendidos. Como visto, a anidrobiose em tardígrados é um fenômeno complexo que envolve a interação de múltiplos mecanismos de proteção, incluindo o reparo de DNA, a defesa antioxidante e a acumulação de dissacarídeos como a trealose. Como visto, sabe-se que os genes-alvo que codificam a enzima catalase e a síntese de glutathione (GSH) via glutathione sintetase têm papéis críticos durante a reidratação de tardígrados, indicando que a tolerância à dessecação depende da integração de mecanismos antioxidantes. Isso sugere que a regulação redox e a capacidade antioxidante são centrais para a anidrobiose, assim como observado em modelos primitivos de vida multicelular, como esponjas do Cambriano. Todas essas características tornam esses animais modelos ideais para

investigar os mecanismos de defesa antioxidante e sua relação com a sobrevivência sob estresses abióticos severos. Uma das principais teorias que explicam a adaptação de organismos a condições de baixa oxigenação é a do Preparo para o Estresse Oxidativo (POS), proposta há mais de duas décadas. A teoria do POS revela ativam suas defesas antioxidantes ao enfrentar estresses periódicos, preparando-se para desafios como a reoxigenação pós-hipóxica, ou a reidratação pós-anidrobiótica (Hermes-Lima et al., 2015).

2 ESPÉCIE DE TARDÍGRADO ESTUDADA

O gênero *Paramacrobiotus* pertence à família Macrobiotidae e foi estabelecido em 2009, após a separação do gênero *Macrobiotus*, com base em diferenças morfológicas (DEGMA; BERTOLANI; GUIDETTI, 2014). Atualmente, existem 45 espécies descritas, distribuídas em várias regiões do planeta em diversos habitats, desde musgos e líquens até ambientes aquáticos e solos úmidos (figura 16) (KAYASTHA et al., 2023). Sua capacidade de sobreviver a condições ambientais extremas, como dessecação e variações de temperatura, reforça sua adaptabilidade e sucesso ecológico.

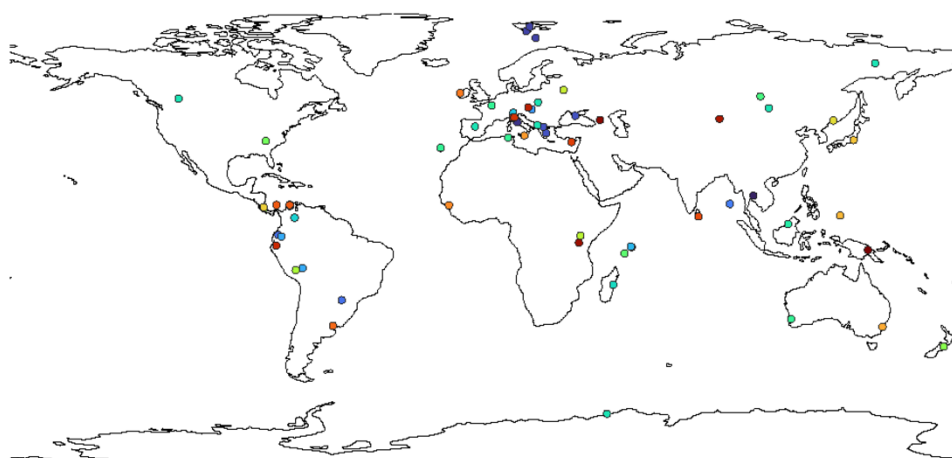


Figura 16 : Distribuição geográfica das espécies do gênero *Paramacrobiotus*. (KAYASTHA et al., 2023).

A diferenciação entre *Paramacrobiotus* e *Macrobiotus* ocorre, entre outros fatores, pelo formato dos ovos e pelas características bucais e placoidais. Enquanto *Macrobiotus* possui ovos com processos em forma de cálice invertido, os ovos de *Paramacrobiotus* apresentam processos em forma de cone reticulado. Além disso, as espécies do gênero *Paramacrobiotus* possuem sempre três macroplacoides bem separados na faringe, enquanto em *Macrobiotus* o terceiro macroplacoide é

frequentemente reduzido ou ausente. Outra característica distintiva é a ausência de poros cuticulares em *Paramacrobiotus*, enquanto *Macrobiotus* os apresenta (KAYASTHA et al., 2023; STEC; DUDZIAK; MICHALCZYK, 2020).

As espécies do gênero *Paramacrobiotus* são classificadas em dois grandes grupos: o grupo *areolatus*, que não apresenta microplacoide na faringe, e o grupo *richtersi*, que o possui. Essa divisão, inicialmente baseada em morfologia, foi posteriormente questionada por análises filogenéticas, sugerindo que a presença ou ausência do microplacoide pode ter evoluído independentemente em diferentes linhagens do gênero (KAYASTHA et al., 2023; STEC; DUDZIAK; MICHALCZYK, 2020).

É possível identificar uma certa diversidade de formas reprodutiva dentro de *Paramacrobiotus*, incluindo espécies bissexuais e partenogenéticas. As espécies bissexuais apresentam fertilização externa, com os machos liberando espermatozoides no ambiente logo após a postura dos ovos (DEGMA; BERTOLANI; GUIDETTI, 2014). Em algumas populações, a reprodução partenogenética, na qual apenas fêmeas são encontradas, é predominante, e estudos citogenéticos indicam que essas linhagens tendem a ser triploides, enquanto as bissexuais geralmente são diploides (KAYASTHA et al., 2023). Essa variação na reprodução pode influenciar a distribuição geográfica das espécies, sendo que as populações partenogenéticas frequentemente apresentam ampla dispersão.

No que se refere ao comportamento alimentar, os *Paramacrobiotus* são onívoros, consumindo cianobactérias, algas, fungos e pequenos invertebrados, como rotíferos, nematoides e juvenis de outros tardígrados. Os adultos preferem presas maiores, enquanto os juvenis consomem principalmente algas unicelulares. Esse padrão alimentar indica a importância do gênero nas cadeias tróficas de microambientes, atuando como predadores e consumidores primários (KAYASTHA et al., 2023).

Um dos aspectos importantes do gênero *Paramacrobiotus* é sua capacidade de entrar em criptobiose. Estudos genéticos têm explorado a relação filogenética dentro do gênero *Paramacrobiotus*, utilizando marcadores moleculares como os genes 18S rRNA, 28S rRNA, ITS-2 e COI. Essas análises têm demonstrado que o gênero é mais diverso do que se pensava inicialmente, e novas linhagens continuam sendo identificadas (KAYASTHA et al., 2023). A recente caracterização do microbioma de algumas espécies revelou a presença de endossimbiontes do gênero *Wolbachia*,

sugerindo possíveis interações ecológicas e evolutivas ainda pouco compreendidas dentro do grupo (MIODUCHOWSKA et al., 2021).

Atualmente, estamos conduzindo a descrição de uma nova espécie pertencente ao gênero, provisoriamente identificada como *Paramacrobiotus cf. centesimus*, objeto de estudo do presente trabalho (figura 17). O uso da abreviação "cf." indica que a morfologia da espécie sugere semelhança com *P. centesimus*, mas que uma identificação definitiva ainda depende de análises adicionais. A descrição encontra-se em andamento e inclui a análise detalhada de espécimes coletados em musgos, por meio de técnicas de microscopia óptica e eletrônica de varredura (MEV). No momento, as imagens de MEV ainda não foram concluídas, mas sua obtenção será essencial para caracterizar as estruturas morfológicas e confirmar possíveis diferenças em relação às espécies descritas.

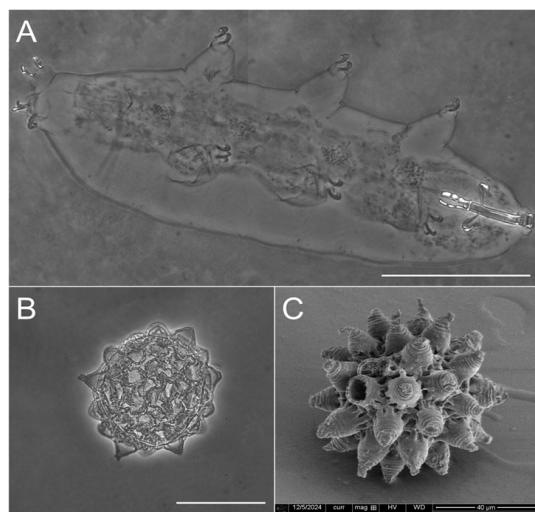


Figura 17 : **Imagens da espécie em descrição:** *Paramacrobiotus cf. centesimus* A: Habitus, indivíduo coletado para identificação; B: Ovo não-fecundado; C: Ovo em microscopia eletrônica de varredura. Imagens de A e B em microscopia de contraste de fase. Escalas de A e B: 100 μ m e 50 μ m respectivamente. Imagens obtidas em parceria com com Victor Renan de Paula, integrante do Laboratório de Desenvolvimento e Metamorfose de Díptera, da UnB.

De acordo com a nossa análise, a morfologia externa específica do de *P. cf. centesimus* inclui uma cutícula lisa (figura 18), sem ornamentações visíveis, e uma cavidade oral com três fileiras de dentes. Os olhos estão ausentes e as lunulas das garras do quarto par de pernas são suaves, sem dentição. A faringe contém três macroplacoides bem definidos, organizados na sequência de comprimento $2 < 1 < 3$. Os indivíduos dessa espécie possuem um tamanho que varia entre 350 μ m e 480 μ m, com variações dependendo do estágio de desenvolvimento e das condições ambientais

(KAYASTHA et al., 2023). Os ovos de *P. cf. centesimus* pertencem ao tipo *areolatus*, apresentando um diâmetro total inferior a 92,0 µm e processos com altura inferior a 11,5 µm. Os processos possuem forma de cone simples e são distribuídos ao redor da circunferência do ovo em número de 11 a 12 (KAYASTHA et al., 2023). Essa espécie habita predominantemente ambientes úmidos, como musgos e líquens, sendo encontrada em regiões temperadas e tropicais. Sua distribuição sugere uma alta capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, incluindo variações na disponibilidade de água e temperatura (KAYASTHA et al., 2023).

Além da caracterização morfológica, estudos moleculares serão conduzidos para avaliar o posicionamento filogenético da nova espécie dentro do gênero *Paramacrobiotus*. A análise de sequências de DNA é importante para comparar os espécimes estudados com os dados disponíveis em bancos genéticos e verificar se há variação significativa que justifique a descrição de uma nova espécie. Com a finalização da análise morfológica e genética, será possível determinar se a espécie representa uma nova adição à taxonomia dos tardígrados ou se se trata de uma variação morfológica de uma espécie já conhecida (figura 18).



Figura 18 : *Paramacrobiotus cf. centesimus* em estado hidratado. DM500 microscope. Imagem obtida em parceria com o Laboratório de Desenvolvimento e Metamorfose de Díptera.

3 JUSTIFICATIVA

Tardígrados são organismos extremófilos capazes de tolerar condições ambientais extremas, incluindo dessecação, variações de temperatura e hipóxia. Essas características tornam esses animais

modelos ideais para investigar os mecanismos de defesa antioxidante e sua relação com a sobrevivência sob estresses abióticos severos. Uma das principais teorias que explicam a adaptação de organismos a condições de baixa oxigenação é a do Preparo para o Estresse Oxidativo (POS), proposta há mais de duas décadas. A teoria do POS revela ativam suas defesas antioxidantes ao enfrentar estresses periódicos, preparando-se para desafios como a reoxigenação pós-hipóxica, ou a reidratação pós-anidrobiótica (Hermes-Lima et al., 2015). Nos últimos 25 anos, nosso laboratório tem se dedicado ao estudo da POS, inclusive investigando o impacto de inibidores antioxidantes em diferentes organismos.

Os resultados obtidos até o momento com peixes e moluscos, citados anteriormente, não demonstraram de forma clara a importância do POS na capacidade dos organismos de lidar com ciclos de anóxia/hipóxia e reoxigenação. Isso porque, a inibição da catalase com ATZ, ou da síntese de glutathione com BSO, não resultou em um aumento expressivo de marcadores de estresse oxidativo, como TBARS ou carbonil. O resultado mais relevante foi o aumento da razão GSSG/GSHt observado nas tilápias em reoxigenação (e injetados com ATZ) e em caracóis em anóxia (e injetados com BSO). Porém não se observou dano oxidativo, ou morbidade/mortalidade entre os animais. Diante disso, direcionamos nossa investigação para os tardígrados, explorando a relevância da POS nesse modelo. Resultados preliminares obtidos por uma estudante de IC indicaram que a inibição da catalase com ATZ, em concentrações inicialmente elevadas (10 mM), levou à mortalidade de 100% dos animais na fase de recuperação do *tun*. Além disso, vimos que mesmo após a redução da concentração do inibidor (para 1 mM), a combinação de ATZ com anidrobiose continuava mantendo uma taxa de mortalidade ainda significativa (acima de 90%), sugerindo um impacto direto no sistema antioxidante desses organismos. Sabíamos que outras espécies de tardígrados já haviam demonstrado a capacidade de realizar POS (Hermes-Lima et al. 2015), o que reforçou a escolha desse grupo como modelo experimental. Assim, este estudo representou nossa última tentativa de evidenciar a importância da POS para a sobrevivência de organismos submetidos a condições extremas de estresse oxidativo.

Do ponto de vista evolutivo, entender como tardígrados regulam o estresse oxidativo pode ajudar a revelar estratégias bioquímicas compartilhadas com outros organismos resistentes. A capacidade de mitigar os efeitos do estresse oxidativo pode ter sido uma característica adaptativa crucial para a sobrevivência de organismos em ambientes instáveis. Além disso, a comparação dos mecanismos antioxidantes dos tardígrados com os de outros organismos tolerantes ao estresse pode revelar padrões evolutivos que ajudem a compreender melhor a biologia da resistência extrema.

Este estudo tem relevância tanto no campo da biologia evolutiva quanto na biomedicina e na astrobiologia. A elucidação dos mecanismos antioxidantes dos tardígrados pode inspirar estratégias para a preservação celular em condições adversas, além de fornecer subsídios para pesquisas sobre tolerância ao estresse em outras espécies. Além disso, a resiliência desses organismos a condições espaciais extremas torna-os um modelo promissor para investigações sobre os limites da vida fora da Terra.

4 OBJETIVOS

Nesse contexto, o objetivo principal deste trabalho é caracterizar a tolerância de tardígrados à anidrobiose, investigando o papel do sistema antioxidante (com ênfase na catalase e na via de síntese de GSH) durante ciclos de dessecação e reidratação, na presença de inibidores enzimáticos (aminotriazol e butionina sulfoximina). Para isso, vamos:

1. Avaliar os efeitos dos inibidores aminotriazol (ATZ) e butionina sulfoximina (BSO) sobre a sobrevivência e metabolismo redox dos tardígrados.
2. Investigar a resposta antioxidante desses animais frente à inibição de enzimas-chave do sistema antioxidante.
3. Testar a hipótese de que a POS é um mecanismo essencial para a sobrevivência dos tardígrados no retorno da anidrobiose.

5 METODOLOGIA

5.1 Local de coleta

Inicialmente, foi realizado o cadastramento do projeto e da espécie no Sistema de Autorização e Informações em Biodiversidade (SISBIO), e obtivemos uma autorização para atividades com finalidade científica, sob o número 90279-1. As coletas ocorreram no campus Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília (UnB), em uma região com alta concentração de árvores, atrás do Memorial

Darcy Ribeiro (Beijódromo), indicada na figura 19. A região foi escolhida por estar próxima a um espelho d'água, pela densidade de árvores e por ser úmida, características que criam um ambiente propício para o desenvolvimento de musgos e, consequentemente, para a presença de tardígrados. Nesses musgos, foram encontrados indivíduos de diversas espécies, mas fizemos a triagem e selecionamos, por características morfológicas, apenas animais *Paramacrobiotus* cf. *centesimus*.



Figura 19 : Local de coleta: Imagem planimétrica do Campus Darcy Ribeiro, com foco na região do Memorial Darcy Ribeiro (Beijódromo) e imagem horizontal das árvores (Latitude -15°45'32.5850", Longitude -47°52'3.1310"). Fonte: SEMA/UnB e imagem do autor.

A coleta manual era realizada com espátulas metálicas, utilizadas para destacar os musgos do substrato, e armazenando em recipientes para transporte ao laboratório (figura 20) (Dutra et. al., 2017). Para garantir a preservação da população local, a coleta foi feita em diferentes regiões das árvores, permitindo que novos musgos pudessem se desenvolver. Além disso, priorizou-se por coletar em regiões mais altas dos troncos e galhos, utilizando uma escada para alcançar essas áreas. A coleta manual era realizada com espátulas metálicas, utilizadas para conseguirmos extrair o musgo sem despedaçá-lo.



Figura 20 : Coleta de musgo para isolamento de tardígrados: (A) Etapa de raspagem do troco de árvores utilizando espátula metálica e (B) Musgo armazenados em sacos plásticos do tipo ziplock para transporte e posterior tratamento em laboratório. Imagens do autor.

