

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

DANIEL CARNEIRO MOREIRA

Adaptações do metabolismo redox aos extremos ambientais:
mecanismo, distribuição e ocorrência do fenômeno de “Preparo para o
Estresse Oxidativo”

Brasília
2017

DANIEL CARNEIRO MOREIRA

Adaptações do metabolismo redox aos extremos ambientais:
mecanismo, distribuição e ocorrência do fenômeno de “Preparo para o
Estresse Oxidativo”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima

Brasília
2017

M838 Moreira, Daniel Carneiro

Adaptações do metabolismo redox aos extremos ambientais: mecanismo, distribuição e ocorrência do fenômeno de "Preparo para o Estresse Oxidativo" / Daniel Carneiro Moreira; orientador Marcelo Hermes-Lima. - Brasília, 2017.

181 p. : il.

Tese (Doutorado - Doutorado em Biologia Molecular) -- Universidade de Brasília, 2017.

1. antioxidante. 2. ecofisiologia. 3. espécies reativas de oxigênio. 4. estivação. 5. hipoxia. I. Hermes-Lima, Marcelo, orient. II. Título.

DANIEL CARNEIRO MOREIRA

**Adaptações do metabolismo redox aos extremos ambientais:
mecanismo, distribuição e ocorrência do fenômeno de “Preparo para o
Estresse Oxidativo”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima
Universidade de Brasília - UnB (Presidente)

Prof. Dr. Fausto Nomura
Universidade Federal de Goiás - UFG

Profa. Dra. Andreza Fabro de Bem
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins
Universidade de Brasília - UnB

Aprovada em: 28 de novembro de 2017.

Local de defesa: Auditório 2 do Instituto de Ciências Biológicas, Campus
Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília.

“Climate plays an important part in determining the average numbers of a species, and periodical seasons of extreme cold or drought, I believe to be the most effective of all checks.”

Charles Darwin – On the Origin of Species by Means of Natural Selection (1859)

“Living creatures press up against all barriers; they fill every possible niche all the world over. [...] We see life persistent and intrusive – spreading everywhere, insinuating itself, adapting itself, resisting everything, defying everything, surviving everything!”

John Arthur Thomson – The Outline of Science (1922)

“How have living systems, which are based on a common set of biochemical structures and processes and subject to a common set of physical-chemical laws, been able to adapt to the enormously wide spectrum of environmental conditions found in the biosphere?”

Peter Hochachka and George Somero – Biochemical Adaptation (2002)

MOREIRA, D. C. **Adaptações do metabolismo redox aos extremos ambientais: mecanismo, distribuição e ocorrência do fenômeno de “Preparo para o Estresse Oxidativo”**. 2017. 181 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

RESUMO

A evolução selecionou um conjunto de adaptações fisiológicas e bioquímicas comuns em animais que toleram amplas variações de parâmetros ambientais em suas histórias de vida. Devido à dependência para produção de energia e a relação com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), situações de flutuação dos níveis de O₂ são condições potencialmente deletérias para animais. Ambientes extremos que afetam a disponibilidade e consumo de O₂ incluem eventos de anóxia, hipóxia, congelamento, desidratação severa, exposição aérea de organismo de respiração aquática e estivação. Uma estratégia comum de animais submetidos a tais situações é a elevação dos níveis de antioxidantes endógenos. Esta estratégia foi batizada de “Preparo para o Estresse Oxidativo” (POS). Os objetivos deste trabalho foram: (i) propor um mecanismo molecular detalhado de ativação do POS em condições de baixa de oxigênio; (ii) desenvolver critérios de classificação e classificar espécies, determinando a prevalência do POS no reino animal; e (iii) verificar a ocorrência do POS em duas espécies de anuros da Caatinga durante a estivação na natureza. A compilação de dados fragmentados na literatura indica um acionamento do POS via aumento da produção de ROS durante a hipóxia. Segundo este modelo, durante a hipóxia haveria um aumento da produção mitocondrial de ROS, ativando fatores de transcrição sensíveis a alterações redox (Nrf2, FoxO, HIF-1 e NF-κB), que, por sua vez, promoveriam a expressão de antioxidantes endógenos. A classificação de animais usando diferentes critérios revelou que o POS é, de fato, uma estratégia amplamente utilizada por animais de 8 filos diferentes. A proporção de animais que apresentam o POS (POS-positivas) durante a privação de O₂ depende do estresse ao qual o animal é submetido. O percentual de espécies POS-positivas foi de 54-77%, 64-77% e 75-86% nos casos de exposição aérea, anoxia e congelamento respectivamente. Dentre animais expostos à estivação e a desidratação a prevalência foi maior, atingindo valores de 91-100%. No caso da hipóxia, a prevalência de animais POS-positivos foi de 37,5-53%, dependendo do critério usado. A alta prevalência do POS no reino animal reforça a importância da modulação de antioxidantes em situações de privação de O₂. Considerando que resultados de animais do campo podem ser mais ecologicamente relevantes que aqueles de animais em condições artificiais de laboratório, investigamos a modulação de antioxidantes no músculo de duas espécies de anuros da Caatinga, *Pleurodema diplolistris* e *Proceratophrys cristiceps*, durante a estivação sem intervenção experimental. Para tanto, foram analisadas as atividades de enzimas antioxidantes, enzimas metabólicas e a concentração de glutathione (nas formas reduzida e dissulfeto). Em ambas espécies, houve queda de 36% da atividade de citrato sintase muscular em animais estivados coletados durante a estação seca comparados com animais ativos. As atividades de catalase, glutathione peroxidase (total) e glutathione peroxidase (H₂O₂) aumentaram em ambas as espécies durante a estivação. Em *P. diplolistris* os aumentos foram de 74%, 74% e 73% respectivamente. Já em *P. cristiceps* os aumentos foram de 48%, 57% e 78% respectivamente. O aumento da capacidade antioxidante de ambas as espécies é o primeiro registro da ocorrência do POS em animais estivados livremente na natureza.

Palavras-chave: Antioxidante; Ecofisiologia; Espécies Reativas de Oxigênio; Estivação; Hipóxia.

MOREIRA, D. C. **Redox metabolism adaptations to extreme environments: mechanism, distribution and occurrence of the “Preparation for Oxidative Stress” phenomenon.** 2017. 181 pp. Thesis (Doctoral) – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

ABSTRACT

Evolution has selected a set of biochemical and physiological adaptations in animals that tolerate wide variations of environmental parameters. Due to its roles in energy metabolism and in reactive oxygen species (ROS) generation, fluctuations in O₂ availability are potentially deleterious to animals. Extreme environments in which oxygen availability and consumption are strongly affected include events of hypoxia, anoxia, freezing, severe dehydration, aerial exposure of aquatic organisms, and estivation. The increase in endogenous antioxidants levels is a common strategy of animals submitted to such situations. This strategy was coined “Preparation for Oxidative Stress” (POS). The aim of this study was: (i) to propose a detailed molecular mechanism for the activation of POS under low oxygen stresses; (ii) to design classification criteria and classify species, determining the prevalence of POS in animals; and (iii) to verify the occurrence of POS in two anurans from the Caatinga during estivation in their natural environment. Published data indicates that POS could be activated by a surge in ROS production during hypoxia. According to this model, the rise in ROS generation would activate redox-sensitive transcription factors (Nrf2, FoxO, HIF-1 e NF-κB), leading to enhanced antioxidant defenses. The proportion of POS-positive species in the animal kingdom depends on the nature of the low oxygen stress. The prevalence of POS-positive species was 54-77%, 64-77% and 75-86% for aerial exposure, anoxia and freezing respectively. In the case of estivation and dehydration the prevalence was higher, reaching 91-100%. For hypoxia, the prevalence of POS-positive animals was 37.5-53%, depending on the criteria. The high prevalence of POS-positive species highlights the important role of antioxidant modulation during low oxygen stresses. Considering that results from field-collected animals might be more ecologically relevant than those from laboratory experiments, we investigated the modulation of antioxidants in the muscle of two anuran species from the Caatinga, *Pleurodema diploslistris* and *Proceratophrys cristiceps*, during estivation without experimental intervention. To do so, we measured the activities of metabolic and antioxidant enzymes, as well as the concentration of reduced and disulfide glutathione. In both species, the activity of citrate synthase decreased by 36% in the muscle of estivating animals collected in the dry season compared to active animals collected in the rainy season. The activities of catalase, glutathione peroxidase (total) and glutathione peroxidase (H₂O₂) increased in both species during estivation. In *P. diploslistris*, they increased by 74%, 74% and 73% respectively. While they increased by 48%, 57% and 78% respectively in *P. cristiceps*. Such enhanced antioxidant capacity in both species is the first report of POS occurrence in animals estivating under natural conditions.

Keywords: Antioxidant; Ecophysiology; Reactive Oxygen Species; Estivation; Hypoxia.

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1 Oxigênio – Disponibilidade, Distribuição, Obtenção e Metabolismo	13
1.1.1 <i>Oxigênio e Metabolismo</i>	13
1.1.2 <i>Disponibilidade de Oxigênio em Ambientes Terrestres e Aquáticos</i>	17
1.1.3 <i>Cascata de Transporte de Oxigênio – da Atmosfera à Mitocôndria</i>	23
1.2 Espécies Reativas de Oxigênio	26
1.2.1 <i>Privação de Oxigênio e Geração de Espécies Reativas</i>	33
1.3 Sistemas Antioxidantes.....	37
1.3.1 <i>Superóxido Dismutases</i>	38
1.3.2 <i>Catalase</i>	38
1.3.3 <i>Glutathione</i>	39
1.3.4 <i>Tioredoxina</i>	42
1.3.5 <i>NADPH e Sistemas Antioxidantes</i>	43
1.3.6 <i>Mudanças Pós-traducionais</i>	44
1.3.7 <i>Controle Transcricional</i>	44
1.3.8 <i>MicroRNAs</i>	49
1.4 Danos Oxidativos e Sistemas de Reparo	49
1.4.1 <i>Estresse Oxidativo</i>	52
1.5 Privação de Oxigênio e Depressão Metabólica	53
1.5.1 <i>Preparo para o Estresse Oxidativo</i>	55
1.6 Justificativa e Objetivos	58
2 CAPÍTULO 2 – MODELO MOLECULAR PARA O FENÔMENO DE PREPARO PARA O ESTRESSE OXIDATIVO.....	60
2.1 <i>Resumo</i>	60
2.2 <i>Preparation for Oxidative Stress Under Hypoxia and Metabolic Depression: Revisiting the Proposal two Decades Later</i>	62
3 CAPÍTULO 3 – DISTRIBUIÇÃO DO FENÔMENO DE PREPARO PARA O ESTRESSE OXIDATIVO NO REINO ANIMAL	84
3.1 <i>Resumo</i>	84
3.2 <i>How Widespread is Preparation for Oxidative Stress in the Animal Kingdom?</i>	86
4 CAPÍTULO 4 – EFEITO DA ESTIVAÇÃO EM AMBIENTE NATURAL SOBRE O METABOLISMO REDOX DE ANUROS DA CAATINGA	101
4.1 <i>Introdução</i>	101
4.2 <i>Material e Métodos</i>	103
4.2.1 <i>Local do Estudo</i>	103
4.2.2 <i>Coleta 1</i>	105

4.2.3 Coleta 2.....	107
4.2.4 Ensaio de Atividade Enzimática	110
4.2.5 Determinação dos Níveis de Glutathione e Proteínas Carboniladas.....	120
4.2.6 Análise Estatística.....	125
4.3 Resultados e Discussão	126
4.4 Conclusão e Perspectivas	134
5 CAPÍTULO 5 – PREPARO PARA O ESTRESSE OXIDATIVO: DESAFIOS E PERSPECTIVAS.....	136
5.1 Resumo	136
5.2 <i>Current Trends and Research Challenges Regarding ‘Preparation for Oxidative Stress’</i>	137
6 CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
APÊNDICE A – <i>Ellagic Acid Inhibits Iron-Mediated Free Radical Formation</i>	175
APÊNDICE B – <i>Blog Construction as an Effective Tool in Biochemistry Active Learning</i>.....	176
APÊNDICE C – <i>Roles of Catalase and Glutathione Peroxidase in the Tolerance of a Pulmonate Gastropod to Anoxia and Reoxygenation</i>	177
APÊNDICE D – <i>Subtropical Hibernation in Juveniles Tegu Lizards (Salvator merianae): Insights from Intestine Redox Dynamics</i>	178
APÊNDICE E – <i>Mammalian Hibernation, Oxidative Stress, and Antioxidant Defenses</i>	180

1 CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

Mesmo ocupando ambientes muito distintos, os seres vivos apresentam um arcabouço bioquímico característico comum. Grupos de biomoléculas, vias metabólicas básicas, estrutura de membranas biológicas, além das maquinarias de transcrição e tradução, são compartilhados entre as diferentes formas de vida. Não obstante, a vida prospera em habitats, aparentemente, inóspitos, incluindo lagos hipersalinos, zonas com temperaturas abaixo de zero, regiões sem qualquer oxigênio e desertos extremamente secos. Por exemplo, formas de vida são registradas em um amplo intervalo de condições ambientais, desde -70°C , no caso de insetos do ártico durante o inverno, até 130°C , no caso de archeas que habitam fontes hidrotermais, ou em extremos de salinidade, desde 0 mOsmol L^{-1} , no caso de invertebrados de água doce, até $3.500 \text{ mOsmol L}^{-1}$ no caso de artêmia (Somero, Lockwood, e Tomanek 2016). As estruturas químicas básicas à vida (e.g. proteínas, ácidos nucleicos e membranas lipoproteicas) e os processos em que participam são sensíveis ao ambiente em que estão e, na natureza, podem ser expostos a extremos de temperatura, baixa disponibilidade de água, incidência de radiação e excesso de espécies químicas reativas (e.g. radicais livres). A manutenção da homeostase (i.e. um ambiente interno constante), diante de um ambiente em frequente mudança, depende de mecanismos cooperativos agindo simultaneamente ou sucessivamente, resistindo a alterações das condições de estado estacionário de maneira organizada e autocontrolada (Cannon 1932).

Adaptações bioquímicas (i.e. alterações de estrutura, função, regulação e níveis de biomoléculas e reações metabólicas) permitem que organismos respondam aos desafios ambientais e mantenham condições adequadas no ambiente interno (Storey 2004). De maneira geral, a adaptação pode ser definida como uma característica que favorece a aptidão (*fitness*) de um organismo em seu habitat de maneira que seus efeitos positivos atuais são consequência da vantagem evolutiva que tal característica propiciou no momento evolutivo em que surgiu (Hochachka e Somero 2002). Diferentes mecanismos moleculares viabilizam as adaptações bioquímicas, que podem ser observadas ao nível transcricional, traducional ou proteico (**Tabela 1, Figura 1**). No curto prazo, a resposta a um estímulo externo é geralmente a modulação de processos já operantes na célula (e.g. modificações pós-traducionais), se o estímulo persistir, a resposta envolve a expressão de genes para

mediadores ainda não operantes ou para mediadores já operantes a fim de se aumentar sua quantidade (Hochachka e Somero 2002).

Tabela 1. Mecanismos comuns de adaptação bioquímica e manutenção da homeostase.

Mecanismo	Exemplo	Modelo animal	Referência
¹ Surgimento de novas proteínas ou recrutamento para novas funções	Proteínas anticongelamento derivadas de lectinas tipo-C (cálcio dependente) originalmente com função de reconhecimento de carboidratos associados a patógenos	Peixes residentes em regiões polares	(Storey 2004)
² Controle sobre a estrutura da cromatina	Redução dos níveis relativos de histona H3 acetilada e fosforiladas no tecido muscular promovendo a compactação da cromatina	Esquilos durante a hibernação	(Morin e Storey 2006)
³ Alterações em elementos de resposta e fatores transcrição	Maior translocação para o núcleo e maior atividade de ligação ao DNA do fator de transcrição FoxO1, resultando em maiores níveis de transcritos regulados por FoxO1 no fígado	Rãs expostas à desidratação	(Malik e Storey 2011)
⁴ Alterações nos níveis de transcritos	Aumento dos níveis de transcritos para a enzima glutatona peroxidase nas brânquias	Gastrópodes marinhos privados de oxigênio	(De Zoysa et al. 2009)
⁵ Controle sobre a maquinaria de tradução	Aumento dos níveis relativos do fator de iniciação eucariótico 2 α fosforilado levando a inibição global da tradução hepática	Rãs durante a estivação	(Pakay et al. 2003)
⁶ Supressão transcritos por microRNAs	Aumento dos níveis dos microRNAs miRNA-16-1 e miRNA-15a associado à inibição da tradução da proteína ciclina D1 no fígado	Tartarugas expostas à anóxia	(Biggar e Storey 2012)
⁷ Alterações na distribuição de isoformas	Mudanças na contribuição relativa de diferentes isoformas de superóxido dismutase para a atividade total	Mexilhões expostos ao ar	(Letendre et al. 2008)
⁷ Alterações na quantidade total de proteína	Aumento na concentração da proteína superóxido dismutase dependente de manganês no cérebro	Peixes pulmonados durante a estivação	(Page et al. 2010)
⁸ Modificações pós-traducionais e alterações nas propriedades cinéticas	Maior nível de fosforilação da enzima catalase no músculo resultando em maior afinidade pelo substrato H ₂ O ₂ e maior velocidade máxima de atividade	Rãs expostas ao congelamento	(Dawson e Storey 2016)
⁹ Alterações na concentração de substratos e cofatores	Aumento da concentração hepática do peptídeo glutatona	Peixes expostos à hipóxia	(Wilhelm Filho et al. 2005)
¹⁰ Alterações na atividade enzimática máxima	Maior atividade de glutatona peroxidase no músculo	Caracóis expostos à anóxia	(Welker, Moreira, e Hermes-Lima 2016)

Os mecanismos citados na tabela estão interconectados e raramente ocorrem de modo isolado. Por exemplo, a redução dos níveis relativos de fosforilação e acetilação de histona H3 está associada a maior atividade de histonas deacetilases (HDAC), que, por sua vez, está associada a uma maior concentração de proteínas HDAC1 e HDAC4 (Morin and Storey 2006).

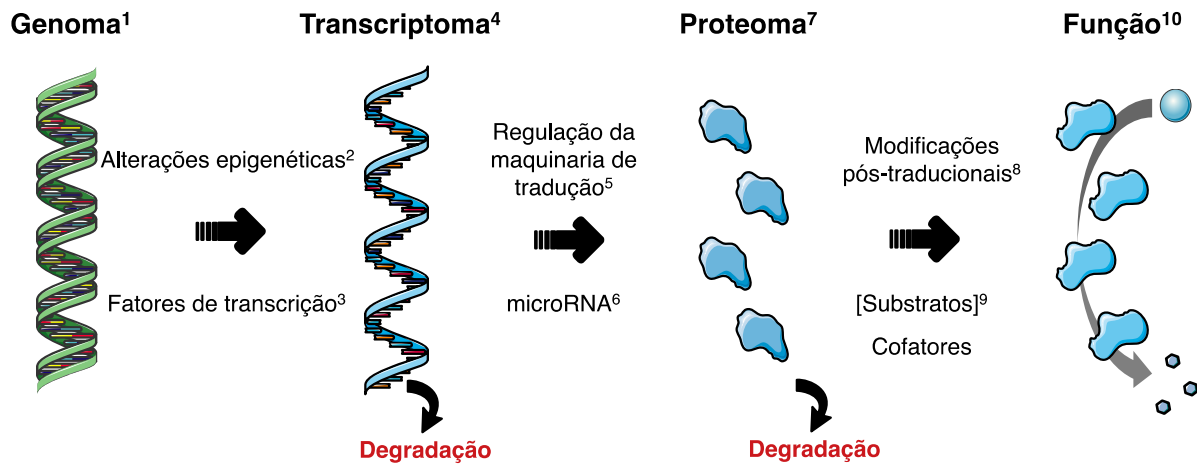


Figura 1. Do genoma à função. Esquema simplificado das etapas entre informação genômica e função. A adaptação bioquímica pode ocorrer por alterações em cada uma dessas etapas. Os números sobrescritos referem-se aos mecanismos e exemplos descritos na tabela 1.1. O processo de degradação ilustrado em vermelho determina a meia-vida de transcritos e proteínas. As diferenças de meia-vida entre transcrito e proteína para um gene explicam a baixa correlação entre mRNA e proteína (Schwanhäusser et al. 2011). A degradação de proteínas ainda tem importante papel de vias de fatores de transcrição e no controle dos níveis de proteínas danificadas. Figura elaborada com ilustrações adaptadas de Servier Medical Art.

Animais dependem de elementos básicos (água e nutrientes), além de fatores abióticos favoráveis, para a geração de energia e síntese de biomoléculas, processos fundamentais para a manutenção da vida. Entretanto, muitas espécies animais são expostas durante sua história de vida a períodos de severa escassez de tais recursos. A duração da exposição a condições ambientais desfavoráveis (e.g. extremos de temperatura, falta de oxigênio, hiposalinidade, hipersalinidade, indisponibilidade de alimento, restrição hídrica) pode durar horas, dias, meses, ou até anos (**Figura 2**). Eventos sazonais de extrema restrição de recursos são reconhecidamente determinantes para a sobrevivência e o sucesso reprodutivo de espécies animais, exercendo importante papel na seleção natural (Darwin 1859).

A ocorrência de condições ambientais desfavoráveis, de forma sazonal ou não, restringe os períodos em que o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução são viáveis. Em regiões de clima temperado ou polar, a variação da incidência de radiação solar resulta em quatro estações do ano bem definidas com alterações marcantes de temperatura e fotoperíodo ao longo do ano. Já regiões tropicais não estão sujeitas a alterações amplas de fotoperíodo, sofrendo alterações menos marcantes entre as estações do ano. Entretanto, áreas tropicais e subtropicais expõem animais a temporadas de privação de recursos, geralmente associadas a

períodos de baixa umidade intercalados por períodos de chuva/alta umidade (e.g. Figura 2D), representando importantes desafios para a adaptação de seus habitantes.

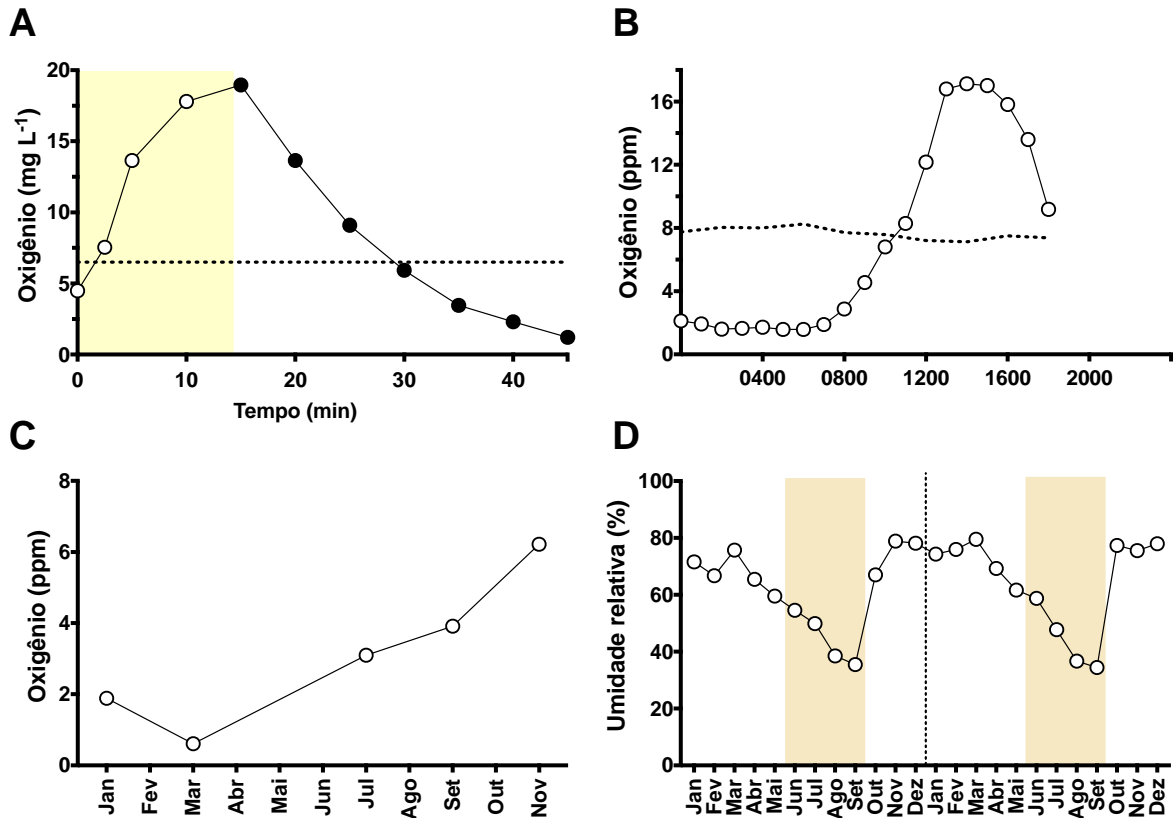


Figura 2. Variações naturais de parâmetros ambientais essenciais à viabilidade de animais ocorrem em diferentes escalas de tempo. (A) Variação da concentração de oxigênio no interior do tentáculo de *Anemonia viridis* contendo simbiontes *Stylophora pistillata* em resposta a exposição à luz (símbolos vazios) e ao escuro (símbolos pretos) (Richier et al. 2003). A linha pontilhada demarca o nível de normoxia. **(B)** Variação circadiana da concentração de oxigênio em uma lagoa na região amazônica contendo peixes dos gêneros *Apistogramma* e *Aequidens* (Kramer et al. 1978). A linha pontilhada demarca o nível de saturação de oxigênio nas condições mensuradas. **(C)** Variação da concentração de oxigênio ao longo dos meses em local de coleta de peixes *Colossoma macropomum* no Rio Solimões (Almeida-Val et al. 1990). **(D)** Variação da umidade relativa do ar em Brasília com destaque para as estações secas (sombreadas) ao longo de dois anos (INMET, estação Brasília). Nesta região, em resposta a baixa umidade e indisponibilidade de recursos, lagartas *Chlosyne lacinia* interrompem seu desenvolvimento e adotam um estado de depressão metabólica até o retorno de condições ambientais favoráveis (Moreira 2014).

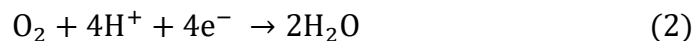
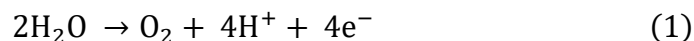
Nestas situações, muitos animais dependem de adaptações comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas para combater perturbações da homeostase causadas por um ambiente desfavorável e sobreviver. Os parâmetros ambientais para os quais as adaptações animais foram mais estudadas são a temperatura, a

concentração de oxigênio, a disponibilidade de água e mudanças de osmolaridade (Somero, Lockwood, e Tomanek 2016). A adoção de um estado de intensa depressão metabólica é uma resposta típica de animais desafiados por ambientes inviáveis para sobrevivência e reprodução (Storey e Storey 2007, 2012; Storey 2015). Tal condição de hipometabolismo é mantida até que a disponibilidade de recursos seja reestabelecida, quando desenvolvimento, crescimento e reprodução são retomados. As espécies animais desafiadas aos limites da capacidade fisiológica discutidas nas próximas seções representam modelos singulares de adaptação bioquímica.

1.1 Oxigênio – Disponibilidade, Distribuição, Obtenção e Metabolismo

1.1.1 Oxigênio e Metabolismo

O oxigênio (O) é estimado como o terceiro elemento mais comum do universo, atrás de hidrogênio e hélio (Dole 1965). Na crosta terrestre, o oxigênio é o elemento mais abundante, correspondendo a 46,6% (por massa) da crosta continental (Lutgens e Tarbuck 2015). Na atmosfera atual, 20,95% do ar seco é constituído de oxigênio molecular (O₂), o alótropo mais estável de oxigênio. Outros alótropos mais reativos são, por exemplo, o ozônio e o oxigênio singlete. O oxigênio molecular exerce papel central para organismos vivos, participando de duas reações críticas: a fotossíntese (1) e a respiração (2):



A atmosfera terrestre, entretanto, durante os primeiros bilhões de anos do planeta continha virtualmente nenhum O₂. A história da terra pode ser dividida em três principais períodos em relação à distribuição de O₂ no ambiente: (i) 4,6 a 2,4 bilhões de anos atrás (Ga), não havia quantidade significativa de O₂ na atmosfera; (ii) 2,4 a 0,54 Ga, quando a concentração de O₂ começou a subir gradualmente na atmosfera e na superfície dos oceanos, mas o fundo do oceano ainda era anóxico; e (iii) 0,54 a 0 Ga, quando a atmosfera e os oceanos tornaram-se ambientes oxigenados (Dietrich, Tice, e Newman 2006). O aumento ainda dos níveis de O₂

atmosférico, a aproximadamente 2,4 Ga, é conhecido como o Grande Evento de Oxidação (GOE) (Holland 2002). A inserção de O₂ na atmosfera é atribuída ao surgimento da fotossíntese, realizada por cianobactérias basais. A sincronia entre o surgimento da fotossíntese e o GOE permanece incerta (Lyons, Reinhard, e Planavsky 2014). Apenas mais recentemente, a 0,5 Ga os níveis de O₂ atmosféricos atingiram valores próximos aos atuais de 21% (Canfield e Teske 1996), período que coincide com o aparecimento explosivo de animais e plantas terrestres no registro geológico (Hsia et al. 2013). Contudo, a relação entre este evento e os níveis de oxigênio ainda não foi inequivocamente demonstrada (Fox 2016). Desde então o conteúdo de O₂ atmosférico flutuou dentro da faixa de 10 a 35% estando associado a diferentes eventos evolutivos, como, por exemplo, grandes extinções e a ocorrência de gigantismo (Hsia et al. 2013).

A disponibilidade de O₂ no ambiente propiciou o desenvolvimento de vias eficientes de produção de energia, nas quais cadeias transportadoras levam elétrons ao O₂. Em células animais, esta via ocorre nas mitocôndrias. O oxigênio molecular também é substrato para diversas reações biológicas (e.g. reações catalisadas por oxidases, oxigenases e hidroxilases). Além de seu efeito na produção energética por seres vivos, a inserção de O₂ na atmosfera teve outros efeitos críticos para a vida na terra: a produção de ozônio (O₃), formando uma camada na estratosfera, e a indisponibilização de íons ferrosos (Fe²⁺), potencialmente danoso por gerar espécies altamente reativas, no ambiente aquático (Halliwell e Gutteridge 2015). O uso de oxigênio permite uma maior extração de energia de nutrientes quando comparado a vias independentes de O₂. O maior rendimento energético possibilitou o surgimento de seres multicelulares complexos, que evoluíram em um ambiente relativamente rico em oxigênio. Consequentemente, muitos organismos são extremamente sensíveis a situações de privação de O₂.

Para manterem-se vivas, as células precisam sustentar taxas adequadas de produção e consumo (*turnover*) de energia. Nas células, a energia necessária para favorecer reações em sistemas biológicos está na forma de ATP e potencial redutor. O ATP é utilizado como fonte de energia livre em um grande número de reações biológicas, incluindo síntese de macromoléculas a partir de precursores, transporte de substâncias e contração muscular. O potencial redutor, na forma de NADPH, é necessário para etapas redutoras de vias de biossíntese (e.g. síntese de ácidos graxos) e para abastecer sistemas antioxidantes. Em células de mamíferos, os

processos biológicos que correspondem ao maior consumo de ATP são a síntese de proteínas (25-30% do consumo) e o funcionamento de bombas iônicas (19-28% por $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e 4-8% por $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$) (Rolfe e Brown 1997). Outras vias com contribuição significativa são a síntese de mRNA e a gliconeogênese (Rolfe e Brown 1997). Cabe ressaltar que a contribuição de cada processo ao consumo de O_2 associado à produção de ATP depende do tipo celular. Por exemplo, no tecido cardíaco o maior consumo (50%) corresponde à contração muscular, enquanto no tecido renal o maior consumo (40-70%) corresponde à atividade de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Rolfe e Brown 1997). Em cultura, o consumo global de O_2 de células de mamíferos varia de < 1 a $> 350 \text{ amol célula}^{-1} \text{ s}^{-1}$ de acordo com o tipo celular (Wagner, Venkataraman, e Buettner 2011).

Os processos biológicos dependem, direta ou indiretamente, do fluxo de elétrons em reações de redução-oxidação (*redox*). Os principais grupos de moléculas que realizam o transporte de elétrons em reações metabólicas são nucleotídeos (e.g. NAD, NADP, FMN e FAD), quinonas (e.g. ubiquinona), centros ferro-enxofre (e.g. aconitase e complexo III) e citocromos (e.g. complexo III) (Halliwell e Gutteridge 2015). Em organismos heterotróficos, os elétrons provenientes da oxidação de macronutrientes reduzidos são transferidos para transportadores de elétrons, as coenzimas NAD e FAD, conservando a energia livre resultante do catabolismo de substratos. Tais coenzimas exercem sua função de transporte de elétrons passando pelos estados oxidados (NAD^+ e FAD) e reduzidos (NADH e FADH_2) reversivelmente em diversas reações redox. Os transportadores reduzidos pelos elétrons da degradação de nutrientes são oxidados na mitocôndria ao entregar elétrons para complexos multiproteicos. Os pontos de entrada de elétrons são os complexos I e II, de onde os elétrons seguem o trajeto ubiquinona, complexo III, citocromo c, complexo IV, onde os elétrons são entregues ao O_2 , formando água (**Figura 3**). Uma molécula de O_2 é reduzida a duas moléculas de H_2O ao receber 4 elétrons. A energia resultante do fluxo de elétrons pelos complexos movimenta prótons da matriz para o espaço intermembranas. O acúmulo de prótons no espaço intermembranas gera um gradiente eletroquímico que favorece o retorno de prótons para a matriz. Este retorno ocorre através da ATP sintase (ou complexo V) e fornece energia para a fosforilação de ADP, produzindo ATP (Mitchell 1961). O fluxo de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (ETC) é mantido por seu aceptor final O_2 .

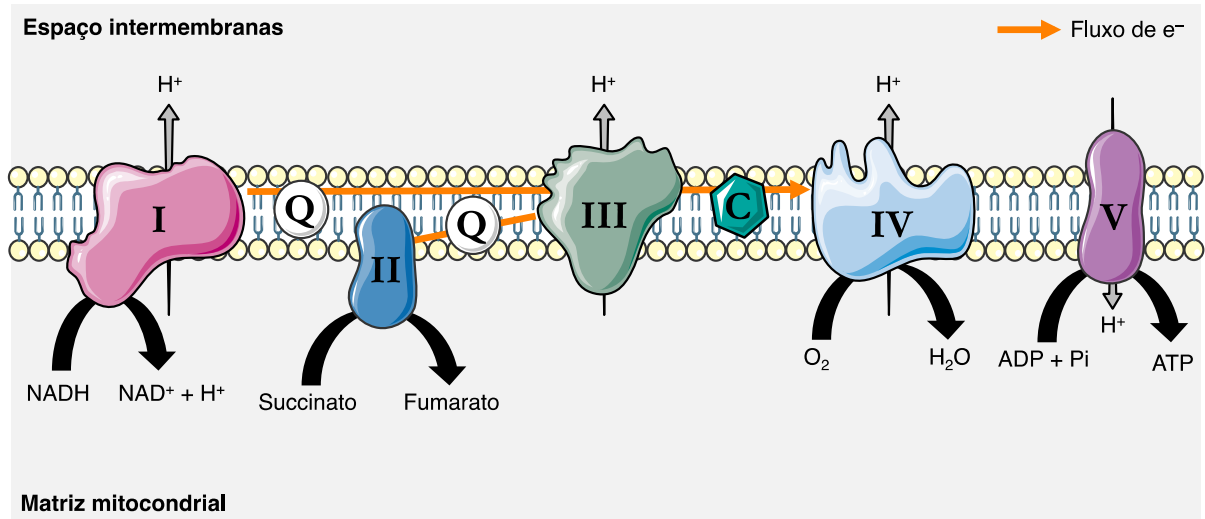


Figura 3. Esquema simplificado da cadeia transportadora de elétrons na membrana interna mitocondrial. A cadeia transportadora de elétrons consiste de quatro complexos multiproteicos que transferem elétrons, na forma de NADH ou FADH_2 , oriundos da oxidação de nutrientes no ciclo do ácido cítrico para oceptor final O_2 . Elétrons provenientes dos complexos I e II são transferidos ao complexo III através da ubiquinona (Q). A ubiquinona recebe dois elétrons nos complexos I e II e os entrega ao sítio Q_o do complexo III. O complexo III transfere elétrons ao citocromo c (C). O complexo IV transfere elétrons do citocromo c ao O_2 formando H_2O . O fluxo de elétrons pelos complexos movimenta prótons através da membrana interna para o espaço intermembranar contra seu gradiente. O resultado é um acúmulo de prótons no espaço intermembranar gerando um gradiente eletroquímico. A produção de ATP ocorre pelo retorno de prótons à matriz mitocondrial através da F_1/F_0 ATP-sintase (complexo V). A força próton-motriz (Δp) que favorece o retorno de prótons para a matriz é a combinação do potencial de membrana ($\Delta\psi_m$, gradiente elétrico de cargas) e o gradiente de pH (ΔpH_m , gradiente de concentração de H^+) (Perry et al. 2011). Figura elaborada com ilustrações adaptadas de Servier Medical Art.