Durante o período de chuvas (outubro a março, típico de Brasília), a coleta tornou-se mais limitada devido às condições do ambiente úmido e à redução no número de animais observada na época de seca (abril a setembro). Essa variação sazonal representou um problema para a coleta, dificultando a realização de experimentos que exigiam maior número de animais, por exemplo.

5.2 Captura e triagem dos animais

No laboratório, os musgos coletados eram distribuídos em placas de Petri, sempre posicionando os rizoides (raízes) para cima (figura 21 a e b), e os filoides em contato com a água, isso era feito estrategicamente para permitir que mais tardígrados presentes no musgo se desprendessem durante o processo de hidratação, além de diminuir matéria orgânica que dificultasse a visualização posterior dos animais. Em seguida, adicionava-se água filtrada até a borda da placa, assegurando que o musgo ficasse completamente submersa, criando um ambiente propício para que os animais migrassem para a solução aquosa. Os musgos eram mantidos nesse estado de hidratação por um período de 2 a 3 horas, tempo suficiente para permitir a reidratação e o desprendimento dos animais do substrato vegetal. Após esse período de molho, os musgos eram removidos das placas de Petri e o excesso de água retido no musgo era espremido de volta para a mesma placa. Essa solução era então observada sob um estereoscópio (figura 21c), permitindo a visualização e a captura dos

tardígrados. Os animais eram coletados utilizando uma micropipeta de 10 μ L e transferidos para lâminas côncavas.

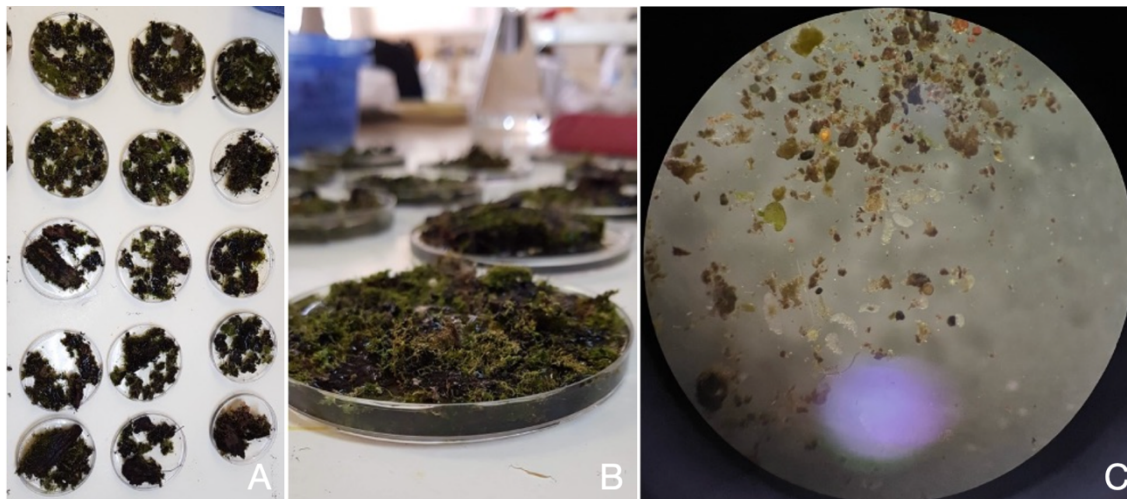


Figura 21 : Imagens da etapa de triagem dos animais: (A e B) musgos sendo hidratados para posterior triagem; (C) tardígrados encontrados nos musgos após o período de hidratação, observação pelo estereoscópio (aumento de 30x). Imagens obtidas em nosso laboratório.

5.3 Indução à anidrobiose

Após a coleta, os tardígrados eram transferidos para lâminas côncavas no mesmo dia e imersos em uma solução de água filtrada com volume de 200 μ L. Em seguida, mantidos por 24 horas em um ambiente controlado com umidade relativa de ~98-99%, com o objetivo de esvaziar o estômago e induzir um estado de pré-estresse, esse ambiente era mantido em alta umidade por meio da adição de água ultrapura (dd H₂O) no fundo de um recipiente com tampa, o ambiente era monitorado por meio de um termo-higrômetro. Após esse período, os animais eram observados em estereoscópio para verificar sua atividade. Somente os indivíduos que estavam ativos seguiam para a próxima etapa. Na segunda etapa, os tardígrados eram transferidos para um ambiente com umidade reduzida (~30-35%), onde permaneciam por mais 24 horas, a baixa umidade era mantida por meio de um dessecador com sílica no fundo e também monitorados com termo-higrômetro, onde permaneciam por mais 24 horas, durante todo o processo a temperatura era mantida entre 26 e 28°C. Após esse período, era possível observar, com auxílio do estereoscópio, que os animais haviam entrado em estado de *tun* (anidrobiose), na figura 22 observa-se o protocolo e na 23 imagens dos animais durante o processo.

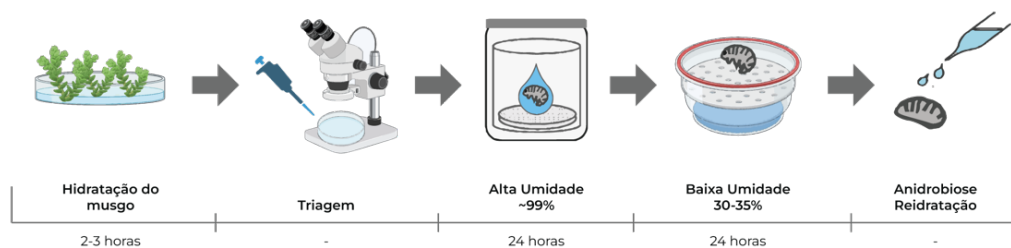


Figura 22 : Protocolo de indução a anidrobiose:No laboratório, os musgos coletados eram hidratados em placas de Petri por 2 a 3 horas, permitindo o desprendimento dos tardígrados. Após remoção do musgo, a solução era analisada sob estereoscópio para triagem dos animais, que eram transferidos para lâminas côncavas com 200 μL de água filtrada. Em seguida, eram mantidos por 24 horas em um ambiente úmido ($\sim 99\%$), seguido da fase de desidratação em baixa umidade ($\sim 30\text{-}35\%$) por mais 24 horas, até entrarem em estado de *tun* (anidrobiose), logo em seguida eram reidratados.

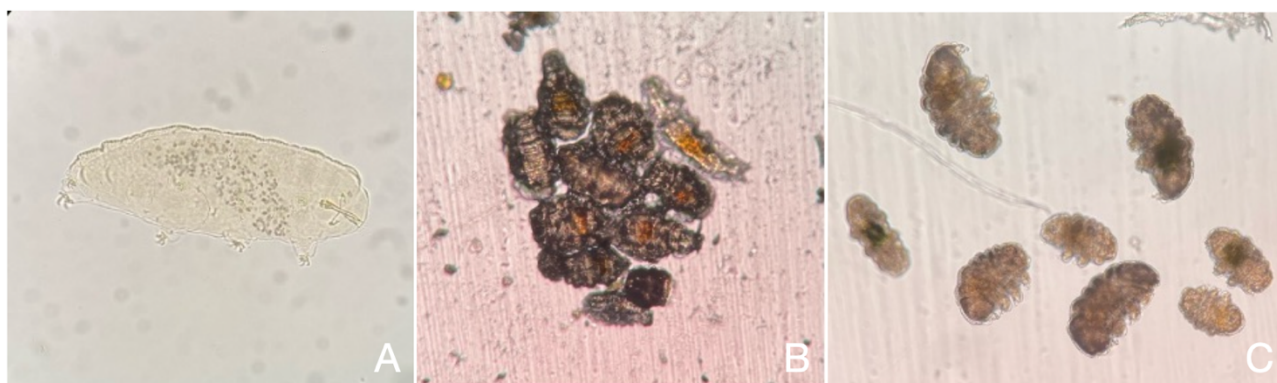


Figura 23 : Tardígrados em diferentes etapas do protocolo experimental: (A) tardígrado ativo após a triagem; (B) tardígrados em anidrobiose (estado de *tun*); (C) tardígrados reidratados após a anidrobiose. Escalas de a: 100 μm , b e c: 50 μm respectivamente. Imagens do autor.

Para os grupos em que houve inibição, o protocolo foi adaptado: nas primeiras 24 horas, os tardígrados foram mantidos em uma solução com inibidores, 3-Amino-1,2,4-triazole (ATZ) (PM: 84,08 g/mol; SIGMA, Cód.: A8056) e L-Buthionine Sulfoximine (BSO) (PM: 222,31 g/mol; SIGMA, Cód.: B2515). em seguida transferidos para o ambiente de alta umidade ($\sim 99\%$), depois transferidos para o ambiente de baixa umidade ($\sim 30\text{-}35\%$), durante todo o protocolo os animais eram mantidos em temperaturas entre 26 e 28°C. Após as 24 horas nesse ambiente, também era observado se os

tardígrados haviam entrado em estado de *tun*, seguidamente eram reidratados e mantidos na água por até 10 minutos, depois eram congelados em nitrogênio líquido, conforme figura 24.

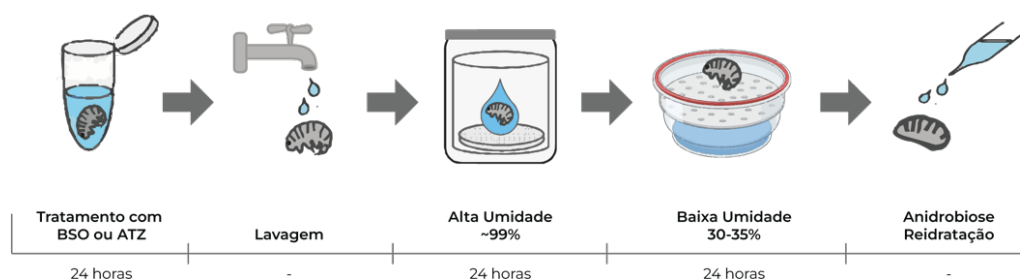


Figura 24 : Protocolo de tratamento com inibidores (ATZ 0,3mM e BSO 0,25mM) e indução à anidrobiose: Protocolo de tratamento com inibidores e indução à anidrobiose: animais expostos por 24 horas a inibidores (BSO ou ATZ), lavagem dos animais para remoção total dos inibidores, manutenção em ambiente úmido (~99%) por 24 horas, desidratação em baixa umidade (~30-35%) por 24 horas até a indução do estado de *tun* (anidrobiose), seguida da reidratação dos animais.

5.4 Preparo de Extrato Proteico para Catalase e Proteínas Totais

Após passarem pelas condições experimentais de cada experimento, os tardígrados eram pesados utilizando uma balança analítica. Inicialmente, os tubos de microcentrífuga eram pesados vazios, e, ao transferir os tardígrados para esses tubos, a água residual também era contabilizada para determinar o peso real do material biológico. Em seguida, as amostras eram congeladas em ultracongelador a -80°C até o momento da homogeneização.

A solução homogeneizadora utilizada continha 1,5% (p/v) de NaCl, 0,1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e um coquetel inibidor de protease na proporção de 1:1.000 (P8340, Sigma-Aldrich). O processo de homogeneização seguiu o protocolo descrito por Regoli et al. (2004). A homogeneização foi realizada utilizando um processador ultrassônico (VC 50T, Sonic & Material), com os tubos mantidos em gelo para minimizar a degradação térmica das amostras. O processo consistiu em três ciclos de ultrassonicação, com a ponta do equipamento mantida em contato com o líquido por 15 segundos, seguidos de 1 minuto de repouso para evitar o aquecimento excessivo. O volume final de homogeneização variava conforme a quantidade de material obtido, o *pool* de tardígrados variava entre 1,8mg e 2,4mg, sendo diluídos na proporção de 1:10, resultando em um volume entre 18 μL e 24 μL de homogeneizado.

Após a homogeneização, as amostras eram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 6 minutos a 4°C . O sobrenadante era transferido para um novo tubo e mantido em gelo para ser utilizado no ensaio de quantificação da atividade de catalase no mesmo dia da preparação. Além disso, aproximadamente 5 μL de cada amostra eram separados para a quantificação de proteínas totais utilizando Qubit® Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Q3321), e lidas no Qubit® Fluorometer.

5.5 Preparo de Extrato para Glutathione Total

O *pool* de tardígrados usado em cada condição experimental, que variava entre 1,8mg e 2,4mg, era congelado em nitrogênio líquido. E o extrato usado para quantificar os níveis de Glutathione Total era em concentração de 1:10, usando ácido tricloroacético (TCA) em concentração final de 10%. Usava-se um estoque de 20% de TCA, diluído em água MiliQ já com a amostra, de forma a ter uma concentração final de 10%. Após isso, os animais passavam por três ciclos de ultrassonicação, as amostras ficavam em contato com um processador ultrassônico (VC 50T, Sonic & Material) por 15 segundos, e um intervalo de um minuto entre cada ciclo. Os tubos eram mantidos em gelo para minimizar a degradação térmica das amostras. Depois eram observadas em estereoscópio para verificar se todo o tecido havia sido homogeneizado. Após isso, eram centrifugadas a $10.000 \times g$ por 6 minutos a 4°C . O sobrenadante era coletado com muito cuidado, para evitar qualquer contato com o pellet. Esses pellets eram guardados, depois ressuspensos em 100mM de NaOH.

5.6 Ensaio bioquímicos

5.6.1 Catalase

A atividade da catalase foi determinada pelo monitoramento da decomposição do do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Diferente dos ensaios tradicionais realizados em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm a 240 nm (Aebi, 1984), a adaptação deste método para o espectrofotômetro Nanodrop One Microvolume Uv-Vis permitiu a análise utilizando volumes reduzidos de amostra diretamente no pedestal do equipamento. Essa adaptação foi necessária devido a limitação no volume disponível de amostra, garantindo que as medições pudessem ser realizadas sem desperdício de material biológico. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 230 nm, diferente dos 240 nm utilizados em espectrofotômetros tradicionais, baseada em estudos prévios que demonstraram que o NanoDrop apresenta um desempenho mais estável e sensível para pequenos volumes nesse comprimento de onda, minimizando ruído e interferências no microvolume de amostra analisado

(Diaz-Albiter et al., 2011; Nelson et. al 1972). O NanoDrop ajusta automaticamente o caminho óptico entre 0,05 e 1 mm, dependendo da concentração da amostra (GÖTZE; SABOROWSKI, 2011)

O volume de homogeneizado utilizado foi reduzido proporcionalmente em relação ao protocolo original, e a por meio da padronização foi definida a utilização de 6 μL da amostra, mantendo as mesmas concentrações de reagentes descritas no protocolo, mas ajustadas para um volume final de 30 μL . O homogeneizado foi diluído na proporção 1:10. As concentrações finais dos reagentes na reação foram: tampão KPi 50 mM pH 7,2, EDTA 1 mM e H_2O_2 10 mM.

A reação foi realizada previamente em um microtubo, e um volume de aproximadamente 2 μL foi pipetado diretamente no pedestal para leitura. A leitura foi realizada no modo endpoint, a cada 10 segundos, totalizando 60 segundos. Para cada medição, 2 μL de meio reacional foram pipetados no pedestal, a leitura foi realizada, o pedestal foi limpo com água ultrapura e uma nova alíquota de 2 μL foi aplicada, repetindo o processo até o tempo total ser atingido.

Para os cálculos da atividade enzimática, foi utilizado o coeficiente de absortividade molar do H_2O_2 em 230 nm de $0,036 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, conforme descrito em estudos anteriores (Diaz-Albiter et al., 2011; Gotze et. al, 2011; Nelson et. al, 1972). Foram subtraídas as taxas controle de ausência de homogeneizado e ausência de substrato (H_2O_2) dos testes amostrais para descontar eventuais consumos de H_2O_2 independentes da atividade de catalase.

5.6.2 Proteínas Carboniladas

A quantificação de proteínas carboniladas foi realizada utilizando o Protein Carbonyl Content Assay Kit (MAK094), um método baseado na derivatização dos grupos carbonila presentes em proteínas com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH). Esse reagente reage especificamente com os grupos carbonila, formando adutos estáveis de dinitrofenil-hidrazona (DNP-hidrazona), que podem ser quantificados por espectrofotometria a 375 nm, refletindo o nível de oxidação proteica. O protocolo foi realizado com a homogeneização de um *pool* de tardígrados, onde aproximadamente 1,9 – 2,0 mg de tecido foi homogeneizado em 100 μL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,4). A homogeneização foi realizada por três ciclos de ultrassonicação, com a ponta do equipamento mantida em contato com o líquido por 15 segundos, seguidos de 1 minuto de repouso para evitar o aquecimento excessivo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $13.000 \times g$ por 5 minutos, e o sobrenadante coletado e mantido em gelo ou armazenado a -80°C para análises posteriores.

Na etapa de derivatização, foi adicionado 100 μL da solução de DNPH a cada amostra, seguido de vortexagem e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Após essa reação, foi adicionado 30 μL da solução de TCA a 87%, as amostras foram vortexadas rapidamente (5 segundos) e incubando no gelo por 5 minutos. As amostras foram então centrifugadas a $13.000 \times g$ por 2 minutos, e o sobrenadante descartado sem perturbar o pellet formado. Para remover DNPH livre, foi realizada uma lavagem com 500 μL de acetona gelada, seguida de sonicação por 30 segundos, incubação a -20°C por 5 minutos e centrifugação a $13.000 \times g$ por 2 minutos, com descarte do sobrenadante. Após a última remoção do DNPH livre, o pellet foi ressuspensionado em 200 μL de solução de Guanidina 6 M, seguido de breve sonicação para auxiliar na solubilização. A amostra solubilizada foi então transferida para uma placa de 96 poços half-area, e a absorbância medida a 375 nm.

A quantificação da carbonilação proteica foi realizada com base na absorbância corrigida pelo branco, utilizando o coeficiente de absortividade molar ajustado de acordo com o volume final de 45 μL . O coeficiente de absortividade molar fornecido no protocolo original é $22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0,2893 \text{ cm} = 6,364$, baseado em um volume de 100 μL , o caminho óptico (pathlength) de 0,2893 cm para uma placa de 96 poços padrão. Como foi usado 45 μL em uma placa half-area, o caminho óptico foi ajustado para 0,2600 cm e coeficiente de absortividade molar: $\epsilon_{\text{ajustado}} = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 0,2600 \text{ cm} \approx 5,72$. Para normalização dos dados, a quantificação das proteínas totais foi realizada utilizando o kit Qubit® Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Q3321), no Qubit® Fluorometer, que fornece diretamente a concentração proteica em $\mu\text{g/mL}$. Os resultados foram expressos em nmol de carbonilas por mg de proteína.

5.6.3 Níveis de Glutathione Total (tGSH)

O seguiu o método reciclador de Griffith (1980) com adaptações para microplacas half area. O método se baseia na reação da glutathione em seu estado reduzido (GSH) com 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) a partir da quebra da ligação dissulfeto, o que gera o composto secundário 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e o conjugado entre o grupo tiol (SH) da GSH com outra molécula de TNB (SH-TNB). Para a determinação dos níveis de GSH-total, é acrescentado no ensaio NADPH e GR para que a glutathione dissulfeto (GSSG) volte ao seu estado reduzido (GSH), e toda a glutathione presente no meio reaja com DTNB, gerando GS-TNB. As concentrações finais dos reagentes foram de tampão KPi (pH 7,0) 125 mM, EDTA 1,25 mM, TCA 0,5% (p/v), NADPH 0,2 mM, DTNB 0,27 mM, e GR 0,27 U/mL, o protocolo foi realizado com a homogeneização de um *pool* de tardígrados,

onde aproximadamente 1,9 – 2,0 mg de tecido. A partir da padronização do método com amostras de *Paramacrobiotus cf. centesimus*, concluiu-se que o volume ideal de tecido é de 6 µL do sobrenadante do homogeneizado em TCA 10% 1:5. Os níveis de glutathiona total foram conferidos em triplicata em espectrofotômetro por 90 s em placas de 96 poços no comprimento de onda de 412 nm, que é absorvido pelo composto TNB. Durante a leitura das amostras foi feita concomitantemente uma curva padrão, substituindo o volume de amostra (6 µL) por GSH diluída em TCA 10% em diferentes concentrações (3,2, 1,6, 0,8, 0,4 e 0,2 µM.). Nestas condições a quantidade de GSH-total nas amostras é determinada pela velocidade de aumento da absorbância em 412 nm comparando com a curva-padrão de GSH.

5.6.4 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o Qubit® Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente, preparou-se a solução de trabalho diluindo o reagente de proteína Qubit® na proporção de 1:200 no tampão Qubit®, em um tubo plástico descartável e âmbar. Para a calibração do equipamento, foram utilizados três padrões fornecidos no kit, contendo concentrações conhecidas de proteína. Cada padrão foi preparado adicionando-se 190 µL da solução de trabalho a tubos individuais, seguidos da adição de 10 µL de cada padrão correspondente, depois agitados em vortex por 2 a 3 segundos.

Para as amostras, foram utilizados volumes entre 3 a 5 µL, ajustando-se o volume final para 200 µL com a solução de trabalho previamente preparada. Cada amostra foi vortexada rapidamente. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura ambiente (22–28°C) por 15 minutos, garantindo a estabilização do sinal fluorescente. Após a incubação, as leituras de fluorescência foram realizadas no Qubit® Fluorometer.

5.6.5 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa R, considerando um nível de significância de $p < 0,05$. As comparações foram feitas entre os grupos que passaram por inibição e os que não passaram, utilizando ANOVA, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. Cada N foi considerado como um pool de animais, determinado com base no peso das amostras, que variou entre 1,8 e 2,4 mg. Os resultados são apresentados na forma de box plot, onde a linha central representa a mediana, a caixa inferior corresponde ao primeiro quartil, a caixa superior ao terceiro quartil, a barra superior indica o valor máximo e a barra inferior o valor mínimo.

5.7 Monitoramento de EROS por fluorescência

A quantificação de fluorescência em tardígrados foi realizada utilizando o sistema de imagem CELLCYTE XTM (CYTENA) e o marcador DCF-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato), um reagente sensível à presença de espécies reativas de oxigênio. O experimento foi conduzido com o objetivo de monitorar a produção de EROs em tempo real, mantendo as amostras em condições controladas dentro do incubador, 27 °C.

Inicialmente, os tardígrados foram incubados em 1 μ M de DCF-DA, usando um volume de 200 μ L, por uma hora, permitindo a internalização do corante para a forma fluorescente DCF na presença de ROS. Após a incubação, os organismos foram transferidos para uma placa de 48 poços. O CELLCYTE XTM foi então programado para capturar imagens de fluorescência em intervalos regulares de 1 hora, em tempo total de 24 horas, utilizando os canais indicados para excitação e emissão do DCF (excitação ~488 nm, emissão ~525 nm). As imagens adquiridas foram analisadas por meio do software associado ao CELLCYTE XTM, que permitiu a quantificação média da intensidade de fluorescência ao longo do tempo.

5.8 Detecção de EROS por microscopia confocal

Para a análise pontual da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), os animais foram previamente preparados em diferentes condições experimentais, sendo expostos a inibidores específicos da glutathione e da catalase, utilizados nas concentrações de 0,25 mM e 0,3 mM, respectivamente. Cada grupo experimental continha 10 animais, que foram incubados nas soluções dos inibidores por um período de 24 horas. Após essa etapa, os animais foram lavados para remover o excesso dos compostos e submetidos ao processo de indução do *tun*, reduzindo a umidade do ambiente de 100% para um intervalo entre 30 e 35%. Os animais permaneceram nesse ambiente de menor umidade por mais 24 horas antes de entrarem efetivamente no estado de *tun*. Decorrido esse tempo, os animais foram analisados sob estereoscópio para confirmar se os animais responderam ao estresse hídrico e adotaram a morfologia característica do *tun*, sendo selecionados apenas aqueles que atingiram esse estado para as etapas subsequentes da análise.

Os organismos foram então incubados com a sonda fluorogênica DCF-DA na concentração de 1 μ M por uma hora, permitindo a internalização do corante no tecido dos animais. Essa sonda é permeável às membranas celulares e, em seu estado reduzido, não apresenta fluorescência, mas após oxidação por ROS, emite um sinal verde brilhante estável, permitindo a detecção do estresse

oxidativo. Após a incubação, os animais foram lavados cinco vezes com água ultrapura para remover qualquer resíduo de sonda não internalizada e, em seguida, transferidos para uma lâmina. Para preservar a fluorescência e minimizar a fotodegradação, as lâminas foram montadas utilizando um meio de montagem *antifading* (Agilent Technologies) e deixados secar completamente. A visualização das amostras foi realizada por microscopia confocal de fluorescência a laser (Leica TCS SP5), permitindo a captura de imagens detalhadas e a visualização da intensidade do sinal fluorescente emitido pelos organismos.

6 RESULTADOS

6.1 Curva de sobrevivência

A definição das concentrações de inibidores utilizadas nos experimentos subsequentes foi baseada em uma análise preliminar da viabilidade dos tardígrados expostos a butionina sulfoximina (BSO) e ao aminotriazol (ATZ). Essa etapa foi essencial para estabelecer uma concentração em que não compromettesse excessivamente a sobrevivência dos animais. Inicialmente testamos concentrações mais elevadas de inibidores, 1 mM e 10 mM de ATZ e 5 mM de BSO. Os animais ainda ativos ficaram 24h em soluções contendo os inibidores, seguida da observação por até 48 horas. Seguidamente os experimentos foram repetidos, mas agora passando pela anidrobiose e recuperação, para avaliar a sobrevivência com base em sua mortalidade e/ou movimentos corporais. No caso do ATZ, nas concentrações testadas inicialmente (acima de 1mM), tivemos 100% de mortalidade dos tardígrados. Tais resultados preliminares com ATZ foram obtidos por Giovanna Zavaroni, então estudante de IC do nosso grupo de pesquisa (Zavaroni 2021). Ela também mostrou que nenhum tardígrado morria se incubado por 48 h com ATZ (1 mM) se não passasse por um ciclo de anidrobiose e recuperação. Isso implica dizer que os animais, mesmo sob inibição de catalase com ATZ, conseguem sobreviver em estado ativo. Ou seja, o real efeito do ATZ é observado no retorno ao *tun*, depois dos animais passarem pelo processo da anidrobiose.

Em seguida, avaliamos os efeitos do BSO nos tardígrados submetidos a um ciclo de anidrobiose (formação do *tun*) e recuperação. Os animais foram expostos a diferentes concentrações do inibidor, variando de zero (controle) a 5 mM, e a taxa de sobrevivência foi determinada após o período de exposição. Os resultados indicaram uma relação dose-dependente entre a concentração de BSO e a viabilidade dos tardígrados (Gráfico 1). No grupo controle (sem BSO), a taxa de

sobrevivência foi próxima de 100%, confirmando a viabilidade dos animais nas condições experimentais padrão (ou seja, quando os animais passavam por um ciclo de anidrobiose e recuperação, só então a mortalidade era avaliada). Com a adição de concentrações crescentes de BSO, observou-se uma redução progressiva na sobrevivência (Gráfico 1). A partir de 0,25 mM, a taxa de sobrevivência começou a declinar significativamente, sendo essa queda ainda mais acentuada em concentrações a partir de 0,5 mM. Com 5 mM de BSO, a taxa de mortalidade foi de aproximadamente 90% (Gráfico 1). A análise dos dados sugere que concentrações de BSO de 0,5 mM ou mais impactam negativamente a viabilidade dos tardígrados. Assim, para os experimentos posteriores, foram consideradas as concentrações de 0,25mM de BSO, a fim de avaliar os efeitos do inibidor sem induzir uma mortalidade significativa.

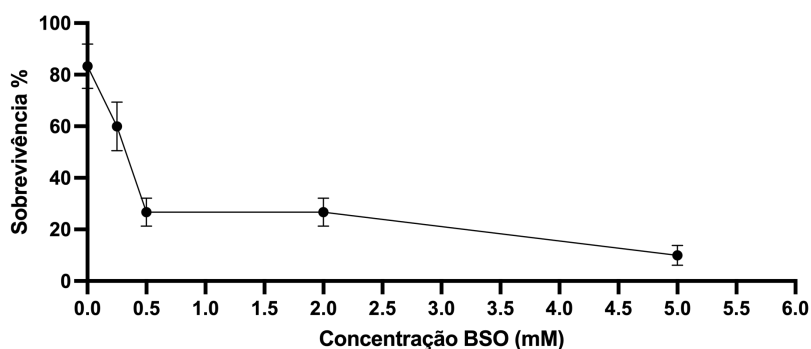


Figura 25 : Sobrevivência de tardígrados em relação à concentração de BSO (butionina sulfóxina): A inibição da síntese de glutatona pelo BSO resulta em uma redução progressiva da sobrevivência conforme a concentração do inibidor aumenta. A diminuição da viabilidade sugere a importância da glutatona na resposta antioxidante e na proteção celular contra o estresse oxidativo induzido pela anidrobiose. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ($n = 15$).

Foi ainda realizado um teste de toxicidade com BSO (5 mM), na qual tardígrados foram incubados por 48 h com a droga, sem passar por anidrobiose e recuperação. Observamos que 100% dos animais se recuperou do *tun*, ficando vivos por mais 24 h, o N por grupo foi de 15 animais.

Para determinar a influência do ATZ sobre a sobrevivência dos tardígrados, os animais foram expostos a concentrações variando entre 0 e 1 mM, e a taxa de viabilidade foi avaliada após o período de incubação. Como observado no BSO, a exposição ao ATZ resultou em uma redução progressiva da sobrevivência com o aumento da concentração (Gráfico 2). Em concentrações mais baixas (0,05mM), a viabilidade dos tardígrados permaneceu semelhante à do grupo controle, sem diferenças estatisticamente significativas.

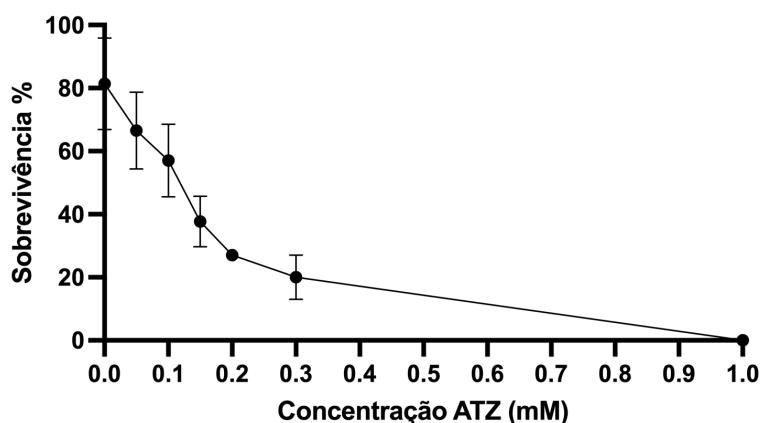


Figura 26 : Sobrevivência de tardígrados em relação à concentração de ATZ: A inibição da catalase pelo ATZ impacta a sobrevivência dos organismos, indicando o papel dessa enzima na neutralização do peróxido de hidrogênio gerado durante a transição entre os estados hidratado e *tun*. No entanto, o efeito observado é menos pronunciado do que o do BSO, sugerindo que outros mecanismos antioxidantes podem compensar a inibição da catalase. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ($n = 15$).

Assim, foi possível verificar as concentrações que permitem a modulação do sistema antioxidante dos tardígrados sem induzir uma mortalidade excessiva e/ou variabilidade exagerada de resultados. Para o BSO, a concentração foi de 0,25 mM foi considerada adequada; no caso do ATZ utilizamos 0,3 mM. Essas concentrações foram utilizadas nos experimentos subsequentes, permitindo avaliar os efeitos da inibição da glutatona e da catalase durante a anidrobiose e a reidratação dos tardígrados. Além disso, calculamos também os valores de IC_{50} , esses valores foram de $0,16mM \pm 0,18mM$ para ATZ e $0,29 \pm 0,06mM$ para BSO.

6.2 Ensaios bioquímicos

Com base nas concentrações de inibidores estabelecidas (Seção 4.1), foi feita a análise de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e ao sistema antioxidante em tardígrados ativos e no estágio de recuperação, imediatamente após a anidrobiose (chamaremos de estágio pós-*tun*). Os experimentos foram conduzidos em seis grupos experimentais para avaliar os efeitos da inibição de catalase e tGSH na sobrevivência e resposta ao estresse oxidativo em tardígrados submetidos à anidrobiose. O grupo 24h ATZ consistiu em animais ativos que foram expostos ao inibidor ATZ (0,3mM) por 24 horas, sem passar por anidrobiose. Já o grupo Pós Tun ATZ incluiu tardígrados que passaram pelo mesmo período de incubação (24 horas) com ATZ (0,3mM), mas foram posteriormente submetidos ao processo de *tun*. O mesmo raciocínio foi aplicado aos grupos tratados com butionina

sulfoximina (BSO), o inibidor da síntese de glutatona: no grupo 24h BSO, os tardígrados foram incubados com BSO (0,25mM) por 24 horas sem passar por *tun*, enquanto no grupo Pós Tun BSO, os animais foram expostos ao BSO (0,25mM) por 24 horas, e passaram pelo estado de *tun*. O grupo Ctrl foi utilizado como controle negativo, sendo composto por tardígrados mantidos por 24 horas em água ultrapura (Milli-Q), sem exposição a inibidores ou ao estado de *tun*, garantindo uma referência para os demais tratamentos. Por fim, o grupo “Pós Tun” consistiu em animais que passaram pelo processo natural de *tun* sem exposição prévia a inibidores, sendo reidratados e submetidos às análises bioquímicas. Após os tratamentos, os animais foram imediatamente congelados em N₂ líquido e armazenados em Ultrafreezer -80°C até a realização dos ensaios.