A taxa metabólica de um organismo é comumente estimada por métodos de respirometria (ou calorimetria indireta), nos quais são realizadas aferições da taxa de consumo de oxigênio (Lighton 2008). O consumo global de O_2 de um organismo reflete a soma das taxas de consumo de O_2 mitocondrial de todos os seus tecidos (Suarez e Moyes 2012). Por conseguinte, pode-se estimar, ainda que de forma limitada, as taxas de *turnover* de ATP. A limitação deve-se a existência de outros processos celulares consumidores de O_2 (e.g. vazamento de prótons na ETC) e de vias de produção de ATP independentes de O_2 (Rolfe e Brown 1997). Ainda assim, a taxa de consumo de O_2 é amplamente utilizada como indicador da taxa metabólica de um organismo, que pode ser vista como o custo de manutenção da homeostase. Em outros termos, este é o custo de manter o alto grau de organização peculiar aos organismos vivos e resistir à segunda lei da termodinâmica (Hochachka e Somero 2002).

Portanto, a presença de O_2 na atmosfera terrestre propiciou o surgimento de vias metabólicas capazes de produzir grandes quantidades de ATP, ao ser utilizado como aceptor final de elétrons. Tal evento está associado ao aparecimento de formas de vidas complexas, que em sua maioria tornaram-se dependentes de um suprimento adequado de O_2 dentro de uma faixa estreita de concentração. A disponibilidade de O_2 ambiental pode flutuar para valores além dos limites dessa faixa, disparando respostas biológicas para reverter a privação ou o excesso de O_2 . Em última análise, o oxigênio molecular é consumido majoritariamente na mitocôndria recebendo 4 elétrons no complexo IV. Como será discutido na seção 1.2, entretanto, o O_2 pode ser parcialmente reduzido em outros locais da ETC dando origem a espécies reativas de oxigênio potencialmente deletérias.

1.1.2 Disponibilidade de Oxigênio em Ambientes Terrestres e Aquáticos

Na atmosfera terrestre atual o O_2 ocupa aproximadamente (20,95%) do volume de ar seco, sendo o volume restante ocupado por gases como N_2 (78,09%), Ar (0,93%) e CO_2 (0,04%) (Williams 2016). A concentração percentual desses gases mantém-se constante na atmosfera, devido à contínua mistura causada por correntes de convecção, ocorrendo oscilações significativas apenas nos limites da atmosfera (Schmidt-Nielsen 2013). Entretanto, a pressão parcial dos gases pode ser muito reduzida em grandes altitudes. Por exemplo, mesmo o conteúdo volume a volume de O_2 permanecendo constante, sua pressão parcial cai pela metade a 5800 m em relação ao nível do mar (Peacock 1998). A pressão parcial de um determinado gás em uma mistura corresponde à pressão hipotética que tal gás exerceria se estivesse sozinho, enquanto a pressão total é a soma da pressão parcial de cada um de seus constituintes. Variações da pressão parcial têm particular importância, pois é a pressão parcial de oxigênio que governa seu transporte por difusão através de barreiras fisiológicas, não, necessariamente, sua concentração. Isso se deve à Lei de Henry, que afirma que a quantidade de determinado gás dissolvido em uma fase líquida é proporcional à pressão parcial do gás na fase gasosa adjacente. Desta forma, a difusão de gases ocorre de regiões de alta pressão parcial para regiões de baixa pressão parcial, tendendo ao equilíbrio entre as duas fases.

A queda da pressão de oxigênio em altitudes elevadas afeta diretamente a tensão de O_2 na circulação de animais (**Figura 4A**) (Banchemo, Grover, e Will 1971).

Nos ambientes terrestres, a altitude é o principal fator que afeta a pressão parcial de oxigênio, mas, em alguns microhabitats, atividades de consumo (respiração) e produção O_2 (fotossíntese) por organismos, além de reações abióticas de oxidação e barreiras físicas para o movimento de gases, podem alterar a disponibilidade de O_2 . Em microhabitats terrestres específicos, tais como um formigueiro (145 mmHg) ou um tronco em decomposição (133 mmHg), a pressão de O_2 pode ser ligeiramente menor que no ambiente em que se encontram (153 mmHg) (Krogh 1959). Em alguns casos, o encharcamento do solo por chuvas pode tampar os poros na superfície impedindo a comunicação com a atmosfera (**Figura 4B**). No caso de mamíferos com hábitos fossoriais, a concentração de O_2 no interior de tocas subterrâneas naturais pode ser reduzida pela limitação de troca gasosa com o exterior e pelo consumo de seus residentes, atingindo, por exemplo, 6% em abrigos naturais do roedor *Geomys bursarius* (Arieli 1979). Os principais fatores que determinam a disponibilidade de O_2 no interior de tais ambientes são: o consumo de seus residentes; a locomoção dos animais (promovem a movimentação do ar no interior da toca); o conteúdo de água do solo; a profundidade e a arquitetura da toca; e a temperatura (Arieli 1979).

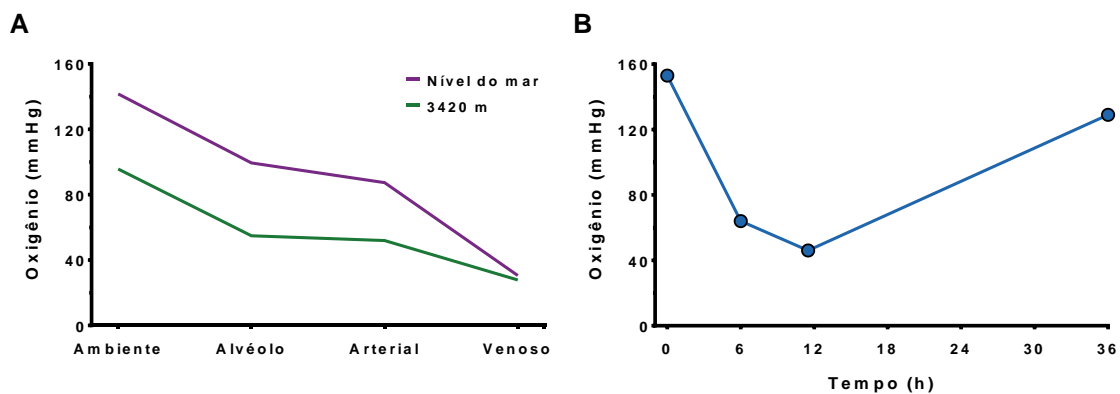


Figura 4. Alterações da disponibilidade de oxigênio e seus efeitos em ambientes terrestres. (A) Pressão parcial de O_2 na atmosfera e tensão de O_2 circulante em lhamas (*Lama glama*) próximas ao nível do mar (260 m) e após aclimação de 10 semanas a 3420 m de altitude (Banchero et al. 1971). (B) Pressão parcial de O_2 na fase gasosa do solo de uma floresta a 30 cm de profundidade, antes da ocorrência de uma chuva (tempo 0) e horas após a chuva (Ege 1916 apud Krogh 1959). A inundação do solo bloqueia a difusão entre o subsolo e atmosfera. À medida que a água escoar e o solo desidrata a difusão é reestabelecida e a pressão parcial de O_2 aumenta.

Os ambientes terrestres e aquáticos diferem em relação à disponibilidade de O_2 . Quando comparada ao ar, a água tem um conteúdo muito menor de O_2 . A 15°C um corpo d'água em equilíbrio com a atmosfera contém 7 mL de O_2 por litro de água, enquanto 1 L de ar contém 209 mL (Schmidt-Nielsen 2013). Outro fator que

diferencia os meios aéreo e aquático é a constante de difusão (K) do O₂, definida como o volume de gás que se difunde por área em determinado intervalo de tempo. A temperatura de 20°C, o valor de K do O₂ no ar é de $1,1 \times 10 \text{ cm}^2 \text{ atm}^{-1} \text{ min}^{-1}$, já na água o valor de K é de $3,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ atm}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Schmidt-Nielsen 2013). Portanto, a difusão de O₂ na água ocorre lentamente, de maneira que perturbações nos níveis de O₂ no ambiente aquático levam mais tempo para serem equilibradas. Além da pressão parcial na fase gasosa, a temperatura, a solubilidade do gás e a presença de solutos são fatores abióticos que afetam quantidade de O₂ dissolvido na água (**Figura 5**) (Weiss 1970). Além dos fatores abióticos, a atividade de organismos aquáticos é capaz de alterar drasticamente os níveis de oxigênio. Devido a tais diferenças e pelos aspectos discutidos a seguir, espécies aquáticas são consideradas mais propensas à exposição à privação de oxigênio que espécies terrestres (Bickler e Buck 2007). De fato, a hipóxia em ambiente aquáticos é um fenômeno comum (Welker et al. 2013).

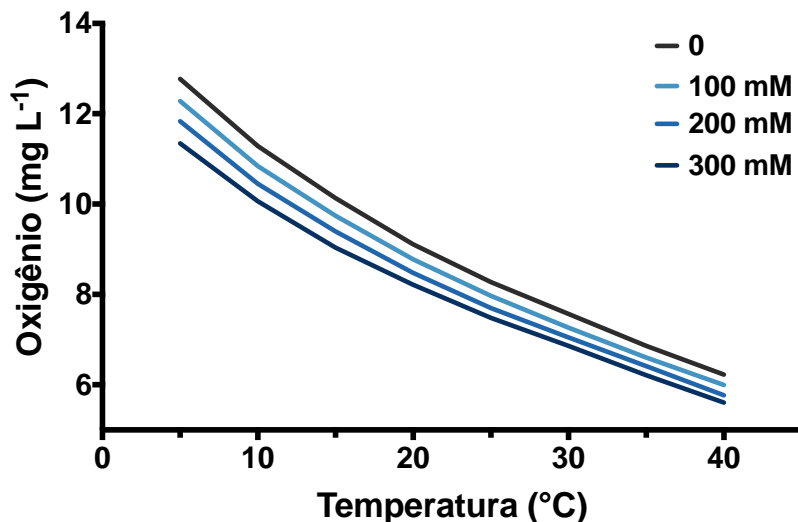


Figura 5. Variação da concentração de oxigênio em função da temperatura e salinidade. Concentração de oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) na água em equilíbrio com atmosfera de 20,94% de O₂ ao nível do mar (760 mmHg) com 100% e umidade relativa em diferentes temperaturas e graus de salinidade. A concentração de O₂ cai com o aumento de temperatura e/ou com o aumento da força iônica. Por exemplo, a solubilidade do O₂ a 10°C é de 9,09 mg L^{-1} e de 11,36 mg L^{-1} na água do mar e em água destilada respectivamente. Já a 25°C as solubilidades caem para 6,78 mg L^{-1} e 8,26 mg L^{-1} respectivamente. Figura elaborada com dados de Wagner et al. (2011).

O oxigênio presente em ambientes aquáticos é majoritariamente proveniente da atmosfera por difusão ou da atividade biológica de organismos (fotossíntese de vegetais e cianobactérias). Como a fotossíntese depende da luz, que tem penetração limitada, ambos os processos ocorrem na camada mais superficial da água (zona eufótica), resultando na formação de gradientes verticais de O_2 (**Figura 6**). Tais gradientes são diretamente afetados pelo conteúdo de matéria orgânica e temperatura, fatores que influenciam diretamente a atividade de organismos. Além da simples difusão, movimentos de correntes de ar e água auxiliam a dispersão do O_2 nos ambientes aquáticos, de maneira que rios tendem a ter maior concentração de oxigênio que lagos. Em altas latitudes, o congelamento sazonal da superfície de lagos aprisiona seus residentes em um ambiente isolado da atmosfera, no qual o consumo de O_2 ao longo do tempo pode levar a severa privação da disponibilidade de O_2 (Hermes-Lima e Zenteno-Savín 2002).

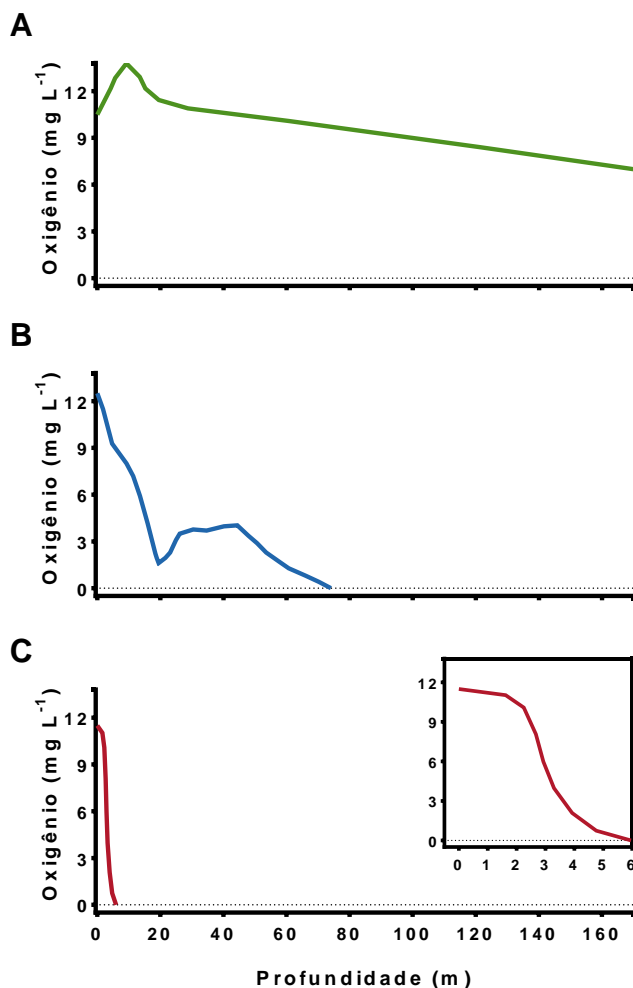


Figura 6. Gradientes verticais de O_2 dissolvido em ambientes aquáticos. Em ambientes aquáticos a concentração de O_2 dissolvido tende a cair à medida que se distancia da superfície, onde ocorre a difusão e a irradiação solar, formando um gradiente. A presença de organismos no ambiente e fatores abióticos afetam o perfil de distribuição do oxigênio. **(A)** Lago oligotrófico (i.e. baixo conteúdo de matéria orgânica). **(B)** Lago eutrófico (i.e. alto conteúdo de matéria orgânica). **(C)** Lago eutrófico protegido de correntes de ar. Dados obtidos de Lampert e Sommer (Lampert e Sommer 2007).

Em determinados ecossistemas, há um gradiente horizontal da concentração de O_2 . Por exemplo, em um sistema de riacho (rico em O_2) desembocando em uma região pantanosa (pobre em O_2), ocorre a redução gradual dos níveis de O_2 (**Figura 7**) (Joyner-Matos et al. 2007). Em outro tipo de habitat, a água armazenada no solo forma ecossistemas aquáticos subterrâneos com características próprias, habitado por muitos invertebrados. A disponibilidade de O_2 nestes ambientes aquáticos subterrâneos está sujeita aos mesmos entraves citados acima (Malard e Hervant 1999).

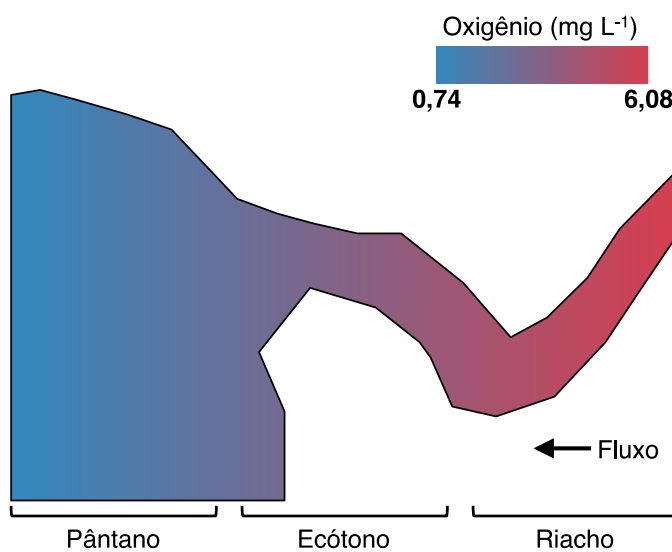


Figura 7. Gradiente horizontal de O_2 dissolvido em ambiente aquático. A concentração de O_2 dissolvido cai à medida que a água de um riacho adentra um pântano (rico em matéria orgânica). Dados de Joyner-Matos et al. (2007).

Em oceanos, abaixo da zona superficial eufótica (onde a produção e difusão de O_2 superam a demanda), o conteúdo de oxigênio é reduzido pela respiração de organismos e pela decomposição de matéria orgânica (Ulloa et al. 2012). Mais abaixo, a concentração de O_2 volta a subir pela introdução de águas relativamente densas ricas em oxigênio provenientes de regiões polares e subpolares (Wyrski 1962). Desta forma, dentro de faixas de profundidade intermediárias, de algumas centenas de metros, a disponibilidade de O_2 é muito reduzida (**Figura 8**). Este perfil de distribuição de oxigênio é observado nos principais oceanos (Rabalais, Turner, e Wiseman 2002). As zonas de mínimo de oxigênio (OMZ) são áreas marinhas de profundidade intermediária que não sofrem mistura significativa de água oxigenada, que podem variar em faixa de profundidade, extensão e concentração de O_2 (Sen Gupta e Machain-Castillo 1993). Uma das maiores OMZs, localizada no golfo do México, também chamada de “Zona Morta”, apresentou extensão de 20.700 m^2 em 2001 apresentando sítios sem qualquer O_2 dissolvido detectável (Rabalais, Turner, e

Wiseman 2002). Ainda assim as OMZs abrigam animais. Por exemplo, peixes-lanternas (*Actinopterygii: Myctophidae*) permanecem em profundidades típicas de OMZ (com $pO_2 \leq 1$ kPa) durante o dia e migram para profundidades menores (21 kPa) durante a noite para obtenção de alimento (Lopes et al. 2013).

Além da ocorrência de hipóxia, também são observadas situações de hiperóxia em ambientes aquáticos. A hiperóxia ocorre quando a concentração de O_2 dissolvido supera o nível de saturação da água. Tal fenômeno é causado pela atividade de organismos fotossintetizantes expostos à luz solar. Desta forma, a hiperóxia ocorre comumente na superfície de ambientes aquáticos (**Figura 2B**) e em microhabitats específicos (**Figura 2A**). Por exemplo, a presença de simbiontes expõe os organismos hospedeiros a ciclos diários de hipóxia-hiperóxia associados a incidência solar (Richier et al. 2003). Em tanques de aquicultura, a adição artificial de O_2 também gera hiperóxia (Kristensen et al. 2010).

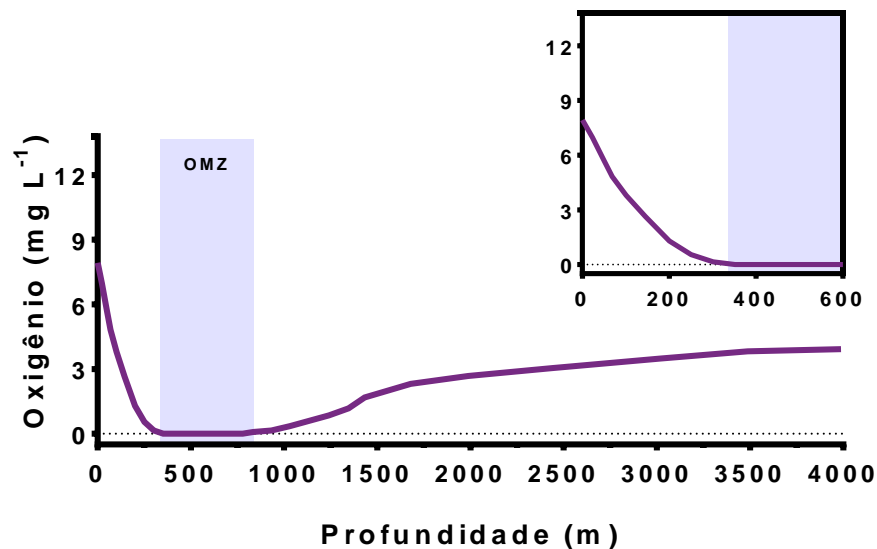


Figura 8. Gradiente vertical de O_2 dissolvido em oceanos. Na zona fótica superficial o conteúdo de O_2 é relativamente alto devido à fotossíntese e a difusão. Abaixo da zona fótica, o consumo de O_2 supera as capacidades fotossintéticas e de difusão (da atmosfera ou de camadas inferiores). Conseqüentemente, ocorre a formação de zonas de oxigênio mínimo (OMZ) em profundidades intermediárias. Abaixo dessas zonas os níveis de O_2 voltam a subir devido ao suprimento de águas mais profundas e a baixa concentração de matéria orgânica. Dados de um sítio do oceano pacífico (Paulmier e Ruiz-Pino 2009).

As condições ambientais sob as quais animais estão naturalmente submetidos podem ser permanentemente desfavoráveis, ou apresentar extremos sazonalmente ou em intervalos de tempo mais curtos. Dado o exposto, percebe-se que variações na disponibilidade de O_2 são comuns na natureza e podem ocorrer em diferentes escalas de tempo e espaço. Para manter suprimento adequado de O_2 para produção de ATP, os animais migram para regiões mais favoráveis (quando possível) ou contam com ajustes fisiológicos e bioquímicos para compensar o déficit.

1.1.3 Cascata de Transporte de Oxigênio – da Atmosfera à Mitocôndria

Para exercer seu papel fundamental como acceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, o oxigênio molecular precisa ser obtido da atmosfera e transportado até a mitocôndria. A chamada cascata de transporte de O_2 consiste de 4 etapas fundamentadas nos processos de convecção e difusão. As quatro etapas/resistências são: a ventilação de ar atmosférico (ou água no caso de respiração aquática) sobre a superfície respiratória (e.g. pulmões e brânquias), a difusão através da superfície respiratória até a circulação, a distribuição pela circulação (etapa na qual o oxigênio é geralmente transportado ligado a pigmentos respiratórios) e a difusão da circulação para os tecidos (nesta etapa também pode ocorrer a participação de proteínas que se ligam ao O_2 , por exemplo, mioglobina e neuroglobina, **Figura 9**). Em muitas espécies de invertebrados, a etapa de “circulação” ocorre por difusão simples. Um quinto fator importante em relação à disponibilidade de oxigênio para as células é o consumo de O_2 pelas mitocôndrias. Em condições de estado estacionário, estes processos são regulados de maneira a manter o suprimento de O_2 equivalente à sua demanda, assim como manter a eliminação CO_2 equivalente à sua produção. Devido à natureza especializada de diferentes tecidos, cada órgão/tecido tem uma tensão de oxigênio ótima para seu adequado funcionamento (**Tabela 2**) (Carreau et al. 2011), assim como diferentes células têm demandas distintas de O_2 , consumindo oxigênio em velocidades variáveis de acordo com o tipo celular, função e estado metabólico (Wagner, Venkataraman, e Buettner 2011).

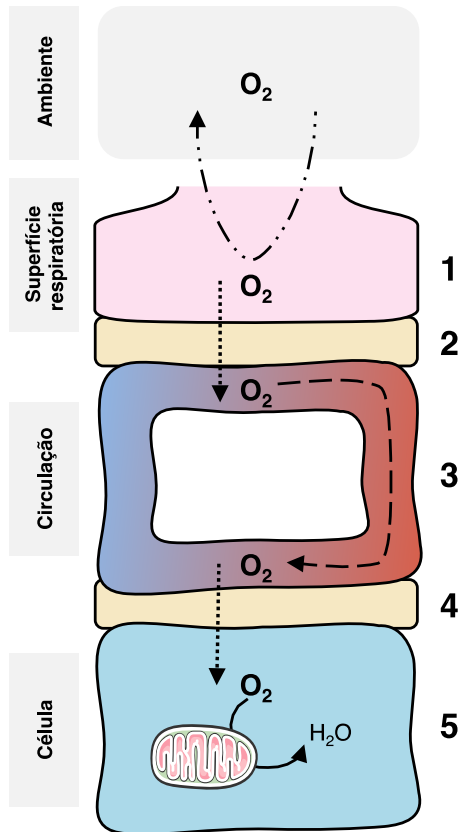


Figura 9. Cascata de transporte O_2 . O transporte do O_2 no ambiente até as mitocôndrias de animais dependem de 4 etapas por dois mecanismos de transferência de massa, convecção e difusão. (1) Ventilação de ar (ou água no caso de respiração aquática) pela superfície respiratória (convecção). (2) Difusão do oxigênio através da superfície respiratória (e.g. epitélio respiratório de pulmões ou brânquias). (3) Transporte do oxigênio pela circulação até os tecidos (convecção). (4) Difusão entre circulação e o interior celular. A quinta etapa (5) é o consumo de O_2 pela mitocôndria que determina o gradiente de O_2 entre célula e circulação. Figura elaborada com contornos de formas adaptadas de Servier Medical Art.

Tabela 2. Níveis basais de pressão parcial (mmHg) e concentração (%) de O_2 da atmosfera até a mitocôndria. A quantidade de O_2 decresce gradualmente desde o ar inspirado até diferentes porções do sangue, diferentes órgãos e regiões e em células de humanos (Carreau et al. 2011).

Local	pO_2 (mmHg)	O_2 (%)
<i>Ambiente</i>		
Ar	160	21.0
Ar inspirado (Traqueia)	150	19.7
Ar inspirado (Alvéolo)	110	14.5
<i>Sangue</i>		
Sangue arterial	100	13.2
Sangue venoso	40	5.3
<i>Tecido</i>		
Rim	72.0	9.5
Intestino	57.6	7.6
Pulmão	42.8	5.6
Fígado	40.6	5.4
Cérebro	33.8	4.4
Músculo	29.2	3.8
Pele (5-10 μm)	8.0	1.1
Pele (45-65 μm)	24.0	3.2
Pele (100-120 μm)	35.2	4.6
<i>Célula</i>		
Célula	9,9 - 19,0	1,3 - 2,5
Mitocôndria	< 9,9	<1,3

Ao longo das etapas da cascata de transporte a disponibilidade de O_2 é gradualmente reduzida até atingir os tecidos, suas células e mitocôndrias, onde a tensão de O_2 é muito menor que na atmosfera (**Figura 10**). Como será discutido na seção 1.2, o O_2 pode dar origem a espécies químicas altamente reativas, capazes de reagir com virtualmente todos os tipos de biomoléculas afetando suas estruturas e funções. Por este motivo, alguns autores interpretam as barreiras de transporte de O_2 , e a consequente redução da pressão parcial, da atmosfera até as células como uma estratégia evolutiva para reduzir a exposição a altos níveis de O_2 , reduzindo potenciais danos oxidativos (Hsia et al. 2013). Nesta mesma linha de raciocínio, a compartimentalização da respiração, protegendo o citosol de espécies reativas, pode ser vista como uma das funções da mitocôndria (Abele 2002).

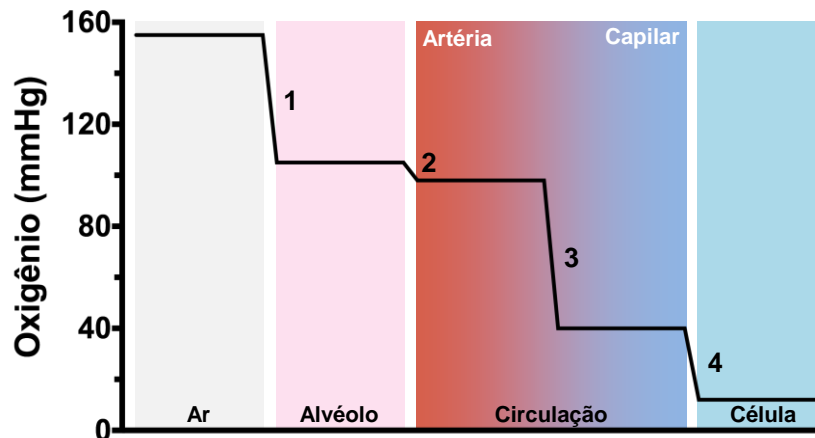


Figura 10. Efeito das barreiras da cascata de transporte na tensão de O_2 em vertebrados. A tensão de O_2 decai gradualmente à medida que o oxigênio é movido da atmosfera até as células, passando pela superfície respiratória e circulação. 1 ventilação, 2 difusão pela superfície respiratória, 3 transporte até os tecidos, 4 difusão dos capilares às células. Figura baseada em dados de Carreau et al. (2011) e Hsia et al. (2013).

Evidentemente, a quantidade de oxigênio disponível no ambiente afeta diretamente a capacidade de oferta de O_2 para os tecidos. Mas, em algumas situações, mesmo havendo disponibilidade de O_2 no ambiente, a oferta de oxigênio para os tecidos e células é severamente restringida pela limitação de uma ou mais etapas da cascata de transporte de oxigênio. Uma dessas situações é o mergulho de aves e mamíferos. Durante o mergulho, a ventilação dos pulmões é completamente interrompida abolindo a captação de O_2 da atmosfera, ocorre bradicardia e ocorre vasoconstrição, expondo os animais a quadros de isquemia e hipoxemia (Meir et al.

2009). O resultado, por exemplo, é uma concentração de lactato no sangue 15 vezes maior (~13,5 mM) ao final do mergulho comparado ao momento pré-mergulho (~0,9 mM) (Hochachka e Somero 2002). O acúmulo de produtos de vias anaeróbicas (e.g. lactato) é comumente utilizado como indicador de privação de oxigênio.

Um outro exemplo é a atividade muscular intensa, que pode aumentar significativamente a demanda por oxigênio e superar a capacidade de distribuição pela circulação. Conseqüentemente, células musculares podem ficar em um estado de privação de oxigênio, quando vias independentes de O_2 são ativadas e um acúmulo de produtos de via anaeróbicas é observado (Diamant, Karlsson, e Saltin 1968). Outra circunstância é a tolerância ao congelamento de animais durante o inverno em altas latitudes, cujos líquidos corporais são congelados e a perfusão cessa completamente. A privação de oxigênio é indicada pelo aumento nos níveis de lactato em diversos tecidos de tartarugas após congelamento (Storey et al. 1988). Quando as células animais são expostas à privação de oxigênio ajustes fisiológicos coordenados são acionados afetando as diferentes etapas da cascata de O_2 , e também na taxa de consumo de O_2 (*i.e.* taxa metabólica), minimizando o déficit de O_2 na tentativa de equilibrar oferta e demanda (Powell, Milsom, e Mitchell 1998; Porteus et al. 2011). Dentre as respostas à privação de oxigênio, a depressão do metabolismo destaca-se por ser amplamente distribuída dentre as espécies animais e condições ambientais (seção 1.5).

Portanto, percebe-se que não só a disponibilidade de O_2 ambiental, mas também situações específicas (e.g. ausência de ventilação durante o mergulho, interrupção da perfusão sanguínea durante o congelamento, elevado consumo de O_2 durante atividade intensa) interferem na cascata de transporte de O_2 , podendo resultar em oferta insuficiente de O_2 às células. Por outro lado, a privação de O_2 ambiental dispara adaptações fisiológicas que podem compensar o déficit ambiental, de maneira que reduções discretas na disponibilidade de O_2 no ambiente não necessariamente privam as células de oxigênio.

1.2 Espécies Reativas de Oxigênio

Apesar de seu importante papel como acceptor final de elétrons, o O_2 é tóxico (Fridovich 1995). Ele participa direta ou indiretamente de reações de oxidação de biomoléculas. Tal toxicidade deriva de sua capacidade de originar radicais livres e

outras espécies reativas. Um radical livre é definido como uma espécie de existência independente contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital molecular ou atômico. A existência de um ou mais elétrons desemparelhados confere característica paramagnética e alta reatividade aos radicais (Halliwell e Gutteridge 2015). Uma vez que o O_2 apresenta dois elétrons desemparelhados, ele próprio é classificado como um radical livre (Hermes-Lima 2004b). Em sistemas biológicos, o O_2 dá origem a espécies reativas de oxigênio (ROS) ao ser parcialmente reduzido (**Figura 11**). Tais espécies são capazes de oxidar carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, podendo resultar em perda de função.

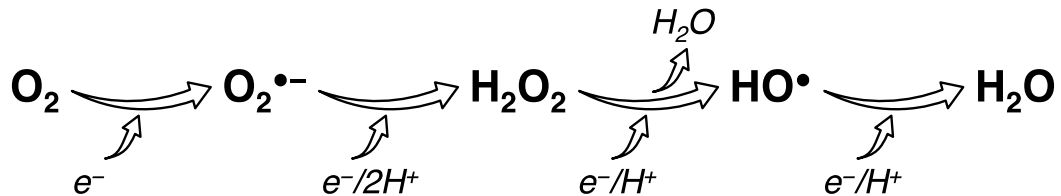


Figura 11. Reações de redução univalente do O_2 . Devido a sua estrutura o oxigênio molecular tende a ser reduzido um elétron por vez. No final da cadeia transportadora de elétrons (complexo IV) o O_2 recebe 4 elétrons, formando água. Entretanto, elétrons podem reagir prematuramente em outros sítios da cadeia dando origem às espécies reativas $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 . Figura elaborada com contornos de formas adaptadas de Servier Medical Art.

O termo ROS abrange compostos com reatividades distintas, incluindo radicais (e.g. $O_2^{\bullet -}$, $\bullet OH$, RO^{\bullet} , ROO^{\bullet}) e moléculas não-radicalares (H_2O_2 e $LOOH$). Fontes biológicas de ROS incluem: (i) reações de autoxidação de biomoléculas (e.g. cisteína, adrenalina, noradrenalina e L-DOPA), (ii) enzimas citocromo c P450, (iii) xantina oxidase, (iv) lipoxigenases, (v) mieloperoxidases, (vi) peroxissomos, (vii) cicloxigenases, (viii) metabolismo peroxissomal, (ix) NADPH oxidases e (x) cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CTE) (Holmström e Finkel 2014; Halliwell e Gutteridge 2015). A **tabela 3** mostra as principais características de espécies reativas com maior relevância em sistemas biológicos. O óxido nítrico ($\bullet NO$) é um radical livre classificado como espécie reativa de nitrogênio (RNS) com diferentes funções fisiológicas, interagindo com vias celulares associadas às ROS. Sua produção *in vivo* é resultado da atividade de enzimas da família óxido nítrico sintase (NOS) (Förstermann e Sessa 2012).

Tabela 3. Reatividade e algumas características de espécies reativas radicalares e não-radicalares.

Espécie Reativa	Par redox	Potencial de redução, E° (V)	Características
Óxido nítrico	$\cdot\text{NO}/\text{NO}^-$	-0,80	<ul style="list-style-type: none"> - Produzido pela atividade de enzimas da família óxido nítrico sintase (NOS) - Capaz de atravessar membranas biológicas - Baixa reatividade frente a biomoléculas - Alta reatividade contra outros radicais - Dá origem a outras espécies reativas de nitrogênio (e.g. ONOO⁻)
Peróxido de hidrogênio	$\text{H}_2\text{O}_2, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}, \cdot\text{OH}$	0,32	<ul style="list-style-type: none"> - Produzido pela redução dielétrica do O₂ - Produzido na mitocôndria direta (CTE) ou indiretamente (pela dismutação espontânea ou catalisada do O₂^{•-}) - Produzido também pela atividade de oxidases (e.g. urato oxidase, glicose oxidase) - Capaz de atravessar membranas biológicas - Reage com metais de transição em solução aquosa produzindo o radical hidroxil (reação de Fenton) - Mensageiro celular ao oxidar resíduos de cisteína de proteínas
Radical superóxido	$\text{O}_2^{\cdot-}, 2\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2$	0,94	<ul style="list-style-type: none"> - Produzido pela redução monoelétrica do O₂ - Radical primário formado na CTE e pela ação de enzimas (e.g. XO e NOX) - Pode agir como redutor ou oxidante - Baixa reatividade com moléculas não radicalares - Alta reatividade contra grupos ferro-enxofre e radicais
Radicais peroxil e alcoxil	$\text{ROO}^\bullet, \text{H}^+/\text{ROOH}$	1,00	<ul style="list-style-type: none"> - Agentes oxidantes moderadamente fortes - Produzidos pela reação do O₂ com radicais centrados em carbono - Produzidos a partir da degradação de hidroperóxidos lipídicos causada por calor, radiação ou metais de transição
	$\text{RO}^\bullet, \text{H}^+/\text{ROH}$	1,60	<ul style="list-style-type: none"> - Participam das reações em cadeia de peroxidação lipídica - Produtos de oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos
Radical hidroxil	$\cdot\text{OH}, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}$	2,31	<ul style="list-style-type: none"> - Produzido pela reação de Fenton e fissão homolítica da água causada por radiação - Apresenta a maior reatividade dentre os radicais de oxigênio - Reage indiscriminadamente com biomoléculas

O potencial redutor monoelétrônico (E°) indica a força oxidante de uma espécie reativa, quanto maior o valor maior a força. Informações compiladas de (Buettner 1993; Bartberger et al. 2002; Halliwell e Gutteridge 2015).

Nas células eucarióticas, a mitocôndria é considerada a principal fonte de ROS (Turrens 2003), onde, além da CTE, reações do ciclo do ácido cítrico catalisadas por 2-oxoglutarato desidrogenase e piruvato desidrogenase, também são fontes de ROS (Quinlan et al. 2014). A produção de ROS na mitocôndria ocorre pela fuga prematura de elétrons da cadeia antes deles atingirem o complexo IV. Quando um único elétron escapa e reage com O₂, é formado o radical superóxido e, quando um par de elétrons escapa e reage com O₂, é formado peróxido de hidrogênio

(Figura 11) (Brand 2016). Na mitocôndria, o H_2O_2 também é formado pela ação da enzima superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD), que catalisa a dismutação de duas moléculas de $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge 2015). Durante a fosforilação oxidativa, os elétrons podem escapar prematuramente de diferentes carreadores: complexos ferro-enxofre, flavoproteínas ou quinonas (Waypa, Smith, e Schumacker 2016). A produção de ROS pela CTE (Figura 12) ocorre nos complexos I (Turrens e Boveris 1980), II (Quinlan et al. 2012) e III (Turrens, Alexandre, e Lehninger 1985) em 11 sítios diferentes (Brand 2016).