6.2.1 Atividade de Catalase

A atividade da catalase foi analisada nos mesmos grupos experimentais submetidos aos tratamentos com ATZ, BSO, anidrobiose (*tun*) e a combinação de inibição com *tun*. As comparações estatísticas evidenciaram diferenças significativas, indicando variações na capacidade antioxidante associadas a cada condição experimental. O grupo 24h ATZ teve uma redução muito expressiva na atividade da catalase quando comparado ao grupo controle ($P < 0.001$) (Gráfico 3a). Nesse grupo, os tardígrados não passaram pelo processo de *tun*. O grupo Pós Tun apresentou aumento significativo na atividade da catalase em relação ao grupo Ctrl ($P < 0.05$), tal resultado sugere que o tardígrado apresenta o mecanismo POS na anidrobiose. Já o grupo 24h BSO (que não passou pelo *tun*) não apresentou diferença significativa em relação ao controle ($P = 0.121$) (Gráfico 3b), esse resultado era esperado, pois o BSO não deveria afetar a atividade de catalase. Ao comparar o grupo Pós Tun ATZ com o grupo 24h ATZ, observou-se um aumento significativo na atividade da catalase ($P < 0.05$). (Gráfico 3a). Já a comparação entre o grupo Pós Tun BSO e 24h BSO revelou um aumento moderado na atividade da catalase, mas que não foi estatisticamente significativo ($P = 0.0558$) (Gráfico 3b).

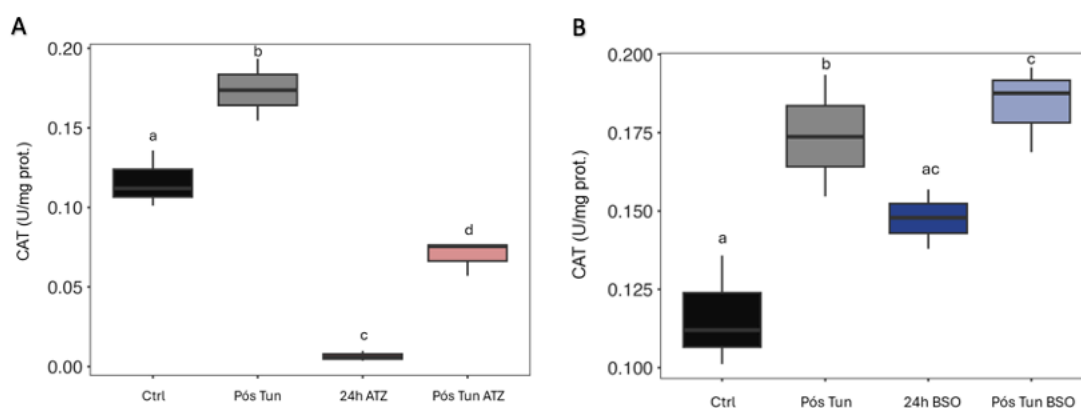


Figura 27 : tividade da enzima catalase (CAT) em tardígrados submetidos a diferentes condições experimentais:

No gráfico A, a comparação entre os grupos indica o efeito do ATZ (3-amino-1,2,4-triazol), um inibidor da catalase, antes e após a indução ao estado de *tun*. No gráfico B, a atividade da catalase é comparada entre os grupos controle e aqueles expostos ao BSO, que inibe a síntese de glutatona. Os grupos são: Ctrl: que não passou por anidrobiose, apenas 24 horas em água, Pós tun: animais que passaram por anidrobiose sem inibidor, 24h ATZ / 24h BSO: animais que ficaram 24 horas no inibidor, Pós Tun ATZ / BSO: que passaram por inibição, seguida de anidrobiose. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão.

6.2.2 Níveis de Glutathiona Total (tGSH)

Os níveis de glutathiona total (tGSH) foram mensurados nos mesmos grupos experimentais da análise da catalase, com o objetivo de avaliar os efeitos dos tratamentos ATZ, BSO, *tun* e a combinação de inibição com *tun*, sobre o sistema antioxidante redox. A análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa nos níveis de tGSH no grupo 24h ATZ em relação ao controle ($P = -.232$) (Gráfico 4a). Esse resultado era esperado, pois o ATZ não deveria afetar os níveis de tGSH. Por outro lado, os níveis de tGSH foram significativamente menores no grupo 24h BSO em comparação ao Ctrl ($P < 0.001$), uma vez que não foi possível a detecção de GSH, demonstrando total inibição (Gráfico 4b). Além disso, o grupo Pós Tun apresentou níveis significativamente elevados de tGSH em relação ao controle ($P < 0.001$), indicando que o mecanismo POS está funcionando também na ativação dos níveis de glutathiona. Já a comparação entre Pós Tun BSO e 24h BSO não apresentou diferença estatística ($P = 1.00$), pois nessas duas condições não foi possível detectar tGSH (Gráfico 4b).

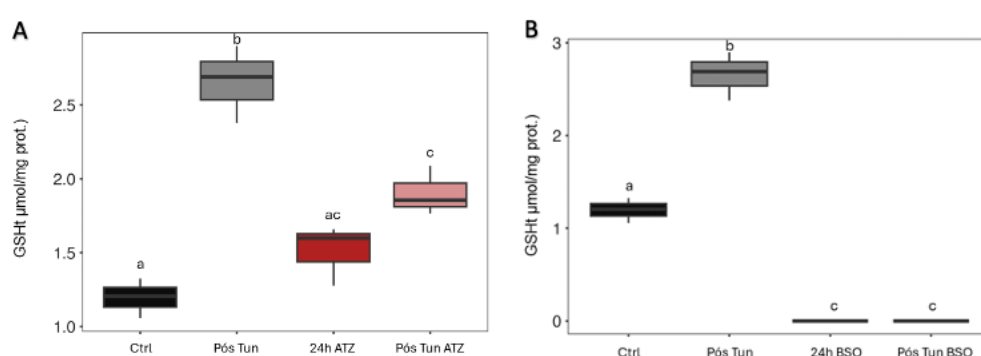


Figura 28 : Níveis de glutathiona total (tGSH) em tardígrados sob diferentes condições experimentais:

No gráfico A, observa-se o impacto da inibição da catalase (ATZ) sobre a regulação da glutathiona antes e após a indução ao *tun*. No gráfico B, o efeito da inibição da síntese de glutathiona pelo BSO é avaliado, com destaque para a resposta dos organismos à anidrobiose. Os grupos são: Ctrl: que não passou por anidrobiose, apenas 24 horas em água, Pós tun: animais que

passaram por anidrobiose sem inibidor, 24h ATZ / 24h BSO: animais que ficaram 24 horas no inibidor, Pós Tun ATZ / BSO: que passaram por inibição, seguida de anidrobiose. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão.

6.2.3 Proteínas carboniladas

A oxidação proteica, avaliada pelos níveis de carbonilas, foi significativamente alterada entre alguns grupos experimentais. Os níveis de carbonilas apresentaram um aumento significativo no grupo 24h ATZ em comparação ao grupo Ctrl ($P < 0.001$). (Gráfico 5a). Da mesma forma, os níveis de carbonilas foram significativamente mais elevados no grupo Pós Tun BSO em comparação ao grupo 24h BSO ($P < 0.001$) (Gráfico 5b) e no grupo Pós Tun ATZ em comparação com 24 h ATZ ($P < 0.001$). Os níveis de carbonilas também foram significativamente aumentados no grupo Pós Tun em relação ao Ctrl ($P < 0.001$) (Gráfico 5). Os resultados mostram que o *tun* induz estresse oxidativo, assim como BSO e ATZ, mesmo sem passar por *tun*. Entretanto, a combinação de *tun* e inibidores causa um estresse oxidativo ainda maior.

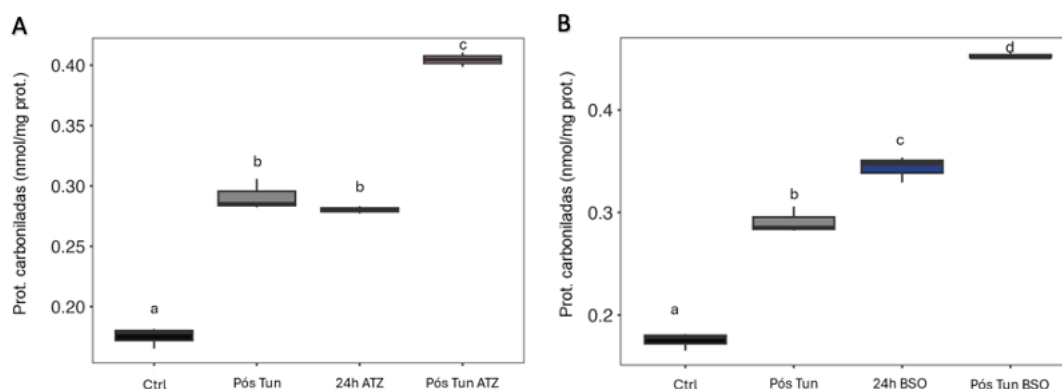


Figura 29 : Níveis de proteínas carboniladas em tardígrados expostos a diferentes condições experimentais: No gráfico A, a comparação entre os grupos evidencia o impacto da inibição da catalase (ATZ) sobre a oxidação proteica antes e após o *tun*. No gráfico B, a inibição da síntese de glutathiona pelo BSO e sua influência na carbonilação proteica são analisadas. Os grupos são: Ctrl: que não passou por anidrobiose, apenas 24 horas em água, Pós tun: animais que passaram por anidrobiose sem inibidor, 24h ATZ / 24h BSO: animais que ficaram 24 horas no inibidor, Pós Tun ATZ / BSO: que passaram por inibição, seguida de anidrobiose. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão.

6.3 Monitoramento de EROS por fluorescência

A Figura 6 ilustra o perfil de fluorescência (relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio) em tardígrados tratados com BSO 0,25 mM (linha rosa; grupo Pós Tun BSO) e ATZ 0,05 mM (linha azul; grupo Pós Tun ATZ 0,05mM), em comparação ao grupo Pós Tun (linha verde). Os animais foram inicialmente incubados com o marcador DCF-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) por 1 hora e, posteriormente, monitorados ao longo de 24 horas por meio do sistema de imagem CELLCYTE X™ (CYTENA).

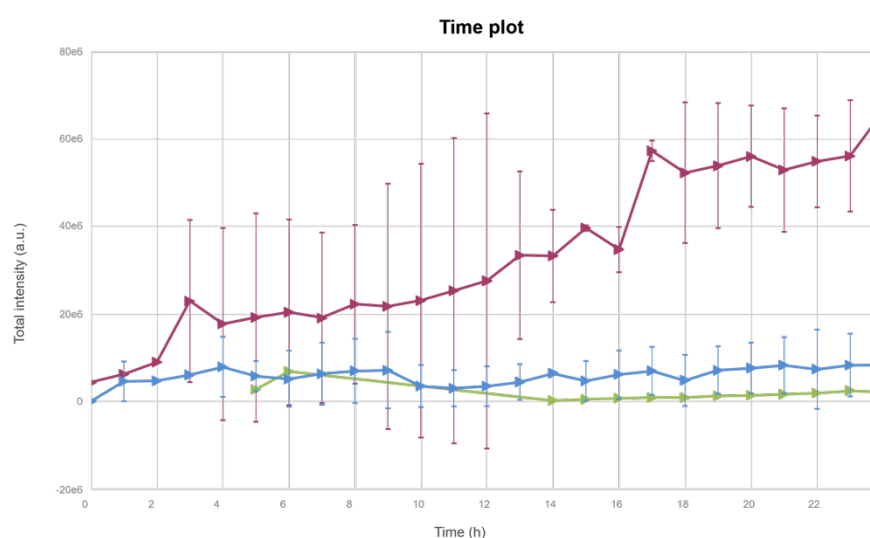


Figura 30 : Perfil de fluorescência ao longo de 24 horas, indicando a produção de espécies reativas de oxigênio em tardígrados tratados com BSO 0,25 mM (linha rosa) e ATZ 0,05 mM (linha azul), comparados ao grupo Pós Tun (linha verde). A fluorescência foi monitorada utilizando o marcador DCF-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) e o sistema de imagem CELLCYTE X™ (CYTENA). A variação nas barras de erro pode estar associada ao movimento dos animais durante o despertar. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ($n = 20$).

A intensidade de fluorescência aumentou de forma mais evidente no grupo Pós Tun BSO, enquanto o grupo Pós Tun ATZ 0,05 apresentou um efeito mínimo, provavelmente em decorrência da pequena dose de inibidor usada. Já o grupo Pós Tun exibiu as menores médias de fluorescência ao longo de todo o período analisado. A variação expressiva das barras de erro reflete, em grande parte, o fato de os tardígrados estarem em processo de despertar durante as medições. Como a quantificação de fluorescência é realizada por meio de uma câmera, a movimentação dos animais e a consequente perda de foco podem ocasionar flutuações na intensidade registrada. Apesar disso, nos ensaios

subsequentes o mesmo comportamento, houve o mesmo padrão de resposta, reforçando a consistência dos resultados obtidos.

Na sequência, observa-se os dados resultantes do ensaio fluorimétrico com tardígrados incubados com 0,30 mM de ATZ, em comparação com aqueles sem inibidor. Ambos os grupos passaram por anidrobiose, antes da análise fluorimétrica. Comparando os dados do gráfico 6 com o gráfico 7, os resultados mostram que, conforme aumentamos a concentração do ATZ, há mais evidência de fluorescência.

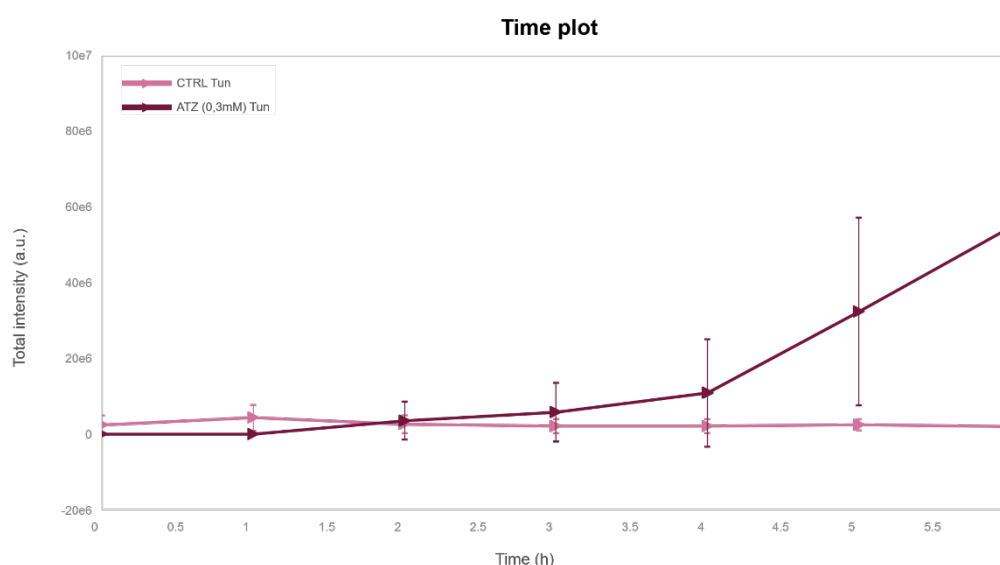


Figura 31 : Ensaio de fluorescência para validação dos padrões de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em tardígrados tratados com ATZ 0,3mM (linha rosa escura) e ou adição de inibidor (linha rosa clara; grupo CTRL, Tun): A fluorescência foi quantificada com DCF-DA e monitorada ao longo de 6 horas, reforçando a tendência observada no primeiro experimento. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ($n = 20$).

6.4 Detecção de EROS por Microscopia Confocal

6.4.1 Detecção de EROS por Microscopia Confocal com inibição de por ATZ 0,3 mM

Os resultados obtidos por microscopia confocal corroboram os dados cinéticos de formação de espécies reativas de oxigênio (Figura 25), demonstrando um aumento expressivo da fluorescência do DCF-DA nos diferentes grupos experimentais. No grupo controle (CTRL), composto por organismos mantidos em condições normais sem indução do estado de *tun*, a fluorescência foi baixa.

Já no grupo submetido ao *tun* (TUN), observou-se um aumento marcante na fluorescência, evidenciando que a transição para esse estado induziu a produção de EROs.

Nos organismos do grupo ATZ (ou seja, 24 h com ATZ 0,3mM, sem passar por anidrobiose) a fluorescência do DCF-DA apresentou um leve aumento em relação ao controle, resultando em um acúmulo moderado de EROs. No entanto, a maior intensidade de fluorescência foi registrada no grupo ATZ TUN, no qual os organismos foram submetidos ao *tun* na presença do inibidor. Esse grupo apresentou um aumento expressivo na fluorescência do DCF-DA. A análise da autofluorescência no canal de 460 nm permitiu diferenciar o sinal endógeno da fluorescência do DCF-DA oxidado, garantindo maior precisão na detecção do estresse oxidativo.

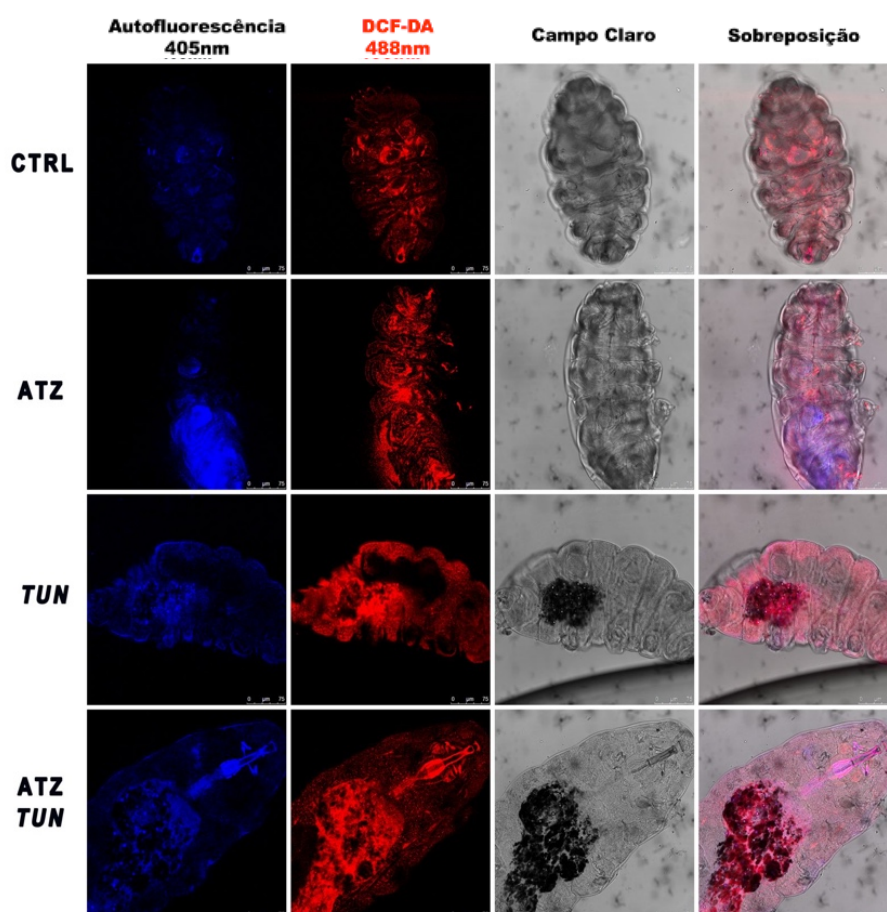


Figura 32 : Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por microscopia confocal: Fluorescência do DCF-DA em tardígrados submetidos a diferentes condições experimentais, detectada por microscopia confocal. Os grupos são:

CTRL: que não passou por anidrobiose, apenas 24 horas em água, TUN: animais que passaram por anidrobiose sem inibidor, ATZ: animais que ficaram 24 horas no inibidor, ATZ *TUN*: que passaram por inibição, seguida de anidrobiose. A concentração de ATZ foi de 0,3 mM. A autofluorescência foi analisada no canal de 460 nm para maior precisão. As imagens foram obtidas por microscopia confocal a (n = 5). Imagens obtidas em parceria com Sarah Pinho e Gabriel Calixto, integrante do Laboratório de Imunologia e Inflamação, UnB.

6.4.2 Detecção de EROS por Microscopia Confocal com inibição de por BSO 0,25mM

A imagem em Brightfield confirmou a integridade tecidual, sem alterações morfológicas associadas a danos celulares. No grupo tratado com BSO (0,25mM) por 24 horas, houve um aumento relevante na fluorescência do DCF-DA em comparação ao controle (CTRL).

No grupo que passou por *tun*, mas sem uso de inibidor (TUN), a intensidade da fluorescência foi maior do que no controle (CTRL), mas inferior à observada no grupo tratado apenas com BSO

por 24 horas (BSO). No entanto, no grupo em que houve a combinação da inibição da glutatona com a indução da anidrobiose (BSO *TUN*), a fluorescência do DCF-DA foi substancialmente maior do que em todos os outros grupos, evidenciando um aumento acentuado na produção de EROs (Figura 26).

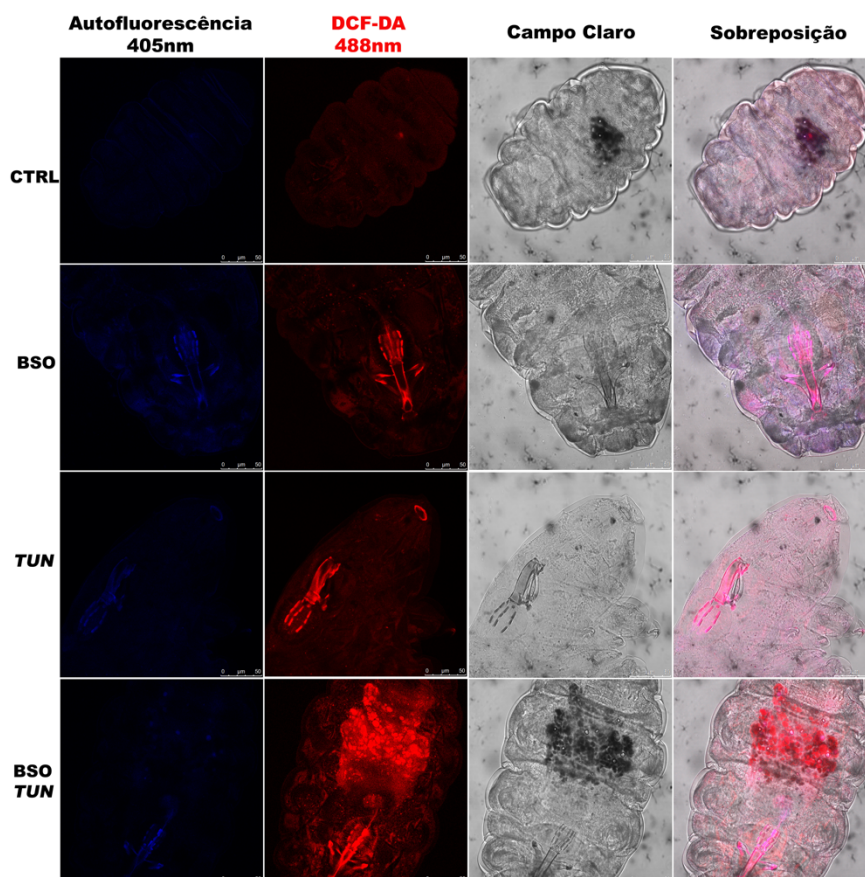


Figura 33 : Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após inibição da glutathione: Fluorescência do DCF-DA em tardígrados submetidos a diferentes condições experimentais, detectada por microscopia confocal. A imagem em Brightfield confirmou a integridade tecidual, sem danos morfológicos evidentes. Os grupos são: CTRL: que não passou por anidrobiose, apenas 24 horas em água, TUN: animais que passaram por anidrobiose sem inibidor, BSO: animais que ficaram 24 horas no inibidor, BSO *TUN*: que passaram por inibição, seguida de anidrobiose. (n = 5). Imagens obtidas em parceria com Sarah Pinho e Gabriel Calixto, integrante do Laboratório de Imunologia e Inflamação, UnB

7 DISCUSSÃO

A análise da curva de sobrevivência dos tardígrados pós-tun submetidos à inibição da catalase e da glutathione (GSH) revelam impactos significativos no processo de reidratação e recuperação dos animais. Os dados obtidos indicam que a inibição desses antioxidantes compromete a capacidade dos tardígrados de sobreviver no retorno ao estado ativo, evidenciando a importância dessas vias na anidrobiose. A literatura demonstra que os tardígrados possuem mecanismos altamente especializados para lidar com o estresse oxidativo durante a anidrobiose, incluindo enzimas antioxidantes como a catalase e o sistema da glutathione (GIOVANNINI et al., 2022a). A catalase, por exemplo, tem um papel essencial na conversão de H_2O_2 em água e oxigênio, protegendo as células contra danos oxidativos (YOSHIDA et al., 2017). Essa reação ocorre nos peroxissomos e é crucial para evitar a propagação de EROs geradas durante a reidratação dos tardígrados (HONG et al., 2024). A inibição dessa enzima por ATZ compromete diretamente a defesa antioxidante, levando a um acúmulo de H_2O_2 (Korovila et al., 2017). Esse acúmulo pode desencadear peroxidação lipídica e danos a proteínas e ácidos nucleicos, resultando na visível redução da sobrevivência dos tardígrados após a reidratação.

Além da catalase, o sistema da glutathione é um dos principais mecanismos de defesa contra EROs em tardígrados, atuando na eliminação de radicais livres e na regeneração de outros antioxidantes, como a própria catalase e a superóxido dismutase (SOD) (Sadowska-Bartosz & Bartosz 2024). A glutathione é um dos principais tampões redox intracelulares, e sua oxidação resulta na formação de glutathione dissulfeto (GSSG), um importante indicador da homeostase redox celular (PEEPLES; GENARO-MATTOS, 2022a). A inibição desse sistema por BSO impede a síntese de GSH, essencial para o funcionamento das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e da glutathione-S-transferase (GST), também resultando no aumento da concentração de EROs e, portanto, causando estresse oxidativo (GIOVANNINI et al., 2022a). Essa desregulação pode explicar a significativa queda na taxa de sobrevivência observada nos grupos tratados com BSO, e que passaram pelo *tun*,

uma vez que esses animais não conseguem atenuar os danos oxidativos acumulados durante o *tun*. Os dados do presente estudo também se alinham com achados anteriores que sugerem que a recuperação dos tardígrados da anidrobiose não depende apenas da formação do *tun*, mas também da capacidade de reparar danos celulares induzidos pelo processo completo de desidratação e reidratação (POPRAWA et al., 2022). Um estudo recente indica que a presença de antioxidantes endógenos, como a própria GSH, pode influenciar diretamente a capacidade de sobrevivência dos tardígrados ao modular a formação e saída do *tun* (SMYTHERS et al., 2024). Durante a saída do *tun*, mostramos há uma intensa produção de EROs (ver Figuras 26 e 27). Assim, a ativação/manutenção do sistema antioxidante no *tun* é crucial para a proteção das estruturas celulares e a sobrevivência após a reidratação (KRAKOWIAK et al., 2024). O comprometimento desses mecanismos naturais de defesa pela inibição da catalase e da glutathione pode levar a danos irreversíveis, dificultando ou até mesmo impedindo a recuperação dos organismos.

Outro fator relevante é que a recuperação dos tardígrados não se resume apenas à eliminação de EROs, mas também envolve a reestruturação da integridade celular e a retomada da atividade metabólica (HESGROVE; BOOTHBY, 2020). A inibição da catalase e da glutathione pode afetar diretamente proteínas estruturais essenciais para a reorganização celular, como as proteínas CAHS, MAHS e LEA, que atuam na estabilização das membranas e na proteção de macromoléculas contra agregação e oxidação durante a anidrobiose (HASHIMOTO et al., 2016a; KITAZUME et al., 2018). Em um artigo, Kasianchuk et al. (2023) destaca o papel crucial de proteínas intrinsecamente desordenadas (TDPs), como CAHS e LEA, na tolerância ao estresse oxidativo e na preservação da integridade celular. Essas proteínas tem a capacidade de estabilizar macromoléculas e reduzir danos oxidativos, funcionando como chaperonas moleculares que impedem a agregação proteica. Além disso, o Dsup, outra proteína encontrada em tardígrados, foi identificado como um fator protetor contra danos ao DNA induzidos por espécies reativas de oxigênio e radiação (KASIANCHUK; RZYMSKI; KACZMAREK, 2023). Isso sugere que, além dos sistemas antioxidantes enzimáticos, os tardígrados podem contar com essas proteínas estruturais para minimizar danos oxidativos durante a transição da anidrobiose. A disfunção desses mecanismos pode explicar a menor taxa de sobrevivência observada nos grupos “pós-tun ATZ” e “pós-tun BSO”. Nesse mesmo trabalho, Kasianchuk et al. (2023) ressalta que a resistência dos tardígrados a estresses extremos também tem sido investigada por seu potencial biomédico, incluindo a proteção de células humanas contra danos oxidativos. Além disso, o fato de que a expressão do gene Dsup em células humanas aumentou

significativamente a sobrevivência celular após exposição à radiação ionizante, sugere que os mecanismos antioxidantes dos tardígrados também podem ser adaptáveis a outros organismos (KASIANCHUK; RZYMSKI; KACZMAREK, 2023). O papel da proteína Dsup na proteção contra quebras de DNA em tardígrados tem sido amplamente estudado, e sua atuação pode ser impactada negativamente pelo aumento do estresse oxidativo resultante da inibição farmacológica da catalase e da glutathione, contribuindo para o menor sucesso na recuperação pós-*tun*.

O aumento na concentração de proteínas carboniladas pode indicar danos estruturais nas proteínas dos tardígrados, resultando em perda de função celular e ativação de vias de degradação. A elevação nos níveis de proteínas carboniladas nos grupos “Pós Tun”, “24h ATZ”, “24 h BSO”, “Pós Tun BSO” e “Pós Tun ATZ” sugere um acúmulo significativo de danos oxidativos em proteínas celulares. Mostramos que o despertar do *tun* gera danos por si só ao animal (grupo “pós Tun”). Durante esse processo, ocorre um acúmulo significativo de proteínas carboniladas nos tardígrados, um indicativo de dano oxidativo gerado principalmente por EROs. A carbonilação proteica é um marcador irreversível de estresse oxidativo e está associada à perda de função de enzimas essenciais, degradação proteossomal e ativação de vias apoptóticas (KOROVILA et al., 2017; SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2024). A formação de proteínas carboniladas pode estar relacionada à reação de EROs com aminoácidos suscetíveis, como prolina, arginina, lisina e histidina. Com a transição para o estado de *tun*, há uma redução no metabolismo, mas a produção de EROs continua favorecendo a oxidação de proteínas, lipídios e DNA. Para minimizar esses danos, os tardígrados utilizam um conjunto de mecanismos protetores. As proteínas de choque térmico (HSPs) auxiliam na prevenção da agregação de proteínas danificadas durante a dessecação e a reidratação, enquanto as proteínas LEA atuam como “escudos moleculares”, reduzindo a formação de agregados proteicos carbonilados. Além disso, proteínas exclusivas dos tardígrados, como CAHS, SAHS e MAHS, apresentam propriedades desordenadas que auxiliam na estabilização estrutural das proteínas durante a desidratação. Após a reidratação, os tardígrados ativam mecanismos para reparar ou eliminar proteínas carboniladas. O sistema ubiquitina-proteassoma degrada proteínas severamente danificadas, enquanto sistemas antioxidantes, como catalase, glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), ajudam a reduzir o estresse oxidativo. Além disso, compostos como glutathione e peroxirredoxinas desempenham um papel essencial na recuperação celular ao minimizar o impacto dos danos oxidativos (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2024). Esse dano oxidativo pode ser exacerbado pela redução na atividade da catalase e glutathione observada no grupo que

passaram por inibição (vide grupos “Pós Tun BSO” e “Pós Tun ATZ”), sugerindo que o sistema de defesa antioxidante foi comprometido, permitindo o acúmulo de H_2O_2 , por exemplo, um dos principais mediadores do estresse oxidativo.

Em animais ativos sem a passagem pelo *tun*, a inibição por ATZ induz danos em proteínas, mas não causa morte (vide grupo “24h ATZ”). É possível que, mesmo com a inibição da catalase, outros sistemas antioxidantes, como a GPx e a SOD, sejam ativados ou mantidos para lidar com o aumento de EROs. Em um estudo com peixes dourados, mesmo com a inibição da catalase, os níveis de danos oxidativos (medidos por carbonila proteica e TBARS) não aumentaram significativamente no fígado, sugerindo que os mecanismos de defesa celular foram capazes de compensar a perda da catalase (BAGNYUKOVA; STOREY; LUSHCHAK, 2005). Isso pode ser semelhante ao que ocorre em tardígrados, onde outros sistemas de defesa antioxidante e reparo celular podem compensar a inibição da catalase, mesmo que ainda haja elevação de proteínas carboniladas nos animais. Já quando observamos a combinação de inibição farmacológica e a passagem pelo *tun*, a morte dos animais evidencia a importância do sistema antioxidante nos tardígrado.