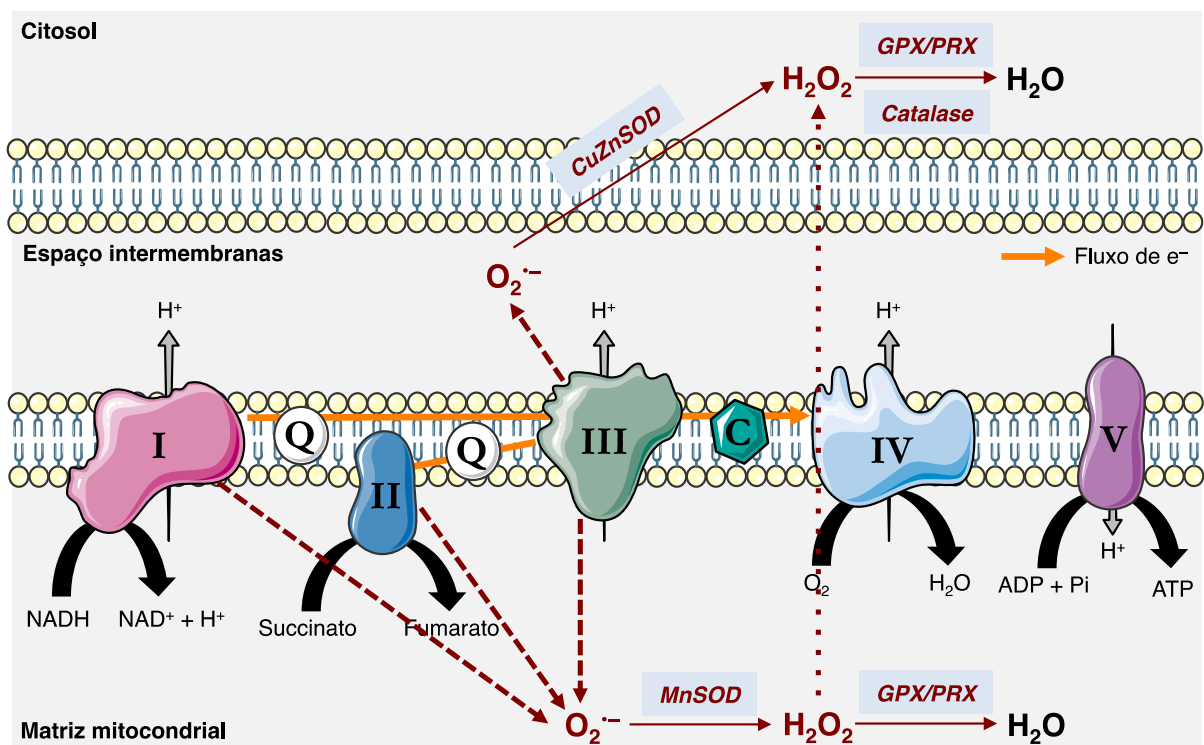


Figura 12. Principais sítios de produção de ROS na CTE. Na mitocôndria, ROS são formados pela reação prematura de elétrons com o O_2 . Os complexos I e III são os principais locais de redução parcial do O_2 . O complexo II e reações do ciclo do ácido cítrico também produzem ROS. O superóxido produzido é dismutado pelas enzimas superóxido dismutases na matriz (MnSOD) ou no espaço intermembranar (CuZnSOD). A dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ produz o peróxido de hidrogênio, que é consumido por catalases ou peroxidases (e.g. glutatona peroxidase e peroxiredoxinas). Figura elaborada com ilustrações adaptadas de Servier Medical Art.

Estima-se que 0,1% do O_2 consumido é continuamente reduzido por um único elétron na mitocôndria formando superóxido (Fridovich 2004). Em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de ratos com oferta de substratos que simula as condições citosólicas em repouso, a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 equivale a 0,1–0,5% do O_2 consumido (Goncalves et al. 2015). A formação de ROS na mitocôndria é

afetada pelo potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), a relação NADH/NAD⁺, a proporção ubiquinona reduzida/oxidada e pela disponibilidade de O₂ (Murphy 2009). Em mitocôndrias com a síntese de ATP suprimida (e.g. falta de ADP) há um acúmulo de componentes da CTE nas formas reduzidas e um aumento do $\Delta\psi_m$, favorecendo a produção de ROS (Murphy 2009). A produção de H₂O₂ na presença de succinato por mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos é de 3,15% do O₂ consumido na ausência de ADP, quando o ADP é adicionado ao meio, a produção cai para 0,04% (Starkov 2008). Agentes desacopladores (e.g. proteínas desacopladoras, UCPs) são capazes de reduzir a formação de ROS ao fornecer um caminho alternativo para o retorno de prótons para a matriz (ao invés da ATP sintase), reduzindo o $\Delta\psi_m$, diminuindo a disponibilidade de elétrons na CTE e aumentando a taxa respiratória (Kowaltowski et al. 2009). A adição de 5 nM do agente desacoplador FCCP reduz o $\Delta\psi_m$ de 170 mV para 118 mV e a produção de H₂O₂ de 0,88 nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹ para 0,28 nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹ em mitocôndrias isoladas de coração de ratos (Hansford, Hogue, e Mildaziene 1997).

A geração de ROS é minimizada, quando há um equilíbrio entre a oferta e o consumo de elétrons por seus aceptores (Lehninger, Nelson, e Cox 2013). De fato, o percentual de ROS produzido por unidade de O₂ consumido cai de 0,1–0,5% para 0,01–0,03% em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético de ratos quando as condições experimentais mimetizam um estado atividade muscular (i.e. maior oferta de substrato e maior demanda por ATP) (Goncalves et al. 2015). O grau de produção de ROS também depende da identidade e da concentração dos substratos ofertados a mitocôndria. Por exemplo, a produção basal de H₂O₂ por mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos é de 3,15, 1,07 ou 0,76% do O₂ consumido na oferta de 5 mM dos substratos succinato, alfa-cetoglutarato ou malato respectivamente (Starkov 2008). A produção de H₂O₂ por mitocôndria isoladas de coração de ratos aumenta de acordo com a concentração de succinato, variando de 0,03 nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹ com 0,25 mM (nível fisiológico) até 0,53 nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹ com 5 mM de succinato (Hansford, Hogue, e Mildaziene 1997). Além dos fatores supracitados, a taxa de produção mitocondrial de ROS tem especificidade em nível do tipo celular e da espécie estudada (Kowaltowski et al. 2009). Como a mitocôndria contém um robusto sistema de antioxidantes que neutralizam ROS (Rabilloud et al. 2001), ela pode regular os níveis de estado estacionário de ROS, produzindo e consumindo-as (Munro e Treberg 2017).

Historicamente os radicais livres e outras espécies reativas foram vistos como uma ameaça frequente e deletéria aos componentes celulares em sistemas biológicos, sendo produtos de um processo acidental de escape de elétrons ou produtos indesejados de outras reações sem papel fisiológico. Esta visão é parcialmente fundamentada pela associação do acúmulo de moléculas oxidadas em diversos quadros patológicos (Hermes-Lima 2004a). Atualmente, espécies reativas são consideradas importantes sinais celulares (Di Meo et al. 2016). O papel fisiológico de espécies reativas em processos de transdução de sinais inclui: a participação em vias de expressão gênica (Kaltschmidt, Sparna, e Kaltschmidt 1999), ciclo celular (Shackelford, Kaufmann, e Paules 2000), citocinas (T. Finkel 1998), sinalização da insulina (Mahadev et al. 2001), transporte de íons (Kourie 1998) e fatores de crescimento (Colavitti et al. 2002), dentre muitas outras (Dröge 2002). Um exemplo clássico do papel de ROS em vias de sinalização é o caso da insulina. Células estimuladas com insulina apresentam um aumento rápido da produção de H_2O_2 , que inativa tirosina fosfatases, aumentando o estado de fosforilação de proteínas envolvidas na cascata de sinais da insulina (Mahadev et al. 2001). Outros processos de relevância biológica, como diferenciação celular, resposta imune e autofagia têm a participação de ROS de origem mitocondrial (Sena e Chandel 2012).

De maneira geral, a sinalização por ROS se dá por duas formas, alterações no estado redox do ambiente intracelular e modificações oxidativas de proteínas (Thannickal e Fanburg 2000). Adicionalmente, eletrófilos reativos produzidos pela oxidação de biomoléculas também disparam sinais celulares (Kansanen, Jyrkkänen, e Levonen 2012). Um mecanismo de sinalização redox bem descrito é o de oxidação de resíduos de cisteína mediado por H_2O_2 (sulfenilação) ou $\bullet NO$ (nitrosotilação) (Cooper et al. 2002). A oxidação de resíduos de cisteína (Cis-SH) por H_2O_2 dá origem ao ácido sulfênico (Cis-SOH) que pode: (i) ser mais oxidado às formas ácido sulfínico (Cys-SO₂H) ou sulfônico (Cys-SO₃H) geralmente de forma irreversível ou (ii) ser revertido pela condensação com outro resíduo de cisteína dentro da mesma molécula, de outra proteína vizinha ou do peptídeo glutationa (**Figura 13**) (Toren Finkel 2012). Tais modificações causam alterações estruturais em proteínas que podem alterar suas atividade e interação com outras proteínas (van der Vliet e Janssen-Heininger 2014). Proteínas alvo desse mecanismo de sinalização incluem fosfatases e quinases (Rhee et al. 2000; Corcoran e Cotter 2013), que afetam diversas outras vias, incluindo a regulação da atividade de enzimas antioxidantes

(seção 1.3.6). Adicionalmente, a oxidação reversível de resíduos de metionina (outro aminoácido que contém enxofre) faz parte de vias de sinalização celular por ROS (G. Kim, Weiss, e Levine 2014).

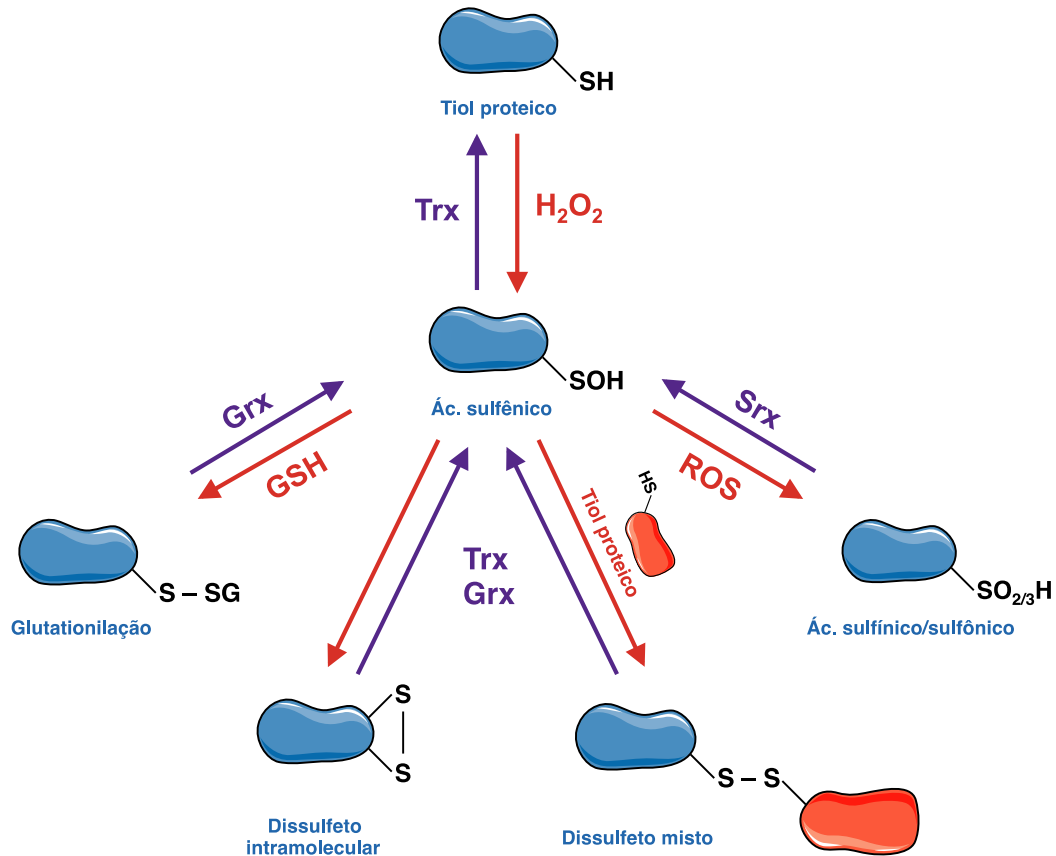


Figura 13. Mecanismos de sinalização redox via H_2O_2 . O H_2O_2 oxida grupos tiol (SH) de resíduos de cisteína formando ácido sulfênico. O ácido sulfênico (SOH) pode ser mais oxidado por ROS, formando ácido sulfínico (SO_2H) e sulfônico (SO_3H). A forma sulfínica, em raros casos, pode ser revertida para sulfênica pela ação da enzima sulfiredoxina (Srx). O grupo SOH pode ainda reagir com um grupo SH da mesma molécula, de outra proteína ou do peptídeo glutiona, reações que podem ser revertidas por tioredoxina (Trx) e glutaredoxina (Grx). Figura elaborada com ilustrações adaptadas de Servier Medical Art e fundamentada em Vliet et al. 2014.

Neste contexto, o H_2O_2 é considerado a principal espécie reativa na transdução de sinais celulares (Sies 2017). As características que tornam o H_2O_2 um mensageiro adequado são: pequeno tamanho, difusibilidade, meia vida relativamente alta (10^3 – 10^4 $M^{-1} cm^{-1}$), capacidade de atravessar membranas biológicas e, principalmente, capacidade de oxidar tióis de resíduos de cisteína (Halliwell e Gutteridge 2015; Bogdanova et al. 2016). Além disso, o fato do H_2O_2 ser produzido e degradado enzimaticamente permite o controle de seus níveis no tempo e espaço

(Forman, Maiorino, e Ursini 2010). O $O_2^{\bullet-}$, por outro lado, tem uma meia vida mais curta ($10^5 M^{-1} s^{-1}$) e seu efeito em tióis proteicos é limitado à habilidade de reagir com centros de ferro-enxofre (Fridovich 1995). A função sinalizadora do radical superóxido deriva de sua capacidade de formar H_2O_2 (Forman et al. 2010). Já o radical hidroxil reage de forma inespecífica com moléculas orgânicas, com constantes de reação na faixa de $10^8-10^{10} M^{-1} s^{-1}$, de forma que a reação depende apenas da proximidade com outra molécula (Halliwell e Gutteridge 2015). Em outras palavras, uma vez formado, e.g. pela redução univalente do H_2O_2 catalisada pela oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} (reação de Fenton), o $\bullet OH$ reage com a primeira molécula que encontrar. Ainda assim, os produtos oxidativos da reação do $\bullet OH$ com biomoléculas pode ter papel sinalizador (Kansanen, Jyrkkänen, e Levonen 2012).

O óxido nítrico ($\bullet NO$), formado por enzimas óxido nítrico sintases, é um radical livre gasoso com alta capacidade de difusão em sistemas biológicos e age em vias intra e intercelulares de comunicação. Seu principal mecanismo de ação depende de sua ligação a enzimas guanilato ciclase, que induz a formação de cGMP disparando cascatas de sinalização envolvidas na regulação da pressão arterial, agregação plaquetária e neurotransmissão (Cary et al. 2006). Na mitocôndria, o $\bullet NO$ reage com os complexos I e IV (Brown 1999). No caso do complexo IV, o $\bullet NO$ liga-se ao sítio de ligação com o oxigênio inibindo reversivelmente a atividade do complexo (Cleeter et al. 1994), mesmo em baixíssimas concentrações (Brown e Cooper 1994).

1.2.1 Privação de Oxigênio e Geração de Espécies Reativas

De maneira geral, condições que favorecem o acúmulo de elétrons na CTE (*i.e.* um estado mais reduzido dos componentes da cadeia) induzem uma maior produção de ROS. Uma destas condições é a privação de O_2 . Entretanto, a comunidade científica mostrou-se resistente em aceitar a ideia de maior produção de ROS na falta de O_2 (Clanton 2005). De fato, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio na falta de oxigênio é contra intuitivo a primeira vista. Além disso, relatos iniciais de menor produção de ROS durante a hipóxia (Archer, Nelson, e Weir 1989; Paky et al. 1993) contribuíram para a tal resistência.

Uma das primeiras observações de aumento de ROS na hipóxia foi publicada em 1996, quando Marshall e colaboradores (1996) demonstraram que células de artérias pulmonares produzem mais ROS quando expostos à hipóxia. Tal efeito foi

atribuído inicialmente a atividade de NADPH oxidases (Marshall et al. 1996), hipótese descartada por estudo subsequente (Archer et al. 1999). Outro estudo pioneiro mostrou o papel da mitocôndria no aumento da produção de ROS durante a exposição de hepatócitos à hipóxia. Hepatócitos da linhagem Hep3B em cultura à 21% de O_2 , mantêm a produção de ROS quando expostos à atmosfera de 8%, entretanto, a geração de ROS aumenta em 2, 7 e 12 vezes quando expostos por 2 h a atmosferas de 5, 3 e 1% respectivamente (**Figura 14**) (Chandel et al. 1998). Quando o mesmo tipo celular, porém sem mitocôndrias funcionais, ρ^0 -Hep3B foi exposto ao mesmo tratamento a 1% de O_2 , a produção de ROS manteve-se constante (Chandel et al. 1998).

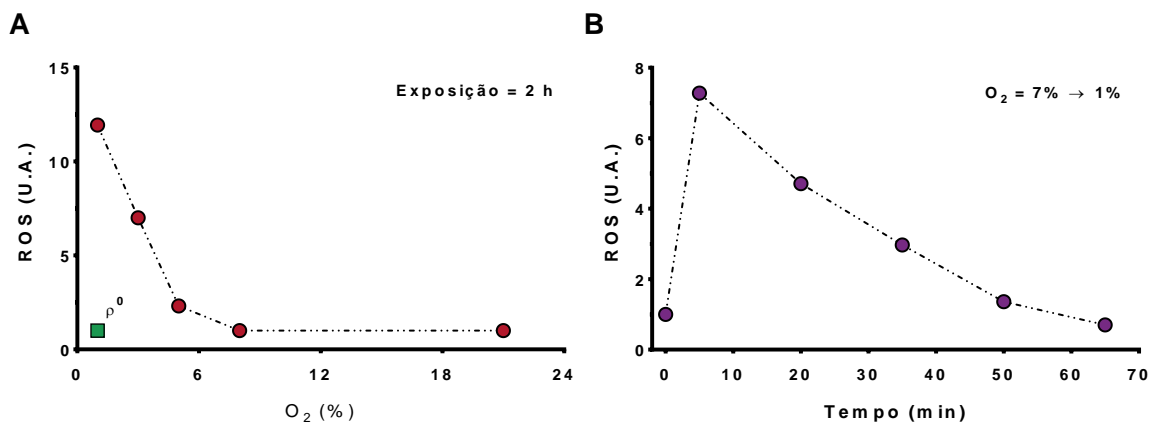


Figura 14. Produção de ROS em células expostas a hipóxia. (A) Produção de ROS acumulada aferida pela sonda fluorescente DCF em células hepatócitos mantidos a 21% expostos a diferentes concentrações de O_2 por duas horas (Chandel et al. 1998). A partir de 5% de O_2 ocorre um aumento linear da quantidade de ROS acumulada em relação à concentração de O_2 . O quadrado verde mostra a resposta de hepatócitos sem mitocôndrias funcionais (ρ^0) expostos a 1% de O_2 . **(B)** Produção de superóxido em intervalos de 10 min aferida pela sonda fluorescente DHE em células endoteliais aórticas bovinas mantidas a 7% de O_2 expostas a 1% de O_2 (Hernansanz-Agustin et al. 2014). Os intervalos analisados foram 0-10, 15-25, 30-40, 45-55 e 60-70 minutos.

Em um estudo seguinte, também foi demonstrado que a produção de ROS, agora em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, aumenta em atmosferas entre 5 e 1%, quando comparadas com 21% de O_2 (Chandel et al. 2000). Tal efeito é abolido quando o complexo III é inibido farmacologicamente (Chandel et al. 2000). Devido ao criticismo à especificidade de sondas fluorescentes de uso amplo e utilizadas nos estudos citados anteriormente (Forman et al. 2015), Guzy e colaboradores (2005) desenvolveram uma sonda redox expressa pela própria célula e com alta especificidade para H_2O_2 , denominada HSP-FRET. Novamente, os resultados

mostraram que a hipóxia aumenta a produção de ROS em células de osteosarcoma 143B, mas não no mesmo tipo celular sem mitocôndrias funcionais, ρ^0 -143B (Guzy et al. 2005). Além disso, foi demonstrado que a ausência de um complexo III mitocondrial funcional inibe a produção de ROS em células 143B expostas à hipóxia (Guzy et al. 2005). Desde então, o fenômeno da maior produção de ROS, aferida por diversos métodos, em resposta a hipóxia foi registrado usando diferentes tipos celulares por vários grupos de pesquisa (Waypa, Smith, e Schumacker 2016), em sua maioria utilizando células em cultura.

Por outro lado, registros de quedas na produção de ROS durante a hipóxia também têm sido publicados (Bogdanova et al. 2016). A controvérsia pode ser causada pela variabilidade de protocolos de exposição (tempo e nível de O_2), uso de tipos celulares distintos e método de detecção (Bogdanova et al. 2016). Uma variável nem sempre apreciada por estudos com células em cultura é que a concentração fisiológica de O_2 depende do tipo celular (ver **Tabela 2**) e é muito menor que a concentração atmosférica (**Figura 10**). Desta forma, a maioria dos estudos, que mantém as células a 21% de O_2 estão na verdade expondo-as à hiperóxia (Ivanovic 2009). Neste cenário, foi mostrado recentemente que a produção de ROS em células expostas a hipóxia ocorre quando células mantidas a 7% de O_2 são transferidas para 1 % de O_2 (**Figura 14**) (Hernansanz-Agustín et al. 2014). O estudo mostrou que a hipóxia dispara a produção de ROS apenas nos primeiros minutos de exposição (Hernansanz-Agustín et al. 2014). A medida que a hipóxia progride a produção de ROS cai e retorna para os níveis de normoxia (Hernansanz-Agustín et al. 2014). O mesmo perfil cinético da produção de ROS foi observado usando-se diferentes linhagens celulares, diferentes sondas para ROS e diferentes valores de normoxia pré-hipóxia (Hernansanz-Agustín et al. 2014). Repetindo a estratégia de outros estudos, foi mostrado que a ausência de mitocôndrias funcionais inibe a superprodução de ROS na hipóxia (Hernansanz-Agustín et al. 2014). A superprodução aguda de ROS em células expostas a hipóxia restrita aos primeiros minutos de exposição pode explicar as observações contrastantes de aumentos e quedas.

Os resultados citados acima indicam a indução de superprodução de ROS de origem mitocondrial em células expostas à privação de O_2 . O principal mecanismo que explica tal fenômeno é a limitação de O_2 para a reação catalisada pelo complexo IV, que resulta em acúmulo de elétrons na CTE e o transporte reverso de elétrons

(RET) (Scialò, Fernández-Ayala, e Sanz 2017), resultando em maior produção de ROS nos complexos I (Hernansanz-Agustín et al. 2017) e III (Chandel et al. 2000; Guzy et al. 2005). O fenômeno de RET consiste no movimento contrário de elétrons pela CTE. A primeira evidência do fenômeno foi descrita em 1961, quando Chandel e Hollunger observaram que mitocôndrias isoladas eram capazes de produzir NADH a partir de NAD^+ na presença de succinato (substrato do complexo II) (Chance e Hollunger 1961). Inicialmente o RET foi considerado como um artefato experimental de mitocôndrias isoladas, entretanto, há diversas evidências de sua ocorrência *in vivo* (Scialò, Fernández-Ayala, e Sanz 2017). O movimento reverso de elétrons ocorre quando o conteúdo de ubiquinona da cadeia está majoritariamente reduzido por elétrons provenientes do complexo II (Chouchani et al. 2014). Tal movimento está associado a alta produção de ROS pelo complexo I (Chouchani et al. 2014).

Outros mecanismos com menor contribuição foram propostos, incluindo a possível ocorrência de alterações conformacionais do complexo III que favoreceriam a produção de superóxido (Guzy et al. 2005) e a redução do conteúdo de citocromo c oxidado (Hsia et al. 2013), que é capaz de reagir com radicais superóxido (Skulachev 1998). Adicionalmente, mesmo em hipóxia a produção de $\bullet\text{NO}$, ainda que reduzida, contribui para o favorecimento de um estado reduzido dos componentes anteriores ao complexo IV CTE ao inibir a atividade do complexo IV (Turrens 2003). Outro fator que favorece a produção de ROS na hipóxia é a distribuição do O_2 em meios hidrofílicos e hidrofóbicos. A solubilidade do O_2 é maior em solvente apolares (Snedden, LeDez, e Manson 1996), apresentando concentrações de $6,5 \mu\text{M}$ e $1,3 \mu\text{M}$ em solvente aquosos e lipídicos, respectivamente, ambos expostos a pressão parcial de O_2 a 1 mmHg (Clanton 2007).

Portanto, ROS de origem mitocondrial (e de outras fontes) devem ser consideradas elementos fundamentais de comunicação celular e não apenas um efeito colateral da respiração aeróbia (Fuhrmann e Brüne 2017). Diversas observações apontam para um aumento da produção de radicais livres durante a restrição de O_2 , que funcionam como sinais celulares disparando respostas compensatórias. O estado estacionário de ROS disponível para transduzir sinais depende de vias de produção e consumo, esta última realizada por sistemas antioxidantes.

1.3 Sistemas Antioxidantes

A elevação dos níveis de O_2 na atmosfera primitiva representou um importante desafio evolutivo para o surgimento de mecanismos de controle das espécies reativas derivadas de O_2 . Este controle é feito por uma rede de sistemas antioxidantes que agem minimizando os níveis de ROS, mas não os eliminando completamente. Tal regulação permite que espécies reativas desempenhem suas funções fisiológicas. Os mecanismos de controle incluem componentes enzimáticos e não enzimáticos (**Figura 15**) que atuam em conjunto para manutenção da homeostase redox, que é caracterizada por condições constitutivamente redutoras (Jones 2006). Além dos sistemas antioxidantes, os tióis proteicos representam uma importante fonte de grupos $-SH$ capaz de resistir a perturbações do ambiente redox. Os estados de oxidação de tais proteínas, assim como o ambiente redox celular, são mantidos por dois sistemas principais, um dependente de glutatona e outro dependente de tioredoxina (Bachi, Dalle-Donne, e Scaloni 2013).

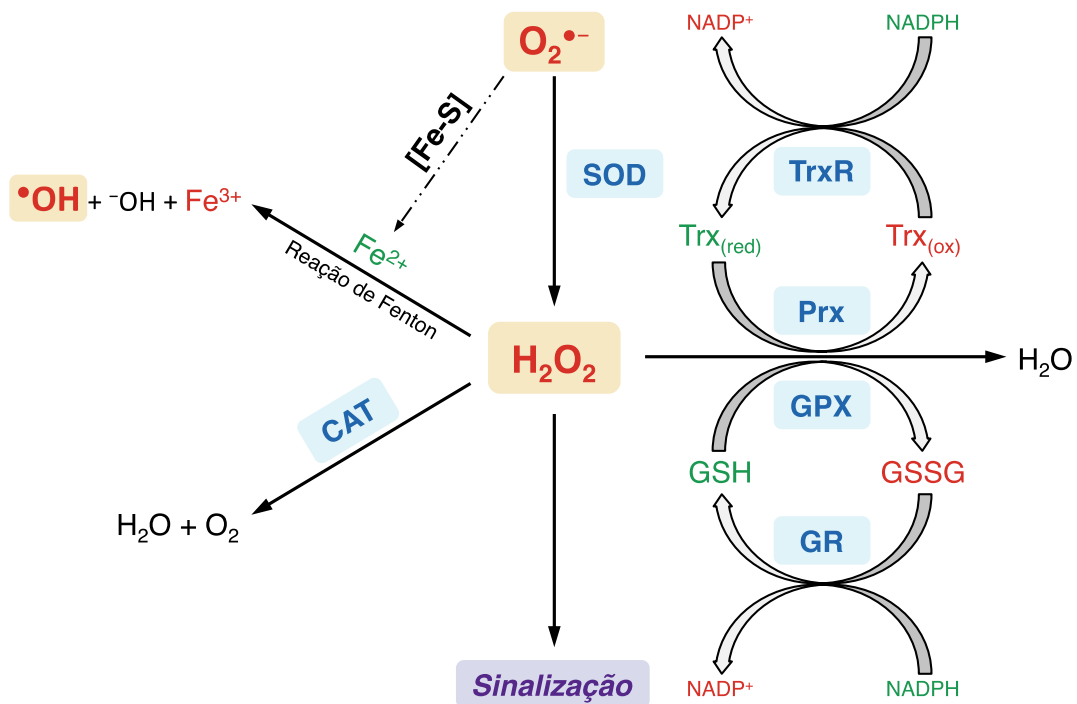
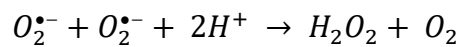


Figura 15. Panorama geral dos principais sistemas antioxidantes. O radical superóxido gerado pelas mitocôndrias é dismutado a H_2O_2 pela ação de superóxido dismutases (SOD). O H_2O_2 é decomposto pela ação da catalase (CAT), de glutatona peroxidases (GPX) e de peroxidases dependentes de tioredoxina (Prx). Os dois últimos grupos de enzimas reduzem o peróxido ao oxidar outro substrato, glutatona (GSH) e tioredoxina ($Trx_{(red)}$). Os substratos oxidados, glutatona (GSSG) e tioredoxina ($Trx_{(ox)}$), são reciclados por enzimas específicas, glutatona redutase (GR) e tioredoxina redutase (TrxR), que utilizam potencial redutor na forma de NADPH para tal. O superóxido ainda é capaz de perturbar centros ferro-enxofre ([Fe-S]) de proteínas (e.g. aconitase) liberando íons ferrosos (Fe^{2+}). Na presença de metais de transição (e.g. Fe^{2+}) o H_2O_2 é reduzido dando origem ao radical hidroxil altamente reativo (Reação de Fenton).

1.3.1 Superóxido Dismutases

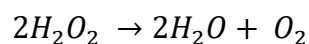
O radical superóxido é a espécie reativa parental produzida em sistemas biológicos. Ele forma o peróxido de hidrogênio ao sofrer dismutação espontânea ou catalisada pelas enzimas superóxido dismutase (SODs). Por isso, as SODs são consideradas a linha de frente do sistema antioxidante. Dismutação é um tipo de reação redox em que o reagente sofre tanto redução quanto oxidação originando dois produtos diferentes (Halliwell e Gutteridge 2015). Neste caso, duas moléculas reagem e uma delas é oxidada a O_2 , enquanto a outra é reduzida a H_2O_2 :



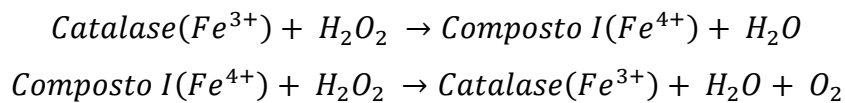
O mecanismo de ação das SODs envolve a redução inicial e posterior oxidação de metais de transição presentes no sítio ativo da enzima (Hermes-Lima 2004b). Em mamíferos, são encontradas três tipos de SODs em diferentes compartimentos (Fukai e Ushio-Fukai 2011). A SOD1 (CuZnSOD) é um homodímero contendo íons cobre e zinco em sua estrutura encontrada no citosol e no espaço intermembranas mitocondrial (Hermes-Lima 2004b). A SOD2 (MnSOD) é um homotetrâmero contendo íon manganês em sua estrutura encontrada na matriz mitocondrial para onde é direcionada após sua síntese no citosol (Fukai e Ushio-Fukai 2011). Em mamíferos, a atividade de MnSOD corresponde a 1–10% da atividade total de SOD (Hermes-Lima 2004b). A SOD3 (ecSOD) é uma glicoproteína tetramérica contendo íons cobre e zinco encontrada no ambiente extracelular, especialmente na matriz extracelular e na superfície celular (Fukai e Ushio-Fukai 2011). O H_2O_2 resultante da dismutação do radical superóxido é removido por dois tipos de enzimas catalases e peroxidases.

1.3.2 Catalase

A catalase age na decomposição de duas moléculas de peróxido de hidrogênio, formando duas moléculas de água e uma de oxigênio molecular:



Em mamíferos a catalase é uma proteína homotetramérica contendo um grupo heme e uma molécula de NADPH por subunidade (Hermes-Lima 2004b). O mecanismo de ação da catalase envolve a reação entre o Fe^{3+} (ligado ao grupo heme da enzima) e uma molécula de H_2O_2 , formando um intermediário contendo íon ferro de alta valência, denominado composto I (Alfonso-Prieto et al. 2009). Uma vez formado, o composto I reage com outra molécula de H_2O_2 , produzindo água e O_2 (Alfonso-Prieto et al. 2009).



A catalase é encontrada principalmente nos peroxissomos (Hermes-Lima 2004b), além de estar presente em mitocôndrias cardíacas (Radi et al. 1991) e hepáticas (Salvi et al. 2007).

1.3.3 Glutathione

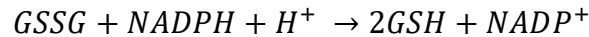
A glutathione é um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) presente em concentrações na faixa milimolar em eucariotos (1–10 mM), onde é o tiol de baixo peso molecular mais abundante (Bachhawat et al. 2013). A maior parte do conteúdo celular de GSH está no compartimento citosólico (80-85%), seguido da matriz mitocondrial (10-15%) e em menor abundância no núcleo e no retículo endoplasmático (Meredith e Reed 1982; Hwang, Sinsky, e Lodish 1992; García-Giménez et al. 2013). A GSH tem papel fundamental no controle dos níveis de ROS e metabolismo de moléculas eletrófilas (e.g. xenobióticos e seus metabólitos), funções que dependem de reações redox do grupo tiol (-SH) de seu resíduo de cisteína (Ribas, Garcia-Ruiz, e Fernandez-Checa 2014). A glutathione é capaz de reagir diretamente com ROS, entretanto, sua principal característica é neutralizar ROS e moléculas eletrófilas (e.g. tióis oxidados) indiretamente via reações enzimáticas. Duas reações dependentes de ATP produzem GSH a partir dos aminoácidos precursores (ácido glutâmico, cisteína e glicina) no citosol de células animais (García-Giménez et al. 2013). A primeira reação, ligação entre ácido glutâmico e cisteína, é a etapa limitante da síntese de GSH catalisada pela γ -glutamil-cisteína ligase (GCL), enzima composta por uma subunidade catalítica (GCLc) e outra

reguladora (GCLm) (Yan e Meister 1990; Huang et al. 1993). O dipeptídeo produzido pela GCL, γ -glutamil-cisteína, é o substrato da segunda etapa da síntese de GSH catalisada pela enzima glutathione sintase (GS), responsável pela ligação covalente da glicina ao dipeptídeo (Lu 2013).

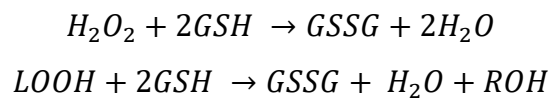
A glutathione é encontrada em sua forma reduzida (GSH) e em formas oxidadas, por exemplo, dissulfeto (GSSG), formada por duas moléculas de glutathione, e dissulfeto misto ligada a outros tióis celulares (RS-SG). A formação de dissulfetos mistos com proteínas (Pr-S-SG) configura uma mudança pós-traducional chamada de glutathionilação que altera a estrutura e função de diversas proteínas (Dalle-Donne et al. 2009). Outro produto de oxidação da GSH é a nitrosoglutathione (GSNO) formada pela reação com espécies reativas de nitrogênio derivadas do \bullet NO (Broniowska, Diers, e Hogg 2013). Os níveis de GSH e outros estados de oxidação da glutathione têm papel fundamental em vias de sinalização redox ao modular o estado de oxidação de resíduos de cisteína em proteínas, regulando processos críticos, tais como proliferação (Shaw e Chou 1986), ciclo celular (Messina e Lawrence 1989; Poot et al. 1995) e morte celular (Garcia-Ruiz e Fernandez-Checa 2006). Devido às elevadas concentrações em sistemas biológicos, o par redox da glutathione age como um tampão redox. A razão entre as formas dissulfeto e reduzida (GSSG/GSH) indica o estado redox celular (Schafer e Buettner 2001). Entretanto, a capacidade de tamponamento da glutathione depende essencialmente da atividade das enzimas que catalisam a transferência de elétrons entre glutathione e outras moléculas (Berndt, Lillig, e Flohé 2014).

As enzimas que catalisam as reações de troca de elétrons entre glutathione e diferentes alvos são glutaredoxinas (Grx), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidases (GPX) e glutathione transferases (GST). As glutaredoxinas (Grx), também denominadas de tioltransferases, formam uma família de polipeptídeos (10–16 kDa) responsáveis por catalisar a redução de ligações dissulfeto intramoleculares ou entre proteínas e glutathione, reação chamada de deglutathionilação, em duas etapas (Allen e Mieyal 2012). Na primeira etapa, a Grx ataca a ligação dissulfeto da proteína formando uma ligação dissulfeto nova entre Grx e a glutathione, produzindo a proteína com seu tiol reduzido. Na segunda etapa, outra molécula de GSH ataca a ligação dissulfeto entre Grx e glutathione, produzindo Grx em seu estado reduzido e GSSG (Allen e Mieyal 2012). A redução de GSSG, proveniente da ação de Grx ou de outras vias, a GSH é catalisada pela flavoenzima GR, um homodímero contendo um grupo

FAD como cofator redox em cada unidade, em uma reação que consome potencial redutor na forma NADPH (Deponete 2013). A atividade de GR é responsável por manter a glutatona em seu estado reduzido, disponível como substrato para as enzimas a seguir.