Como mencionado anteriormente, a saída da anidrobiose nos tardígrados é um processo complexo que envolve a restauração da homeostase celular após um período de ametabolismo extremo (Møbjerg et al. 2011). Esse processo depende fundamentalmente da regulação do metabolismo redox, garantindo que os danos acumulados durante o estado anidrobiótico (*tun*) sejam minimizados e reparados. A catalase e a glutathione desempenham papéis centrais nesse equilíbrio, e sua inibição farmacológica pode comprometer severamente a recuperação dos tardígrados, levando a falhas na retomada das funções metabólicas e, conseqüentemente, à morte celular. Verificamos em nossa pesquisa que durante a anidrobiose, os tardígrados enfrentam um estresse oxidativo severo devido à produção de EROs (vide gráficos 6 e 7, figuras 26 e 27). A desidratação leva a mudanças extremas na compartimentalização celular e na organização do citoesqueleto, expondo organelas e biomoléculas a danos oxidativos. No momento da reidratação, ocorre uma retomada rápida da respiração celular, intensificando a produção de H_2O_2 e outras EROs, que precisam ser rapidamente eliminadas para evitar danos irreversíveis às estruturas celulares (HONG et al., 2024). Esse efeito é particularmente crítico em um organismo que está tentando restaurar sua fisiologia basal após um período de suspensão metabólica, pois a alta reatividade do radical hidroxila (formado a partir de íons

ferro e H_2O_2) pode desencadear uma cascata de lesões que inviabiliza a recuperação celular (Hermes-Lima, 2004; Møbjerg et al., 2011). Quando ocorre inibição farmacológica de antioxidantes, há um acúmulo progressivo de proteínas disfuncionais e agregados proteicos que dificultam a retomada das funções celulares normais (Hong et al., 2024).

Outro fator crítico na transição entre os estados anidrobiótico e ativo é a regulação osmótica. A rápida reidratação dos tardígrados requer um controle preciso da entrada e saída de água através das membranas celulares. Proteínas de transporte, como as aquaporinas, facilitam esse processo, permitindo a reidratação controlada e a prevenção de danos mecânicos às células. No entanto, o acúmulo de H_2O_2 devido à inibição da catalase e GSH pode levar à oxidação dessas proteínas de membrana, comprometendo sua funcionalidade e resultando em uma reidratação desordenada, que pode levar ao rompimento celular ou à falha na ativação de vias metabólicas essenciais (Møbjerg et al., 2011).

A homeostase redox também está diretamente ligada à regulação do metabolismo energético. Durante a reidratação, os tardígrados precisam restabelecer rapidamente a produção de ATP para fornecer energia aos processos de reparo e manutenção celular. A GSH é fundamental nesse aspecto, pois regula a atividade de diversas enzimas do metabolismo central, incluindo da via glicolítica e do ciclo do ácido cítrico. Sem níveis adequados de glutathione (devido ao efeito do BSO), a produção de energia é severamente comprometida, tornando a transição para o estado ativo inviável. Além disso, a oxidação descontrolada de lipídios de membrana pode comprometer a integridade mitocondrial, reduzindo ainda mais a capacidade da célula de gerar ATP (Hong et al., 2024). A recuperação da anidrobiose também envolve a ativação de proteínas especializadas em estresse, como as proteínas de choque térmico (em especial Hsp70 e Hsp90) e proteínas LEA (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2024). Entretanto, a atividade dessas proteínas depende de um ambiente redox equilibrado. A menor atividade de GSH e/ou catalase compromete a capacidade de muitas dessas proteínas de cumprir suas funções protetoras, dificultando a recuperação do estado metabólico normal. Além disso, muitas dessas proteínas são reguladas por fatores de transcrição sensíveis ao estresse oxidativo (como o Nrf2), que podem ser desativados ou desregulados na presença de altos níveis de EROs (Møbjerg et al., 2011). A glutathione também protege proteínas redox-sensíveis da oxidação irreversível via S-glutathionilação. Sem essa proteção, proteínas críticas podem perder sua

funcionalidade durante a reidratação (Korovila et al., 2017). Além disso o acúmulo de proteínas danificadas durante a dessecação exige um sistema eficiente de remoção via ubiquitina-proteassoma e autofagia. A baixa concentração de GSH pode comprometer esse processo, levando à falha na restauração do proteoma funcional (KOROVILA et al., 2017).

Em resumo, a saída da anidrobiose nos tardígrados é altamente dependente da ação coordenada de sistemas antioxidantes e de reparo/proteção de proteínas que minimizam os danos causados pelo estresse oxidativo acumulado durante a dessecação. A inibição da catalase e da glutatona impede o controle eficiente dos níveis de H_2O_2 e de outras formas de EROs, levando a um colapso no controle osmótico, disfunção enzimática generalizada e falhas no metabolismo energético. Esse cenário torna inviável a recuperação celular e, conseqüentemente, a retomada da vida ativa. Portanto, esses mecanismos antioxidantes não são apenas auxiliares na recuperação da anidrobiose, mas sim elementos fundamentais para a sobrevivência dos tardígrados em ambientes extremos.

O aumento natural da atividade da catalase no grupo “Pós Tun” em *Paramacrobiotus cf. centesimus* sugere um efeito adaptativo induzido possivelmente pela via de resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Esse fenômeno pode ser explicado pelo mecanismo de “*Preparation for Oxidative Stress*” (POS), um processo descrito em mais de uma centena de organismos que enfrentam condições ambientais extremas. O POS consiste no aumento da capacidade antioxidante durante períodos de metabolismo reduzido, como anidrobiose, hibernação ou exposição a hipóxia (GIRAUD-BILLOUD et al., 2024; HERMES-LIMA et al., 2015). Durante esse período, há um aumento na expressão e atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase e a glutatona peroxidase, além da elevação da concentração de compostos antioxidantes, como a glutatona (GSH). Esse aumento pode ser desencadeado pela ativação de fatores de transcrição redox-sensíveis, como Nrf2, FOXO e HIF, que promovem a expressão de genes antioxidantes e melhoram a resistência celular ao estresse oxidativo subsequente (Hermes-Lima et al. 2015). Em diversos sistemas biológicos, a ativação da catalase ocorre como um mecanismo essencial para mitigar os danos oxidativos decorrentes da transição entre estados metabólicos. Um por exemplo disso são sapos que habitam grandes altitudes. De acordo com Niu et al. (2023), indivíduos adultos de *Nanorana parkeri* que vivem a 4.600 metros acima do nível do mar apresentaram maior atividade da catalase no fígado, em comparação com aqueles que vivem a 3.400 metros. Além disso, juvenis de grande altitude também demonstraram maior atividade da

catalase tanto no fígado quanto no músculo. Esse aumento na atividade da catalase faz parte de um conjunto de adaptações antioxidantes que auxiliam os sapos a lidar com as condições ambientais adversas das grandes altitudes, como menor pressão parcial de oxigênio e temperaturas mais baixas (NIU et al., 2023). Em sapos asiáticos há um aumento tanto durante a hibernação quanto no despertar dela. De acordo com Patnaik e Sahoo (2021), durante a hibernação, os sapos reduzem sua ingestão de oxigênio e sua taxa metabólica, resultando em maior produção de EROs. Como resposta, ocorre um aumento na atividade da catalase e da SOD, bem como na concentração do antioxidante não-enzimático ácido ascórbico no fígado e no cérebro (PATNAIK; SAHOO, 2021). Além disso, Patnaik e Sahoo (2021), observaram que, ao saírem da hibernação, os sapos apresentam um novo aumento nos níveis de antioxidantes, incluindo a catalase, à medida que restauram seu consumo de oxigênio e taxa metabólica. Outro exemplo é o no gastrópode marinho *Littorina sitkana* que aumentou significativamente a atividade de catalase após 6 horas de exposição ao ar durante a maré baixa. Segundo Istomina et al. (2013), enquanto após 2 horas de exposição não houve mudanças significativas na atividade da catalase, após 6 horas houve um aumento de 60% na atividade da enzima em comparação com os animais submersos na maré alta (ISTOMINA; BELCHEVA; CHELOMIN, 2013). Esse aumento da catalase sugere uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo gerado pela exposição periódica ao ar, modulando os níveis de EROs no hepatopâncreas.

Em invertebrados que resistem a ambientes extremos por meio da anidrobiose, como os tardígrados, observa-se a ativação de uma peroxidase dependente de manganês (Mn-peroxidase), que desempenha papel semelhante ao da catalase na detoxificação de H_2O_2 e na proteção contra EROs (Hibshman et al., 2020). A possibilidade de que um mecanismo semelhante esteja sendo ativado nos tardígrados do grupo “Pós Tun” merece ser investigada em estudos futuros. Com a redução significativa na atividade da catalase no grupo “Pós Tun ATZ”, houve comprometimento da capacidade celular de decompor H_2O_2 . Quando associamos os resultados da inibição da atividade de catalase com ATZ 0,3 mM (Gráfico 3) com a curva de sobrevivência dos animais no grupo PÓS TUN ATZ a elevada taxa de mortalidade pode ser explicada pelo o acúmulo excessivo de H_2O_2 seguido da formação de radicais hidroxila ($\bullet OH$). Sem a ação da catalase, o H_2O_2 acumulado pode reagir com íons metálicos, como Fe^{2+} , via reação de Fenton, gerando radicais $\bullet OH$ altamente reativos. Esses radicais causam danos severo a membranas celulares, proteínas e DNA, induzindo morte celular, ferroptose e apoptose (Hermes-Lima 2004, Peebles and Genaro-Mattos 2022b).

Um estudo de Giovannini et al. (2022b) investigou o papel da catalase e de outros antioxidantes endógenos na tolerância ao estresse oxidativo durante o processo de anidrobiose em *Paramacrobiotus spatialis*, do mesmo gênero da espécie usada neste trabalho. Os autores evidenciaram que a catalase desempenha um papel fundamental na reidratação e recuperação da motilidade após o estado de *tun*. Utilizando a técnica de interferência por RNA (RNAi), os autores demonstraram que a inibição da catalase comprometeu a saída do estado de *tun*, uma vez que os tardígrados apresentaram imobilidade imediatamente após a reidratação, embora tenham recuperado parte da mobilidade posteriormente (Giovannini et al., 2022b). No estudo, a inibição dessa enzima retardou significativamente a recuperação da motilidade, indicando que a redução da capacidade de decompor o H_2O_2 pode resultar em danos celulares persistentes e atraso na reativação metabólica após a reidratação (Giovannini et al., 2022b). Além disso, os autores destacam que o sistema antioxidante composto por SOD e catalase atua de maneira complementar na redução de EROs. Como a SOD converte o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em H_2O_2 , a ausência da catalase pode levar ao acúmulo tóxico de peróxido de hidrogênio, resultando em danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA. Isso pode explicar o aumento de EROs nos tardígrados pós-*tun* sob efeito do aminotriazol (ATZ) quando monitoramos com a sonda DCF-DA. Bagnyukova et al. (2005b) também demonstraram que a inibição da catalase por ATZ no cérebro do peixe *Carassius auratus* resultou em um aumento expressivo de peroxidação lipídica e carbonilação proteica, indicando desequilíbrio da homeostase redox. Além disso, o aumento compensatório das atividades de GPx e GST sugere que, na ausência de catalase, outras vias são induzidas para manter o controle redox (Bagnyukova, Vasylykiv, et al., 2005b). Essa adaptação pode ocorrer também em tardígrados, mas com menor eficiência no contexto da anidrobiose, levando à inviabilidade observada no grupo tratado com ATZ. Portanto, a inibição da catalase compromete a saída do *tun* devido ao acúmulo de EROs, que interfere na recuperação da homeostase redox. Isso prolonga a disfunção metabólica e pode aumentar a taxa de mortalidade dos organismos anidrobiônicos ao impedir a retomada eficiente da atividade celular após o estresse da desidratação. Os resultados de Giovannini et al. (2022b) indicam que a inibição da catalase por RNAi apenas retardou a recuperação dos tardígrados, enquanto nos nossos experimentos, a inibição da catalase por ATZ resultou na morte dos animais ao despertar do *tun*. Essa diferença sugere que os sistemas antioxidantes das espécies estudadas operam de forma distintas de controle e mecanismos de compensação. No estudo de Giovannini et al. (2022b), a glutathiona peroxidase (GPX) pode ter assumido parte da função da catalase, conferindo maior flexibilidade bioquímica e permitindo a recuperação dos animais mesmo na ausência da catalase funcional. No entanto, nos nossos resultados,

essa plasticidade metabólica não foi observada, sugerindo que a supressão da catalase pelo ATZ levou a um grande acúmulo de peróxidos, resultando em um estresse oxidativo letal. Isso levanta questões sobre a rapidez e eficiência da modulação da resposta antioxidante durante a transição entre estados fisiológicos e se há limiares críticos de atividade enzimática abaixo dos quais a recuperação se torna inviável. Além disso, a regulação das enzimas antioxidantes parece diferir entre as espécies. Em *P. spatialis*, a catalase apresentou um aumento de atividade durante a dessecação, seguido por um declínio na reidratação, enquanto em *A. antarcticus*, a SOD teve um comportamento oposto, com atividade reduzida no estado seco e recuperação após a reidratação; não houve qualquer alteração da catalase em *A. antarcticus* (Giovannini et al. 2022a). Isso sugere que, em *P. spatialis*, a catalase pode ter um papel central no controle intracelular do H_2O_2 . Esse aumento da catalase em *P. spatialis* durante o *tun* indica o mecanismo POS em ação. A diferença entre as duas espécies de tardígrados pode estar relacionada a fatores evolutivos, como as pressões seletivas do habitat e a organização genômica de cada espécie. A ausência de um mecanismo redox compensatório eficiente na espécie *Paramacrobiotus cf. centesimus*, estudado nesse trabalho, sugere uma menor redundância funcional entre as enzimas antioxidantes, tornando a resposta ao estresse oxidativo mais vulnerável à inibição de uma enzima. Analisar os níveis de GPX e SOD no presente modelo experimental pode esclarecer se há alguma compensação bioquímica ativa ou se a perda da catalase leva a um colapso irreversível da homeostase redox.

Quando comparamos os resultados de catalase e da glutathione, observa-se que a GSH tem um papel central na regulação do estresse oxidativo durante a transição para o estado *tun*. A conexão entre essas vias antioxidantes e a adaptação dos tardígrados à desidratação e reidratação é respaldada por estudos que buscam entender os mecanismos associados a essa resposta. A ausência de diferença significativa nos níveis de glutathione total (tGSH) no grupo “24h ATZ” em relação ao controle (vide gráfico 4) sugere que a inibição da catalase não afetou a homeostase da glutathione nos tardígrados. Esse resultado pode estar relacionado com uma compensação bioquímica e funcional das enzimas antioxidantes, como a glutathione S-transferase (GST), que também auxilia na detoxificação de peróxidos orgânicos e na regulação do balanço GSH/GSSG (HERMES-LIMA, 2004; HERMES-LIMA, 2005; HYGUM et al., 2016). No entanto, a inibição da síntese de glutathione pelo BSO levou a uma redução drástica dos níveis de tGSH, tornando impossível esse antioxidante indetectável. Esse resultado é coerente com achados prévios que indicam que a GPx é um dos principais sistemas enzimáticos envolvidos na resposta antioxidante à dessecação em tardígrados (SADOWSKA-

BARTOSZ; BARTOSZ, 2024). Já foi visto que a inibição da GPx em tardígrados por meio de iRNA resulta na morte dos animais pós-*tun*, demonstrando que essa enzima é essencial para a tolerância à dessecação (Giovannini, Boothby, et al., 2022; Giovannini, Corsetto, et al., 2022). Entretanto, o nosso estudo é o primeiro em que a inibição farmacológica de catalase ou GSH causa a morte dos animais que foram submetidos ao *tun* e reidratados. Os animais conseguem entrar em anidrobiose e formar o estado vítreo característico do *tun* na presença dos inibidores, mas não conseguem retornar à atividade, conforme aumenta-se a dose do inibidor.

De forma análoga, enquanto a presença de GSH é fundamental para sair do *tun*, a entrada nesse estado depende da oxidação reversível de cisteína em tardígrados (SMYTHERS et al., 2024). Os autores usaram a quimiobiose, um tipo criptobiose em resposta a substâncias químicas tóxicas, para demonstrar que a formação do *tun* no tardígrado é mediada por EROs (onde pequenas concentrações de H₂O₂ exógeno induzem o *tun*). Revelou-se ainda que a formação do *tun* é dependente da oxidação reversível de determinadas cisteínas e é facilitada pela liberação de EROs intracelulares (H₂O₂ oxida grupos SH de cisteínas). Por meio de espectrometria paramagnética eletrônica (EPR) *in vivo* viu-se um aumento intracelular de EROs após indução do estresse do *tun* (Smythers et al. 2024). Quando essa produção de EROs foi praticamente extinta pela aplicação de antioxidantes exógenos, como por exemplo a GSH, os tardígrados não conseguiram mais entrar no estado de *tun*. Ou seja, a inibição de antioxidantes endógenos por nós verificada (por ATZ ou BSO), por si só não causa a morte dos tardígrados, pois os animais ainda conseguem entrar em criptobiose. Porém, quando retomam à atividade, é necessário que haja uma rede de mecanismos agindo na homeostase redox. Isso é possível de visualizar no grupo “Pós Tun”, que apresentou níveis elevados de tGSH em relação ao controle (vide gráfico 4), sugerindo que a reidratação pode estar associada a um aumento da síntese de glutathione, possivelmente como um mecanismo de proteção contra a explosão oxidativa (“*oxidative burst*”, possivelmente de origem mitocondrial) que ocorre durante no processo de “despertar” do *tun*.