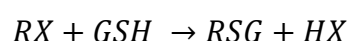


Apesar de termodinamicamente favoráveis, muitas reações entre GSH e moléculas oxidantes tem velocidade muito reduzida (Flohé 2013), de forma que grande parte da função antioxidante da GSH depende da ação de enzimas glutatona peroxidases (GPXs). As GPX são peroxidases encontradas no citosol, mitocôndria e espaço extracelular, onde reduzem hidroperóxidos lipídicos (LOOH) ou H₂O₂ aos seus álcoois correspondentes (LOH) ou água respectivamente (Halliwell e Gutteridge 2015). Para tanto, as GPX utilizam a GSH como equivalente redutor, produzindo GSSG, reduzida pela atividade de GR.



As GPX podem ser separadas em dois grandes grupos: um contendo selenocisteína no sítio ativo e outro grupo contendo cisteína no sítio ativo (Brigelius-Flohé e Maiorino 2013). Em vertebrados, existem oito tipos de GPX, com atividade sobre diferentes substratos, incluindo H₂O₂, hidroperóxidos de ácidos graxos, hidroperóxidos de fosfolipídeos e hidroperóxidos sintéticos (Brigelius-Flohé e Maiorino 2013).

As enzimas glutatona transferases (GSTs) formam uma superfamília de enzimas que catalisam o ataque nucleofílico da GSH a átomos de carbono, nitrogênio ou enxofre de compostos eletrofílicos (Hayes, Flanagan, e Jowsey 2005).

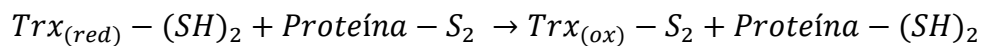


As GSTs são encontradas em diferentes compartimentos celulares, incluindo citosol e mitocôndria, onde participam de reações de conjugação de GSH com uma ampla variedade de substratos (Board e Menon 2013). Os principais substratos da

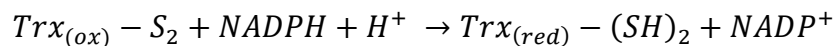
GST são xenobióticos eletrofílicos e produtos da oxidação de lipídeos (e.g. aldeídos), tornando-os, geralmente, menos reativos (Halliwell e Gutteridge 2015).

1.3.4 Tioredoxina

As tioredoxinas (Trxs) são polipeptídeos com massa aproximada de 12kDa contendo dois grupos –SH, em seu estado reduzido, com atividade redox fundamentais para sua função fisiológica (Halliwell e Gutteridge 2015). Estes peptídeos exercem sua atividade biológica ao passar por oxidação/redução reversível de seus resíduos de cisteína do sítio catalítico (Mustacich e Powis 2000). As Trxs participam de reações redox com diversas proteínas, reduzindo ligações dissulfeto.



O mecanismo de ação das Trxs envolve a formação de uma ligação dissulfeto mista entre Trx e a proteína alvo, que é posteriormente desfeita, produzindo Trx em sua forma oxidada e a proteína em sua forma reduzida. Por este mecanismo, as Trx fornecem potencial redutor para diferentes redutases e peroxiredoxinas, além de participar de diferentes vias reações de troca tiol-dissulfeto (Arnér e Holmgren 2000). A Trx reduz dissulfetos proteicos algumas ordens de magnitude mais rápido que GSH (Arnér e Holmgren 2000). A $Trx_{(ox)}$ é reduzida pela ação da enzima tioredoxina redutase (TrxR). As TrxR são flavoproteínas da família piridina das nucleotídeo-dissulfeto oxidoreduases, da qual a GR também faz parte (Mustacich e Powis 2000). De forma similar à GR, a TrxR utiliza equivalente redutores do NADPH para reduzir $Trx_{(ox)}$ a $Trx_{(red)}$.



As peroxiredoxinas (Prxs) formam uma família de pequenas (22–27 kDa) proteínas independentes de selênio responsáveis por catalisar a degradação de H_2O_2 , hidroperóxidos orgânicos e peroxinitrito (Rhee, Chae, e Kim 2005). Um característica das Prxs é a elevada velocidade de redução de peróxidos na faixa de 10^6 – $10^8 M^{-1} s^{-1}$ (Poole, Hall, e Nelson 2011). O modo de ação das Prxs envolve a

oxidação de seu resíduo de cisteína peroxidático (C_P-SH) por H_2O_2 (ou outro peróxido), produzindo um resíduo de cisteína-ácido sulfênico (C_P-SOH) (Neumann, Cao, e Manevich 2009). Este C_P-SOH é então reduzido por outro resíduo de cisteína da Prx, formando uma ligação dissulfeto intramolecular (Neumann, Cao, e Manevich 2009). Tal ligação é reduzida por Trx, regenerando a Prx para sua forma ativa.

O sistema da glutathiona difere deste da Trx pelo fato da GR ter atividade limitada sobre GSSG, enquanto a TrxR pode agir sobre outros substratos dissulfetos. Além disso, enquanto a GSH é encontrada em concentrações milimolares, a Trx está presente em concentrações micromolares (Mustacich e Powis 2000). Por outro lado, os sistemas apresentam algumas semelhanças, tais como: participação de uma enzima da família piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidoreductase (TrxR e GR); participação de um polipeptídeo com atividade redox (Trx e Grx); fornecer poder redutor para peroxidases (Prx e GPX); capacidade de participar de reações de troca de tiol-dissulfeto; e dependência de potencial redutor na forma de NADPH.

1.3.5 NADPH e Sistemas Antioxidantes

A manutenção de tioredoxina e glutathiona, principais responsáveis pela regulação do ambiente redox celular, em seus estados reduzidos depende de equivalentes redutores na forma de NADPH. O NADPH, que abastece o sistema antioxidante e vias de biossíntese em células aeróbicas, é proveniente de quatro reações catalisadas pelas enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH, citosólica), 6-fosfogliconato desidrogenase (PGD, citosólica), enzima málica (ME, citosólica e mitocondrial) e $NADP^+$ -isocitrato desidrogenase (IDH, citosólica e mitocondrial) (Stanton 2012). Dentre estas, a G6PDH ocupa posição de destaque, uma vez que a supressão de sua atividade resulta em maior sensibilidade ao estresse oxidativo (Pandolfi et al. 1995), evidenciando a incapacidade de outras vias em manter o suprimento de NADPH. Na mitocôndria, moléculas de $NADP^+$ podem ser reduzidas por NADH, produzindo NAD^+ e NADPH pela enzima nicotinamida nucleotídeo transhidrogenase (NNT) localizada na membrana mitocondrial interna (Blacker e Duchon 2016). Desta forma, o potencial redutor na forma de NADH proveniente do ciclo do ácido cítrico pode ser utilizado na CTE, onde ROS são formados, ou convertido em NADPH, abastecendo o sistema antioxidante mitocondrial. O knockdown da expressão de NNT em neurônios de ratos resulta em

maior razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, menor capacidade de decompor H_2O_2 , e maior conteúdo de glutathiona dissulfeto (Lopert e Patel 2014). Interessantemente, apesar de sistemas antioxidantes dependerem de NADPH, enzimas que produzem espécies reativas, tais como: óxido nítrico sintases, NADPH oxidases e citocromo p450 também utilizam NADPH como substrato (Stanton 2012).

1.3.6 Mudanças Pós-traducionais

O sistema antioxidante e vias de sinalização redox podem modular e serem moduladas por mudanças pós-traducionais de suas enzimas, que pode alterar suas propriedades cinéticas e as interações com outras proteínas. As atividades de muitas quinases e fosfatases são reguladas pelo ambiente redox (Rhee et al. 2000). Por exemplo, espécies reativas podem induzir os três grupos de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), incluindo quinases p38, quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK) e quinases c-Jun N-terminal quinases (Halliwell e Gutteridge 2015). Por outro lado, a exposição de fosfatases de tirosina a condições oxidantes causa redução de suas atividades como resultado da oxidação de um resíduo de cisteína conservado fundamental para a atividade enzimática (Denu e Tanner 1998). O estado de fosforilação de enzimas que metabolizam H_2O_2 , catalase, GPX e Prx, afeta suas atividades (Rhee et al. 2005). Por exemplo, a exposição células a H_2O_2 promove a interação entre GPX e as tirosina quinases c-Abl e Arg, resultando na fosforilação e maior atividade de GPX (Cao et al. 2003). O mesmo fenômeno é observado para a catalase, que é ativada pela fosforilação via c-Abl e Arg quinases em resposta a tratamento com H_2O_2 (Cao, Leng, e Kufe 2003). Além das enzimas que agem sobre H_2O_2 , a atividade de MnSOD também é regulada por fosforilação. Por exemplo, a exposição células de mamíferos à radiação causa translocação da proteína quinase Cdk1 para a mitocôndria, onde ela fosforila a MnSOD tornando-a mais ativa (Candas et al. 2013). Proteínas antioxidantes ainda podem ter suas atividade reguladas ao serem alvos de outras mudanças pós-traducionais, como no caso da acetilação (S. C. Kim et al. 2006; Qiu et al. 2010).

1.3.7 Controle Transcricional

Há uma ampla lista de fatores de transcrição que respondem a desequilíbrios redox e estresse oxidativo regulando a expressão de componentes dos sistemas

antioxidantes. Por exemplo, em mamíferos, as atividades dos fatores de transcrição AP-1, Nrf2, p53, NOTCH, NF- κ B, SP1, HIF-1, SREBP-1 e HSF1 são reguladas pelos níveis de H₂O₂ (Marinho et al. 2014). Outros fatores de transcrição, tais como o PGC-1 α (Valle et al. 2005) e FoxOs (Klotz et al. 2015), controlam a expressão de antioxidantes.

Os fatores de transcrição da família *forkhead box* classe O (FoxOs), FoxO1, FoxO3, FoxO4 e FoxO6, regulam a expressão de proteínas envolvidas em diversos processos celulares importantes, incluindo ciclo celular, reparo de DNA, sistemas antioxidantes, apoptose e autofagia (Calnan e Brunet 2008). Assim como no caso de outros fatores de transcrição, a atividade de FoxOs sobre a expressão de genes depende da sua presença no núcleo, que é controlada por diferentes mudanças pós-traducionais (van der Horst e Burgering 2007). FoxOs podem sofrer fosforilação, acetilação e monoubiquitinação em múltiplos sítios da proteína (de Keizer, Burgering, e Dansen 2011). O mecanismo mais conhecido de controle da localização subcelular de FoxOs é a fosforilação pela via PI3K/Akt. A fosforilação de resíduos específicos em proteínas FoxOs por esta via cria sítios de interação com a proteína chaperona 14-3-3. A ligação desta chaperona com FoxOs favorece a exportação de FoxOs do núcleo e previne a importação de FoxOs para o núcleo (Calnan e Brunet 2008). A fosforilação ainda causa interferência na sequência peptídeo sinal de localização nuclear, inibindo a translocação de FoxO1 para o núcleo (Rena et al. 2001). Já a via de ativação de FoxOs por desequilíbrio redox, apesar de envolver eventos de fosforilação, é muito mais complexa e ocorre por mudanças pós-traducionais em sítios diferentes daqueles da via PI3K/Akt, envolvendo a participação, por exemplo, das proteínas quinases MAPKs, JNK e ERK (de Keizer, Burgering, e Dansen 2011). Enquanto, a via PI3K/Akt inibe a translocação de FoxOs para o núcleo, as vias por desequilíbrio redox podem ativar ou inibir a atividade desses fatores, além de potencialmente direcionar alvos transcripcionais (de Keizer, Burgering, e Dansen 2011). Catalase, MnSOD, CuZnSOD, peroxiredoxinas, GPX1, GST, Trx2 (mitocondrial) e TrxR2 (mitocondrial) são antioxidantes endógenos cujas transcrições são reguladas por FoxOs (Klotz et al. 2015).

O fator nuclear (*erythroid-derived 2*)-like 2 (Nrf2) é considerado o principal fator de transcrição no controle da expressão de antioxidantes, influenciando a transcrição dos principais componentes descritos nesta seção 1.3 e afetando desde a síntese de glutatona até o provimento de NADPH. Os alvos do Nrf2 têm em

comum o elemento de resposta antioxidante (ARE), caracterizado pela sequência TGA***GC, em região *upstream* de seus genes (Wasserman e Fahl 1997). Apesar do Nrf2 ser constitutivamente expresso, ele tem uma meia-vida curta (<10 min) (McMahon et al. 2004) em condições fisiológicas devido à constante degradação via ubiquitinação-proteassoma (Suzuki e Yamamoto 2015). A ubiquitinação do Nrf2 é favorecida pela formação de um complexo com a proteína Keap1, um homodímero ancorado à actina e com alguns resíduos de cisteína expostos (Kang et al. 2004). A Keap1 no complexo Nrf2:Keap1, além de manter o Nrf2 no citosol, atua como substrato adaptador para a ubiquitina ligase Cullin 3, que catalisa a ubiquitinação do Nrf2 direcionando-o para a degradação no proteassoma (Niture, Khatri, e Jaiswal 2014). Os resíduos de cisteína da Keap1 atuam como sensores redox, que podem ser oxidados por ROS ou moléculas eletrófilas (**Figura 16**). A oxidação de tióis específicos na molécula da Keap1 (especialmente Cis151) resulta em alterações conformacionais que impedem a formação do complexo Nrf2:Keap1, evitando sua degradação (Niture, Khatri, e Jaiswal 2014). Desta forma, a translocação do Nrf2 para o núcleo é permitida, onde ele forma heterodímeros com pequenas proteínas da família Maf. O complexo Nrf2:Maf liga-se a regiões regulatórias ARE promovendo a transcrição de genes downstream das regiões (Espinosa-Diez et al. 2015). A expressão das proteínas da rede de sistemas antioxidantes GCLc, GCLm, GR, GSTs, GPX2, Trx, TrxR, além de proteínas envolvidas na produção de NADPH (G6PDH, PGD, ME e IDH) e no controle da disponibilidade de ferro (Ferritina) é controlada pela atividade de Nrf2 (Gorrini, Harris, e Mak 2013).

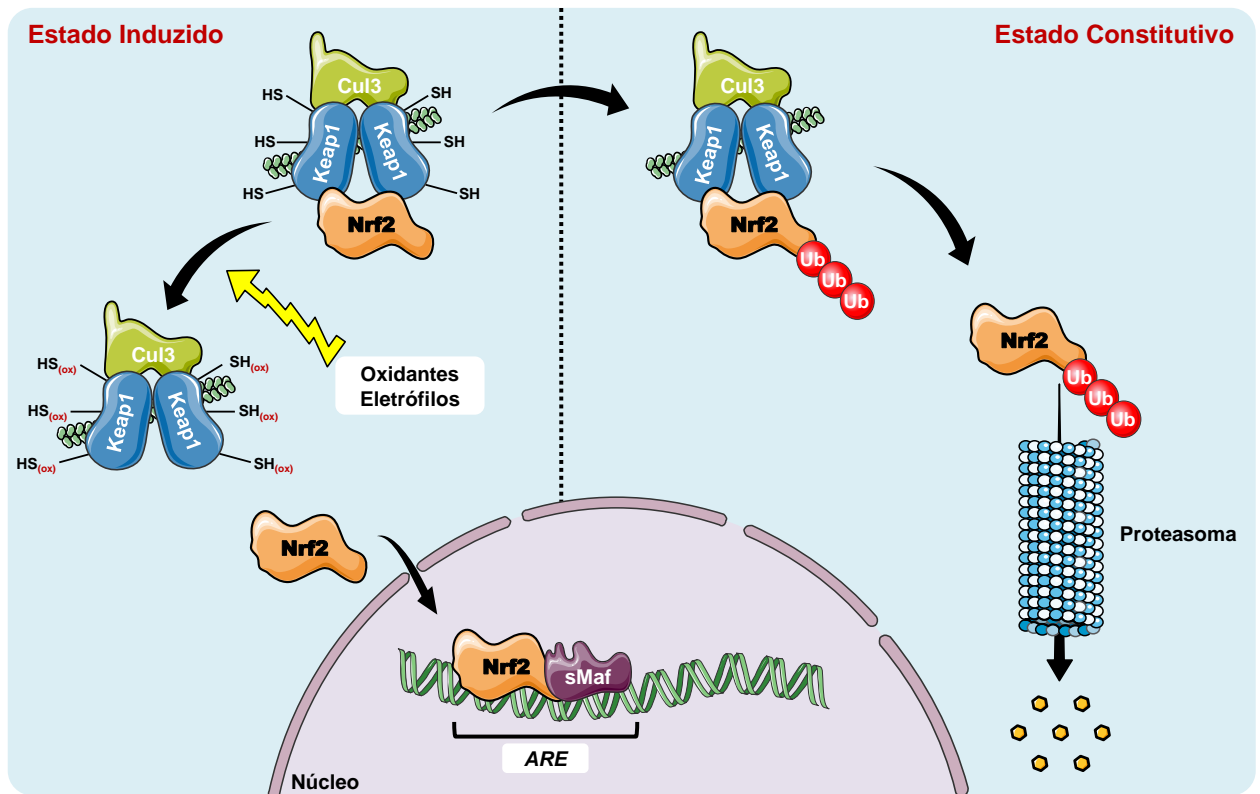


Figura 16. A via Nrf2-Keap1. A estabilidade do Nrf2 é controlada pela proteína Keap1. Em condições constitutivas, o Nrf2 é mantido no citosol pela interação com o homodímero Keap1, que encontrasse associado a filamentos de actina. Keap1, por ser um substrato adaptador do complexo ubiquitina ligase Cul3, favorece a ubiquitinação e consequente degradação via proteassoma do Nrf2. Portanto, no estado basal o Nrf2 é constantemente degradado como consequência da interação com Keap1. Moléculas oxidantes (e.g. ROS) e eletrófilos (e.g. produtos de peroxidação lipídica) oxidam resíduos de cisteína da Keap1, resultando em alterações conformacionais e na liberação do Nrf2. Uma vez livre, o Nrf2 é translocado para o núcleo onde forma heterodímeros com pequenas proteínas Maf (sMaf). Este heterodímero liga-se ao elemento de resposta antioxidante (ARE), favorecendo a expressão de uma série de genes antioxidantes. Figura baseada em Espinosa-Diez et al. (2015) e elaborada com ilustrações adaptadas de Servier Medical Art.

O fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1) consiste de um heterodímero formado por subunidades HIF-1 α e HIF-1 β (Semenza 2007). Ambas as unidades são expressas constitutivamente, porém, a subunidade alfa é continuamente degradada em condições de normoxia (Semenza 2007). A degradação do HIF-1 α é iniciada pela hidroxilação de resíduos de prolina catalisada por enzimas da família prolin hidroxilase (PHDs) (Semenza 2007). A atividade de PHD depende dos substratos 2-oxoglutarato e O₂. Outra via de hidroxilação do HIF-1 α envolve do fator inibidor do HIF (FIH) que também hidroxila a subunidade alfa, mas em resíduos de asparagina (Lando et al. 2002). Uma vez hidroxilado o HIF-1 α interage com a proteína von Hippel Lindau (VHL), que funciona como um sinal para a ubiquitinação da proteína, marcando-a para a degradação via proteassoma. Quando

os níveis de O_2 caem, a via de degradação da subunidade alfa é inibida, seus níveis aumentam e ocorre a formação do dímero entre HIF-1 α e HIF-1 β . A hipóxia inibe a atividade das hidroxilases não só pela ausência de substrato (O_2), mas também pela ação de ROS produzidos em resposta à hipóxia (Chandel et al. 2000). O dímero formado recruta a proteína p300 formando um complexo que se liga a elementos de resposta a hipóxia (HREs; A/GCGTG) promovendo a expressão de vários genes em resposta a hipóxia (Wenger e Gassmann 1997). Dentre os genes ativados estão enzimas glicolíticas (Semenza 2012), e a enzima antioxidante GPX (Bierl et al. 2004). Um efeito antioxidante indireto do HIF é a indução de mitofagia ao ativar a transcrição das proteínas BNIP3 and BNIP3L (Semenza 2012), responsáveis pela promoção de autofagia mitocondrial (Ney 2015).

Os fatores nucleares kappa B (NF- κ B) são uma família de complexos proteicos sensíveis a perturbações redox caracterizados pela formação de homo e heterodímeros a partir de cinco proteínas diferentes: RelA, RelB, c-Rel, p50/p105 e p52/p100 (Hayden 2004). A atividade de NF- κ B é regulada principalmente pela interação com proteínas inibitórias I κ B. Tais proteínas inibitórias contêm sequências que inibem interações com DNA e sinalizam exportação do núcleo (Morgan e Liu 2011). Proteínas NF- κ B encontram-se em complexos citoplasmáticos inativos com proteínas I κ B em condições basais/fisiológicas. Em resposta a uma variedade de estímulos (e.g. citocinas), as I κ B podem ser fosforiladas pelo complexo I κ B quinase (IKK), resultando em ubiquitinação e degradação proteasomal das mesmas. Na ausência da formação de complexos com proteínas inibitórias, dímeros NF- κ B são translocados ao núcleo onde promovem a transcrição de genes contendo a sequência consenso GGGR**YYCC (R=purina, Y=pirimidina) em regiões upstream (Ghosh, May, e Kopp 1998). Espécies reativas são capazes de induzir a atividade de NF- κ B, apesar da incerteza quanto ao mecanismo. Os mecanismos candidatos envolvem a modulação de vias de fosforilação por ROS (Siomek 2012). Por exemplo, proteínas quinases que fosforilam e ativam IKK têm suas atividades reguladas por H_2O_2 (Oliveira-Marques et al. 2009). A atividade de NF- κ B promove a transcrição dos antioxidantes MnSOD, CuZnSOD, catalase, Trx, GPX e GST (Morgan e Liu 2011).

1.3.8 *MicroRNAs*

MicroRNAs representam uma outra camada de controle da expressão de componentes do sistema antioxidante. Esta família de pequenos RNAs (21–25 nucleotídeos) altamente conservados regula negativamente a expressão de genes ao interagir com sequências complementares de mRNA, inibindo a tradução (He e Hannon 2004). Recentemente, um grupo de microRNAs sensíveis a alterações redox foi identificado e denominado ‘redoxmiRs’ (Cheng, Ku, e Siow 2013). Os redoxmiRs tem como alvo principal vias dependentes de Nrf2, resultando em, por exemplo, menores expressões de GR e GCL (Cheng, Ku, e Siow 2013).

Em resumo, células aeróbias contam com uma rede intrincada de antioxidantes para controlar os níveis de espécies reativas produzidas continuamente. Os diferentes sistemas antioxidantes têm suas especificidades, mas cooperam entre si, havendo muitas vezes o cruzamento de vias. A oferta de NADPH tem papel fundamental para abastecer sistemas antioxidantes de equivalentes redutores mantendo-os em funcionamento. Na ocasião de um desafio oxidativo, a perturbação do ambiente redox celular dispara respostas compensatórias do sistema antioxidante por diversos mecanismos, incluindo mudanças pós-traducionais e indução de transcrição sobre alvos específicos.

1.4 Danos Oxidativos e Sistemas de Reparo

As ROS que excedem a capacidade de controle dos sistemas antioxidantes oxidam biomoléculas, podendo causar a perda de função e a formação de produtos reativos. Ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas são alvos de oxidação por espécies reativas, produzindo um conjunto de produtos de oxidação que podem ser mensurados experimentalmente a fim de aferir o grau de dano oxidativo (**Tabela 4**). A oxidação de biomoléculas mediada por ROS ocorre mesmo em condições fisiológicas na ausência de estresse, de forma que são observados níveis constitutivos de produtos de oxidação, denominados marcadores de dano oxidativo. Os níveis de marcadores de dano oxidativo acumulam em situações de estresse oxidativo.

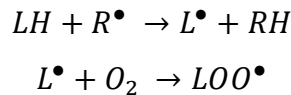
Tabela 4. Biomoléculas e produtos de oxidação por espécies reativas comumente aferidos como marcadores de estresse oxidativo (Niki e Yoshida 2011).

Lipídeos	Proteínas	DNA
TBARS	Proteínas carboniladas	Ensaio do cometa (quebra de fita)
Dienos conjugados	Hidroperóxidos proteicos	Timina glicol
Hidroperóxidos lipídicos	Dissulfetos	5-hidroxiuracila
Aldeídos	Ácidos sulfênicos	2,8-di-hidroxiadenina
Cetonas	Ácidos sulfínicos	8-oxoguanina
Isoprostanos	Ácidos sulfônicos	
Neuroprostanos	Nitrotirosina	
Isofuranos	Proteínas modificadas por aldeídos	
Neurofuranos		

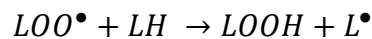
A reação de espécies reativas com o DNA dá origem há diversos produtos de oxidação (Dizdaroglu et al. 2002). Dentre as bases nitrogenadas que compõe o DNA, a guanina é especialmente vulnerável à ação de ROS devido ao seu baixo potencial de oxidação (Steenken e Jovanovic 1997). Por isso, o produto da oxidação de guanina, 8-oxoguanina (8-oxoG), é relativamente abundante e tem sido comumente medido como indicador de dano oxidativo ao DNA (David, O'Shea, e Kundu 2007). A presença de 8-oxoG pode resultar na incorporação de adenina na fita complementar, ao invés de citosina, com efeito potencialmente deletério (David, O'Shea, e Kundu 2007). O alto potencial mutagênico da formação de 8-oxoG é minimizado por sistemas de reparo via dois mecanismos: excisão de bases (na fita de DNA) e hidrólise (dos nucleosídeos trifosfato). A hidrólise de 8-oxo-dGTP é catalisada pela enzima MTH1, evitando a incorporação do nucleosídeo danificado a fitas de DNA ou RNA nascentes (Leon et al. 2016). Já a excisão de 8-oxoG de fitas já sintetizadas é realizada pela 8-oxoguanine glycosilase (OGG) (Faucher, Doublíé, e Jia 2012).

Ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) são os principais componentes de membranas biológicas. A presença de múltiplas insaturações torna-os vulneráveis ao ataque de espécies reativas, dando início ao processo de peroxidação lipídica (Halliwell e Gutteridge 2015). A peroxidação lipídica é o processo de degradação de lipídeos poliinsaturados em uma reação em cadeia que ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação (descritas abaixo com base em Hermes-Lima 2004b; Halliwell e Gutteridge 2015). Danos oxidativos a PUFAs alteram a fluidez de membranas, afetando suas funções fisiológicas. A fase de iniciação é caracterizada pela abstração de um hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) de um lipídeo (LH) por uma espécie reativa (R^\bullet) produzindo radical livre de carbono no lipídeo (L^\bullet). Uma vez formado, o radical livre de carbono é estabilizado pelo rearranjo de duplas ligações formando dienos conjugados ($=\text{CH}-\text{CH}=\text{}$), entretanto o radical livre

permanece (L^\bullet). Em condições aeróbicas, o radical de carbono reage com o O_2 , produzindo o radical peróxil (LOO^\bullet).



O radical LOO^\bullet , por sua vez, pode abstrair um H de um ácido graxo próximo, formando um novo radical lipídico de carbono (L^\bullet), propagando a reação em cadeia. Desta forma, o efeito da primeira reação de abstração na fase de iniciação é amplificado. A abstração do H por LOO^\bullet resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$).



Os hidroperóxidos lipídicos ainda podem reagir com íons metálicos, produzindo os radicais peróxil (LOO^\bullet) e alcoxil (LO^\bullet), que sustentam a propagação da peroxidação. A terminação do processo de peroxidação lipídica ocorre quando: dois radicais lipídicos reagem entre si; a reação em cadeia atinge um antioxidante lipofílico (e.g. α -tocoferol); ou quando são formado produtos finais derivados de $LOOH$, LOO^\bullet e LO^\bullet . Dentre os produtos finais, estão hidrocarbonetos, isoprostanos e aldeídos (Hermes-Lima 2004b). Determinações dos níveis de dienos conjugados (Corongiu e Banni 1994), hidroperóxidos lipídicos (Hermes-Lima, Willmore, e Storey 1995), malondialdeído (MDA) (Buege e Aust 1978), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (Spickett 2013) e F_2 -isoprostanos (Roberts e Morrow 2000), são comumente usadas como indicadores de dano oxidativo a lipídeos. Os aldeídos MDA e HNE podem formar adutos com ácidos nucleicos, proteínas e fosfolipídeos (Esterbauer, Schaur, e Zollner 1991).

O reparo de danos oxidativos a lipídeos é realizado pelas enzimas fosfolipase A2, GPX, GST, aldeído desidrogenase (ALDH) e citocromo c p450 (Spickett 2013). A fosfolipase A2 cliva peróxidos fosfolipídicos de membrana liberando-os em solução, possibilitando a redução dos peróxidos pela GPX (van Kuijk et al. 1987). Algumas formas de GPX ainda são capazes de reduzir hidroperóxidos fosfolipídicos *in situ* em membranas (Ursini et al. 1982). As GSTs catalisam a reação de conjugação entre aldeídos provenientes da peroxidação e a GSH, tornando-os menos reativos

(Nilsson, Gustafsson, e Mannervik 2000). As ALDHs oxidam o HNE ao ácido 4-hidroxi-2-nonenóico, um produto muito menos reativo (Uchida 2003), que pode ser detoxificado pela via da citocromo c P450 (Spickett 2013).

As proteínas formam outra classe de biomoléculas que são importantes alvos de oxidação por espécies reativas. Os principais efeitos oxidativos de ROS e RNS em proteínas são a oxidação de resíduos de cisteína, a sulfoxidação de resíduos de metionina, a oxidação de resíduos de triptofano e histidina, a nitração de resíduos de triptofano e tirosina, e a introdução de grupos carbonila em diferentes sítios (Bachi, Dalle-Donne, e Scaloni 2013). Oxidações de resíduos de cisteína (Cis-SH) a ácidos sulfênicos (Cis-SOH) e dissulfetos (Cis-S-S-Cis) são reduzidas pelos sistemas dependentes de glutathione e tioredoxina (Figura 1.2.3). Se a oxidação é mais intensa, ocorre a geração de ácido sulfínico (Cis-SO₂H), que é reduzido pela atividade de sulfiredoxinas (Srxs) em uma reação que consome ATP (Jeong et al. 2012). A hiperoxidação a ácido sulfônico (Cis-SO₃H) é irreversível. A oxidação de resíduos de metionina produz sulfóxidos de metionina (MetO), causando alterações conformacionais ao tornar hidrofílico (MetO) um amino ácido hidrofóbico (Met) (Oien e Moskovitz 2007). Os MetO são reduzidos pela enzima metionina sulfóxido redutases (Msr), cuja atividade depende do sistema tioredoxina (Trx, TrxR e NADPH) (Stadtman, Moskovitz, e Levine 2003). Já as proteínas carboniladas são o resultado da modificação oxidativa irreversível de proteínas por diversos mecanismos e seus níveis são frequentemente medidos como indicadores de estresse oxidativo (Wehr e Levine 2012). Em geral, proteínas oxidadas são reconhecidas degradadas a aminoácidos pelas atividades do proteasoma 20S no citosol (Davies 2001) e da protease Lon na mitocôndria (Bota e Davies 2002).

1.4.1 Estresse Oxidativo

O termo 'estresse oxidativo' foi definido pela primeira vez por Helmut Sies (1991) como *uma perturbação no equilíbrio prooxidante-antioxidante em favor do primeiro, resultando em dano potencial*. Tal conceito foi elaborado em um momento em que o papel de espécies reativas como sinalizadores celulares essenciais à vida ainda não era apreciado. Ao longo do tempo, tornou-se evidente que vias celulares de oxidação e redução têm funções fisiológicas. Desta forma, o conceito de estresse oxidativo sofreu mudanças desde sua criação, sendo definido como uma perturbação

de vias específicas de sinalização e controle redox (Jones 2006). Tal perturbação pode ocorrer de forma independente da produção de espécies reativas (Jones 2008). Apesar do avanço do conceito, ainda é comum o uso do termo para se referir à sua definição original (Pamplona e Costantini 2011; Nikolaidis et al. 2012). Neste trabalho, o termo estresse oxidativo será usado para se referir ao aumento nos níveis de marcadores de danos oxidativos a biomoléculas. Portanto, o estresse oxidativo é caracterizado por um aumento dos níveis de estado estacionário de marcadores de estresse oxidativo, que pode resultar de três fenômenos: (i) diminuição da capacidade da rede de sistemas antioxidantes; e/ou (ii) aumento da produção de espécies reativas; e/ou (iii) limitação dos sistemas de reparo.

1.5 Privação de Oxigênio e Depressão Metabólica

Mamíferos em geral são extremamente vulneráveis à privação de oxigênio. Quando expostos à hipóxia, mesmo que por segundos ou minutos, seus tecidos disparam uma série de eventos degenerativos que levam à morte celular (Pérez-Pinzón et al. 1992). Danos celulares associados à privação de oxigênio ocorrem, por exemplo, nos tecidos cardíaco (Ganote et al. 1975; Jennings et al. 1990), intestinal (Guan et al. 2009) e cerebral (Love 1999). Este efeito deve-se a inaptidão de manter o equilíbrio entre suprimento e demanda de ATP. Por exemplo, em neurônios de mamíferos sob hipóxia por alguns minutos os níveis de ATP caem drasticamente, reduzindo o bombeamento de íons e perturbando gradientes intermembranas (Lipton 1999). A consequente despolarização resulta no influxo de Ca^{2+} , que ativa proteases, endonucleases e lipases, levando a morte celular (Lipton 1999). Outros eventos são a queda de pH e maior produção mitocondrial de ROS (Lipton 1999; Guan et al. 2009). Tal sensibilidade também é observada em muitos vertebrados além de mamíferos (Larson et al. 2014).

Por outro lado, várias espécies animais são tolerantes à privação direta (restrição de O_2 ambiental) ou indireta (incapacidade de obter O_2 e/ou distribuir O_2 para os tecidos, mesmo em concentrações adequadas de O_2) da disponibilidade de O_2 , por períodos desde horas a meses, como parte integrante de suas vidas (Bickler e Buck 2007). Tal tolerância está associada às capacidades de (i) suprimir de forma coordenada vias de consumo e produção de ATP, (ii) tolerar o acúmulo de metabólitos, e (iii) evitar ou reparar lesões derivadas da reoxigenação (Bickler e Buck 2007). O equilíbrio entre oferta e demanda de ATP é atingido por ajustes metabólicos

e priorização do uso de ATP para funções vitais. Em hepatócitos de tartarugas *Chrysemys picta*, conhecidas por sua extraordinária tolerância a anóxia, a demanda por ATP é reduzida a 6% do valor de normoxia (Hochachka e Somero 2002). Tal redução é atingida pela supressão do consumo de ATP de 75% da atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$, 93% da síntese de proteínas, 94% da degradação de proteínas e 100% da gliconeogênese (Hochachka e Somero 2002). A supressão de processos energeticamente dispendiosos, tais como expressão de proteínas e transporte ativo (Rolfe e Brown 1997), resulta em menor demanda por recursos, maximizando as chances de sobrevivência e reduzindo o consumo de O_2 (i.e. depressão metabólica).

No reino animal, a entrada de um estado fisiológico de depressão metabólica reversível, no qual a taxa metabólica basal é fortemente suprimida, é uma estratégia de autopreservação em resposta a ambientes desfavoráveis (Storey 2015). Ambientes tornam-se desfavoráveis por falta de O_2 , extremos de temperatura, escassez de alimento, baixíssima humidade relativa, isolada ou conjuntamente. A redução do metabolismo é tipicamente de 70-80%, mas pode atingir 90-99% em algumas espécies (Storey e Storey 2012), ou até mesmo 100% (Clegg 1997). Tal fenômeno é observado desde grupos basais (e.g. poríferos) aos mais derivados (e.g. mamíferos) e faz parte dos ciclos de vida de espécies pertencentes aos principais filos de invertebrados e a todas as classes de vertebrados (Guppy, Fuery, e Flanigan 1994). Ao reduzir a demanda por recursos, organismos em hipometabolismo maximizam suas chances de sobreviver e a possibilidade de retomar desenvolvimento, crescimento e reprodução quando condições ambientais viáveis forem restauradas. O hipometabolismo é observado em fenômenos sazonais, tais como hibernação, estivação e diapausa (Ruf e Geiser 2015; Carvalho, Navas, e Pereira 2010; Denlinger 2002), e também em outros eventos que podem ser sazonais ou não, incluindo a desidratação, o congelamento, a exposição aérea de organismos de respiração aquática e a privação de oxigênio (van Ginneken et al. 1999; Muir, Costanzo, e Lee 2007; Storey e Storey 2007).

Como citado anteriormente os fenômenos de depressão metabólica estão associados à repressão global de processos celulares. Entretanto, um seleto grupo de vias celulares é induzido nestas situações de limitação energética. O grupo é composto por: (i) mecanismos epigenéticos de repressão de expressão, incluindo modificação de histonas, metilação de DNA e microRNAs (Storey 2015); (ii) mecanismos de preservação do proteoma pela ação de proteínas chaperonas

(Storey e Storey 2011); (iii) mecanismos de controle dos níveis de espécies reativas pela ação de antioxidantes endógenos (Hermes-Lima e Zenteno-Savín 2002). Enquanto, alterações epigenéticas auxiliam na supressão metabólica, chaperonas e antioxidantes atuam na proteção do proteoma, o que mantém o funcionamento de biomoléculas e minimiza a necessidade de gasto energético com síntese e degradação, ao longo do período de hipometabolismo. Adicionalmente, o aumento de antioxidantes na fase de dormência da depressão metabólica minimiza a superprodução de ROS esperada no despertar e retomada do metabolismo basal (Welker et al. 2013), quando ocorre um aumento abrupto do consumo de O_2 (Toien et al. 2001). O aumento da capacidade de antioxidantes endógenos durante a depressão metabólica é uma resposta adaptativa comum no reino animal.

1.5.1 Preparo para o Estresse Oxidativo

As primeiras observações do fenômeno de isquemia e reperfusão (I/R) mostraram que se trata de uma situação altamente deletéria para as células. A privação de perfusão impede a oferta de nutrientes e O_2 e prejudica a eliminação de metabólitos. Foi demonstrado que a reperfusão, e não a isquemia em si, é responsável pelas principais injúrias celulares associadas a I/R. O avanço dos estudos de quadros de I/R mostrou que ROS e sistemas antioxidantes tem papel fundamental na ocorrência de lesões. Um amplo conjunto de evidências indica que os efeitos deletérios da I/R derivam da ocorrência de estresse oxidativo, incluindo a observação de aumentos dos níveis de ROS e de marcadores de estresse oxidativo em tecidos pós-isquêmicos e a observação de diminuição ou ausência de dano em tecidos pós-isquêmicos suplementados com antioxidantes (Granger e Kvietys 2015).

Por exemplo, a produção de radicais aumenta em segundos após o início reperfusão em corações de coelho (Zweier, Flaherty, e Weisfeldt 1987), reduzindo o número de células endoteliais aórticas viáveis para 10% (Zweier, Kuppusamy, e Luty 1988). Se a reperfusão é realizada na presença dos antioxidantes catalase ou SOD, a viabilidade após I/R é maior que 90% (Zweier, Kuppusamy, e Luty 1988). Corações de ratos transgênicos superexpressando SOD produzem menos radicais durante a reperfusão, apresentam lesões miocárdicas 50% menores e mantém melhor função contrátil em relação a ratos selvagens (Wang et al. 1998). O pico de formação de radicais é retardado e menos intenso se a reperfusão é realizada em

condições hipóxicas (Garlick et al. 1987). A reperfusão ainda causa aumento dos níveis de GSSG, queda dos níveis de GSH, acúmulo de proteínas carboniladas, maior produção de H_2O_2 em mitocôndrias cardíacas (Serviddio et al. 2005). Estes efeitos são muito reduzidos ou ausentes se os primeiros minutos de reperfusão ocorrem em condições hipóxicas (Serviddio et al. 2005). Mais recentemente, foi mostrado que rins, fígado, coração e cérebro de mamíferos acumulam succinato durante a isquemia devido à atividade reversa do complexo II mitocondrial, reduzindo fumarato a succinato (Chouchani et al. 2014). No momento da reperfusão, as altas disponibilidades de succinato e O_2 favorecem a superprodução de espécies reativas (Chouchani et al. 2014) como observado em estudos anteriores. Enquanto quadros de I/R causam severos danos oxidativos aos tecidos de mamíferos, muitas espécies animais toleram transições de disponibilidade/consumo de O_2 análogas naturalmente.

Neste panorama, pesquisadores começaram a abordar a seguinte pergunta: como animais que naturalmente passam por situações análogas a I/R ao longo de suas vidas são capazes de tolerar este estresse? Baseado nos dados de efeito protetor de antioxidantes em modelos de I/R, inicialmente propôs-se que tais animais teriam altos níveis constitutivos de antioxidantes. O alto teor de antioxidantes seria responsável por controlar ROS oriundos de situações análogas a I/R. De fato, a primeira observação publicada neste sentido foi a de que eritrócitos de cágados *Phrynosoma hilarii*, espécie tolerante a hipóxia, contêm níveis incomumente altos de grupos -SH (Reischl 1986). Tal hipótese foi testada em serpentes *Thamnophis sirtalis* tolerantes ao congelamento e à anóxia. Foi verificado que os níveis de antioxidantes endógenos desta espécie não eram especialmente elevados, apresentando valores inferiores aos de outras espécies animais intolerantes a hipóxia (Hermes-Lima 2004b). Contudo, quando as serpentes foram submetidas ao congelamento ou a anóxia, as atividades de diferentes enzimas antioxidantes aumentaram no músculo, fígado e pulmão (Hermes-Lima e Storey 1993). Na época, o aumento de antioxidantes foi surpreendente por dois motivos: (i) esperava-se uma queda dos níveis de ROS, e (ii) há uma supressão global de processos biológicos durante a fase de restrição de oxigênio. Contudo, observações subsequentes confirmaram a ocorrência do aumento da capacidade antioxidante em caramujos *Otala lactea* durante a estivação (Hermes-Lima e Storey 1995), rãs *Rana sylvatica* durante o congelamento (Joanisse e Storey 1996), e rãs *Rana pipiens* durante

exposição à anóxia (Hermes-Lima e Storey 1996) e a desidratação (Hermes-Lima e Storey 1998).

Com base no padrão de resposta de sete espécies animais submetidas a hipóxia, anóxia, congelamento, desidratação ou estivação, em 1998, foi proposto que a maior atividade de enzimas antioxidantes nestas situações era uma importante resposta adaptativa para lidar com o estresse da reoxigenação (Hermes-Lima, Storey, e Storey 1998). O fenômeno do aumento da capacidade antioxidante endógena durante a privação de oxigênio em animais resistentes a flutuações da disponibilidade/consumo de O₂ foi batizado de “Preparo para o Estresse Oxidativo” (POS) (Hermes-Lima, Storey, e Storey 1998). Segundo a hipótese do POS, os antioxidantes são induzidos como um mecanismo antecipatório (‘preparo’) para lidar com o potencial efeito danoso (‘estresse oxidativo’) da reoxigenação (Hermes-Lima, Storey, e Storey 1998). Diversos estudos confirmaram que o POS ocorre em muitas espécies animais (Bickler e Buck 2007), em situações como hipóxia, anóxia e exposição aérea (Welker et al. 2013). Apesar de ser considerado uma resposta adaptativa fundamental para a tolerância aos estresses de privação de oxigênio (Hermes-Lima e Zenteno-Savín 2002), o mecanismo pelo qual o POS é acionado permaneceu elusivo até recentemente.

No contexto em que a hipótese do POS foi concebida, a privação de O₂ levaria necessariamente a supressão da produção de ROS. Logo, um mensageiro “não-radicalar” era sinal candidato a ativar o POS (Hermes-Lima e Storey 1993). Com o passar do tempo, acumularam-se evidências de que durante a privação de O₂, a produção de ROS pode na realidade aumentar (seção 1.2.1). Adicionalmente, em muitos casos foi observado um acúmulo de marcadores de estresse oxidativo durante a privação de oxigênio em animais tolerantes à falta de O₂ (e.g. (de Oliveira, Belló-Klein, e Kucharski 2006; Lushchak e Bagnyukova 2007; Lushchak et al. 2005; Hermes-Lima e Storey 1996) lista em Hermes-Lima et al. 2015). Com base nestas observações, foi proposto que o mecanismo de ativação do POS em organismos expostos à privação de O₂ ocorre pela superprodução de ROS mitocondriais induzida pela hipóxia (Welker et al. 2013). Tal aumento hipotético de ROS acionaria vias de fatores de transcrição, tais como HIF-1, p53, FoxOs, NF-κF e Nrf2 (seção 1.3.7), promovendo a expressão de antioxidantes (Welker et al. 2013). O acúmulo de defesas antioxidantes durante a hipóxia seria, então, uma resposta a um desafio oxidativo que ocorre já na hipóxia, e não somente na reoxigenação.

Entretanto, não há evidências diretas de aumento de produção de ROS em animais que aumentam suas capacidades antioxidantes durante a privação de O₂. Na verdade, as observações disponíveis apontam para uma queda da produção de ROS em três modelos animais tolerantes a hipóxia: tartarugas *Trachemys scripta* (Milton et al. 2007), platelmintos marinhos *Macrostomum ligano* (Rivera-Ingraham, Bickmeyer, e Abele 2013) e mexilhões *Mytilus edulis* (Rivera-Ingraham et al. 2013). Cabe ressaltar que algumas espécies não apresentam qualquer sinal de aumento de antioxidantes durante a hipóxia, mantendo (Leveelahti et al. 2014) ou reduzindo os níveis de antioxidantes (e.g. Olsvik et al. 2006; Garcia Sampaio et al. 2008; lista em Welker et al. 2013). Explicações alternativas para organismos que não apresentam o POS em resposta à privação de oxigênio incluem: altos níveis constitutivos de antioxidantes endógenos e potencial capacidade de controlar/evitar a produção de espécies reativas (Hermes-Lima e Zenteno-Savín 2002).

1.6 Justificativa e Objetivos

Apesar do grande número de estudos sobre o metabolismo redox de animais expostos à privação de oxigênio e a depressão metabólica publicados desde a concepção do fenômeno do POS, algumas questões fundamentais permanecem sem resposta. A primeira delas é: qual o sinal molecular que aciona os mecanismos bioquímicos de ativação de sistemas antioxidantes nestas situações? Dada a frequência em que é observado, o POS é uma resposta/estratégia universal de animais privados de oxigênio? Qual a distribuição desta estratégia no reino animal? Considerando que os relatos de ocorrência de POS são majoritariamente de animais em laboratório, o fenômeno do POS ocorre na natureza? Este trabalho aborda estas e outras questões ao investigar o mecanismo, distribuição e ocorrência do fenômeno do 'Preparo para o Estresse Oxidativo' no reino animal com os seguintes objetivos:

- Propor um modelo de acionamento de vias de ativação de sistemas antioxidantes (POS) em animais tolerantes a estresses de baixa de O₂ (hipóxia, anóxia, desidratação, congelamento, e exposição aérea de organismos com respiração aquática) e estivação.
- Desenvolver critérios de classificação de animais no âmbito do POS com base na resposta antioxidante durante a privação de O₂.

- Classificar espécies animais que tiveram seus antioxidantes endógenos aferidos em resposta à privação de oxigênio usando os critérios desenvolvidos
- Calcular a prevalência do fenômeno do POS em animais expostos a diferentes situações de limitação de O₂.
- Verificar a ocorrência do POS em duas espécies de anuros da Caatinga durante a estivação em condições naturais sem intervenção experimental.

Para atingir tais objetivos, são aqui discutidas adaptações bioquímicas de animais em resposta a privação de oxigênio e/ou depressão metabólica, com ênfase no papel de espécies reativas e antioxidantes. No **capítulo 1**, foram realizadas revisão da literatura e fundamentação teórica acerca da produção e o controle de espécies reativas de oxigênio, a manutenção do equilíbrio redox, as adaptações associadas às principais situações de privação de oxigênio e depressão metabólica, e, finalmente, do fenômeno do “preparo para o estresse oxidativo” (*‘preparation for oxidative stress’*, POS). No **capítulo 2**, é apresentado um modelo molecular detalhado para o acionamento do fenômeno do POS em condições de falta de oxigênio e estivação. No **capítulo 3**, foram estabelecidos critérios de classificação da resposta antioxidante em animais privados de oxigênio. Com base nesses critérios e na análise de mais de uma centena de publicações, dezenas de espécies animais foram categorizadas resultando em um mapa de distribuição do fenótipo do POS no reino animal. No **capítulo 4**, são analisados alterações do equilíbrio redox, níveis de marcadores de estresse oxidativo e a modulação de antioxidantes endógenos durante a estivação em duas espécies de anuros na natureza. Nos **capítulo 5 e 6**, são considerados os avanços, limitações e perspectivas referentes à pesquisa do fenômeno do POS, a saber, a ausência de evidência direta para suportar o modelo de acionamento do POS, a escassez de observações do fenômeno do POS em animais na natureza (comparadas com estudos de animais em laboratório) e a posição do POS na história evolutiva do reino animal.

2 CAPÍTULO 2 – MODELO MOLECULAR PARA O FENÔMENO DE PREPARO PARA O ESTRESSE OXIDATIVO

2.1 Resumo

Organismos tolerantes a variações amplas da disponibilidade de O_2 , especialmente à hipóxia, costumam lidar com condições ambientais desfavoráveis durante suas vidas. Tais condições incluem, por exemplo, a indisponibilidade de alimento e/ou água, baixas ou altas temperaturas, e a falta de oxigênio. Apesar da forte supressão da síntese de proteínas, muitos animais apresentam aumentos dos níveis de antioxidantes durante a privação de O_2 . Esta observação intrigou os pesquisadores por mais de 20 anos. Inicialmente, duas linhas de pensamento incompatíveis vigoravam: por um lado, a hipóxia causaria uma redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), por outro lado, a indução de sistemas antioxidantes requeria maiores níveis de ROS. A indução de antioxidantes endógenos durante a hipóxia foi interpretada como uma estratégia de preparo do organismo para lidar com o possível estresse oxidativo associado à reoxigenação. O termo “preparo para o estresse oxidativo” (POS) foi criado em 1998 com base em tal interpretação. Contudo, muitos animais tolerantes à falta de O_2 apresentam sinais de estresse oxidativo, antes da reoxigenação, ainda na fase de privação de oxigênio. Além disso, a ideia de que a produção de ROS estaria necessariamente reduzida durante a hipóxia foi contestada. Ao invés disso, dados da literatura apontam para uma maior produção de ROS em resposta à hipóxia. Recentemente, tornou-se possível propor uma explicação detalhada para a indução de antioxidantes em animais sob hipóxia. As evidências que suportam tal explicação, assim como suas limitações, são amplamente exploradas neste trabalho, onde são discutidos resultados de animais expostos à estivação e a situações de baixa de O_2 , incluindo a hipóxia, o congelamento, a desidratação e a exposição aérea de animais de respiração aquática. Propomos que, ao atingir um limiar, a privação de O_2 causa uma superprodução de ROS e induz respostas bioquímicas à hipóxia. As respostas seriam mediadas pela ativação de fatores de transcrição sensíveis a alterações redox (FoxO, Nrf2, HIF-1, NF- κ B e p53) e pelo acionamento de mecanismos pós-traducionais, resultando em defesas antioxidantes mais robustas. Adicionalmente, espécies reativas de nitrogênio podem modular a produção de ROS nesta situação. Concluímos o trabalho discutindo perspectivas para este campo de pesquisa e como

o maior entendimento dos mecanismos envolvidos no POS podem levar à elucidação de respostas fisiológicas de organismos a estresses ambientais.

2.2 Preparation for Oxidative Stress Under Hypoxia and Metabolic Depression: Revisiting the Proposal two Decades Later

Free Radical Biology and Medicine 89 (2015) 1122–1143



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed



Review Article

Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later



Marcelo Hermes-Lima ^{a,*}, Daniel C. Moreira ^{a,1}, Georgina A. Rivera-Ingraham ^b, Maximiliano Giraud-Billoud ^c, Thiago C. Genaro-Mattos ^{a,d}, Élide G. Campos ^a

^a Laboratório de Radicais Livres, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900, Brazil

^b Groupe Fonctionnel AEO (Adaptation Ecophysiologique et Ontogénèse), UMR 9190 MARBEC, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

^c Laboratorio de Fisiología (IHEM-CONICET), and Instituto de Fisiología (Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo), Casilla de Correo 33, 5500 Mendoza, Argentina

^d Laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2015

Received in revised form

11 July 2015

Accepted 25 July 2015

Available online 25 September 2015

Keywords:

Anoxia
Dehydration
Estivation
Freeze tolerance
Hypoxia tolerance
Ischemia

ABSTRACT

Organisms that tolerate wide variations in oxygen availability, especially to hypoxia, usually face harsh environmental conditions during their lives. Such conditions include, for example, lack of food and/or water, low or high temperatures, and reduced oxygen availability. In contrast to an expected strong suppression of protein synthesis, a great number of these animals present increased levels of antioxidant defenses during oxygen deprivation. These observations have puzzled researchers for more than 20 years. Initially, two predominant ideas seemed to be irreconcilable: on one hand, hypoxia would decrease reactive oxygen species (ROS) production, while on the other the induction of antioxidant enzymes would require the overproduction of ROS. This induction of antioxidant enzymes during hypoxia was viewed as a way to prepare animals for oxidative damage that may happen ultimately during reoxygenation. The term "preparation for oxidative stress" (POS) was coined in 1998 based on such premise. However, there are many cases of increased oxidative damage in several hypoxia-tolerant organisms under hypoxia. In addition, over the years, the idea of an assured decrease in ROS formation under hypoxia was challenged. Instead, several findings indicate that the production of ROS actually increases in response to hypoxia. Recently, it became possible to provide a comprehensive explanation for the induction of antioxidant enzymes under hypoxia. The supporting evidence and the limitations of the POS idea are extensively explored in this review as we discuss results from research on estivation and situations of low oxygen stress, such as hypoxia, freezing exposure, severe dehydration, and air exposure of water-breathing animals. We propose that, under some level of oxygen deprivation, ROS are over-produced and induce changes leading to hypoxic biochemical responses. These responses would occur mainly through the activation of specific transcription factors (FoxO, Nrf2, HIF-1, NF-κB, and p53) and post translational mechanisms, both mechanisms leading to enhanced antioxidant defenses. Moreover, reactive nitrogen species are candidate modulators of ROS generation in this scenario. We conclude by drawing out the future perspectives in this field of research, and how advances in the knowledge of the mechanisms involved in the POS strategy will offer new and innovative study scenarios of biological and physiological cellular responses to environmental stress.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	1123
2. Preparation for oxidative stress under low oxygenation	1126
3. Redox imbalance and oxidative stress under low oxygen stress and metabolic depression	1127

* Corresponding author.

E-mail addresses: hermes.unb@gmail.com, hermes@unb.br, m_hermes_lima@yahoo.com.br (M. Hermes-Lima).

¹ Marcelo Hermes-Lima and Daniel C. Moreira Contributed equally to this work

<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156>
0891-5849/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

3.1. Anoxia	1127
3.2. Hypoxia	1127
3.3. Air exposure	1130
3.4. Freezing and dehydration	1130
4. Estivation	1131
5. Mechanisms of ROS formation under hypoxia—Evidence in mammals and invertebrates	1132
6. Redox sensitive transcription factors and low oxygen stress	1133
7. Is there a role for post translational modifications of antioxidant enzymes during low oxygen stress?	1134
8. The role of reactive nitrogen species	1135
9. Lipid peroxidation and hypoxia studies	1136
9.1. Molecular mechanisms for increased lipid peroxidation under hypoxia	1136
9.2. Lipid peroxidation products as signaling molecules	1136
9.3. Challenges for lipid peroxidation measurements in comparative biology	1137
10. Conclusions, limitations, and perspectives	1137
10.1. Free radical formation under low oxygen stress and estivation produce redox imbalance and activate antioxidant defenses	1137
10.2. Limitations on the POS mechanistic proposal	1137
10.3. Historical perspective	1138
Acknowledgments	1138
References	1139

1. Introduction

Oxygen is essential for the majority of organisms on Earth. For most of them, oxygen restriction is highly deleterious. However, many animal species are able to survive long periods of oxygen deprivation, including a variety of invertebrates and vertebrates. In nature, oxygen deprivation ranges from mild hypoxia to complete anoxia [217]. Information on the physiological processes and biochemical mechanisms to cope with hypoxia, in special metabolic depression, has been amassed for the past 30–40 years, and several mechanisms have been unveiled [201]. One of the issues that have interested researchers since the 1990s is the role of free radicals in the process of natural hypoxia tolerance, and our aim is to discuss the interplay between reactive oxygen species and this process. Additional natural conditions that involve reduced oxygen delivery to organs, such as freezing stress and severe dehydration, will also be covered in this article.

One well-known mechanism used to survive low oxygen levels is the severe depression of the metabolic rate during oxygen deprivation in association with lower rates of ATP production via fermentative pathways. Such ability to severely slow down many energy-consuming pathways is a key strategy for survival. It includes reduction of key metabolic enzymes activities via post translational modifications, or via decreased transcription and/or translation. Changes in expression/activity of several kinases and phosphatases, transcription factors, and microRNAs participate in such responses [16,195,198,200]. Next, the modulation of free radical metabolism during oxygen deprivation in hypoxia-tolerant animals is presented.

In the early 1990s it was well established that ischemia and reperfusion episodes in mammalian organs elicited intense formation of reactive oxygen species (ROS) during the recirculation of oxygenated blood [237,238]. There were unequivocal evidences that increased formation of ROS during reperfusion was one of the key factors for cell damage under these conditions. Mitochondria were already recognized as the major source of excess ROS formation during reoxygenation. Based on the knowledge of ischemia/reperfusion injury it was reasonable to argue that hypoxia-tolerant animals would be adapted to endure the potential dangers of reoxygenation. At that time, it was hypothesized by one of us that these animals would rely on high levels of antioxidant defenses to control the effects of a putative overproduction of ROS during reoxygenation.

The first examination of this hypothesis was performed using

garter snakes *Thamnophis sirtalis parietalis*, which are naturally tolerant to anoxia for a few days, and freezing for several hours. The activities of garter snake antioxidant enzymes, such as catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), and glutathione S-transferase (GST) in liver, muscle, and lung were determined. Unexpectedly, garter snake enzyme activities (in tissues from control animals) were much lower than those reported, for example, in mice and rats. On the other hand, it was also unexpected that some of the activities increased during exposure to anoxia for 10 h at 5 °C or freezing for 5 h (with 40–50% of the total body water frozen at –2.5 °C) [80]. This increase was observed for SOD in muscle and liver from anoxia-exposed snakes, as well as for catalase in muscle and lung and for GPX in muscle from frozen animals. Under both conditions the increase in enzyme activities was higher than 100% (liver SOD and muscle GPX) when compared to controls. Moreover, levels of reduced glutathione (GSH) increased by about 1.6-fold in muscle of anoxia-exposed garter snakes [80].

In the light of these results, it was suggested that garter snakes activated their antioxidant defenses under conditions when ROS production would be low (freezing) or absent (anoxia). The reasoning at that time was that free radical formation would always be dependent on and directly proportional to oxygen availability. Thus, under the hypoxic condition of freezing oxygen radicals production would be low. This assumption hampered the understanding of how antioxidant defenses were being activated. In those days, it was already known that upregulation of genes for antioxidant defenses happens under oxidative stress conditions; i.e., rises in ROS formation should stimulate mechanisms that result in increased expression of antioxidant enzymes. Because garter snakes under anoxia or freezing would be under severe oxygen limitation, it was improbable (in 1990s) that ROS formation would increase under these conditions. Therefore, it was proposed that these snakes enhanced their antioxidant capacity in order to prepare them for a putative increase in ROS generation and oxidative stress during reoxygenation (i.e., increasing the defenses before oxidative stress). The conclusion of the study [80] was:

The antioxidant defenses are built when oxyradical formation is not likely to occur (under the frozen or anoxic condition) in anticipation of their need when the perfusion of oxygenated blood is reinitiated. A nonradical messenger must stimulate these enzyme systems at either transcriptional, translational, or posttranslational levels.

Since then, many studies reported that when hypoxia-tolerant

animals are exposed to low oxygen stress there is an increase in their antioxidant defense capacity [196,225,84,86]. Low oxygen stress situations include anoxia, hypoxia, freezing, severe dehydration, and aerial exposure of water-breathing animals. Estivation is another situation related to the adaptation to harsh environmental conditions (and, in the case of gastropods, decreased O₂ availability in tissues) in which endogenous antioxidants were found increased. In the late 1990s, this process was coined as “preparation for oxidative stress” (POS) [85].

Although there were growing evidences of increased antioxidant levels in animals under low oxygen stress (i.e., POS), a biochemical explanation on the molecular basis of this mechanism was still missing. The first observation of POS dates back to 1993 and only in 2005 the first attempt to explain the molecular mechanisms underlying antioxidant activation appeared in the literature [4]. The present work describes how we put together the puzzle about the POS mechanism and discuss a rationale for the understanding of this process.

Table 1
Activated antioxidant defenses in response to freezing, dehydration, and anoxia.

Common name	Species	Stress	Duration	Tissue	Antioxidant	Reference
Wood frog	<i>Rana sylvatica</i>	Freezing	24 h	Brain Heart Kidney Liver Muscle Muscle ^a	↑ GPX , GSH-eq, GSH ↑ SeGPX , GPX ↑ SeGPX , GPX ↑ GPX , GST ↑ SeGPX , GPX , GSH-eq, GSH ↑ CuZnSOD , phospho-MnSOD ^b	[101] [42]
Painted turtle	<i>Chrysemys picta marginata</i>	Freezing	5 h	Brain Gut	↑ GSTP1, GSTM1, GSTM3 ↑ GSTM3	[117]
Garter snake	<i>Thamnophis sirtalis parietalis</i>	Freezing	5 h	Lung Muscle	↑ CAT ↑ CAT , SeGPX	[80]
Eutardigrade	<i>Paramacrobrotus richtersi</i>	Dehydration	20 h	Whole body	↑ GPX , SOD , GSH-eq	[184]
Antarctic midge	<i>Belgica antarctica</i>	Dehydration	12 h	Whole body	↑ CAT , <i>MnSOD</i>	[128]
Leopard frog	<i>Rana pipiens</i>	Dehydration	90 h	Liver Muscle	↑ GPX ↑ CAT	[83]
African clawed frog	<i>Xenopus laevis</i>	Dehydration	162 h	Heart Kidney Liver Lung Muscle	↑ GSTP1 ↑ GSTK1, GSTA3, GSTT1 ↑ GSTP1 ↑ GSTM1, GSTM3, GSTA3 ↑ GSTM1, GSTM3, GSTK1, GSTT1	[135]
		Dehydration	6–7 days	Skin Liver Muscle	↑ GSTP1, GSTM1, GSTM3 ↑ <i>CAT</i> , <i>MnSOD</i> ↑ CAT	[136]
Marine worm	<i>Heteromastus filiformis</i>	Anoxia	6 h 24 h	Whole body Whole body	↑ CAT ↑ CAT	[1]
Pulmonate snail	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Anoxia	24 h	Hepatopancreas	↑ SeGPX	[58]
Common periwinkle	<i>Littorina littorea</i>	Anoxia	24 h	Hepatopancreas Muscle	↑ GSTT1 ↑ GSTS1, GSTT1	[202]
		Anoxia	6 days	Hepatopancreas Muscle	↑ GSH-eq, GSH ↑ GSH-eq	[164]
Long-lived bivalve ^b	<i>Arctica islandica</i>	Anoxia ^c	3.5 days	Gill	↑ GSH-eq	[167]
Midge	<i>Chironomus riparius</i>	Anoxia	24 h	Whole body	↑ CAT , GCL , GPX , GST	[60]
Caribbean fruit fly	<i>Anastrepha suspensa</i>	Anoxia	1 h	Whole body	↑ GPX , MnSOD	[127]
Estuarine crab	<i>Chasmagnathus granulata</i>	Anoxia	8 h	Gill	↑ CAT , GST	[44]
Striped barnacle	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	Anoxia	24 h	Whole body	↑ CAT , SOD	[46]
Subterranean amphipod	<i>Niphargus rhenorhodanensis</i>	Anoxia	24 h	Whole body	↑ GPX	[121]
Goldfish	<i>Carassius auratus</i>	Anoxia	8 h	Brain Liver Muscle	↑ GPX ↑ CAT ↑ SeGPX	[132]
Leopard frog	<i>Rana pipiens</i>	Anoxia	30 h	Brain Heart Muscle	↑ SeGPX ↑ CAT , SeGPX ↑ CAT	[82]
Red-eared slider	<i>Trachemys scripta elegans</i>	Anoxia	5 h 5 h 20 h	Liver Liver Liver	↑ <i>CuZnSOD</i> , <i>MnSOD</i> ↑ CAT ↑ GR	[118] [119] [228]
				Red muscle White muscle	↑ GR ↑ GRX , GS	
			20 h	Liver	↑ <i>CuZnSOD</i> , <i>MnSOD</i>	[118]
			9 days	Plasma	↑ GSH-eq	[99]
Garter snake	<i>Thamnophis sirtalis parietalis</i>	Anoxia	10 h	Liver Muscle	↑ SOD ↑ SOD , GSH-eq, GSH	[80]

Parameters in bold indicate maximal enzyme activity, parameters in italics indicate mRNA levels, underlined parameters indicate protein levels. Note that only increased levels of antioxidant parameters are reported. Even though it is not shown, there are cases in which other antioxidants levels may have been reduced or maintained in the same situation, species, or tissue. CAT, catalase; GCL, glutamate-cysteine ligase; GPX, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GRX, glutaredoxin; GS, glutathione synthase; GSH-eq, total glutathione levels (both reduced and disulfide forms); GSH, reduced glutathione; GST, glutathione transferase; SeGPX, selenium-dependent glutathione peroxidase (activity toward H₂O₂); SOD, superoxide dismutase.

^a Superoxide dismutases were first isolated from frog muscle and then assayed for activity. The phosphorylated form of MnSOD has more affinity for superoxide (i.e., lower *K_m*).

^b Quahogs from the German bight population.

^c In this study animals were exposed to two kinds of hypoxia, environmentally forced (nitrogen bubbling in water) or self-induced (shell closure). This result refers to self-induced anoxia.

Table 2
Activated antioxidant defenses in response to hypoxia and air exposure.

Common name	Species	Stress	Duration	Tissue	Antioxidant	Reference
Midge	<i>Chironomus riparius</i>	Hypoxia (1.6 mg O ₂ L ⁻¹)	24 h	Whole body	↑ GST, CuZnSOD, MnSOD	[32]
Freshwater clam	<i>Corbicula fluminea</i>	Hypoxia (15–25% O ₂ saturation)	48 h 5 days	Whole body Whole body	↑ MnSOD ↑ CAT, GST	[220]
Chinese scallop	<i>Chlamys farreri</i>	Hypoxia (2.66 mg O ₂ L ⁻¹) Hypoxia (4.57 mg O ₂ L ⁻¹)	12 h 12 h	Serum Serum	↑ SOD ↑ SOD	[28]
Mediterranean mussel	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Hypoxia (2.0 mg O ₂ L ⁻¹) Hypoxia (2.0 mg O ₂ L ⁻¹)	24 h 24 h	Gill Muscle	↑ CuZnSOD ↑ GST	[231] [230]
Pacific oyster	<i>Crassostrea gigas</i>	Hypoxia (30% O ₂ saturation)	48 h 7 days	Muscle Gill	↑ GST ↑ GPX	[39]
			7 days 14 days 14 days 14 days 21 days 21 days 21 days	Mantle Gill Hepatopancreas Mantle Gill Hepatopancreas Mantle	↑ GPX ↑ GPX ↑ GPX ↑ GPX ↑ GPX ↑ GPX ↑ GPX	
Disk abalone	<i>Haliotis discus discus</i>	Hypoxia ^a	1 h 2 h 4 h 8 h	Gill Gill Gill Gill	↑ <i>MnSOD, PRX</i> ↑ <i>SeGPX, MnSOD, PRX</i> ↑ <i>SeGPX, MnSOD</i> ↑ <i>SeGPX, MnSOD</i>	[45]
Striped barnacle	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	Hypoxia (1.0 mL O ₂ L ⁻¹) Hypoxia (0.5 mL O ₂ L ⁻¹)	24 h 24 h	Whole body Whole body	↑ CAT, SOD ↑ CAT, SOD	[46]
Baltic amphipod	<i>Monoporeia affinis</i>	Hypoxia (30–34% air saturation)	5–9 days	Whole body	↑ CAT, SOD	[69]
	<i>Monoporeia affinis</i> Reference sediment	Hypoxia (16–20% air saturation)	4 days	Whole body	↑ CAT, SOD	[70]
	<i>Monoporeia affinis</i> Contaminated sediment	Hypoxia (16–20% air saturation)	4 days	Whole body	↑ CAT, SOD	
Subterranean amphipod	<i>Niphargus rhenorhodanensis</i>	Hypoxia (22.70 μmol O ₂ L ⁻¹)	10 days	Whole body	↑ GPX	[121]
Whiteleg shrimp	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Hypoxia (1.0 mL O ₂ L ⁻¹) Hypoxia (1.5 mg O ₂ L ⁻¹) Hypoxia (4 kPa) Hypoxia (4 kPa) Hypercapnic	24 h 24 h 6 h 24 h 4 h 24 h	Hepatopancreas Muscle Gill Gill Hepatopancreas Hepatopancreas Hepatopancreas Hepatopancreas	↑ SOD ↑ SOD ↑ CAT ↑ CAT ↑ <i>MnSOD, GPX</i> ↑ <i>MnSOD</i> ↑ <i>MnSOD, GPX</i> ↑ <i>MnSOD</i>	[165] [212] [114]
Indian catfish	<i>Clarias batrachus</i>	Hypoxia (5.0–0.98 mg O ₂ L ⁻¹) Hypoxia (0.98 mg O ₂ L ⁻¹)	NS ^b 3 h ^b 6 h ^b 6 h ^b 6 h ^b 12 h ^b 12 h ^b	Gill Blood Gill Muscle Gill Muscle	↑ SOD ↑ CAT ↑ CAT ↑ CAT ↑ CAT ↑ CAT ↑ CAT	[213]
Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	Hypoxia (< 1.0 mg O ₂ L ⁻¹)	8 h ^c 8 h ^c 8 h ^c	Brain Gill Liver	↑ SOD ↑ SOD ↑ SOD	[221]
Characid fish	<i>Hyphessobrycon callistus</i>	Hypoxia (0.9 mg O ₂ L ⁻¹)	5.5 h	Brain	↑ CAT, SeGPX	[131]
Piapara fish	<i>Leporinus elongatus</i>	Hypoxia (≤ 1.0 mg O ₂ L ⁻¹) Hypoxia (1.92 mg O ₂ L ⁻¹)	10 min ^d 14 days 14 days	Serum Blood Liver	↑ GPX, SOD ↑ SOD, GSH, GSH-eq ↑ GPX, GST, SOD,	[163] [227]
		Hypoxia (3.91 mg O ₂ L ⁻¹)	7 days ^e 7 days ^e	Blood Liver	↑ GSH-eq ↑ GSH-eq	
Chinese sleeper	<i>Perccottus glenii</i>	Hypoxia (0.4 mg O ₂ L ⁻¹)	2 h 6 h 6 h 10 h 10 h	Muscle Liver Muscle Liver Muscle	↑ GST ↑ SOD, L-SH ↑ GST, L-SH ↑ L-SH ↑ L-SH	[130]
Gilthead sea bream	<i>Sparus aurata</i>	Hypoxia (2.8 mg O ₂ L ⁻¹) Hypoxia (18–19% O ₂ saturation)	3 h ^f 6 h ^f 1 h ^g	Liver Liver Plasma	↑ GR ↑ SeGPX ↑ TAC	[166] [13]
Silver catfish	<i>Rhamdia quelen</i>	Hypoxia (2.83 mg O ₂ L ⁻¹)	20 days	Gill	↑ CAT	[53]
Panama lanternfish	<i>Benthoosema panamense</i>	Hypoxia (≤ 1 kPa, OMZ)	– ^h	Whole body	↑ GST	[126]
Mexican lanternfish	<i>Triphoturus mexicanus</i>	Hypoxia (≤ 1 kPa, OMZ)	– ^h	Whole body	↑ CAT, GST	[188]
Mole rat	<i>Spalax judaei</i>	Hypoxia (6% O ₂)	5 h	Liver	↑ GST	[193]
				Harderian gland	↑ GR	[193]
Octocoral	<i>Veretillum cynomorium</i>	Air exposure	1.0 h 1.5 h	Whole body Whole body	↑ GST ↑ GST	[211]

Table 2 (continued)

Common name	Species	Stress	Duration	Tissue	Antioxidant	Reference
Brown mussel	<i>Perna perna</i>	Air exposure	2.0 h	Whole body	↑ CAT, GST	[2]
			2.5 h	Whole body	↑ GST	
			4 h	Hepatopancreas	↑ SOD	
			18 h	Hepatopancreas	↑ GST	
Crab	<i>Callinectes ornatus</i>	Air exposure	3 h	Muscle	↑ CAT, GPX	[63]
False king crab	<i>Paralomis granulosa</i>	Air exposure	3 h	Gill	↑ CAT	[185]
			3 h	Haemolymph	↑ CAT, SOD	
			3 h	Hepatopancreas	↑ SOD	
			6 h	Gill	↑ CAT, GST	
			6 h	Haemolymph	↑ SOD	
			6 h	Hepatopancreas	↑ SOD	
			6 h	Muscle	↑ CAT, SOD	
			12 h	Haemolymph	↑ SOD	
12 h	Hepatopancreas	↑ SOD				

Parameters in bold indicate maximal enzyme activity, parameters in italics indicate mRNA levels, underlined parameters indicate protein levels. Note that only increased levels of antioxidant parameters are reported. Even though it is not shown, there are cases in which other antioxidants levels may have been reduced or maintained in the same situation, species, or tissue. CAT, catalase; GPX, glutathione peroxidase; GSH-eq, total glutathione levels (both reduced and disulfide forms); GSH, reduced glutathione; GST, glutathione transferase; L-SH, low molecular mass thiols; PRX, peroxiredoxin; SeGPX, selenium-dependent glutathione peroxidase (activity toward H₂O₂); SOD, superoxide dismutase; TAC, total antioxidant capacity.

^a Hypoxia was achieved by stopping the aeration of the tank. Oxygen levels were not specified.

^b Tank aeration was stopped and by the consumption of O₂ by fish dissolved oxygen decreased from 5.0 to 0.98 mg O₂ L⁻¹. Once this oxygen level was achieved a group of animals was collected (NS). The rest of the fish were maintained under this hypoxic condition for 3, 6, and 12 h more.

^c Hypoxia was achieved by stopping the aeration of the tank. Oxygen concentration decreased from 5 to < 1 mg O₂ L⁻¹ within 1.25 h and was this concentration was kept for more 6.75 h.

^d Oxygen concentration decreased from 6.5 to < 1.0 mg O₂ L⁻¹ within 2.5 h and remained at < 1.0 mg O₂ L⁻¹ for an additional 10 min.

^e Fish were exposed first to 1.92 mg O₂ L⁻¹ for 14 days, then a group of fish were subsequently exposed to 3.91 mg O₂ L⁻¹ for 7 days more.

^f Water aeration was discontinued and within 1 h oxygen concentration reached 2.8 mg O₂ L⁻¹ (from 7.1 mg O₂ L⁻¹). Once 2.8 mg O₂ L⁻¹ was reached it was kept constant for 3 or 6 h more.

^g Hypoxia advanced gradually from > 85% to 18–19% O₂ saturation. Once 18–19% was reached, fish were kept in this condition for 1 h. Total exposure time was 11 h.