O aumento da concentração de glutathione durante a anidrobiose (vide gráfico 4) indica outra evidência que o mecanismo POS é essencial nos tardígrados *Paramacrobiotus cf. centesimus*. Esse resultado se soma ao aumento de atividade de catalase, discutido anteriormente. A ausência de GSH nos grupos “24 h BSO” e “Pós Tun BSO” (com 0,25 mM de BSO) sugere que essa via é indispensável para a proteção celular, e que sua depleção resulta em um acúmulo crítico de EROs na saída do *tun*.

Isso é evidenciado pelo aumento expressivo na fluorescência do DCF-DA nesses grupos, aumento de proteínas carboniladas e indução de mortalidade parcial dos tardígrados (com BSO 5 mM há cerca de 90% de mortalidade no pós-*tun*).

O monitoramento da produção de EROs por fluorescência evidenciou que a integridade do metabolismo redox em tardígrados depende criticamente da atividade dos sistemas antioxidantes. A inibição da biossíntese de glutathiona por BSO (0,25 mM) provocou um aumento expressivo na produção de EROs durante a saída do *tun* dos animais (vide gráfico 6). Sem a presença de GSH, a enzima GPX fica inativa, uma vez que um de seus substratos está inibido (GSH), resultando no acúmulo excessivo de H₂O₂ e, conseqüentemente, no aumento de EROs detectado por fluorescência. Esse resultado demonstra que os tardígrados dependem da ação coordenada da catalase e da GPX para proteção durante a fase pós-*tun*; se uma dessas enzimas falha, os organismos enfrentam desafios metabólicos potencialmente letais. Em contrapartida, quando testamos o efeito de 0,05 mM de ATZ, concentração essa que quase não causa inibição da catalase, uma produção moderada de EROs no experimento de fluorescência; essa dosagem também induz baixa taxa de mortalidade no pós-*tun*. Entretanto, quando a concentração de ATZ foi elevada para 0,3 mM – um nível que induz mortalidade relativamente alta – os níveis de EROs alcançaram patamares semelhantes aos observados com BSO (vide gráficos 6 e 7), sugerindo que uma inibição mais intensa da catalase ultrapassa a capacidade compensatória redox dos tardígrados. Estudos em organismos extremófilos reforçam que a robustez dos mecanismos de defesa redox é são essenciais para a sobrevivência sob condições adversas e indicam que alterações significativas na atividade enzimática podem desencadear um limiar crítico, comprometendo a viabilidade celular (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Assim, nossos achados ressaltam não apenas a importância da glutathiona como tampão redox central, mas também a complexa inter-relação entre os diferentes sistemas antioxidantes na resposta ao estresse oxidativo em condições extremas.

Finalmente, a microscopia confocal revelou um aumento significativo da fluorescência do DCF-DA ao compararmos os grupos controles com aqueles tratados com inibidor (ATZ ou BSO) seguidos de *tun*, indicando que a inibição dos antioxidantes amplificou os efeitos do estresse oxidativo durante a reidratação (Vide Figura 25 e 26). Esse resultado sugere que tanto a catalase quanto a glutathiona desempenham papéis críticos no controle da concentração de hidroperóxidos gerados

durante a dessecação e reidratação, prevenindo danos oxidativos aos componentes celulares. Esses resultados reforçam a importância desses sistemas antioxidantes endógenos para a sobrevivência dos tardígrados no processo de anidrobiose, destacando a catalase e GSH como componentes chave de adaptação molecular (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2024). Tendo em vista que GSH e catalase estão com maior atividade no *tun* (ou seja, são respostas-POS), mostramos a relevância do mecanismo POS no processo de adaptação e sobrevivência dos tardígrados ao dessecação.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo fornecem uma visão detalhada sobre a relevância dos sistemas antioxidantes na sobrevivência dos tardígrados durante a transição entre os estados de anidrobiose e reidratação. A inibição da catalase e da glutatona revelou impactos profundos na capacidade desses organismos de mitigar os efeitos do estresse oxidativo, destacando a interdependência desses sistemas na homeostase celular.

A análise da sobrevivência dos tardígrados sob inibição farmacológica mostrou que tanto a catalase quanto a glutatona desempenham papéis essenciais na regulação da concentração de H_2O_2 , prevenindo a formação de radicais hidroxila altamente reativos. No caso da glutatona, além de sua função no controle do equilíbrio redox via atividade da GPX, esse tripeptídeo também participa de processos celulares independentes da regulação oxidativa, como o transporte de aminoácidos e a ativação da glutatona S-transferase (GST), que atua na remoção de moléculas tóxicas utilizando a GSH como co-substrato (Hermes-Lima 2004). Assim, a inibição da síntese de glutatona pelo BSO não apenas compromete sua atuação na resposta antioxidante, mas também interrompe essas funções essenciais. A inibição de ambos os sistemas pelos inibidores resultou em um acúmulo significativo de proteínas carboniladas, indicando danos estruturais irreversíveis às biomoléculas e comprometimento da função celular dos tardígrados no ciclo de anidrobiose e recuperação.

A fluorescência do DCF-DA confirmou a elevação dos níveis de EROs nos grupos tratados, com especial destaque para os grupos submetidos à inibição da glutatona e catalase simultaneamente, nos quais o estresse oxidativo atingiu patamares críticos. Esses achados sustentam a hipótese de que a resposta antioxidante dos tardígrados – em especial no caso da catalase e GSH – é um mecanismo fundamental para sua resiliência em ambientes extremos.

O aumento natural da atividade da catalase e da glutathione no estágio de *tun*–reforça a existência de um mecanismo de '*Preparation for Oxidative Stress*' (POS), similar ao observado em diversos outros organismos submetidos a condições ambientais severas. Além da evidência fornecida pelos inibidores, observamos que esse aumento espontâneo de GSH e CAT no *tun* revela a existência do POS nos tardígrados *Paramacrobiotus* cf. *centesimus*, um achado “inesperado” (tendo em vista que não era o que estávamos procurando no início do projeto), fortalece a ideia de que esse mecanismo não é apenas auxiliar, mas fundamental para a sobrevivência desses animais. Assim, a comprovação da teoria do POS, que nosso laboratório vem procurando há cerca de 20 anos, finalmente aconteceu – pelo menos para o caso de *P. centesimus*.

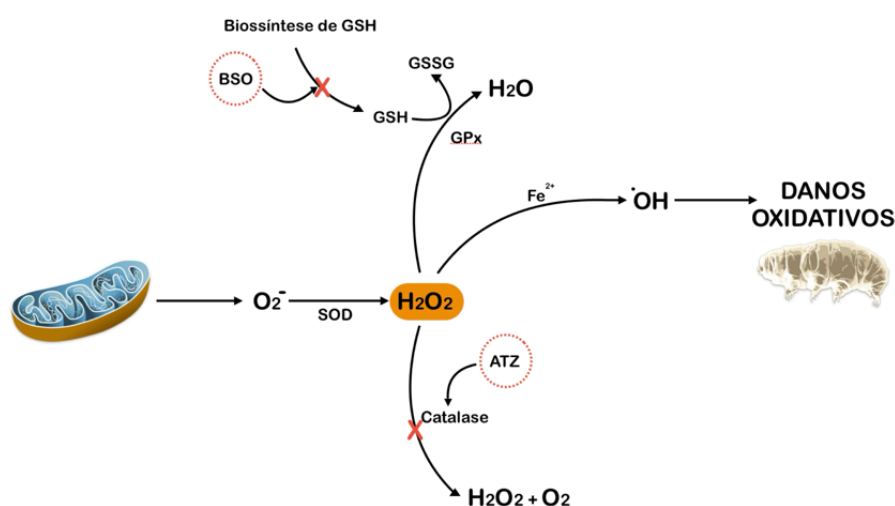


Figura 34: Resumo dos locais de inibição nas vias metabólicas e seus efeitos sobre os tardígrados: O BSO inibe a síntese de GSH (glutathione), afetando o equilíbrio redox celular, enquanto o ATZ interfere na atividade da catalase, comprometendo a degradação de peróxido de hidrogênio. Essas inibições demonstram os efeitos moduladores sobre os sistemas antioxidantes celulares.

9 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a ativação dos sistemas antioxidantes é indispensável para a sobrevivência dos tardígrados após a anidrobiose. A inibição da catalase e da síntese de glutathione afetou diretamente a recuperação desses organismos, resultando no acúmulo de espécies reativas de oxigênio, danos oxidativos e maior mortalidade. Isso indica que esses antioxidantes têm um papel central na proteção celular, ajudando a evitar lesões causadas pelo estresse oxidativo.

Observamos também que, mesmo nos animais não tratados com inibidores, a atividade da catalase e a síntese de glutathione aumenta naturalmente no estágio de *tun*. Confirmando a existência do *Preparation for Oxidative Stress* (POS) em *Paramacrobiotus cf. centesimus*, e que esse mecanismo é um fator determinante para a sobrevivência dos animais. Essa evidência reforça uma hipótese que nosso grupo de pesquisa investiga há mais de duas décadas, fortalecendo a ideia de que o POS não é apenas auxiliar, mas fundamental para a sobrevivência desses animais na adaptação dos tardígrados a ambientes extremos.

Portanto, este estudo deixa claro que a resistência dos tardígrados à anidrobiose depende diretamente da atuação do sistema antioxidante. Quando essas defesas são bloqueadas, o equilíbrio redox se desfaz, impedindo a retomada do metabolismo e levando à morte celular. Além de ampliar nosso entendimento sobre a biologia dos tardígrados, esses achados trazem novas perspectivas para o estudo da regulação do metabolismo oxidativo em organismos que enfrentam condições ambientais severas.

10 PERSPECTIVAS FUTURAS

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, puderam ser identificadas algumas possibilidades de melhoria e de continuação a partir de futuras pesquisas, as quais incluem:

- Avaliação de outros antioxidantes e sua modulação por meio do *tun* e/ou por inibição farmacológica: Além da catalase e da glutathione, antioxidantes como SOD, GPx, GST e as peroxirredoxinas também podem desempenhar papéis essenciais na tolerância ao estresse oxidativo dos tardígrados. Para identificarmos interações compensatórias e fornecer um panorama maior da resposta antioxidante nesses organismos é fundamental avaliar a atividade e expressão dessas enzimas em conjunto, especialmente sob condições de inibição seletiva, a fim de compreender outros mecanismos de redundância metabólica e adaptação.
- Análise aprofundada dos danos induzidos pelo estresse oxidativo: O presente estudo identificou a carbonilação proteica como um indicador de dano oxidativo, mas outros marcadores, como peroxidação lipídica e quebras no DNA, podem ser avaliados para fornecer uma compreensão mais detalhada dos efeitos do acúmulo de EROs.

- Repetição de alguns dos ensaios bioquímicos para reforçar a robustez estatística: Isso melhoraria a confiabilidade dos dados maior reprodutibilidade e permitiria análises estatísticas mais robustas.
- Desenvolvimento de uma população estável de tardígrados no laboratório: Atualmente, a limitação na obtenção de replicatas biológicas decorre da dificuldade em manter populações viáveis de tardígrados em cultura laboratorial. Por isso que os tardígrados são coletados no campo um dia antes de cada experimento. Assim, o estabelecimento de uma cultura estável permitiria experimentos mais consistentes e uma melhor padronização dos ensaios.
- Investigar a conformação estrutural da interação entre antioxidantes e inibidores nos tardígrados, em especial da interação do ATZ com a catalase: Em estudos futuros podemos explorar detalhadamente como a conformação final das enzimas antioxidantes é alterada na presença de inibidores específicos. Modelagens computacionais e análises estruturais, como cristalografia de raios-X ou espectroscopia de RMN, podem fornecer informações sobre possíveis modificações conformacionais induzidas por estresse oxidativo e sua influência na funcionalidade dessas proteínas.

Essas perspectivas futuras abrem um leque de novas investigações que podem ser realizadas tanto por este grupo de pesquisa quanto por outros interessados na área, permitindo um avanço significativo no entendimento dos mecanismos de resistência dos tardígrados e suas possíveis aplicações científicas e tecnológicas.

11 REFERÊNCIAS

- ABALENIKHINA, YU. V. et al. Regulation and Role of Hypoxia-Induced Factor 1 α (HIF-1 α) under Conditions of Endogenous Oxidative Stress In Vitro. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 173, n. 3, p. 312–316, 18 jul. 2022.
- AGAR, N. S. et al. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? **Journal of Clinical Investigation**, v. 77, n. 1, p. 319–321, 1 jan. 1986.
- ALEJANDRA LÓPEZ. **Caracterização da absorção de ureia por aquaporinas e da sua regulação por nutrientes minerais em plantas de arroz (Oryza sativa L.)**. [s.l.] Universidade de São Paulo (USP), 2017.
- ALFONSO-PRIETO, M. et al. The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 33, p. 11751–11761, 26 ago. 2009.
- ALTIERO, T.; SUZUKI, A. C.; REBECCHI, L. Reproduction, Development and Life Cycles. Em: [s.l: s.n.]. p. 211–247.
- ANOUD, M. et al. Comparative transcriptomics reveal a novel tardigrade-specific DNA-binding protein induced in response to ionizing radiation. **eLife**, v. 13, 9 jul. 2024.
- BACHHAWAT, A. K.; YADAV, S. **The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ -glutamyl cycle**. **IUBMB Life**, 2018.
- BAGNYUKOVA, T. V. et al. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. **Brain Research**, v. 1052, n. 2, p. 180–186, 9 ago. 2005.
- BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, n. 3, p. 335–341, 2005.
- BARTELS, P. J. et al. A global biodiversity estimate of a poorly known taxon: phylum Tardigrada. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 178, n. 4, 2016.
- BAYLIAK, M. et al. Inhibition of catalase by aminotriazole in vivo results in reduction of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 4, p. 420–426, 6 abr. 2008.
- BERNHARD K. **MINI REVIEW Regulation of Respiration and ATP Synthesis in Higher Organisms: Hypothesis 1** **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. [s.l: s.n.].
- BICKLER, P. E.; BUCK, L. T. **Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: Life with variable oxygen availability**. **Annual Review of Physiology**, 2007.
- BLAUSTEIN, R. The Great Oxidation Event. **BioScience**, v. 66, n. 3, p. 189–195, 2 fev. 2016.

BOOTHBY, T. C. et al. Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation. **Molecular cell**, v. 65, n. 6, p. 975- 984.e5, 16 mar. 2017.

BUMP, E. A.; BROWN, J. M. Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells invitro and in vivo. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n. 1, p. 117–136, jan. 1990.

BURNETT, L. et al. Respiratory and Acid-Base Physiology of the Purple Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* , During Air Exposure: Presence and Function of a Facultative Lung. **The Biological Bulletin**, v. 203, n. 1, p. 42–50, ago. 2002.

CALABRESE, E. J. et al. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 222, n. 1, p. 122–128, jul. 2007.

CANFIELD, D. E. et al. Oxygen dynamics in the aftermath of the Great Oxidation of Earth's atmosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 42, p. 16736–16741, 15 out. 2013.

CHANDEL, N. S. et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 20, p. 11715–11720, 29 set. 1998.

DEGMA, P.; BERTOLANI, R.; GUIDETTI, R. Actual checklist of Tardigrada species (2009-2014 , Ver . 27 : 31-10-2014). **Checklist of Tardigrada**, n. 1, 2014.

DELANEY, M. A.; KLESIUS, P. H. Hypoxic conditions induce Hsp70 production in blood, brain and head kidney of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 236, n. 1–4, p. 633–644, jun. 2004.

DENNISS, S. G.; LEVY, A. S.; RUSH, J. W. E. Effects of Glutathione-depleting Drug Buthionine Sulfoximine and Aging on Activity of Endothelium-derived Relaxing and Contracting Factors in Carotid Artery of Sprague–Dawley Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 58, n. 3, p. 272–283, set. 2011.

DIAZ-ALBITER, H. et al. **SBBq XL Annual Meeting of Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society Highly sensitive quantification of Catalase using a Nanodrop assay**. [s.l: s.n.].

EISENBACK, J. D.; WEI, M.; ROANE, C. W. Heat Tolerance and Aging of the Anhydrobiotic Seed Gall Nematode with SEM Observations. **Journal of nematology**, v. 45, n. 1, p. 43–8, mar. 2013.

EL-BELTAGII, H. S.; MOHAMED, H. I. Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 41, n. 1, p. 44, 28 maio 2013.

- FERRO, C. DE O. et al. Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 31–38, fev. 2010.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, nov. 2000.
- GASPAR, M. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 4, p. 481–491, dez. 2011.
- GIOVANNINI, I. et al. Production of reactive oxygen species and involvement of bioprotectants during anhydrobiosis in the tardigrade *Paramacrobiotus spatialis*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022a.
- GIOVANNINI, I. et al. Antioxidant Response during the Kinetics of Anhydrobiosis in Two Eutardigrade Species. **Life**, v. 12, n. 6, p. 817, 30 maio 2022b.
- GIRAUD-BILLOUD, M. et al. REVIEW: Evidence supporting the ‘preparation for oxidative stress’ (POS) strategy in animals in their natural environment. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 293, p. 111626, jul. 2024.
- GÖTZE, S.; SABOROWSKI, R. NanoDrop fluorometry adopted for microassays of proteasomal enzyme activities. **Analytical Biochemistry**, v. 413, n. 2, p. 203–205, 15 jun. 2011.
- GOYAL, M. M.; BASAK, A. Human catalase: looking for complete identity. **Protein & Cell**, v. 1, n. 10, p. 888–897, 9 out. 2010.
- GREVEN, H. About the little water bear* A commented translation of GOEZE’S note „Ueber den kleinen Wasserbär” from 1773 . **Acta Biologica Benrodis**, v. 17, p. 1–17, 2015.
- GRIFFITH, O. W. L-BUTHIONINE-SR-SULFOXIMINE: MECHANISM OF ACTION, RESOLUTION OF DIASTEREOMERS AND USE AS A CHEMOTHERAPEUTIC AGENT. Em: **Glutathione Centennial**. [s.l.] Elsevier, 1989. p. 285–299.
- GRIFFITH, O. W.; MEISTER, A. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). **The Journal of biological chemistry**, v. 254, n. 16, p. 7558–60, 25 ago. 1979.
- HAGELBÄCK, P.; JÖNSSON, K. I. An experimental study on tolerance to hypoxia in tardigrades. **Frontiers in Physiology**, v. 14, 5 set. 2023.
- HALBERG, K. A.; JØRGENSEN, A.; MØBJERG, N. Desiccation Tolerance in the Tardigrade *Richtersius coronifer* Relies on Muscle Mediated Structural Reorganization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e85091, 31 dez. 2013.
- HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: Measurement, mechanism and the effects of nutrition.

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 443, n. 1–2, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [s.l.] Oxford University Press, 2015.

HASHIMOTO, T. et al. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. **Nature Communications**, v. 7, 2016a.

HASHIMOTO, T. et al. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 12808, 20 set. 2016b.

HEIM, W. G.; APPLEMAN, D.; PYFROM, H. T. Production of Catalase Changes in Animals with 3-Amino-1,2,4-Triazole. **Science**, v. 122, n. 3172, p. 693–694, 14 out. 1955.

HENGHER, S.; SCHILL, R. O. Environmental Adaptations: Cryobiosis. Em: [s.l: s.n.]. p. 295–310.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Em: **Functional Metabolism**. [s.l.] Wiley, 2004. p. 319–368.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Em: **Functional Metabolism**. [s.l: s.n.].

HERMES-LIMA, M. et al. **Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later**. **Free Radical Biology and Medicine**, 2015.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 265, n. 3, p. R646–R652, 1 set. 1993.

HESGROVE, C.; BOOTHBY, T. C. The biology of tardigrade disordered proteins in extreme stress tolerance. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, p. 178, 4 dez. 2020.

HIBSHMAN, J. D.; CLEGG, J. S.; GOLDSTEIN, B. Mechanisms of Desiccation Tolerance: Themes and Variations in Brine Shrimp, Roundworms, and Tardigrades. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 592016, 2020.

HONG, Y. et al. **Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution**. **Antioxidants** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 mar. 2024.

HYGUM, T. L. et al. Tun formation is not a prerequisite for desiccation tolerance in the marine tidal tardigrade *Echiniscoides sigismundi*. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 178, n. 4, p. 907–911, dez. 2016.

HYRA, M. et al. Body cavity cells of Parachela during their active life. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 178, n. 4, p. 878–887, dez. 2016.

ISTOMINA, A.; BELCHEVA, N. B.; CHELOMIN, V. Antioxidant System of the Intertidal Mollusk *Littorina kurila* in Its Natural Habitat . **Journal of Environmental Science and Engineering A 2** , p. 713–718, 2013.

JEFFERIES, H. et al. Glutathione. **ANZ Journal of Surgery**, v. 73, n. 7, p. 517–522, 18 jul. 2003.

KACZMAREK, Ł. et al. The Zoogeography of Marine Tardigrada. **Zootaxa**, v. 4037, n. 1, 2 nov. 2015.

KACZMAREK, Ł.; MICHALCZYK, Ł.; MCINNES, S. J. Annotated zoogeography of non-marine Tardigrada. Part II: South America. **Zootaxa**, v. 3923, n. 1, 25 fev. 2015.

KASIANCHUK, N.; RZYMSKI, P.; KACZMAREK, Ł. The biomedical potential of tardigrade proteins: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 158, p. 114063, fev. 2023.

KAYASTHA, P. et al. A Review on the Genus *Paramacrobiotus* (Tardigrada) with a New Diagnostic Key. **Diversity**, v. 15, n. 9, p. 977, 29 ago. 2023.

KIM, G. H. et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325–340, 30 dez. 2015.

KITAZUME, H. et al. Assessment of the behaviour and survival of nematodes under low oxygen concentrations. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, 2018.

KNIFFIN, C. D.; BURNETT, L. E.; BURNETT, K. G. Recovery from hypoxia and hypercapnic hypoxia: Impacts on the transcription of key antioxidants in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 170, p. 43–49, abr. 2014.

KNOLL, A. H. Paleobiological perspectives on early eukaryotic evolution. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 1, jan. 2014.

KOROVILA, I. et al. Proteostasis, oxidative stress and aging. **Redox Biology** Elsevier B.V., , 1 out. 2017.

KRAKOWIAK, M. et al. Tardigrade proteins: molecular tools in the phenomenon of anhydrobiosis. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 200, n. 1, p. 269–281, 2 jan. 2024.

KUMP, L. R. .; KASTING, J. F. .; CRANE, R. G. . **The earth system**. [s.l.] Pearson, 2014.

LUO, G. et al. Rapid oxygenation of Earth's atmosphere 2.33 billion years ago. **Science Advances**, v. 2, n. 5, 1 maio 2016.

- LUSHCHAK, V. I.; HERMES-LIMA, M. The effect of buthionine sulfoximine on the glutathione level in goldfish tissues. **Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal (1999)**, v. 77, n. 3, p. 35–8, 2005.
- LYONS, T. W.; REINHARD, C. T.; PLANAVSKY, N. J. **The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere**. Nature Publishing Group, , 19 fev. 2014.
- MARGOLIASH, E.; NOVOGRODSKY, A.; SCHEJTER, A. Irreversible reaction of 3-amino-1:2:4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. **Biochemical Journal**, v. 74, n. 2, p. 339–348, 1 fev. 1960.
- MEREDITH, M. J.; REED, D. J. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. **The Journal of biological chemistry**, v. 257, n. 7, p. 3747–53, 10 abr. 1982.
- MIODUCHOWSKA, M. et al. Taxonomic classification of the bacterial endosymbiont *Wolbachia* based on next-generation sequencing: is there molecular evidence for its presence in tardigrades? **Genome**, v. 64, n. 10, p. 951–958, out. 2021.
- MØBJERG, N. et al. Survival in extreme environments – on the current knowledge of adaptations in tardigrades. **Acta Physiologica**, v. 202, n. 3, p. 409–420, 22 jul. 2011.
- MØBJERG, N. et al. **Water Bears: The Biology of Tardigrades**. Cham: Springer International Publishing, 2018. v. 2
- MOREIRA, D. C. et al. How widespread is preparation for oxidative stress in the animal kingdom? **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 200, 2016.
- MOREIRA, D. C. Adaptações do metabolismo redox aos extremos ambientais: mecanismo, distribuição e ocorrência do fenômeno de “preparo para o estresse oxidativo”. 2018.
- NANNENGA, B. L. et al. Structure of catalase determined by MicroED. **eLife**, v. 3, 10 out. 2014.
- NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25° C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 474–478, out. 1972.
- NELSON, D. R.; BARTELS, P. J.; GUIL, N. Tardigrade Ecology. Em: [s.l: s.n.]. p. 163–210.
- NEUMANN, S. et al. DNA damage in storage cells of anhydrobiotic tardigrades. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 153, n. 4, p. 425–429, ago. 2009.
- NICHOLLS, P. The reaction between aminotriazole and catalase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 59, n. 2, p. 414–420, maio 1962.

NIU, Y. et al. Integrated analysis of transcriptome and metabolome data reveals insights for molecular mechanisms in overwintering Tibetan frogs, *Nanorana parkeri*. **Frontiers in Physiology**, v. 13, 9 jan. 2023.

OGATA, M.; MIZUGAKI, J.; TAKAHARA, S. Recovery of catalase activity after inhibition with aminotriazole in acatalasemia mice. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 116, n. 1, p. 39–43, 1975.

OLIVEIRA, M. F. et al. Is “preparation for oxidative stress” a case of physiological conditioning hormesis? **Frontiers in Physiology**, 2018.

PATNAIK, P.; SAHOO, D. DAS. Variations in oxidative stress and antioxidant defense level during different phases of hibernation in common Asian toad, *Duttaphrynus melanostictus*. **Biology Open**, v. 10, n. 7, 15 jul. 2021.

PEEPLES, E. S.; GENARO-MATTOS, T. C. **Ferroptosis: A Promising Therapeutic Target for Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury**. **International Journal of Molecular SciencesMDPI**, , 1 jul. 2022a.

PEEPLES, E. S.; GENARO-MATTOS, T. C. Ferroptosis: A Promising Therapeutic Target for Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7420, 4 jul. 2022b.

PERCY, M. E. Catalase: an old enzyme with a new role? **Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 62, n. 10, p. 1006–1014, 1 out. 1984.

POPRAWA, I. et al. Verification of *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek et al., 2018 (Eutardigrada; Hypsibiidae) application in anhydrobiosis research. **PLOS ONE**, v. 17, n. 3, p. e0261485, 18 mar. 2022.

RHEE, S. G. et al. **Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins**. **Current Opinion in Cell Biology**, 2005.

RIZZO, A. M. et al. Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 156, n. 2, 2010.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G. Antioxidant Defense in the Toughest Animals on the Earth: Its Contribution to the Extreme Resistance of Tardigrades. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 15, p. 8393, 1 ago. 2024.

SCHILL, R. O. et al. Molecular mechanisms of tolerance in tardigrades: New perspectives for preservation and stabilization of biological material. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 348–352, jul. 2009.

SCHILL, R. O.; HENGHER, S. Environmental Adaptations: Desiccation Tolerance. Em: [s.l: s.n.]. p. 273–293.

SCHILL, R. O.; HENGHER, S. Environmental Adaptations: Desiccation Tolerance. Em: [s.l: s.n.]. p. 273–293.

SCHOKRAIE, E. et al. Proteomic Analysis of Tardigrades: Towards a Better Understanding of Molecular Mechanisms by Anhydrobiotic Organisms. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9502, 3 mar. 2010.

SCHOONEN, M. A. A. et al. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in pyrite oxidation by molecular oxygen. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 74, n. 17, 2010.

SEMENZA, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 4, p. 1474–1480, 1 abr. 2000.

SHATILOVICH, A. et al. A novel nematode species from the Siberian permafrost shares adaptive mechanisms for cryptobiotic survival with *C. elegans* dauer larva. **PLOS Genetics**, v. 19, n. 7, p. e1010798, 27 jul. 2023.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, p. 613–619, abr. 2017.

SMYTHERS, A. L. et al. Chemobiosis reveals tardigrade tun formation is dependent on reversible cysteine oxidation. **PLOS ONE**, v. 19, n. 1, p. e0295062, 17 jan. 2024.

STEC, D.; DUDZIAK, M.; MICHALCZYK, Ł. Integrative Descriptions of Two New Macrobiotidae Species (Tardigrada: Eutardigrada: Macrobiotidea) from French Guiana and Malaysian Borneo. **Zoological studies**, v. 59, p. e23, 2020.

STOREY, J. M.; STOREY, K. B. In defense of proteins: Chaperones respond to freezing, anoxia, or dehydration stress in tissues of freeze tolerant wood frogs. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 331, n. 7, p. 392–402, 5 ago. 2019.

STOREY, K. B. Oxidative stress: Animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 12, 1996.

SWITALA, J.; LOEWEN, P. C. Diversity of properties among catalases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 401, n. 2, p. 145–154, maio 2002.

TEIXEIRA, T. et al. Coral physiological adaptations to air exposure: Heat shock and oxidative stress responses in *Veretillum cynomorium*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 439, 2013.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502–522, mar. 1969.

TONELLI, C.; CHIO, I. I. C.; TUVESON, D. A. Transcriptional Regulation by Nrf2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 17, p. 1727–1745, 10 dez. 2018.

TUDEK, B. et al. Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. **American journal of translational research**, v. 2, n. 3, p. 254–84, 15 maio 2010.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, mar. 2006.

WELKER, A. F.; MOREIRA, D. C.; HERMES-LIMA, M. Roles of catalase and glutathione peroxidase in the tolerance of a pulmonate gastropod to anoxia and reoxygenation. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 186, n. 5, 2016a.

WELKER, A. F.; MOREIRA, D. C.; HERMES-LIMA, M. Roles of catalase and glutathione peroxidase in the tolerance of a pulmonate gastropod to anoxia and reoxygenation. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 186, n. 5, p. 553–568, 9 jul. 2016b.

YOSHIDA, M. et al. Measurement of radical-scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spin resonance spectroscopy. **Toxicology**, v. 213, n. 1–2, p. 74–80, set. 2005.

YOSHIDA, Y. et al. Comparative genomics of the tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varieornatus*. **PLOS Biology**, v. 15, n. 7, p. e2002266, 27 jul. 2017.

ZÁMOCKÝ, M. et al. The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. **FEBS Letters**, v. 492, n. 3, p. 177–182, 16 mar. 2001.

ZIDONI, E.; KREMER, M. L. Kinetics and mechanism of catalase action. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 161, n. 2, p. 658–664, abr. 1974.

12 ANEXOS

ANEXO 1:

Primeiro protocolo de indução ao *tun* utilizado no laboratório, que gerou os resultados preliminares deste trabalho, é descrito abaixo. O protocolo foi aprimorado, a fim de otimizar os resultados e diminuir o tempo de indução ao *tun*.

1.0. Preparação dos Microambientes de Umidade:

- Preparar dois microambientes com diferentes níveis de umidade relativa:
 - 80% a 85% de umidade, utilizando solução saturada de KCl em água milli-Q.
 - 40% a 45% de umidade, utilizando solução saturada de NaOH em água milli-Q.
- Cada solução deve ser armazenada em um recipiente fechado para criar o microambiente desejado.

2.0 Exposição dos Tardígrados à Variação de Umidade:

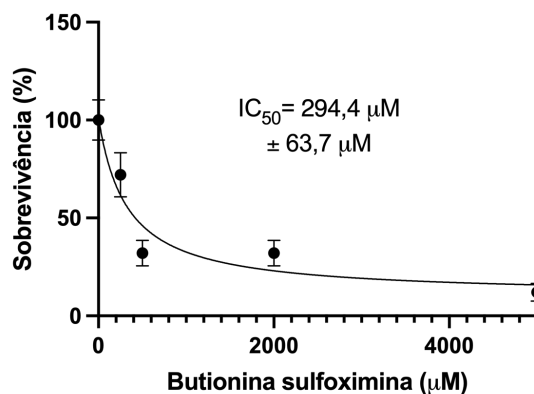
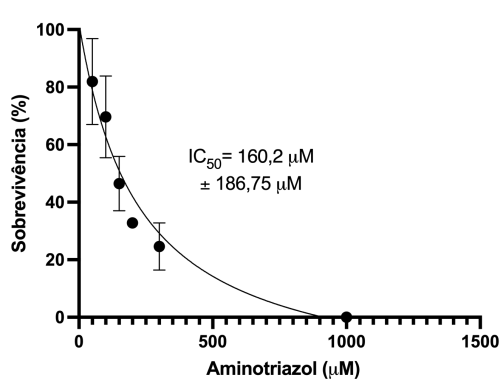
- Os tardígrados coletados devem ser mantidos inicialmente no microambiente com umidade de 80% a 85% por 24 horas.
- Em seguida, transferi-los para o microambiente com umidade de 40% a 45% por 48 horas, induzindo a transição para o estado de *tun*.

3.0 Reidratação e Recuperação:

- Após observação e entrada no estado de *tun*, os tardígrados devem ser reidratados com água milli-Q para estimular a saída do estado de *tun* e avaliar sua recuperação.

ANEXO 2:

IC₅₀ calculadas com base nas curvas de sobrevivências.



ANEXO 3: Resultado da atividade de catalase, em concentração de 0,05mM, após os animais ficarem 24h no tratamento. É possível observar que não houve inibição expressiva da atividade da enzima em relação ao controle.