^h Fish captured at the oxygen minimum zone (OMZ; day time, 300–400 m, ≤ 1 kPa, 10 °C) compared to fish captured at the surface (night time, 40–50 m, 20 kPa., 20–25 °C).

2. Preparation for oxidative stress under low oxygenation

After the pioneering work on garter snakes [80] many studies reported that anoxia or hypoxia exposure in several other organisms induces increased activity or gene expression of antioxidant enzymes. Leopard frogs (*Rana pipiens*) under 30 h anoxia presented increased activities of catalase in muscle and heart, GPX in heart and brain, and GST in brain [82]. Goldfish (*Carassius auratus*) under anoxia showed increased GPX activity in brain and catalase activity in liver [132]. Crabs (*Chasmagnathus granulata*) under anoxia showed increased catalase and GST activities in both anterior and posterior gills [44]. Anoxia exposure for 6 days of the marine gastropod (*Littorina littorea*) caused an increase in GSH levels, although the activity of antioxidant enzymes was reduced [164]. Furthermore, pupae of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, presented higher GPX and MnSOD activities, while the activities of catalase and CuZnSOD remained unchanged in response to 1 h anoxia [127].

Similar results have been observed in several animals exposed to hypoxia. Common carps (*Cyprinus carpio*) under hypoxia for 5 h presented increased catalase and GPX activities in brain [131]. Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) under hypoxia (from 3 to 24 days) showed increased mRNA expression for GPX in mantle, gill, and hepatopancreas [39]. Moreover, microarray analysis of these oysters under hypoxia (for 20 days) also showed increased expression of peroxiredoxin-5 in hepatopancreas [206]. In the disc abalone, *Haliotis discus*, hypoxia for 8 h prompted increased expression (mRNAs) of MnSOD, SeGPX, catalase, and thioredoxin [45]. Exposure of amphipods *Monoporeia affinis* to hypoxia for 5 or 9 days induced a rise in the activities of catalase and SOD [69,70]. In a study with *Balanus amphitrite* barnacles under anoxia, severe hypoxia and mild hypoxia (24 h) resulted in a sharp increase in catalase and SOD activities in larvae and adults [46]. In another

crustacean, the shrimp *Litopenaeus vannamei*, hypoxia exposure for 4 h elicited an upregulation of the genes coding for GPX, cytoplasmic MnSOD, and peptide-methionine (R)-S-oxide reductase [114]. The later enzyme participates in the repair of oxidatively damaged proteins, specifically methionyl residues. In the case of the subterranean amphipod *Niphargus rhenorhodanensis*, an increase in GPX activity was observed after exposure to either anoxia (24 h) or hypoxia (10 days) [121]. Other cases of increased antioxidant levels in response to anoxia or hypoxia are presented in Tables 1 and 2.

In addition to hypoxia/anoxia, other conditions are also related to functional low oxygenation, such as freezing stress, severe dehydration, and aerial exposure of water-breathing animals. We and other authors observed that leopard frogs under dehydration [83], wood frogs, garter snakes and turtle hatchlings under freezing [118,80,101], and crabs and bivalves under aerial exposure [185,2,63] presented increased activities of antioxidant enzymes. The endogenous antioxidants that were found to be increased in response to freezing, dehydration or air exposure are presented in Tables 1 and 2.

In the majority of the studies the enhancement of antioxidant defenses was regarded as an important adaptation to deal with the recovery/reoxygenation phase from oxygen restriction, in which a sharp ROS overproduction is expected to occur. The trigger to such response, however, was unknown and few attempts were made to explain at the molecular level this phenomenon. If one looks closely, there are clues that indicate a putative trigger to the increase in endogenous antioxidant. These clues are the observations of altered redox balance and increased oxidative stress during low oxygen stress discussed in the next section.

Not all animals respond to oxygen restriction by increasing activity/expression of endogenous antioxidants. Examples are salamanders under anoxia exposure [98], three fish species under

hypoxia [122], golden gall fly larvae exposed to freezing [102], and in the fish *Heteropneustes fossilis* exposed to air exposure [161,162]. Thus, as noted in previous works [84,86], the process of POS is not a universal adaptive mechanism in animals for dealing with the stress of low oxygenation. However, POS is present in a great number of species that evolved under the pressure of low oxygen stress.

3. Redox imbalance and oxidative stress under low oxygen stress and metabolic depression

Following the proposal that a “nonradical” messenger would trigger the activation of endogenous antioxidant defenses [80] (Fig. 1), there were many observations indicating oxidative stress and/or a redox imbalance during low oxygen stress and estivation. The most relevant examples are discussed below for studies on the stresses of anoxia, hypoxia, freezing, severe dehydration, aerial-exposure of aquatic animals, and estivation.

3.1. Anoxia

A 1990s study on the free radical metabolism in leopard frogs (*R. pipiens*) under anoxia indicated that levels of disulfide glutathione (GSSG) were increased in muscle and liver after 30 h anoxia exposure [82]. Moreover, the ratio GSSG:GSH-eq was also increased in muscle after 30 h anoxia and in liver at 10 and 30 h of anoxia, followed by a decrease in the GSSG:GSH-eq ratio during recovery. The elevation in this ratio was indicative of redox imbalance, indicating that GSSG accumulation occurred at 10 and 30 h anoxia. These results were interpreted as a consequence of diminished capacity of anoxic frogs to recycle GSSG, possibly by a reduction in the carbon flux via the pentose pathway, that provides NADPH for glutathione reductase-catalyzed reactions. However, such interpretation did not explain why GSH was still being oxidized under anoxia.

Indeed, in the earlier garter snake study ([80]), it was observed that GSSG levels increased in muscle from animals exposed to

Low Oxygen Stress - The Old Interpretation

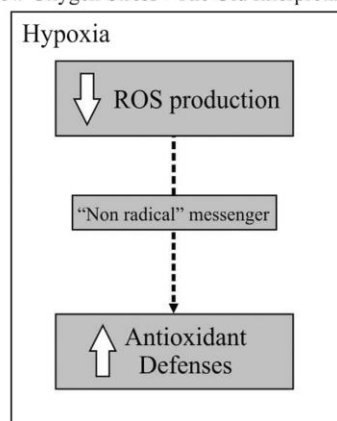


Fig. 1. The old explanation of how endogenous antioxidants would become enhanced in animals exposed to low oxygen stress. Because the formation of reactive oxygen species was expected to decrease during oxygen deprivation, a “nonradical messenger” would be responsible for the activation of antioxidants. This explanation was first published in a study with garter snakes exposed to freezing and anoxia stresses [80] and then referred to by many works in the comparative biology field.

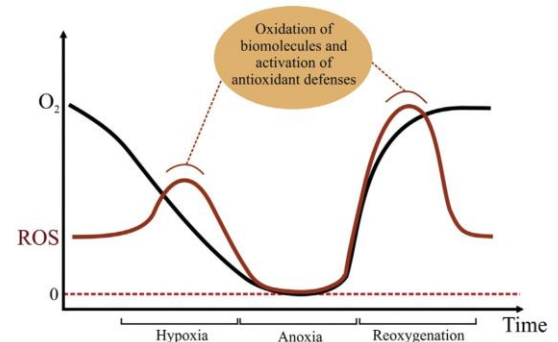


Fig. 2. Current view of how changes in oxygen availability and ROS levels would modulate the preparation for oxidative stress. As oxygen concentration declines from normoxia to anoxia, cellular hypoxia occurs. At some point during the hypoxic phase, mitochondrial ROS formation increases temporarily. During reoxygenation, as oxygen concentration rises from anoxia to normoxia (reoxygenation) ROS formation also increases. In both moments, increased ROS levels are expected to cause oxidative damage and activate antioxidant defenses. Thus, ROS are the signaling molecules involved in the preparation for oxidative stress. This figure was based on Welker et al. [225] and on references therein. Note that this figure has no quantitative meaning; it is just an illustrative expression of how ROS generation would behave during hypoxia/anoxia exposure. Moreover, we cannot predict the specific pO_2 where the burst of ROS should happen—this should vary considerably within the many animal species that are tolerant to low oxygenation.

anoxia for 10 h, but not in liver and lung. This was explained as a consequence of the elevation in total glutathione under anoxia. This increase was possibly due to activation of GSH biosynthesis, because the GSSG:GSH-eq ratio was maintained and levels of GSH increased under anoxia in muscle. This interpretation, however, failed to explain why oxidation of GSH to GSSG increased under anoxia. Oxidation of GSH by GPX-catalyzed reaction requires H_2O_2 or other hydroperoxides. How would hydroperoxides still be available (or formed) in muscle tissue after 10 h under anoxia? Other intriguing observations were made in a study with marine gastropods *Littorina littorea* under anoxia ([164]) showing that lipid peroxidation (determined by two different methods) increased in foot muscle after 6 days anoxia, returning to control levels following recovery. No explanation could be given as to how lipids would undergo peroxidation under anoxia. Recently, it was suggested that there might be an increase in mitochondrial ROS formation during the hypoxic phase that preceded full anoxia ([225]). Fig. 2 shows a proposed connection between ROS formation under anoxia/hypoxia exposure and the activation of endogenous antioxidant defenses.

In addition, a Brazilian study with crabs (*C. granulata*) under 8 h anoxia showed an increase in lipid peroxidation in hepatopancreas [43]. Lipid peroxidation was determined by two methods (conjugated dienes and TBARS) and in both methods the levels increased after 8 h anoxia and diminished on recovery. The authors explained this by the presence of residual O_2 in the internal tissues after exposure to anoxia, which could trigger ROS formation. However, the general view in those days was that under hypoxia there would be less ROS formation. As discussed in more detail in the following sections, since the late 1990s there are amounting evidences for increased ROS formation, at least in mammalian cells, under hypoxia.

3.2. Hypoxia

A Ukrainian study with carps exposed to hypoxia reported an increase in liver lipid peroxidation, determined as TBARS, while no

Table 3
Activated antioxidant defenses in response to estivation.

Common name	Species	Stress	Duration	Tissue	Antioxidant	Reference
Giant African snail	<i>Achatina fulica</i>	Estivation ^a	28 days	Muscle	↑ CuZnSOD	[187]
Freshwater snail	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Estivation ^a	15 days	Hepatopancreas	↑ SeGPX	[58]
Land snail	<i>Helix aspersa</i>	Estivation ^b	15 days	Hepatopancreas	↑ SeGPX, GST	[174]
		Estivation ^c	20 days	Hepatopancreas	↑ SeGPX, GSH-eq	
		Winter		Muscle	↑ SeGPX	[175]
		Estivation ^a	20 days	Hepatopancreas	↑ SeGPX	
Land snail	<i>Helix pomatia</i>	Summer		Muscle	↑ GSH-eq	[155]
		Estivation ^d Spring	21 days	Muscle	↑ SeGPX, GPX	
		Estivation ^b	21 days	Kidney	↑ SeGPX, GPX	[156]
		Spring		Muscle	↑ SeGPX, GPX	
		Torpor ^b	–	Hepatopancreas	↑ CAT, GST	[153]
		Spring		Kidney	↑ CAT	
		Torpor ^b Autumn	–	Hepatopancreas	↑ GST	[154]
		Torpor ^b	–	Hepatopancreas	↑ CAT, GR, GST	
		Winter		Kidney	↑ CAT	[81]
		Estivation ^b	21 days	Muscle	↑ GPX	
Land snail	<i>Otala lactea</i>	Estivation ^c	21 days	Hepatopancreas	↑ GST	[153]
		Estivation ^a	30 days	Muscle	↑ SeGPX	[154]
		Estivation ^a	30 days	Hepatopancreas	↑ SeGPX, SOD	[81]
Apple snail	<i>Pomacea canaliculata</i>	Estivation ^b	30 days	Muscle	↑ CAT, GST, SOD	[203]
		Estivation ^b	45 days	Hepatopancreas	↑ CAT, PRX1	
		Estivation ^b	45 days	Soft tissues	↑ Uric acid	[65]
		Estivation ^b	45 days	Hepatopancreas	↑ Uric acid	[66]
African lungfish	<i>Protopterus dolloi</i>	Estivation ^a	45 days	Kidney	↑ Uric acid	[160]
		Estivation ^b	60 days	Kidney	↑ Uric acid	
		Estivation ^b	60 days	Brain	↑ CAT, SeGPX, GR, CuZnSOD, MnSOD	
African lungfish	<i>Protopterus annectens</i>	Estivation ^b	6 days	Heart	↑ CAT, SeGPX	[125]
		Estivation ^b	6 days	Liver	↑ GSTM	
		Estivation ^b	180 days	Brain	↑ Asc, tAsc	[30]
Spadefot toad	<i>Scaphiopus couchii</i>	Estivation ^b	60 days	Brain	↑ SOD1	[90]
		Estivation ^d	60 days	Kidney	↑ CAT, SeGPX	[73]
Striped burrowing frog	<i>Cyclorana alboguttata</i>	Estivation ^b	180 days	Liver	↑ SOD	[234]
		Estivation ^b	180 days	Muscle	↑ GPX, SOD	
		Estivation ^b	120 days	Gastrocnemius	↑ Mit-SSC	[179]
		Estivation ^b	120 days	Iliofibularis	↑ Cyt-SSC, mit-SSC	
		Estivation ^b	120 days	Gastrocnemius	↑ GCL, GSTO2, Srxn1	

Parameters in bold indicate maximal enzyme activity, parameters in italics indicate mRNA levels, underlined parameters indicate protein levels. Note that only increased levels of antioxidant parameters are reported. Even though it is not shown, there are cases in which other antioxidants levels may have been reduced or maintained in the same situation, species, or tissue. Asc, ascorbic acid; CAT, catalase; cyt-SSC, cytosolic superoxide scavenging activity; GCL, glutamate-cysteine ligase; GPX, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH-eq, total glutathione levels (both reduced and disulfide forms); GST, glutathione transferase; mit-SSC, mitochondrial superoxide scavenging activity; PRX, peroxiredoxin; SeGPX, selenium-dependent glutathione peroxidase (activity toward H₂O₂); SOD, superoxide dismutase; Srxn, sulfiredoxin; tAsc, total ascorbic acid (ascorbic acid + dehydroascorbic acid).

^a Estivating animals versus 24 h aroused animals.

^b Estivating animals versus control active animals.

^c Estivating animals versus outdoor control group.

^d Estivating animals versus 10 days aroused animals.

changes were observed in brain, kidney, and muscle [131]. At that time, it was expected that low oxygenation would cause a decrease or no change in lipid peroxidation, since it was assumed that ROS formation would be lower. In fact, levels of lipid peroxides (measured as cumene hydroperoxide equivalents by the xylenol orange method), initial products of peroxidation, decreased in carp liver and brain under hypoxia [131]. Based on these findings, the authors speculated that nonradical molecules would be responsible for the activation of antioxidants [129]. However, in their next publication, an increase in oxidative stress markers was observed in rotan fish *P. glenii* exposed to hypoxia [130]. Protein oxidation (as carbonyl protein) increased in brain, liver, and muscle after 2 to 6 h of hypoxia exposure. Lipid peroxides concentration also increased in brain and liver after 2 h of hypoxia. Based on such findings, the authors suggested that mitochondrial ROS production could be increased under hypoxia [130]. This series of publications by Lushchak et al. illustrates the transition from the idea of a nonradical messenger (Fig. 1) to the current view of increased ROS production during oxygen deprivation that the field has gone through (Fig. 2).

An interesting study by UK researchers showed that erythrocytes from carps exposed to hypoxia for 30 days present similar levels of DNA damage when compared to carps exposed to hyperoxia [149]. This result was obtained using three different protocols of the comet assay. It is well known that hyperoxia induces ROS formation and oxidative stress; therefore the authors concluded that ROS formation also increased under hypoxia, possibly by “electron scape” from the mitochondrial respiratory chain. Therefore, fish oxidative stress would result from either excess or diminished oxygen availability. Since 2007–2008, researchers, in general, studying hypoxia-tolerant animals began to be aware of the possibility of increased mitochondrial ROS formation under hypoxia (see [14]).

A study with two species of subterranean mole rats (*Spalax galili* and *S. judaei*) revealed that these hypoxia-tolerant species have increased constitutive expression levels (mRNA) of many genes related to antioxidant protection when compared to laboratory rats [188]. This observation was interpreted as a way to counteract the effects of ROS formation under hypoxia: “The permanent subterranean lifestyle of *Spalax* most probably requires

Table 4
Increased levels of oxidative stress markers in animals during estivation or exposed to low oxygen stress.

Common name	Species	Stress	Duration	Tissue	Oxidative stress marker	Reference
Intertidal blue mussel	<i>Mytilus edulis</i>	Hypoxia (< 0.6% air saturation)	48 h	Gill	↑ PC	[183]
Mediterranean mussel	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Hypoxia (2.0 mg O ₂ L ⁻¹)	24 h	Muscle	↑ TBARS	[230]
			48 h	Muscle	↑ TBARS	
Antarctic clam	<i>Laternula elliptica</i>	Hypoxia (2 kPa)	16 days	Gill	↑ PC	[36]
South African abalone	<i>Haliotis midae</i>	Hypoxia (6.74 mg O ₂ L ⁻¹)	30 days	Haemocytes	↑ Tail DNA	[223]
Baltic amphipod	<i>Monoporeia affinis</i>	Hypoxia (30–34% air saturation)	5–9 days	Whole body	↑ TBARS	[69]
	<i>Monoporeia affinis</i>	Contaminated sediment	4 days	Whole body	↑ GSSG(%), TBARS	[70]
Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	Hypoxia (0.9 mg O ₂ L ⁻¹)	5.5 h	Liver	↑ TBARS	[131]
		Hypoxia (1.8 mg O ₂ L ⁻¹)	30 days	Erythrocytes	↑ Tail DNA	[149]
Longsnout seahorse	<i>Hippocampus reidi</i>	Hypoxia (1.5 mg O ₂ L ⁻¹)	8 h	Erythrocytes	↑ Tail DNA	[150]
Piapara fish	<i>Leporinus elongatus</i>	Hypoxia (1.92 mg O ₂ L ⁻¹)	14 days	Blood	↑ GSSG	[227]
			14 days	Liver	↑ GSSG, TBARS	
		Hypoxia (3.91 mg O ₂ L ⁻¹)	7 days ^a	Blood	↑ GSSG	
			7 days ^a	Liver	↑ GSSG	
Chinese sleeper	<i>Perccottus glenii</i>	Hypoxia (0.4 mg O ₂ L ⁻¹)	2 h	Brain	↑ LOOH	[130]
			2 h	Liver	↑ LOOH, PC	
			6 h	Brain	↑ PC	
			6 h	Liver	↑ LOOH, PC	
			6 h	Muscle	↑ PC	
			10 h	Brain	↑ PC, TBARS	
			10 h	Liver	↑ PC	
			10 h	Muscle	↑ PC	
Gilthead sea bream	<i>Sparus aurata</i>	Hypoxia (2.8 mg O ₂ L ⁻¹)	6 h ^b	Liver	↑ TBARS	[166]
Brown mussel	<i>Perna perna</i>	Air exposure	24 h	Gill	↑ 8-oxodGuo, TBARS	[4]
			24 h	Hepatopancreas	↑ TBARS	
False king crab	<i>Paralomis granulosa</i>	Air exposure	3 h	Gill	↑ PC	[185]
			6 h	Gill	↑ PC	
			6 h	Hepatopancreas	↑ LOOH	
			12 h	Gill	↑ PC	
			12 h	Hepatopancreas	↑ LOOH	
			24 h	Gill	↑ PC	
			24 h	Hepatopancreas	↑ LOOH	
			24 h	Muscle	↑ LOOH	
Asian catfish	<i>Heteropneustes fossilis</i>	Air exposure	3 h	Brain	↑ PC, TBARS	[161]
			6 h	Brain	↑ PC, TBARS, H ₂ O ₂	
			12 h	Brain	↑ PC, TBARS, H ₂ O ₂	
			18 h	Brain	↑ PC, TBARS, H ₂ O ₂	
			3 h	Muscle	↑ TBARS, H ₂ O ₂	[162]
			6 h	Muscle	↑ PC, TBARS, H ₂ O ₂	
			12 h	Muscle	↑ PC, TBARS, H ₂ O ₂	
			18 h	Muscle	↑ PC, TBARS, H ₂ O ₂	
Goldenrod gall fly	<i>Eurosta solidaginis</i>	Freezing	24 h	Whole body	↑ GSSG, GSSG(%)	[102]
Wood frog	<i>Rana sylvatica</i>	Freezing	24 h	Brain	↑ GSSG, GSSG(%)	[101]
				Kidney	↑ GSSG, GSSG(%)	
Leopard frog	<i>Rana pipiens</i>	Dehydration	90 h	Liver	↑ GSSG, GSSG(%)	[83]
Common periwinkle	<i>Littorina littorea</i>	Anoxia	6 days	Hepatopancreas	↑ GSSG	[164]
				Muscle	↑ CD, LOOH	
Estuarine crab	<i>Chasmagnathus granulata</i>	Anoxia	8 h	Hepatopancreas	↑ CD, TBARS	[43]
Leopard frog	<i>Rana pipiens</i>	Anoxia	30 h	Liver	↑ GSSG, GSSG(%)	[82]
				Muscle	↑ GSSG, GSSG(%)	
Red-eared slider	<i>Trachemys scripta elegans</i>	Anoxia	20 h	Liver	↑ GSSG, GSSG(%)	[228]
Garter snake	<i>Thamnophis sirtalis parietalis</i>	Anoxia	10 h	Muscle	↑ GSSG	[80]
Land snail	<i>Helix aspersa</i>	Estivation ^c	20 days	Hepatopancreas	↑ GSSG, LOOH, TBARS	[174]
		Winter		Muscle	↑ PC	
Land snail	<i>Helix pomatia</i>	Torpor ^d Autumn	–	Kidney	↑ TBARS	[156]
		Torpor ^d Winter	–	Muscle	↑ TBARS	
Land snail	<i>Otala lactea</i>	Estivation ^c	30 days	Hepatopancreas	↑ GSSG, GSSG(%)	[81]
			30 days	Muscle	↑ GSSG, GSSG(%)	
Apple snail	<i>Pomacea canaliculata</i>	Estivation ^d	45 days	Soft tissues	↑ TBARS	[65]
		Estivation ^d	45 days	Kidney	↑ TBARS	[66]
		Estivation ^c	45 days	Kidney	↑ TBARS	
				Muscle	↑ TBARS	
African lungfish	<i>Protopterus dolloi</i>	Estivation ^d	60 days	Brain	↑ Nitrotyrosine	[160]
Striped burrowing frog	<i>Cyclorana alboguttata</i>	Estivation ^d	180 days	Iliofibularis	↑ PC	[234]
Spadefot toad	<i>Scaphiopus couchii</i>	Estivation ^d	60 days	Gut	↑ CD, GSSG, GSSG(%)	[73]

Table 4 (continued)

Common name	Species	Stress	Duration	Tissue	Oxidative stress marker	Reference
				Heart	↑ CD, GSSG, GSSG(%)	
				Kidney	↑ CD, GSSG(%)	
				Liver	↑ CD, GSSG(%), LOOH	
				Lung	↑ GSSG(%)	
				Muscle	↑ CD, LOOH	

Note that only increased levels of oxidative stress markers are reported. Even though it is not shown, there are cases in which other oxidative stress markers levels may have been reduced or maintained in the same situation, species, or tissue. 8-oxodGuo, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; CD, conjugated dienes; GSSG(%), ratio between disulfide glutathione and the total pool of glutathione; GSSG, disulfide glutathione; LOOH, lipid hydroperoxides; PC, protein carbonyl; Tail DNA, DNA damage assessed by the COMET method; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

^a Fish were exposed first to 1.92 mg O₂ L⁻¹ for 14 days, then a group of fish were subsequently exposed to 3.91 mg O₂ L⁻¹ for 7 days more.

^b Water aeration was discontinued and within 1 h oxygen concentration reached 2.8 mg O₂ L⁻¹ (from 7.1 mg O₂ L⁻¹). Once 2.8 mg O₂ L⁻¹ was reached it was kept constant for 3 or 6 h more.

^c Estivating animals versus 24 h aroused animals.

^d Estivating animals versus control active animals.

constant protection against hypoxia-generated ROS injury. If O₂ tension suddenly drops even more, e.g. by flooding of the soil in the rainy season (Shams et al., 2005), immediate prophylactic protection by high antioxidant levels is required" [188]. As far as we know, this is the first study in comparative biology to treat increased ROS formation during hypoxia as an assured phenomenon. Accordingly, the idea that mitochondrial ROS formation is increased under hypoxia in mammalian cells is presented in the 2008 edition of the Lenhinger textbook.

3.3. Air exposure

Aerial exposure of aquatic animals, that causes functional hypoxia to internal tissues, has been the subject of many studies [64]. Many water-breathing sessile animals are periodically subjected to air exposure as a consequence of tidal height variations. In this context, bivalves compose a group of extensively studied animals. Mussels *Perna* exposed to air for 18 h showed 1.5-fold increase in hepatopancreas GST activity [4]. Moreover, when the same species was exposed to air for 24 h increased lipid peroxidation (as TBARS) in gills and hepatopancreas was observed. They also had increased DNA damage in gills measured as levels of 8-oxodGuo [4]. The authors originally proposed the idea (quoted below) that increased mitochondrial ROS formation during hypoxia would modulate antioxidant defenses in mussels. This was the first biochemical explanation by which the POS process functions and was also discussed in following publications [3,5].

The decrease in cytochrome oxidase V_{max} during hypoxia is responsible for an increase in mitochondrial redox state (Chandel and Schumacker, 2000), which, in turn, accelerates ROS generation during hypoxia, triggering the activation of different transcriptional factors involved in numerous cellular hypoxia responses. Despite its modulator effect, such increase in ROS production would be also accounted for increases in lipid and DNA damage in cells.

As in mussels, stone crabs *Paralomis granulosa* exposed to air for 3 to 24 h presented increased protein oxidation in gills, measured as carbonyl protein, while no changes happen in muscle or hepatopancreas [185]. Moreover, lipid peroxidation, determined as levels of lipid peroxides, increases in muscle and hepatopancreas after 6 to 24 h of aerial exposure. This indication of increased ROS formation could be a trigger for regulation of several antioxidant enzymes in the tissues of *P. granulosa*.

In cnidarians, the air exposure of corals *Veretillum cynomorium* for 2.5 h resulted in no change in TBARS levels, but a sharp

increase (by 10-fold) in TBARS levels occurs after 30 min re-immersion [211]. Catalase and GST activities increased during air exposure, and SOD activity shows no changes. Interesting, catalase and GST activities returned to control levels on reimmersion, while SOD activity increased on reimmersion. Despite a probable ROS overgeneration on return to water, an increase in ROS of smaller magnitude may have happened under air exposure, inducing catalase and GST without an increase in oxidative damage.

3.4. Freezing and dehydration

In the mid-1990s, a Canadian study [101] described the alterations in the redox metabolism in a cycle of freeze and thaw in the wood frog *R. sylvatica*. The main observation was the increase in GPX activity in several tissues (muscle, liver, kidney, brain, and heart) after 24 h of freezing exposure at -2.5 °C. Overall lipid peroxidation levels (determined as TBARS and total lipid peroxides) remained stable in all tested tissues after thawing (30 min, 90 min, and 4 h). Moreover, GSSG levels remained stable after 24 h thawing in five tissues. It was concluded that thawing would cause no oxidative stress because tissues had increased antioxidant capacity during freezing, in a way to prepare tissues for potentially deleterious effects of ROS. This was in agreement with previous observations in garter snakes under freezing stress [80]. However, a couple of observations indicated a redox imbalance in kidney and brain during freezing in wood frogs: the increase in GSSG levels and GSSG:GSH-eq ratio. These changes were not observed in muscle, liver, and heart. The unexpected increases in GSSG and GSSG:GSH-eq ratio were interpreted by the authors as a consequence of reduced capacity (due to hypometabolism) for glutathione recycling [101], the same explanation presented in the study with leopard frogs under anoxia [82]. Alternatively, we can currently consider that an increase in ROS formation during freezing could cause GSH oxidation to GSSG in the two frog organs (kidney and brain), even though this was unable to induce lipid peroxidation.

Severe dehydration is a condition that resembles the effect of freezing on internal organs. Dehydration-tolerant anurans may endure up to 60% loss of body water. The consequences of this condition are reduced blood volume and increased blood viscosity, which induces a severe loss in aerobic cardiovascular capacity, including a decline in pulse rate and oxygen consumption. Therefore, internal organs become hypoxic during severe dehydration. Restoration of body fluids in dehydrated anurans is comparable to reoxygenation/reperfusion, in which an increase in ROS formation would be expected [84,86].

The observed increase in the activity of antioxidant enzymes in liver and muscle (and levels of hepatic GSH) during severe dehydration (50% body water loss) in leopard frogs was considered a

preventive process to counteract the effects of ROS during rehydration [83]. As in the case of freezing, ROS formation was supposed to be decreased only during dehydration, due to the hypoxic/ischemic condition. However, levels of GSSG in liver, as well as the GSSG:GSH ratio, increased during dehydration by 80–90%. These results were regarded as a failure in the GSSG recycling mechanism, as in the case of wood frogs under freezing or leopard frogs under anoxia. On the other hand, this redox imbalance in liver could be (from the current point of view) a sign for increased ROS formation during severe dehydration.

In summary, there is a wide range of species that had signs of redox imbalance and increased levels of oxidative markers when exposed to low oxygen stress (anoxia, hypoxia, air exposure, freezing, and dehydration). In most cases, these observations were somehow unexpected due to the lack of O₂ availability. Thus, due to the assumption of an assured reduction of ROS formation during oxygen restriction, the perturbations in redox balance parameters as well as the increases in oxidative stress markers (Table 4) were left without explanation or explained by “nonradical” hypotheses. It was not until 2005 [4] that an explanation different from the idea of a “nonradical” messenger was made and set the base for a more comprehensive explanation of the POS.

4. Estivation

Another adaptation to stressful environmental conditions that is related to modulation of the antioxidant capacity is estivation in snails, fish, and anurans. Estivating land snails *O. lactea* deeply depress their metabolic rate and continue to rely on aerobic catabolism. As a result of the dormancy phenotype, oxygen partial pressure decreases in the hemolymph of estivating snails [9]. Thus, mitochondrial respiratory chain may function at “low speed” due to restricted provision of NADH and/or FADH₂ in a hypoxic intracellular environment. Therefore, in the mid-1990s, it was considered that mitochondrial ROS formation would be low under estivation [85]. On the other hand, there is a bout in oxygen consumption [88] that could increase mitochondrial ROS formation and oxidative stress during early moments of arousal.

The activities of several antioxidant enzymes in *O. lactea* increase after 30 days estivation [81]. This occurs with total SOD and GPX in hepatopancreas and total SOD, catalase, and GST in foot muscle, which could be a preparatory mechanism to control oxidative stress during arousal. Moreover, lipid peroxidation (as TBARS) increased in hepatopancreas during the first minutes of arousal. It was suggested that the enhanced antioxidant capacity during estivation functioned in a way to minimize such oxidative stress during arousal (few years after this study, the concept of “preparation for oxidative stress” was proposed [85]).

This adaptive mechanism was also reported for land snails *Helix aspersa*, because GPX activity increased in hepatopancreas and foot muscle (by 2- to 3-fold) during 20-day estivation [174]. Levels of GSH increased during estivation in hepatopancreas, but not in foot muscle, suggesting that GSH biosynthesis increases during snail estivation. Furthermore, the GSSG:GSH-eq ratio increased in hepatopancreas during the first moments of arousal, indicating that arousal promotes redox imbalance. Levels of TBARS did rise in hepatopancreas when comparing snails active for 5 min versus 30 min. The increase in GSH and GPX levels was regarded as an adaptation to minimize oxidative stress just during arousal, but not during estivation. The same conclusion was made for a study on estivation of the aquatic snail *Biomphalaria tenagophila* in which an increase in GPX activity occurred at 15 days estivation [58].

It was proposed in the studies cited above that during estivation ROS production would be decreased, and that an alternative “non-radical” mechanism would activate antioxidant defenses. However,

when reexamining these studies, a number of evidences indicate that ROS formation increases in estivating snails, compared to active snails. In the case of *O. lactea*, the increase in GSSG levels in hepatopancreas and foot muscle and the increase in GSSG:GSH ratio in foot muscle alone during estivation [81] are evidences of a redox imbalance. The hypoxic condition in between breaths in *O. lactea*, as well as the increase in oxygen input during breaths, could increase mitochondrial ROS formation during estivation.

In the case of *H. aspersa*, there is clear evidence for increased ROS formation and consequent oxidative stress during estivation, even though this was not concluded in the original article. When compared to aroused active snails, estivating animals had increased TBARS and lipid peroxides levels in hepatopancreas, increased carbonyl protein levels in foot muscle, and increased GSSG concentration in hepatopancreas [174]. These findings strongly suggest that oxidative stress increases during 20-day winter estivation in *H. aspersa*. No changes in markers of oxidative stress and redox balance happened in summer estivation in this snail species [175].

In addition, a Polish study on *Helix pomatia* revealed an increase in lipid peroxidation (determined as TBARS) in muscle and kidney, but not in hepatopancreas, during winter torpor. Moreover, these land snails increase their enzymatic antioxidant activities, especially catalase and glutathione-related enzymes during torpor [156]. The results obtained with *H. pomatia* in the field roughly agree with those from estivating *O. lactea* and *H. aspersa* performed in the laboratory.

The upregulation of antioxidant proteins, such as catalase and thioredoxin peroxidase, as well as some chaperones (small heat shock protein and protein disulfide isomerase), was also reported in the freshwater apple snail *Pomacea canaliculata* after 30 days of estivation [203]. Furthermore, other authors also found increased TBARS concentration in total soft tissue or in foot and kidney, indicating oxidative stress in apple snails after 45 days of estivation at 23–25 °C [65,66]. Under these conditions uric acid was possibly used as nonenzymatic antioxidant in hepatopancreas and kidney [66]. Furthermore, when metabolic depression was induced at 13 °C these snails showed an increase in both TBARS concentration (in hepatopancreas, kidney and foot) and in antioxidant defenses (SOD and GSH) in foot muscle [68].

Estivation and oxidative stress were also investigated in anurans. The first study analyzed desert spadefoot toads *Scaphiopus couchii* and compared animals that had been estivating for 2 months with active animals [73]. The majority of the activities of antioxidant enzymes and concentrations of GSH were decreased in several tissues of toads under estivation (exceptions are shown in Table 3). Moreover, in most organs lipid peroxidation parameters, as well as GSSG:GSH ratio increased during estivation (Table 4).

A study with the striped burrowing frog *Cyclorana alboguttata* showed that superoxide scavenging capacity (possibly SOD activity) increased in both iliofibularis and gastrocnemius muscles during estivation. Carbonyl protein levels increased in the iliofibularis muscle, but not in the gastrocnemius muscle, after 6 months of estivation [234]. Another study with these animals showed that the mRNA levels for glutamate cysteine ligase regulatory subunit and glutathione transferase omega 2 increased after 4 months of estivation [179]. Furthermore, H₂O₂ formation by permeabilized gastrocnemius frog muscle was decreased after 4 months estivation, while it remained unchanged in cardiac muscle when compared to muscles from active controls [178]. These observations as a whole indicate that there is a response of the redox metabolism (ROS formation, oxidative damage, and expression of antioxidants) during estivation in green-striped frogs and such response is dependent on muscle type.

In the case of lungfish *Protopterus dolloi* increased activity/protein levels of antioxidant enzymes were observed in brain (MnSOD, CuZnSOD, catalase, and GR) and heart (GPX) after 60 days of estivation. However, there was no increase in the levels of indicators of

oxidative stress, except for nitrotyrosine levels in brain [160]. Because the ratio GSSG:GSH was not measured, one cannot conclude if a redox imbalance took place during estivation of *P. dolloi*.

Similar to what was observed for low oxygen stresses there are many examples of estivating animals that had increased oxidative stress markers, and enhanced antioxidant defenses. These observations indicate that ROS generation increases at some point of estivation in anurans, gastropods, and lungfish. Such increase in ROS production would in turn trigger mechanisms that would ultimately result in increased expression of endogenous antioxidants. ROS-mediated activation of Nrf2 and FoxO1 transcription factors [135,136,179] could be one of these mechanisms.

5. Mechanisms of ROS formation under hypoxia—Evidence in mammals and invertebrates

The effects of hypoxia on mammalian models have been long and extensively studied under the premise that ROS production is directly proportional to oxygen concentration. But it was not until the early 1970s, with the radiobiological studies by Hall [75], that we find the first reports providing a deeper insight on the levels of free radical production under limiting oxygen conditions. Rao et al. [176] later reported that coronary occlusion elicited a 55% increase in free radical levels in dog ventricular tissue when compared to normoxia. Such observations constituted a key finding that opened a completely new perspective on what was known at the time on ROS formation under limited oxygen concentrations and set the bases for later works.

The impact of the earlier works by Rao et al. [176] is demonstrated by the growing number of studies showing similar increases in ROS on hypoxic exposure in a wide diversity of

mammalian cell lines, cells types, and tissues (Table 5). Rao et al. [176] measured free radical formation through electron spin resonance, so far the only analytical method for direct detection of free radicals [134], but the theory of increased ROS formation under hypoxia has also been widely supported by data obtained using fluorescent-specific probes for detecting ROS. Imaging cellular events is by no means an easy task, and much controversy has arisen on the use of such techniques [106,61]. Further studies have, however, confirmed hypoxic ROS production through the application of RNA interference techniques in conjunction with the use of protein-based fluorescence resonance energy transfer (FRET) sensors (HSP-FRET). Guzy et al. [74] applied such a ratio-metric probe, consisting of the fusion of two fluorescent peptides (one yellow, YFP, and one cyan, CFP) linked to a redox-sensitive bacterial heat shock protein, to provide further direct and reliable evidence for increased ROS formation in the cytosol under hypoxia.

Diving mammals such as whales or seals constitute a valuable model in the study of the physiological effects of hypoxia-reoxygenation events. These animals are obliged to make subsequent dives in order to feed, exposing themselves to cyclic bouts of ischemia and reperfusion and the negative consequences that the later entails. Vázquez-Medina et al. [219] have recently reviewed the current knowledge regarding how such diving species are able to avoid oxidative damage. This and similar reports led the authors to hypothesize that hypoxia-induced ROS production in diving mammals may be involved in the induction of antioxidant mechanisms and other protective pathways relevant for hypoxic adaptation. This would occur through the activation of HIFs (e.g., [103], reviewed by [235]), heterodimeric transcription factors present in the cytoplasm which through their activation a wide variety of hypoxia adaptive cell responses are regulated [113,189,190,26].

Table 5
Examples of works reporting hypoxia-induced increase in reactive oxygen species production.

Measurement	Animal model	Tissue or cell	Method	O ₂ (%)	Average Δ (hypoxia vs normoxia) (%)	Duration (min)	Reference
FR	Dog	Ventricular tissue	EPR	n.a	54.5	15	[176]
FR	Rat	Ventricular tissue	EPR	n.a	56.5	10	[139]
ROS	Chick	Cardiomyocytes	Fluorescence (DCFH-DA)	1.9	150	10	[218]
ROS	Chick	Cardiomyocytes	Fluorescence (DCFH-DA)	1	300	15	[54]
ROS	Chick	Cardiomyocytes	Fluorescence (DCFH-DA)	1	1100	120	
ROS	Human	Hep3B cells	Fluorescence (DCFH-DA)	1	300	30	[26]
ROS	Rat	Pulmonary artery smooth muscle cells	Fluorescence (DCDHFH-DA)	16	500	60	[110]
ROS	Rat	Pulmonary artery smooth muscle cells	Fluorescence (DCDHFH-DA)	16	165	10	
ROS	Rabbit	Intrapulmonary artery smooth muscle cells	Fluorescence (DCFH-DA)	1	85	60	[159]
O ₂ ^{•-}	Guinea pig	Ventricular tissue	Fluorescence (DHE)	n.a	35	1	[109]
O ₂ ^{•-}	Guinea pig	Ventricular tissue	Fluorescence (DHE)	n.a	95	20	
ROS	Human	A549 cells	Fluorescence (DCFH-DA)	1	50	120	[71]
ROS	Human	HepG2 cells	Fluorescence (DCDHFH-DA)	1	200	1440	[33]
ROS	Human	Umbilical vein endothelial cells	Fluorescence (C-DHFH-DA)	6.3	15	30	[141]
ROS	Mouse	Lung tissue	Fluorescence (RoGFP)	1.5	58	5	[47]
O ₂ ^{•-}	Cow	Aortic endothelial cells	Fluorescence (DHE)	1	360	10	[87]
O ₂ ^{•-}	Human	EA.hy926 cells	Fluorescence (DHE)	1	300	10	
ROS	Cow	Aortic endothelial cells	Fluorescence (C-DCFH-DA)	1	450	30	
O ₂ ^{•-}	Human	EA.hy926 cells	Fluorescence (Mito-HE)	1	100	10	
O ₂ ^{•-}	Cow	Aortic endothelial cells	Fluorescence (Mito-HE)	1	427	10	
O ₂ ^{•-}	Mouse	C57 cells	Fluorescence (DHE)	1	300	10	
O ₂ ^{•-}	Mouse	C57 cells lacking functional OXPHOS	Fluorescence (DHE)	1	100	10	

C-DCFH-DA, carboxydichlorofluorescein diacetate; C-DHFH-DA, carboxydidhydrofluorescein diacetate; DCDHFH-DA, dichlorodihydrofluorescein diacetate; DCFH-DA, dichlorofluorescein diacetate; DHE, dihydroethidium; DHFH-DA, dihydrofluorescein diacetate; EPR, electron paramagnetic resonance; Mito-HE, mitohydroethidine; n.a. not available.

A great body of information also comes from the field of cardiology and what it is currently known as “ischemic preconditioning” (IPC), that is, the process by which subsequent ischemic–reperfusion events increases cell resistance [148]. The involvement of ROS in IPC has been demonstrated through indirect means, such as through the use of antioxidants (which reduce the cardioprotective effects of IPC) [208] and prooxidants (which under normoxia induced IPC-like protection as shown by Baines [7] or Vanden Hoek et al. [218]).

But when does such a ROS increase occur in mammalian cells? Reports agree that this ROS peak can occur only some minutes after the hypoxic insult. Recent investigations conducted on bovine and human endothelial cells under acute hypoxia (1–2% O₂) showed that ROS formation peaks around 10–20 min of hypoxic exposure [87], agreeing with previous studies (Table 5). In contrast to mammalian cells, fewer studies have assessed ROS production in animals that are naturally exposed to low oxygen stress. A study using *in vivo* staining with the nonspecific ROS detector C-H₂DFDA, evidenced that the marine platyhelminthes *Macrostomum lignano* ROS formation follows the typical oxygenation-dependent pattern [182]. However, superoxide formation (DHE staining) remained constant across oxygenation conditions (ranging from hyperoxia (40 kPa) to near-anoxia), and only reoxygenation caused a 2-OH-E⁺:DHE ratio increase. Even though these contrasting results are difficult to interpret, this work was the first in comparative biology to demonstrate that superoxide formation under near-anoxia remains unchanged in comparison to normoxia and suggests that it could be contributing as a signaling mechanism in hypoxic acclimation.

Another study by the same group evidenced that, in the hypoxia-tolerant mussel *Mytilus edulis*, levels of carbonyl proteins in gills increase after 48 h under near-anoxia (< 0.6% air saturation) even though ROS formation decreases (as determined *ex vivo* by DHE and C-H₂DFDA staining) [183]. Shorter periods of near-anoxia exposure were not assessed, but it is possible that ROS production increases in gill tissues before the investigated 48 h time point. Indeed, as discussed above, increased ROS formation occurs during the first 10–20 min from the onset of hypoxia exposure in mammalian cells, decreasing after that period [87]. Future quantification of ROS at shorter incubation times might help verify if, as observed in mammalian cells, increased ROS formation under hypoxia also applies to invertebrates.

It is also of major interest to review the current knowledge related to the molecular mechanism of hypoxic ROS production since most of the results come from mammalian cell studies. It is within mammalian cells that it is long known that mitochondria produce ROS [100] and that mitochondria are the main ROS producers (e.g., [18,217]). Thus, many works have attempted to determine the exact source of the hypoxia-induced ROS formation. Both pharmacological and genetic methods have been extensively applied, the later being mostly related to the analysis of the activation of HIFs. Chandel et al. [26] demonstrated in Hep3 cells that functional mitochondria are necessary to produce the hypoxia-induced ROS that are required for IPC. This is expected, since as the same author correctly points out, other ROS-regenerating systems such as cytochrome P450 or NADPH oxidase would decrease ROS production under hypoxic conditions. In a more recent study, Hernansanz-Agustín et al. [87] further demonstrated that the hypoxia-derived ROS largely requires a mitochondrial oxidative phosphorylation system. But where exactly are such ROS produced? Complexes I, II, and III are the main mitochondrial sources of O₂^{•-} [171,217]. Located in the inner side of the inner mitochondrial membrane, complexes I and II generate O₂^{•-} which is released in the mitochondrial matrix. Complex III, on the other hand, is a transmembrane complex, and, thus, not only generates O₂^{•-} in the matrix but also to the intermembrane space from

where they can be carried to the cytoplasm via voltage-dependent anion channels [76] and be potentially available for HIF activation and participation in other signaling pathways. Even though the exact mechanism through which mitochondrial ROS are involved in HIF activation is not established, the important role of complex III must be highlighted. This has been further supported by several other groups working with a variety of cells lines (e.g., [12,74,138,224]). Chandel et al. [26] proposed that this occurs due to an accumulation of electrons in the proximal areas of the respiratory chain and their further leakage to form O₂^{•-} when there is limited oxygen available to the terminal cytochrome c oxidase. Later, studies allowed the refinement of such model and suggested that, under hypoxia, the mitochondrial complex III suffers a conformational change that would facilitate the interaction between O₂ and ubiquinone, resulting in an increase of O₂^{•-} formation [74]. Others also consider complex II as relevant for ROS formation during hypoxia exposure [159]. It was proposed that this complex switches its catalytic activity from succinate dehydrogenase to fumarate reductase at diminished oxygen levels. This would not only cause succinate to accumulate but additionally will cause ROS generation because fumarate reductase has been demonstrated to be a powerful O₂^{•-} generator (e.g., [94,140,216]). This change in complex II would then be modulating the directionality of the electron flow because not only O₂ would be the final electron acceptor but also fumarate [34]. Further research is required to consolidate knowledge on the role of each of the mitochondrial complexes in the induction of hypoxia adaptation across the different tissues and cell models.

6. Redox sensitive transcription factors and low oxygen stress

The description of transcription factors that regulate the expression of genes coding for antioxidant proteins in animals exposed to low oxygen stress is limited. A strong indication that a transcription factor acts in any particular gene is the presence of a consensus binding sequence for such specific factor in the promoter region of the gene. In this case, the promoter region of the gene must be known. Data about the promoter sequences of the antioxidant genes from the organisms cited in the present review are scarce. Therefore, the evidence of the action of any particular transcription factor on the induction of antioxidant defense genes in the animals discussed herein is rather indirect.

The nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2) regulates genes involved in the biosynthesis of glutathione and NADPH as well as genes coding for CuZnSOD, peroxiredoxin, thioredoxin, GPXs, and GSTs [112,115,207,25,8,96]. Its stability and activity can increase on exposure to H₂O₂ through oxidation of its inhibitory protein Keap1 [62]. Nrf2 also controls a number of genes involved in intermediate metabolism that may also contribute to survival under reduced oxygen tensions [78]. In the African clawed frog *X. laevis*, the exposure to dehydration resulted in increased expression of GST isoforms in several organs [135]. GST-P1 was induced in liver, heart and skin by 2- to 9-fold, whereas GST-M1 and GST-M3 increased in muscle, kidney, and skin. These results were related to increased Nrf2 expression at both protein and mRNA levels [135].

The protein p53 is reported to control the expression of MnSOD and GPXs [133,209]. Both up- and downregulation of antioxidant gene expression can result from p53 action depending on its intracellular concentration [49]. This protein may also provide antioxidant protection under hypoxia by upregulating the mitochondrial glutaminase 2 (GSL2) gene. Glutaminase 2 catalyzes the hydrolysis of glutamine to glutamate, which is a precursor of GSH. Activation of p53 increases the level of glutamate and GSH and decreases ROS levels in cells *in vitro*. In addition, the human

GSL2 gene contains a p53 consensus DNA-binding element and this element may also be present in the GSL2 gene from other organisms [93].

The hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) is the main transcription factor involved in the response to hypoxia. The role of HIF in animal adaptation to hypoxia has been the subject of numerous studies since the 1990s [92]. There is an indication that HIF-1 regulates the expression of GPX3 in human plasma [15]. HIF-1 subunits have been cloned from some nonmammalian species, including shrimp, oyster, and fish [146,168,192]. A putative HRE has been located in intron 2 of the lactate dehydrogenase B gene from the killifish *Fundulus heteroclitus*. Putative HREs may also be present in the genes coding for *F. heteroclitus* antioxidant enzymes [177]. This indicates that HIF-1 or its homologs may be involved in mediating the effects of environmental hypoxia in other animals.

The genes coding for MnSOD and catalase are direct transcriptional targets of forkhead box O (FoxO) transcription factors [116,72]. The role of FoxOs in the induction of antioxidant defenses has been demonstrated in studies in species facing low oxygen stress. The liver of African clawed frogs, *X. laevis*, exposed to dehydration had increased FoxO1 abundance in nucleus, increased FoxO1 DNA binding activity, and reduced levels of phosphorylated FoxO1 [136]. This activation of the FoxO1 pathway was related to the increase of two antioxidant enzymes, MnSOD and catalase, at both protein and mRNA levels in the liver [136]. Furthermore, activation of FoxO1 and FoxO3 transcription factors has been also demonstrated in the anoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta elegans* [119].

The influence of NF- κ B proteins on ROS levels occurs via increased expression of MnSOD, CuZnSOD, GST, and GPX [147]. In mice neonatal cardiac myocytes and adult myocardial endothelial cells the migration of NF- κ B and AP-1 to the nucleus is associated with increased enzyme activity and amount of MnSOD protein under conditions of anoxia/reoxygenation preconditioning. The mouse MnSOD gene contains putative bind sites for NF- κ B and AP-1 in its promoter region. The use of NF- κ B and AP-1 artificial inhibitors indicates a direct action of these transcription factor on MnSOD gene expression [186].

An explanation was proposed on how antioxidant enzymes are increased under conditions of low oxygen availability [225,3]. The proposal assumes that ROS formation increases during hypoxia in aquatic animals, and that such increased ROS formation would activate transcriptional factors that regulate the expression of antioxidant enzymes. Candidate transcription factors are Nrf2, p53, HIF-1, NF- κ B proteins, and FoxO proteins (Fig. 3). Herein, we expand the idea on the role of such transcription factors in animals during estivation and situations of low oxygen stress, including freezing and dehydration in both terrestrial and aquatic species. In another section, the role of ROS-derived electrophiles in the activation of transcription factors will also be considered.

7. Is there a role for post translational modifications of antioxidant enzymes during low oxygen stress?

In addition to transcription factors, post translational modification of proteins is a mechanism for regulating protein function with the advantages of being rapid and ATP-inexpensive, meeting the conditions of hypometabolism. Indeed, protein phosphorylation has been shown to regulate the activity of enzymes involved in energy metabolism in animals under low oxygen stress, for example, arginine kinase and glutamate dehydrogenase in crayfish under severe hypoxia [40,41], lactate dehydrogenase in turtles under anoxia [232], and creatine kinase and hexokinase in frogs exposed to freezing conditions [50,52]. Moreover, there are evidences that reversible phosphorylation and other post translational modifications are mechanisms that control the activity (in terms of V_{max}) of

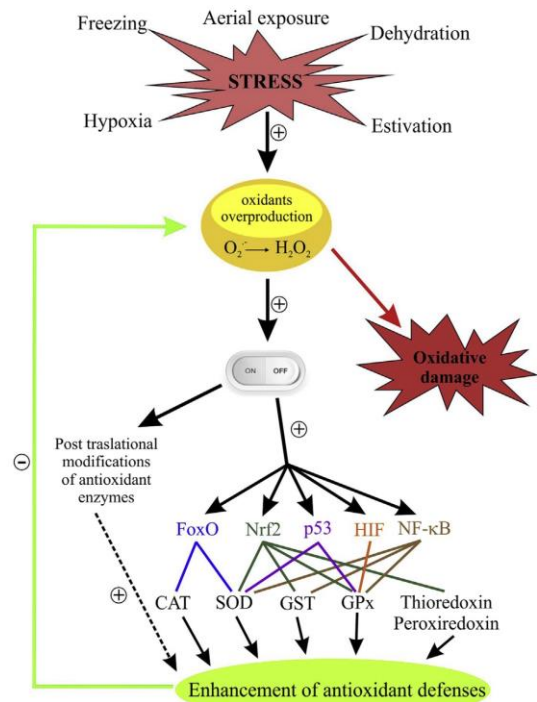


Fig. 3. The general proposed mechanism used by organisms to tolerate estivation or low oxygen stress. Low oxygen stress includes hypoxia (including anoxia), freezing, aerial exposure of water-breathing animals, and severe dehydration. The hypoxic nature of such stresses leads to mitochondrial ROS overproduction that causes oxidative damage to biomolecules and activates redox-sensitive transcription factors (FoxO, Nrf2, p53, HIF-1 α , and NF- κ B). These transcription factors promote activation of antioxidant defenses (such as catalase, SOD, glutathione transferase, glutathione peroxidase, thioredoxin, and peroxiredoxins). Mitochondrial ROS overproduction might also promote post translational modification of antioxidant enzymes. Activation of antioxidant defenses may function as a negative feedback and reduce ROS levels.

antioxidant enzymes. However, only one study has analyzed the specific role of post translational regulation of an antioxidant enzyme in animals under low oxygen stress [42]. The altered ROS production in organisms under low oxygen stress could trigger signaling pathways leading to post translational modifications of antioxidant enzymes and related proteins.

Protein phosphorylation is widely recognized as a post translational modification that modulates the activity of enzymes in general. In addition to the switch on and off effect, by the action of kinases and phosphatases on proteins, reversible phosphorylation may also alter enzyme properties and the interaction between enzymes and other proteins [197]. Although not an antioxidant enzyme itself, glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) is an important enzyme that fuels glutathione and thioredoxin systems by producing reducing potential in the form of NADPH. Reversible phosphorylation regulates G6PDH enzymatic properties in response to hypometabolism in land snails [173], to freezing in wood frogs [51], and to anoxia in periwinkles [120]. Snails estivating for 10 days have higher levels of phosphorylated G6PDH resulting in increased G6PDH activity in comparison to active animals [173]. On the other hand, phospho-G6PDH levels are reduced in wood frogs exposed to freezing conditions for 24 h, leading to a reduced affinity for its substrates in the frozen state [51].

Regarding antioxidant enzymes, H₂O₂-related enzymes (catalase, glutathione peroxidase, and peroxiredoxins) have been shown to have their activities regulated by phosphorylation in response to oxidative stress mediated by H₂O₂ in mammalian cells [180]. Two important tyrosine kinases c-Abl and Arg are activated on H₂O₂ treatment and phosphorylate catalase [20] and GPX1 [21], leading to increased activities. Phosphorylation of several peroxiredoxins occurs *in vitro* and this modification leads to reduced activity of peroxiredoxin I, which is phosphorylated *in vivo* [27]. The antioxidant-related enzymes glutamate-cysteine ligase (GCL) and glutathione transferase P1 (GSTP1) are also subject to reversible phosphorylation. While GCL has its activity reduced [204], GSTP1 presents higher catalytic efficiency when phosphorylated by different kinases [124,157,191]. Phosphorylation has also been reported to regulate MnSOD activity *in vivo* and *in vitro* in mammalian cells exposed to radiation, in such a manner that phosphorylation by CyclinB1/Cdk1 increases its activity [19].

In addition to reversible phosphorylation, antioxidant proteins are targets of other covalent modifications that may alter their activities, including acetylation [111] and glutathionylation [137]. There is a broad range of proteins known to be modified by reversible acetylation (the transfer of an acetyl group from acetyl coenzyme A to a protein) resulting in the regulation of many cellular processes [152,194]. A large number of mitochondrial proteins have been found to be acetylated, including enzymes involved in the energetic metabolism and stress response, e.g., MnSOD, CuZn-SOD, thioredoxin, and isocitrate dehydrogenase 2 [111].

Several studies have shown that MnSOD activity is affected by deacetylation in response to different stresses [158,239]. Specifically, the deacetylation of MnSOD by the mitochondrial sirtuin Sirt3 (a NAD⁺-dependent protein deacetylase) increases SOD activity [172,29]. Increased MnSOD expression (by 6-fold) results in a slight (10%) decrease of ROS levels in mammalian cells [172]. However, ROS levels are strongly suppressed (90%) when SIRT3 and SOD2 are coexpressed. Moreover, the expression of a modified deacetylated SOD2 alone also reduces ROS levels by 90% [172]. Thus, the overexpression of SOD has little effect on ROS levels unless deacetylation occurs [172,210,29].

To our knowledge, there is a single study about post translational modification of antioxidant enzymes in animals in response to low oxygen stress [42]. Muscular MnSOD was purified from control and frozen *Rana sylvatica* frogs. Freezing induces increased relative phosphorylation levels of MnSOD resulting in greater stability (assessed by resistance to urea denaturation) and increased affinity (lower K_m) of the enzyme for O₂^{•-}. However, no effect on V_{max} was observed as a result of phosphorylation [42].

It is tempting to consider the role of post translational modifications on the activity of antioxidant enzymes for several reasons. First, there is a wide range of intermediary metabolism enzymes regulated by phosphorylation, as well as other post translational modifications, in these animals [201]. Second, many studies have shown post translational modification of antioxidant enzymes in other systems (including in response to increased ROS) and sites for modifications other than phosphorylation have been identified in these enzymes. Finally, the trigger for these modifications to occur during hypoxia exposure could be the increased ROS formation, which, for example, is known to alter the activities of protein kinases, phosphatases, and sirtuins. Thus, one could speculate that reversible covalent modifications of antioxidant enzymes play an important role in hypoxia-tolerant animals under low oxygen stress. For example, a hypothetical Sirt3-mediated activation of MnSOD in response to elevated levels of H₂O₂ under hypoxia (which could happen in the hypoxic condition that antecedes full anoxia) could be an alternative explanation for the increase in SOD activity in anoxia-exposed garter snakes reported by Hermes-Lima and Storey [80].

Besides the direct effects on antioxidant enzymes, many studies have reported the occurrence of the post translational modifications addressed above on redox-sensitive transcription factors. For example, the acetylation of several transcription factors has been reported, including FoxOs, HIF-1 α , NF- κ B, Nrf2, and p53 [11,194,205,215]. Furthermore, the roles of reversible phosphorylation and acetylation of p53 [236] and reversible phosphorylation of FoxO1 and FoxO3 [119] were investigated in *T. scripta elegans* turtles exposed to anoxia. For example, in liver and muscle, several phosphorylated forms of p53 increase in *T. scripta elegans* exposed to anoxia [236].

The discussion above highlights the importance of the employment of methodologies to specifically detect antioxidant enzymes in their active forms (e.g., enzymatic activity or selective antibodies against the active form of the enzyme). Due to the multiple layer control of gene expression, mRNA levels do not always match protein levels, and protein levels do not necessarily reflect active protein levels [57]. Moreover, when analyzing antioxidant enzymes one should take care to avoid *in vitro* protein modification during sample handling, for example, adding phosphatase inhibitors to the sample at the time of homogenization. Furthermore, proteins involved in these post translational modifications (e.g., Sirt3) are candidates to be regulated and investigated in animals under low oxygen stress and during metabolic depression.

8. The role of reactive nitrogen species

Reactive nitrogen species (RNS) have also been demonstrated to play important physiological roles in a wide range of taxa. Nitric oxide (NO), for example, is an evolutionarily conserved intercellular messenger involved in multiple biological processes, ranging from defense in bacteria [77] to mitochondrial biogenesis in mammals [151]. NO is directly involved in regulating respiration rates [169], essential for prolonging survival on hypoxic periods. This molecule is more stable under very low environmental oxygen (0.5–1.5 μ M O₂) and acts as a multisite inhibitor of the mitochondrial respiratory chain [22]. Cytochrome oxidase has higher affinity for NO when compared to O₂, making complex IV (responsible for most of the oxygen consumption) the most sensitive site to this inhibition [169,37]. But the reversible nature of this inhibition [17] is probably the key adaptive response to subsequent ischemia–reperfusion events, since a decrease in mitochondrial respiration prevents an excess of ROS production on reoxygenation. Moreover, NO-derived metabolites (nitrite and, due to the low pH in tissues during hypoxia, also the strong S-nitrosylating agent N₂O₃) can interact with complex I through S-nitrosylation, also slowing down the electron flow at the respiratory chain, and thus mitigating any ROS burst [56].

Studies analyzing RNS-derived biochemical markers in estimating or low oxygen stressed animals are scarce. In addition to the well-known products nitrite and nitrate, RNS may react with a range of cellular components producing, for example, iron-nitrosyl (FeNO), S-nitroso (SNO), and N-nitroso (NNO) compounds [104,108,24]. Jensen et al. [99] reported that, in the anoxia-tolerant red-eared slider turtle *T. scripta*, NO metabolites (FeNO and NNO) increased in response to a 9-day exposure to anoxia in all analyzed tissues. Other metabolites such as SNO also increased during anoxia but decreased shortly after O₂ reintroduction, which makes it a good candidate molecule for it to be involved in S-nitrosylation of complex I and, thus, controlling ROS formation. Nitrite, which has also been demonstrated to be an important cytoprotector on ischemia–reperfusion events [48], increased in a tissue-specific way in turtles exposed to anoxia [99]. Animal species that estivate are also interesting study models. A study in the lungfish *Protopterus dolloi* showed an increase in NOS activity in heart and kidney after 40 days estivation, suggesting that NO is involved in

the adjustment of these organs [6]. Such long-term estivation had no effect in heart nitrotyrosine levels in the pulmonate snail *Achatina fulica* (subject to 4-week estivation) [187] or the lungfish *P. dolloi* (60-day estivation) [160], although levels increased in other tissues such as brain [160]. After an estivation period of 6 months [31], another lungfish, *Protopterus annectens*, also had increased levels of nitrite and nitrate in liver. These and other examples not reviewed here indicate some similarities regarding NO-derived metabolism among taxa.

At the transcriptional level, NO is also involved in the regulation of hypoxia-related genes. Several studies focused on the role of NO and its derivatives in stabilization of HIF, a key component in hypoxic acclimation. HIFs are not only stabilized by a decrease in O₂ but also require S-nitrosylation of certain pathway components as recently reviewed [170,91], highlighting the important role of RNS in hypoxic acclimation.

9. Lipid peroxidation and hypoxia studies

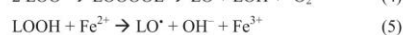
9.1. Molecular mechanisms for increased lipid peroxidation under hypoxia

A number of studies have shown increased lipid peroxidation products, including TBARS and lipid hydroperoxides, in tissues of many animal species under low oxygen stress (Table 4). However, molecular oxygen (O₂) is a critical substrate for the propagation of the lipid peroxidation cascade [233], playing a role, for instance, in the reaction of alkyl radicals with O₂. Therefore, if O₂ is essential for the lipid peroxidation cascade, how can it be enhanced in organisms exposed to hypoxic conditions?

As discussed above, mitochondria may increase ROS formation (specifically O₂^{•−} and H₂O₂) under low oxygen stress. Furthermore, H₂O₂ can undergo a heterolytic reduction in the presence of iron ions or heme-containing proteins giving rise to hydroxyl radicals. This radical, in turn, can abstract hydrogen atoms from unsaturated lipids initiating lipid peroxidation reactions [79]. However, the burst of free radicals produced under hypoxia explains only the formation of alkyl radicals, but fails to explain the formation of peroxy radicals, a crucial step that requires the reaction with O₂. In this context, Hernansanz-Agustín and co-workers [87] showed that the burst of free radical production—measured by superoxide detection with DHE—lasts for 30–60 min in cells exposed to hypoxia. If this hypoxia-induced superoxide production occurs for such a short period in most animal species, how can we explain the increased lipid peroxidation observed over the course of hours or days under hypoxia?

One hypothesis to explain this increased oxidative damage in animals exposed to hypoxia is related to the chemistry of O₂ and its solubility in membranes (Scheme 1). Since oxygen is a nonpolar molecule, its solubility in the nonpolar core of lipid membranes is higher than in aqueous media [229,55]. Therefore, regardless of the overall O₂ availability in tissues/cells, the pO₂ in the hydrophobic portion of the membrane should be higher than the pO₂ in the aqueous phase of cytosol. Such behavior ensures that there would be enough O₂ in the membrane to allow the occurrence of lipid peroxidation even under hypoxia.

Once alkyl radicals are generated in the initial burst of free radicals (Eq. (1) in Scheme 2) the following reactions of the cascade can occur for hours (even days) with the residual O₂ in the membrane. This relatively high abundance of O₂ in the membrane



Scheme 2. Simplified lipid peroxidation cascade showing the requirement of O₂ and formation of oxidizing species. Equation (1) represents the initiation of the lipid peroxidation cascade promoted by [•]OH (generated in the burst of free radicals). Equation (2) represents the critical step that requires O₂. Equations (3) to (6) represent reactions in the peroxidation cascade that produces oxidizing species, including peroxy and alkoxyl radicals and singlet molecular oxygen (¹O₂) [144,145]. Excited carbonyl species can also be formed as a product of the Russel mechanism [145]. Such species, in turn, could lead to oxidative damage.

during hypoxia could be a key aspect for explaining the increased levels of lipid peroxidation products in a number of studies discussed in this article (Table 4). Noteworthy, this reaction (Eq. (2) in Scheme 2) is favorable from both a thermodynamic and a kinetic point of view [233]. Peroxyl radicals, in turn, generate several other oxidizing species—including lipid hydroperoxides—that could induce the oxidative damage observed in animals exposed to hypoxia (Scheme 2). The production of such peroxy-derived oxidizing species would be independent from the pO₂ inside the cell, which could also be related to the increase in lipid peroxidation during hypoxia. Moreover, besides their involvement in free radical reactions, lipid hydroperoxides can also affect membrane organization and cell-signaling effects, leading to increased cellular protection, apoptosis, or necrosis [144,67].

The lipid peroxidation cascade ends with the production of ketones and aldehydes, including α,β-unsaturated species such as 4-hydroxynonenal (HNE) [79]. These species have been shown elevated in cells exposed to hypoxia [23] and also conjugated to GSH in livers of a fish under hypoxic conditions [10]. Due to the chemical nature of species such as HNE, it can covalently modify several amino acids in the cell through either a Michael addition (addition to the double bond) or a Schiff base mechanism (formation of an imine bond) [97]. Indeed, lysine, histidine, cysteine, and arginine residues are modified in proteins modified by HNE [97]. Such modifications are able to alter protein structure and function, which leads to protein malfunction, oxidative stress, signaling effects, and cell death [226].

Overall, the observed increase in oxidative stress could be related to the residual oxygen levels found in the membrane even after long periods under hypoxic conditions. In addition, the electrophiles produced over the course of the lipid peroxidation could also modulate Nrf2 activity (see following topic) and, therefore, the enzymatic antioxidant response of the organisms under hypoxia.

9.2. Lipid peroxidation products as signaling molecules

A new line of thought to explain the activation of antioxidant response in organisms exposed to long periods of hypoxia is based on the effects of electrophiles in cells. As discussed above, lipid peroxidation is a process that can occur “independently” from the pO₂ in the cell and may last for hours (even days). In such a scenario, lipid peroxidation products—as electrophilic aldehydes—could be produced hours (or days) after the beginning of the hypoxia. These molecules, such as HNE, may play a pivotal role in triggering the antioxidant defense in organisms. Some reports show that HNE can react with amino acid residues in the Keap1–Nrf2 complex, modulating its activity [107,89]. Although the exact mechanism remains unclear, Kansanen and co-workers [107] suggest that HNE covalently modifies specific cysteine residues in the Keap1 domain. These modifications decrease the affinity between Keap1 and Nrf2, which



Scheme 1. Chemical equilibrium of oxygen in cells.

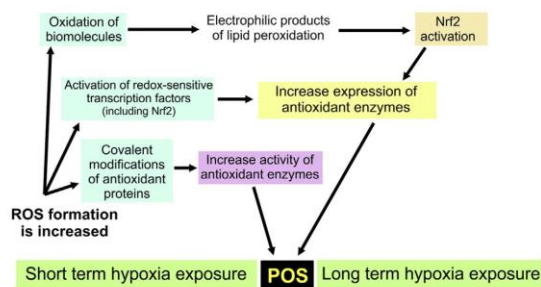


Fig. 4. The overall view of the mechanisms that participates in the preparation for oxidative stress (POS). When some animal species are exposed to an environmental situation that induce a short-term hypoxia exposure, we propose that reactive oxygen species (ROS) formation increases causing the oxidation of biomolecules (e.g., GSH, proteins, and membrane lipids) and the activation of redox-sensitive transcription factors (Nrf2, HIF, etc.). These transcription factors could induce augmented expression of antioxidant enzymes. Moreover, ROS-mediated covalent modification of antioxidant proteins may also increase their activities, contributing to the “POS response.” The formation of electrophilic products of lipid peroxidation (such as HNE) could also activate Nrf2 and thus contribute to the POS response under long-term hypoxia.

allows Nrf2 translocation to the nucleus where it activates the antioxidant response [107,89]. Moreover, treatment with oxidized LDL also leads to an activation of Nrf2 pathway, corroborating the finding that lipid peroxidation products modulate antioxidant response [95]. In addition to nonspecific lipid peroxidation products (as HNE), enzymatic lipid peroxidation products, such as prostaglandins, have been shown to modulate the Nrf2 pathway, increasing the antioxidant response (Fig. 4) [89].

9.3. Challenges for lipid peroxidation measurements in comparative biology

A major limitation of our study (and the comparative biology field) is that most of the available data on lipid peroxidation is based on TBARS and xylenol orange and determinations of lipid hydroperoxides by conjugated dienes. All these methods have been publicly criticized due to their lack of specificity, which could lead to a misinterpretation of the actual levels of lipid peroxidation. Therefore, one of the great challenges of the field is to improve the analytical measurements of lipid peroxidation. Methods such as TBARS should not be used when the matrix is complex [61], which is the case of comparative biology studies. Future researchers should consider replacing such methods by more precise methods of detection, such as the detection of F2-isoprostanes by mass spectrometry [123,142].

One can also argue that the observed increase in lipid peroxidation markers in tissues of hypoxia-exposed animals could be due to postmortem effects. However, since the handling of control (normoxia) and hypoxic groups was equal, the postmortem effects were also equal, which would only increase the baseline for both groups without affecting the difference already present.

10. Conclusions, limitations, and perspectives

10.1. Free radical formation under low oxygen stress and estivation produce redox imbalance and activate antioxidant defenses

As noted before, it was recently proposed that increased ROS generation during hypoxia—in comparison with normoxia—is responsible for the activation of transcriptional factors involved in the upregulation of antioxidant enzymes [225]. This mechanism

potentially explains how antioxidant enzymes can be activated under estivation and low oxygen stress: anoxia/hypoxia (in which ROS formation could be higher in the hypoxic phase that precedes full anoxia), dehydration, freezing, and air exposure of water-breathing animals. Thus, ROS-mediated activation of redox-sensitive transcription factors and pathways leading to post translational modifications are—according to our proposal—key components of the molecular POS mechanism.

Furthermore, the increase in GSH oxidation (toward GSSG), lipid peroxidation, protein oxidation, and DNA damage—reported in many works throughout this review—can be explained by an augment in ROS formation. One example is the increased levels of lipid peroxidation after 6 days under anoxia in marine gastropods [164]. In another example, the putative low pO_2 in internal organs of land snails during estivation could be the reason for an increased ROS formation, leading to mild oxidative stress (increased lipid peroxidation, protein oxidation, and GSSG levels; [174]). Thus, the augment in endogenous antioxidant defenses may minimize oxidative damage under (i) low oxygenation and (ii) also in the following condition, normoxic recovery, which is expected to increase ROS generation.

In summary, we propose that the following events underlie the increased expression of endogenous antioxidants in response to oxygen restriction known as “preparation for oxidative stress” (Fig. 4):

- (i) Once animals are exposed to low oxygen stress, oxygen concentration begins to drop and, at some point, pO_2 reaches a threshold level, in which electrons accumulate at the mitochondrial electron transport chain and, thus, the generation of superoxide radicals and H_2O_2 increases temporarily;
- (ii) This increment in ROS levels under low oxygenation may:
 - (a) cause redox imbalance, increasing the GSSG/GSH-eq ratio;
 - (b) oxidize cellular components directly or participate in reactions that produce other oxidizing species (e.g., peroxyinitrite and lipid hydroperoxides), increasing the levels of oxidative stress markers (e.g., conjugated dienes, protein carbonyls, and 8-oxodGuo);
 - (c) trigger the activation of redox-sensitive transcription factors (e.g., FoxOs, HIF-1, NF- κ B, Nrf2, and p53), resulting in an increased expression of antioxidant defenses; and
 - (d) activate signaling pathways (e.g., Sirt3 and specific kinases) that cause post translational modifications in both antioxidant enzymes and redox-sensitive transcription factors. The overall result would be an enhanced antioxidant system.
- (iii) After some period of time the burst in ROS generation will eventually decrease and so will its effects. However, electrophile lipid peroxidation products may further extend the signal for the expression of antioxidants by acting on transcription factors (e.g., Nrf2; section 9.2). This should be important to maintain the “POS response” in long-term hypoxia.

To some extent, our proposal is a simplification of a complex process that may be affected by the action of RNS (Section 8), protein chaperones [199,214], uncoupling proteins (UCPs 2 and 3 seen to control mitochondrial ROS formation: [13,98]) as well as the presence of nonenzymatic compounds such as ascorbate [181] or uric acid [65].

10.2. Limitations on the POS mechanistic proposal

The biggest limitation of our POS hypothesis is that actually there is no direct evidence that mitochondrial ROS generation increases during estivation or under low oxygen stress. The few works that had measured ROS levels using chemical probes indicate that indeed ROS formation still occurs during oxygen deprivation (even in animals under anoxia) ([143,182,183]), but, so

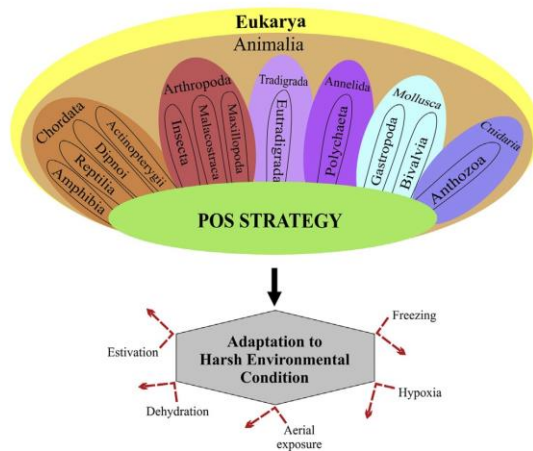


Fig. 5. Animals from six different phyla when exposed to low oxygen stresses (anoxia, hypoxia, freezing, dehydration, and air exposure) or during estivation enhance their antioxidant defenses. The examples are distributed within the following groups: Anthozoa (corals), Polychaeta, Bivalvia (mussels and clams), Gastropoda (land and aquatic snails), Eutardigrada (“water bears”), Malacostraca (amphipods, shrimps, and crabs), Maxillopoda (barnacles), Insecta, Actinopterygii (ray-finned fish), Dipnoi (lungfish), Amphibia (frogs and toads), and Reptilia (snakes and turtles).

far, there is no report of increased ROS in these situations. On the other hand, there are many pieces of indirect evidence that indicates that ROS levels should rise. The disturbed redox balance, increased levels of oxidative stress markers, and the increase in antioxidant defenses itself points toward conditions of increased ROS generation. Once experimentally tested, the burst in ROS formation in hypoxia-tolerant and estivating animals will consolidate the POS mechanism.

Another relevant limitation of our proposal is that we cannot predict (or even estimate) exactly when ROS production is expected to increase (and then activate antioxidant defenses) once exposure to low oxygen stress begins. The reason is that available data on the activation of endogenous antioxidants in oxygen-restricted and metabolic depressed animals varies enormously in terms of exposure time. If we look at the reports of increased antioxidant defenses only, the response times ranged from 5 to 24 h for freezing, 12 h to 1 week for dehydration, 10 min to 21 days for hypoxia/anoxia, 1 to 18 h for air exposure, and 6 to 180 days for estivation. Moreover, the respiratory physiology of a given animal is also expected to affect the exact time in which the proposed phenomena (i.e., increased ROS formation and antioxidant response) take place.

What is common among all these cases is that so many different animals had increased antioxidants—at some point—when exposed to low oxygen stress. This process was observed in six animal phyla: cnidarians (corals), annelids (polychaetes), tardigrades, mollusks (bivalves and gastropods), arthropods (crustaceans and insects), and vertebrates (fish, amphibians and reptiles) (Fig. 5). Such widespread distribution is also observed for hypoxia tolerance phenotypes (p. 108, [92]).

10.3. Historical perspective

Our present article described the scientific path that led to a biochemical/molecular explanation on how animals respond to low oxygen stress. It has been observed by a great number of authors since the 1990s that many animals increase their

antioxidant defenses during estivation and under low oxygen stress and this was interpreted as a way to protect themselves against the potential danger of reoxygenation or reoxygenation-like stress. For quite a number of years researchers could not go beyond a biological/physiological explanation for the POS phenomenon. This phenomenon was regarded as an adaptive strategy for hypoxia/reoxygenation survival, with ecological relevance for animals facing intermittently oxygen restriction in nature² [38]. The observations that mitochondrial ROS formation could be increased under hypoxia in mammalian cells shed some light on the potential molecular pathways to induce the POS phenomena (Section 5). Evidences for that started to emerge in the 1980s (Table 5), and for many years, in the words of Thomas Clanton in an editorial, “scientists have been hesitant to embrace the idea that conditions of hypoxia induce ROS in the absence of reoxygenation” [35]. Therefore, according to our understanding, ROS formed at an early phase of estivation or low oxygen stresses could both (i) activate endogenous antioxidants and (ii) inflict oxidative damage to biomolecules in anoxia/hypoxia-tolerant animals. Other reactive species, such as 4-HNE and prostaglandins (lipid peroxidation products), as well as RNS, may also play relevant roles in the POS process.

The key aspect of the present article is that the original POS proposal has not changed to “something else,” but it has evolved from a simplistic hypothesis to a theory based on several direct and indirect evidences. The “danger” of reoxygenation (well recognized since the 1980s) is still there [34]. The understanding of the molecular mechanisms that allow animals to respond to low oxygen stress should pave the road for further experiments that now can be based on a firm rational that can be tested, confirmed or dismissed. Because most of the studies about low oxygen stress were performed in the laboratory, the occurrence of the mechanisms proposed herein is yet to be verified in animals in the wild. This is the next frontier.

Note added in proof Three other cases of POS that were not listed in the tables are briefly described below. Earthworms (*Dendrobaena octaedra*) exposed to freezing for 14 h had increased mRNA levels for GST when compared to control animals [59]. Moreover, hepatic CuZnSOD activity increased in European common lizards (*Lacerta vivipara*) in response to freezing for 20 h [222]. In another lizard species (*Phrynocephalus vlangalii*), hypoxia (8% O₂) exposure for 6 weeks resulted in increased TBARS levels and catalase activity in liver and brain, while SOD activity increased only in liver [240].

Acknowledgments

This work was supported by grants from INCT-Processos Redox em Biomedicina (CNPq, Brazil), Projeto Universal (CNPq) and from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, Grant 193.000.040/2012). D.C. Moreira is a graduate student funded by a CAPES studentship. M. Hermes-Lima receives a Research Fellowship from CNPq. G. Rivera-Ingraham is supported by Marie Curie Actions EU grant (FP7-PEOPLE-2013-IEF) [Grant 622087-“IAS-Life”]. We acknowledge Prof. Alexis F. Welker (University of Brasília) for the critical reading of the manuscript. This study is in honor of Cláudio Mário Guimarães da Silva (Rio de Janeiro, Brazil), retired biology teacher.

² In contrast to intermittent oxygen availability, animals chronically exposed to hypoxia may present increased fitness when compared to animals in normoxia. This is the case of the fingernail clams (*Sphaerium* sp.), in which a population living further in the swamp (low dissolved O₂) presents higher number of animals, decreased levels of oxidative damage to nucleic acids, and increased reproductive success when compared to clams living in normoxia closer to the stream [105].

References

- [1] D. Abele, H. Großpietsch, H.O. Pörtner, Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental PO_2 , temperature, H_2O_2 and H_2S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the capitellid worm *Heteromastus filiformis*, Mar. Ecol. Prog. Ser. 163 (1998) 179–191.
- [2] E.A. Almeida, A.C.D. Bairy, Effects of aerial exposure on antioxidant defenses in the brown mussel *Perna perna*, Braz. Arch. Biol. Technol. 49 (2006) 225–229.
- [3] E.A. Almeida, P. Di Mascio, Hypometabolism and antioxidative defense systems in marine invertebrates, in: A. Nowakowska, M. Caputa (Eds.), Hypometabolism: strategies of survival in vertebrates and invertebrates, Research Signpost, Kerala, India, 2011, pp. 39–55.
- [4] E.A. Almeida, A.C.D. Bairy, A.L. Dafré, O.F. Gomes, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 318 (2005) 21–30.
- [5] E.A. Almeida, A.C.D. Bairy, A.P. Loureiro, M. de, G.R. Martinez, S. Miyamoto, J. Onuki, L.F. Barbosa, C.M.G. Carrião, F.M. Prado, G.E. Ronsein, et al., Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage, Comp. Biochem. Physiol. A 146 (2007) 588–600.
- [6] D. Amelio, F. Garofalo, E. Brunelli, A.M. Loong, W.P. Wong, Y.K. Ip, B. Tota, M. C. Cerra, Differential NOS expression in freshwater and aestivating *Protopterus dollioi* (lungfish): heart vs kidney readjustments, Nitric Oxide 18 (2008) 1–10.
- [7] C. Baines, Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium, J. Mol. Cell. Cardiol. 29 (1997) 207–216.
- [8] A. Banning, S. Deubel, D. Kluth, Z. Zhou, R. Brigelius-Flohé, The G1-GPx gene is a target for Nrf2, Mol. Cell. Biol. 25 (2005) 4914–4923.
- [9] M.C. Barnhart, Respiratory gas tensions and gas exchange in active and dormant land snails, *Otala lactea*, Physiol. Zool. 59 (1986) 733–745.
- [10] F.F. Bastos, S.A.L. Tobar, R.F. Dantas, E.S. Silva, N.P.A. Nogueira, M.C. Paes, B.D. P. Righi, J.C. Bastos, V.L.F.C. Bastos, Melatonin affects conjugation of 4-hydroxyphenol with glutathione in liver of pacu, a hypoxia-tolerant fish, Fish Physiol. Biochem. 39 (2013) 1205–1214.
- [11] E.L. Bell, B.M. Emerling, S.J.H. Ricoult, L. Guarente, SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1 α and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production, Oncogene 30 (2011) 2986–2996.
- [12] E.L. Bell, T.A. Klimova, J. Eisenbart, C.T. Moraes, M.P. Murphy, G.R.S. Budinger, N.S. Chandel, The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production, J. Cell Biol. 177 (2007) 1029–1036.
- [13] A. Bernejo-Nogales, J.A. Calduch-Giner, J. Pérez-Sánchez, Tissue-specific gene expression and functional regulation of uncoupling protein 2 (UCP2) by hypoxia and nutrient availability in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): implications on the physiological significance of UCP1–3 variants, Fish Physiol. Biochem. 40 (2014) 751–762.
- [14] P.E. Bickler, L.T. Buck, Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability, Annu. Rev. Physiol. 69 (2007) 145–170.
- [15] C. Bieri, B. Voetsch, R.C. Jin, D.E. Handy, J. Loscalzo, Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression, J. Biol. Chem. 279 (2004) 26839–26845.
- [16] K.K. Biggar, K.B. Storey, Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals, J. Exp. Biol. 218 (2015) 1281–1289.
- [17] G.C. Brown, Nitric oxide and mitochondrial respiration, Biochim. Biophys. Acta 1411 (1999) 351–369.
- [18] E. Cadenas, K.J.A. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, Free Radic. Biol. Med. 29 (2000) 222–230.
- [19] D. Candas, M. Fan, D. Nantajit, A.T. Vaughan, J.S. Murley, G.E. Woloschak, D. J. Grdina, J.J. Li, CyclinB1/Cdk1 phosphorylates mitochondrial antioxidant MnSOD in cell adaptive response to radiation stress, J. Mol. Cell Biol. 5 (2013) 166–175.
- [20] C. Cao, Y. Leng, D. Kufe, Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response, J. Biol. Chem. 278 (2003) 29667–29675.
- [21] C. Cao, Y. Leng, W. Huang, X. Liu, D. Kufe, Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases, J. Biol. Chem. 278 (2003) 39609–39614.
- [22] A. Cassina, R. Radi, Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport, Arch. Biochem. Biophys. 328 (1996) 309–316.
- [23] F. Cervellati, C. Cervellati, A. Romani, E. Cremonini, C. Sticozzi, G. Belmonte, F. Pessina, G. Valacchi, Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells, Free Radic. Res. 48 (2014) 303–312.
- [24] B.C. Challis, S.A. Kyrtopoulos, The chemistry of nitroso-compounds. Part 11. Nitrosation of amines by the two-phase interaction of amines in solution with gaseous oxides of nitrogen, J. Chem. Soc., Perkin Trans 1 (1979) 299–304.
- [25] K. Chan, Y.W. Kan, Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 12731–12736.
- [26] N.S. Chandel, E. Maltepe, E. Goldwasser, C.E. Mathieu, M.C. Simon, P. T. Schumacker, Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 11715–11720.
- [27] T.-S. Chang, W. Jeong, S.Y. Choi, S. Yu, S.W. Kang, S.G. Rhee, Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation, J. Biol. Chem. 277 (2002) 25370–25376.
- [28] J. Chen, K. Mai, H. Ma, X. Wang, D. Deng, X. Liu, W. Xu, Z. Liufu, W. Zhang, B. Tan, et al., Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston), Fish Shellfish Immunol. 22 (2007) 272–281.
- [29] Y. Chen, J. Zhang, Y. Lin, Q. Lei, K.-L. Guan, S. Zhao, Y. Xiong, Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS, EMBO Rep. 12 (2011) 534–541.
- [30] B. Ching, J.L.Y. Ong, Y.R. Chng, X.L. Chen, W.P. Wong, S.F. Chew, Y.K. Ip, L-Gulonolactone oxidase expression and vitamin C synthesis in the brain and kidney of the African lungfish, *Protopterus annectens*, FASEB J. 28 (2014) 3506–3517.
- [31] Y.R. Chng, J.L.Y. Ong, B. Ching, X.L. Chen, W.P. Wong, S.F. Chew, Y.K. Ip, Molecular characterization of argininosuccinate synthase and argininosuccinate lyase from the liver of the African lungfish *Protopterus annectens*, and their mRNA expression levels in the liver, kidney, brain and skeletal muscle during aestivation, J. Comp. Physiol. B 184 (2014) 835–853.
- [32] J. Choi, H. Roche, T. Caquet, Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarkers, Environ. Toxicol. Chem. 19 (2000) 495–500.
- [33] S.-O. Choi, Y.-S. Cho, H.-L. Kim, J.-W. Park, ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBP α and STAT-3, Biochem. Biophys. Res. Commun. 356 (2007) 312–317.
- [34] E.T. Chouchani, V.R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijevic, S.Y. Sundier, E.L. Robb, A. Logan, S.M. Nadtochiy, E.N.J. Ord, A.C. Smith, et al., Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS, Nature 515 (2014) 431–435.
- [35] T. Clanton, Yet another oxygen paradox, J. Appl. Physiol. 99 (2005) 1245–1246.
- [36] M.S. Clark, G. Husmann, M.A.S. Thorne, G. Burns, M. Truebano, L.S. Peck, D. Abele, E.E.R. Philipp, Hypoxia impacts large adults first: consequences in a warming world, Glob. Chang. Biol. 19 (2013) 2251–2263.
- [37] M.W. Cleeter, J.M. Cooper, V.M. Darley-Usmar, S. Moncada, A.H. Schapira, Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases, FEBS Lett. 345 (1994) 50–54.
- [38] D. Costantini, Variation in oxidative stress threats and hormesis across environments, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg (2014), p. 75–109. In: *Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology*.
- [39] E. David, A. Tanguy, K. Pichavant, D. Moraga, Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions, FEBS J. 272 (2005) 5635–5652.
- [40] N.J. Dawson, K.B. Storey, Regulation of tail muscle arginine kinase by reversible phosphorylation in an anoxia-tolerant crayfish, J. Comp. Physiol. B 181 (2011) 851–859.
- [41] N.J. Dawson, K.B. Storey, An enzymatic bridge between carbohydrate and amino acid metabolism: regulation of glutamate dehydrogenase by reversible phosphorylation in a severe hypoxia-tolerant crayfish, J. Comp. Physiol. B 182 (2012) 331–340.
- [42] N.J. Dawson, B.A. Katzenback, K.B. Storey, Free-radical first responders: the characterization of CuZnSOD and MnSOD regulation during freezing of the freeze-tolerant North American wood frog, *Rana sylvatica*, Biochim. Biophys. Acta 1850 (2015) 97–106.
- [43] U.O. de Oliveira, A. Belló-Klein, L.C. Kucharski, Oxidative balance and immunodetection of antioxidant enzymes in the hepatopancreas of the crab *Chasmagnathus granulata* subjected to anoxia and reoxygenation, Can. J. Zool. 84 (2006) 677–684.
- [44] U.O. de Oliveira, A.S. da Rosa Araújo, A. Belló-Klein, R.S.M. da Silva, L. C. Kucharski, Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*, Comp. Biochem. Physiol. B 140 (2005) 51–57.
- [45] M. De Zoysa, I. Whang, Y. Lee, S. Lee, J.-S. Lee, J. Lee, Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress, Comp. Biochem. Physiol. B 154 (2009) 387–395.
- [46] D.V. Desai, S. Prakash, Physiological responses to hypoxia and anoxia in *Balanus amphitrite* (Cirripedia: Thoracica), Mar. Ecol. Prog. Ser. 390 (2009) 157–166.
- [47] J.R. Desireddi, K.N. Farrow, J.D. Marks, G.B. Waypa, P.T. Schumacker, Hypoxia increases ROS signaling and cytosolic Ca^{2+} in pulmonary artery smooth muscle cells of mouse lungs slices, Antioxid. Redox Signal. 12 (2010) 595–602.
- [48] C. Dezfulian, N. Raat, S. Shiva, M.T. Gladwin, Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics, Cardiovasc. Res. 75 (2007) 327–338.
- [49] S.K. Dhar, Y. Xu, D.K. St Clair, Nuclear factor κB - and specificity protein 1-dependent p53-mediated bi-directional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene, J. Biol. Chem. 285 (2010) 9835–9846.
- [50] C.A. Dieni, K.B. Storey, Creatine kinase regulation by reversible phosphorylation in frog muscle, Comp. Biochem. Physiol. B 152 (2009) 405–412.
- [51] C.A. Dieni, K.B. Storey, Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by reversible phosphorylation in liver of a freeze tolerant frog, J. Comp. Physiol. B 180 (2010) 1133–1142.

- [52] C.A. Dieni, K.B. Storey, Regulation of hexokinase by reversible phosphorylation in skeletal muscle of a freeze-tolerant frog, *Comp. Biochem. Physiol. B* 159 (2011) 236–243.
- [53] G.S. Dolci, L.T. Vey, A.J. Schuster, K. Roversi, K. Roversi, V.T. Dias, C.S. Pase, R.C. S. Barcelos, C.T.D. Antoniazzi, J.I. Golombieski, et al., Hypoxia acclimation protects against oxidative damage and changes in prolactin and somatolactin expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to manganese, *Aquat. Toxicol.* 157 (2014) 175–185.
- [54] J. Duranteau, N.S. Chandel, A. Kulisz, Z. Shao, P.T. Schumacker, Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 11619–11624.
- [55] B.G. Dzиковski, V.A. Livshits, D. Marsh, Oxygen permeation profile in lipid membranes: comparison with transmembrane polarity profile, *Biophys. J.* 85 (2003) 1005–1012.
- [56] A. Fago, F.B. Jensen, Hypoxia tolerance, nitric oxide, and nitrite: lessons from extreme animals, *Physiology (Bethesda)* 30 (2015) 116–126.
- [57] M.E. Feder, J.-C. Walser, The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses, *J. Evol. Biol.* 18 (2005) 901–910.
- [58] M.V.R. Ferreira, A.C.R. Alencastro, M. Hermes-Lima, Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), *Can. J. Zool.* 81 (2003) 1239–1248.
- [59] K.V. Fisker, M. Holmstrup, J.G. Sørensen, Freezing of body fluids induces metallothionein gene expression in earthworms (*Dendrobaena octaedra*), *Comp. Biochem. Physiol. C (Elsevier Inc)* 179 (2016) 44–48.
- [60] M. Forcella, E. Berra, R. Giacchini, P. Parenti, Antioxidant defenses preserve membrane transport activity in *Chironomus riparius* larvae exposed to anoxia, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 65 (2007) 181–194.
- [61] H.J. Forman, O. Augusto, R. Brigelius-Flohé, P.A. Dennerly, B. Kalyanaraman, H. Ischiropoulos, G.E. Mann, R. Radi, L.J. Roberts II, J. Viña, et al., Even free radicals should follow some rules: a guide to free radical research terminology and methodology, *Free Radic. Biol. Med.* 78 (2015) 233–235.
- [62] S. Fourquet, R. Guerois, D. Biard, M.B. Toledano, Activation of NRF2 by nitrosative agents and H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 8463–8471.
- [63] C.A. Freire, V.G. Togni, M. Hermes-Lima, Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions, *Comp. Biochem. Physiol. A* 160 (2011) 291–300.
- [64] C.A. Freire, A.F. Welker, J.M. Storey, K.B. Storey, M. Hermes-Lima, Oxidative stress in estuarine and intertidal environments (temperate and tropical), in: D. Abele, J.P. Vazquez-Medina, T. Zenteno-Savín (Eds.), *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, Wiley, Chichester, UK, 2011, pp. 41–57.
- [65] M. Giraud-Billoud, M.A. Abud, J.A. Cueto, I.A. Vega, A. Castro-Vazquez, Uric acid deposits and estivation in the invasive apple-snail, *Pomacea canaliculata*, *Comp. Biochem. Physiol. A* 158 (2011) 506–512.
- [66] M. Giraud-Billoud, I.A. Vega, M.E.R. Tosi, M.A. Abud, M.L. Calderon, A. Castro-Vazquez, Antioxidant and molecular chaperone defences during estivation and arousal in the South American apple snail *Pomacea canaliculata*, *J. Exp. Biol.* 216 (2013) 614–622.
- [67] A.W. Girotti, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J. Lipid Res.* 39 (1998) 1529–1542.
- [68] Giuffrida, P.M., Vega, I.A. and Giraud-Billoud, M. (2013). Antioxidants defenses involved in the tolerance to hibernation of a freshwater snail; p. 55. VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine-South American Group. Buenos Aires.
- [69] E. Gorokhova, M. Löf, H.P. Halldórsson, U. Tjärnlund, M. Lindström, T. Elfving, B. Sundelin, Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers, *Aquat. Toxicol.* 99 (2010) 263–274.
- [70] E. Gorokhova, M. Löf, M. Reutgard, M. Lindström, B. Sundelin, Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia, *Aquat. Toxicol.* 127 (2013) 46–53.
- [71] P. Goyal, N. Weissmann, F. Grimminger, C. Hegel, L. Bader, F. Rose, L. Fink, H. A. Ghofrani, R.T. Schermuly, H.H.H.W. Schmidt, et al., Upregulation of NAD(P) H oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.* 36 (2004) 1279–1288.
- [72] E.L. Greer, A. Brunet, FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression, *Oncogene* 24 (2005) 7410–7425.
- [73] J.E. Grundy, K.B. Storey, Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*, *J. Comp. Physiol. B* 168 (1998) 132–142.
- [74] R.D. Guzy, B. Hoyos, E. Robin, H. Chen, L. Liu, K.D. Mansfield, M.C. Simon, U. Hammerling, P.T. Schumacker, Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing, *Cell Metab.* 1 (2005) 401–408.
- [75] Hall, E.R. The oxygen effect. In: Hall, E. T., ed. *Radiobiology for the radiologists*. New York: 1973: 48–61.
- [76] D. Han, F. Antunes, R. Canali, D. Rettori, E. Cadenas, Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 5557–5563.
- [77] A. Hausladen, A.J. Gow, J.S. Stamler, Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 14100–14105.
- [78] J.D. Hayes, A.T. Dinkova-Kostova, The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism, *Trends Biochem. Sci.* 39 (2014) 199–218.
- [79] Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: *Functional metabolism: regulation and adaptation* (ed. Storey, K. B., pp. 319–368. Hoboken, NJ.
- [80] M. Hermes-Lima, K.B. Storey, Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes, *Am. J. Physiol.* 265 (1993) R646–R652.
- [81] M. Hermes-Lima, K.B. Storey, Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail, *Am. J. Physiol.* 268 (1995) R1386–R1393.
- [82] M. Hermes-Lima, K.B. Storey, Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in the frog *Rana pipiens*, *Am. J. Physiol.* 271 (1996) R918–R925.
- [83] M. Hermes-Lima, K.B. Storey, Role of antioxidant defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*, *Mol. Cell. Biochem.* 189 (1998) 79–89.
- [84] M. Hermes-Lima, T. Zenteno-Savín, Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress, *Comp. Biochem. Physiol. C* 133 (2002) 537–556.
- [85] M. Hermes-Lima, J.M. Storey, K.B. Storey, Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails, *Comp. Biochem. Physiol. B* 120 (1998) 437–448.
- [86] M. Hermes-Lima, J.M. Storey, K.B. Storey, Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress, in: K.B. Storey, J.M. Storey (Eds.), *Protein adaptations and signal transduction*, Elsevier, 2001, pp. 263–287.
- [87] P. Hernansanz-Agustín, A. Izquierdo-Álvarez, F.J. Sánchez-Gómez, E. Ramos, T. Villa-Piña, S. Lamas, A. Bogdanova, A. Martínez-Ruiz, Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells, *Free Radic. Biol. Med.* 71 (2014) 146–156.
- [88] C.F. Herreid, Metabolism of land snails (*Otala lactea*) during dormancy, arousal, and activity, *Comp. Biochem. Physiol. A* 56 (1977) 211–215.
- [89] A.N. Higdon, A. Landar, S. Barnes, V.M. Darley-Usmar, The electrophile responsive proteome: integrating proteomics and lipidomics with cellular function, *Antioxid. Redox Signal.* 17 (2012) 1580–1589.
- [90] K.C. Hiong, Y.K. Ip, W.P. Wong, S.F. Chew, Differential gene expression in the brain of the African lungfish, *Protopterus annectens*, after six days or six months of aestivation in air, *PLoS One* 8 (2013) e71205.
- [91] J.J.D. Ho, H.S.J. Man, P.A. Marsden, Nitric oxide signaling in hypoxia, *J. Mol. Med.* 90 (2012) 217–231.
- [92] P.W. Hochachka, G.N. Somero, *Biochemical adaptation*, Oxford University Press, New York, 2002.
- [93] W. Hu, C. Zhang, R. Wu, Y. Sun, A. Levine, Z. Feng, Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 7455–7460.
- [94] J.A. Imlay, A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 19767–19777.
- [95] T. Ishii, K. Itoh, E. Ruiz, D.S. Leake, H. Unoki, M. Yamamoto, G.E. Mann, Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal, *Circ. Res.* 94 (2004) 609–616.
- [96] T. Ishii, K. Itoh, S. Takahashi, H. Sato, T. Yanagawa, Y. Katoh, S. Bannai, M. Yamamoto, Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16023–16029.
- [97] A.L. Isom, S. Barnes, L. Wilson, M. Kirk, L. Coward, V. Darley-Usmar, Modification of cytochrome c by 4-hydroxy-2-nonenal: evidence for histidine, lysine, and arginine-aldehyde adducts, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 15 (2004) 1136–1147.
- [98] J. Issartel, F. Hervant, M. de Fraipont, J. Clobert, Y. Voituron, High anoxia tolerance in the subterranean salamander *Proteus anguinus* without oxidative stress nor activation of antioxidant defenses during reoxygenation, *J. Comp. Physiol. B* 179 (2009) 543–551.
- [99] F.B. Jensen, M.N. Hansen, G. Montesanti, T. Wang, Nitric oxide metabolites during anoxia and reoxygenation in the anoxia-tolerant vertebrate *Trachemys scripta*, *J. Exp. Biol.* 217 (2014) 423–431.
- [100] P.K. Jensen, Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles II. Steroid effects, *Biochim. Biophys. Acta* 122 (1966) 167–174.
- [101] D.R. Joannisse, K.B. Storey, Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog, *Am. J. Physiol.* 271 (1996) R545–R553.
- [102] D.R. Joannisse, K.B. Storey, Oxidative stress and antioxidants in stress and recovery of cold-hardy insects, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28 (1998) 23–30.
- [103] P. Johnson, R. Elsner, T. Zenteno-Savín, Hypoxia-inducible factor 1 proteomics and diving adaptations in ringed seal, *Free Radic. Biol. Med.* 39 (2005) 205–212.
- [104] M.S. Joshi, T.B. Ferguson, T.H. Han, D.R. Hyde, J.C. Liao, T. Rassaf, N. Bryan, M. Feilisch, J.R. Lancaster, Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 10341–10346.
- [105] J. Joyner-Matos, L.J. Chapman, Persisting in papyrus: size, oxidative stress, and fitness in freshwater organisms adapted to sustained hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 165 (2013) 405–416.
- [106] B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K.J.A. Davies, P.A. Dennerly, H.J. Forman, M.B. Grisham, G.E. Mann, K. Moore, L.J. Roberts II, H. Ischiropoulos, Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1–6.
- [107] E. Kansanen, H.-K. Jyrkkänen, A.-L. Levonen, Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 973–982.

- [108] M. Kelm, Nitric oxide metabolism and breakdown, *Biochim. Biophys. Acta* 1411 (1999) 273–289.
- [109] L.G. Kevin, A.K.S. Camara, M.L. Riess, E. Novalija, D.F. Stowe, Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion, *Am. J. Physiol.* 284 (2003) H566–H574.
- [110] D.W. Killilea, R. Hester, R. Balczon, P. Babal, M.N. Gillespie, Free radical production in hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells, *Am. J. Physiol.* 279 (2000) L408–L412.
- [111] S.C. Kim, R. Sprung, Y. Chen, Y. Xu, H. Ball, J. Pei, T. Cheng, Y. Kho, H. Xiao, L. Xiao, et al., Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey, *Mol. Cell* 23 (2006) 607–618.
- [112] Y.C. Kim, Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 18399–18406.
- [113] T. Klimova, N.S. Chandel, Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF, *Cell Death Differ.* 15 (2008) 660–666.
- [114] C.D. Kniffin, L.E. Burnett, K.G. Burnett, Recovery from hypoxia and hypercapnic hypoxia: impacts on the transcription of key antioxidants in the shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Comp. Biochem. Physiol. B* 170 (2014) 43–49.
- [115] M. Kobayashi, M. Yamamoto, Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species, *Adv. Enzyme Regul.* 46 (2006) 113–140.
- [116] G.J.P.L. Kops, T.B. Dansen, P.E. Polderman, I. Saarloos, K.W.A. Wirtz, P.J. Coffey, T.-T. Huang, J.L. Bos, R.H. Medema, B.M.T. Burgering, Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress, *Nature* 419 (2002) 316–321.
- [117] A. Krivoruchko, K.B. Storey, Molecular mechanisms of turtle anoxia tolerance: A role for NF- κ B, *Gene* 450 (2010) 63–69.
- [118] A. Krivoruchko, K.B. Storey, Activation of antioxidant defenses in response to freezing in freeze-tolerant painted turtle hatchlings, *Biochim. Biophys. Acta* 1800 (2010) 662–668.
- [119] A. Krivoruchko, K.B. Storey, Anoxia-responsive regulation of the FoxO transcription factors in freshwater turtles, *Trachemys scripta elegans*, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2013) 4990–4998.
- [120] J.L. Lama, R.A.V. Bell, K.B. Storey, Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation in the hepatopancreas of the anoxia-tolerant marine mollusc, *Littorina littorea*, *PeerJ* 1 (2013) e21.
- [121] M. Lawniczak, C. Rostaing, D. Roussel, C. Maazouzi, D. Renault, F. Hervant, Preventive antioxidant responses to extreme oxygen level fluctuation in a subterranean crustacean, *Comp. Biochem. Physiol. A* 165 (2013) 299–303.
- [122] L. Levelahti, K.T. Rytönen, G.M.C. Renshaw, M. Nikinmaa, Revisiting redox-antioxidant defenses in response to hypoxic challenge in both hypoxia-tolerant and hypoxia-sensitive fish species, *Fish Physiol. Biochem.* 40 (2014) 183–191.
- [123] W. Liu, J.D. Morrow, H. Yin, Quantification of F2-isoprostanes as a reliable index of oxidative stress in vivo using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 1101–1107.
- [124] H.-W. Lo, G.R. Antoun, F. Ali-Osman, The human glutathione S-transferase P1 protein is phosphorylated and its metabolic function enhanced by the Ser/Thr protein kinases, cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C, in glioblastoma cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 9131–9138.
- [125] A.M. Loong, K.C. Hiong, W.P. Wong, S.F. Chew, Y.K. Ip, Differential gene expression in the liver of the African lungfish, *Protopterus annectens*, after 6 days of estivation in air, *J. Comp. Physiol. B* 182 (2012) 231–245.
- [126] A.R. Lopes, K. Trübenbach, T. Teixeira, V.M. Lopes, V. Pires, M. Baptista, T. Repolho, R. Calado, M. Diniz, R. Rosa, Oxidative stress in deep scattering layers: Heat shock response and antioxidant enzymes activities of myctophid fishes thriving in oxygen minimum zones, *Deep-Sea Res.* 182 (2013) 10–16.
- [127] G. Lopez-Martinez, D.A. Hahn, Short-term anoxic conditioning hormesis boosts antioxidant defenses, lowers oxidative damage following irradiation and enhances male sexual performance in the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, *J. Exp. Biol.* 215 (2012) 2150–2161. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.065631>.
- [128] G. Lopez-Martinez, J.B. Benoit, J.P. Rinehart, M.A. Elnitsky, R.E. Lee, D. L. Denlinger, Dehydration, rehydration, and overhydration alter patterns of gene expression in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*, *J. Comp. Physiol. B* 179 (2009) 481–491.
- [129] V.I. Lushchak, T.V. Bagnyukova, Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish, *Comp. Biochem. Physiol. B* 144 (2006) 283–289.
- [130] V.I. Lushchak, T.V. Bagnyukova, Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Percottus glenii*, *Comp. Biochem. Physiol. B* 148 (2007) 390–397.
- [131] V.I. Lushchak, T.V. Bagnyukova, O.V. Lushchak, J.M. Storey, K.B. Storey, Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 1319–1330.
- [132] V.I. Lushchak, L.P. Lushchak, A.A. Mota, M. Hermes-Lima, Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation, *Am. J. Physiol.* 280 (2001) R100–R107.
- [133] W.-J. Mai, J.-L. Yan, L. Wang, Y. Zheng, Y. Xin, W.-N. Wang, Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells, *Aquat. Toxicol.* 100 (2010) 271–281.
- [134] G. Malanga, S. Puntarulo, The use of electron paramagnetic resonance in studies of oxidative damage to lipids in aquatic systems, in: D. Abele, J. P. Vazquez-Medina, T. Zenteno-Savín (Eds.), *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, Wiley, Chichester, UK, 2011, pp. 448–457.
- [135] A.J. Malik, K.B. Storey, Activation of antioxidant defense during dehydration stress in the African clawed frog, *Gene* 442 (2009) 99–107.
- [136] A.J. Malik, K.B. Storey, Transcriptional regulation of antioxidant enzymes by FoxO1 under dehydration stress, *Gene* 485 (2011) 114–119.
- [137] Y. Manevich, S.I. Feinstein, A.B. Fisher, Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with μ GST, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 3780–3785.
- [138] K.D. Mansfield, R.D. Guzy, Y. Pan, R.M. Young, T.P. Cash, P.T. Schumacker, M. C. Simon, Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation, *Cell Metab.* 1 (2005) 393–399.
- [139] V. Maupouil, L. Rochette, Evaluation of free radical and lipid peroxide formation during global ischemia and reperfusion in isolated perfused rat heart, *Cardiovasc. Drug. Ther.* 2 (1988) 615–621.
- [140] K.R. Messner, J.A. Imlay, Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 42563–42571.
- [141] T.M. Millar, V. Phan, L.A. Tibbles, ROS generation in endothelial hypoxia and reoxygenation stimulates MAP kinase signaling and kinase-dependent neutrophil recruitment, *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 1165–1177.
- [142] G.L. Milne, S.C. Sanchez, E.S. Musiek, J.D. Morrow, Quantification of F2-isoprostanes as a biomarker of oxidative stress, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 221–226.
- [143] S.L. Milton, G. Nayak, S. Kesari, L. Kara, H.M. Prentice, Suppression of reactive oxygen species production enhances neuronal survival in vitro and in vivo in the anoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta*, *J. Neurochem.* 101 (2007) 993–1001.
- [144] S. Miyamoto, P. Di Mascio, Lipid hydroperoxides as a source of singlet molecular oxygen, *Subcell. Biochem.* 77 (2014) 3–20.
- [145] S. Miyamoto, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the russell mechanism: studies using 18(O)-labeled linoleic acid hydroperoxide and monomer light emission measurements, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 6172–6179.
- [146] V. Mohindra, R.K. Tripathi, R.K. Singh, K.K. Lal, Molecular characterization and expression analysis of three hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 α , -2 α and -3 α in hypoxia-tolerant Indian catfish, *Clarias batrachus* [Linnaeus, 1758], *Mol. Biol. Rep.* 40 (2013) 5805–5815.
- [147] M.J. Morgan, Z.-G. Liu, Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling, *Cell Res.* 21 (2011) 103–115.
- [148] C.E. Murry, R.B. Jennings, K.A. Reimer, Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium, *Circulation* 74 (1986) 1124–1136.
- [149] S.A. Mustafa, S.N. Al-Subiai, S.J. Davies, A.N. Jha, Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Ecotoxicology* 20 (2011) 1455–1466.
- [150] L.A. Negreiros, B.F. Silva, M.G. Paulino, M.N. Fernandes, A.R. Chippari-Gomes, Effects of hypoxia and proteoglycan on the genotoxic and morphological parameters of *Hippocampus reidi*, *Comp. Biochem. Physiol. C* 153 (2011) 408–414.
- [151] E. Nisoli, E. Clementi, C. Paolucci, V. Cozzi, C. Tonello, C. Sciorati, R. Bracale, A. Valerio, M. Francolini, S. Moncada, et al., Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide, *Science* 299 (2003) 896–899.
- [152] K.L. Norris, J.-Y. Lee, T.-P. Yao, Acetylation goes global: the emergence of acetylation biology, *Sci. Signal.* 2 (2009), pe76.
- [153] A. Nowakowska, M. Caputa, J. Rogalska, Natural aestivation and antioxidant defence in *Helix pomatia*: effect of acclimation to various external conditions, *J. Molluscan Stud.* 76 (2010) 354–359.
- [154] A. Nowakowska, M. Caputa, J. Rogalska, Defence against oxidative stress in two species of land snails (*Helix pomatia* and *Helix aspersa*) subjected to estivation, *J. Exp. Zool.* A 315 (2011) 593–601.
- [155] A. Nowakowska, P. Gralikowska, J. Rogalska, M. Ligaszewski, M. Caputa, Effect of induced spring aestivation on antioxidant defence in *Helix aspersa* O. F. Müller, 1774 (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae), *Fol. Malacol.* 22 (2014) 41–48.
- [156] A. Nowakowska, G. Swiderska-Kolacz, J. Rogalska, M. Caputa, Effect of winter torpor upon antioxidant defence in *Helix pomatia*, *Can. J. Zool.* 87 (2009) 471–479.
- [157] T. Okamura, S. Singh, J. Buolamwini, T. Haystead, H. Friedman, D. Bigner, F. Ali-Osman, Tyrosine phosphorylation of the human glutathione S-transferase P1 by epidermal growth factor receptor, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 16979–16989.
- [158] O. Ozden, S.-H. Park, H.-S. Kim, H. Jiang, M.C. Coleman, D.R. Spitz, D. Gius, Acetylation of MnSOD directs enzymatic activity responding to cellular nutrient status or oxidative stress, *Ageing* 3 (2011) 102–107.
- [159] R. Paddenberg, B. Ishaq, A. Goldenberg, P. Faulhammer, F. Rose, N. Weissmann, R.C. Braun-Dullaeus, W. Kummer, Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature, *Am. J. Physiol.* 284 (2003) L710–L719.
- [160] M.M. Page, K.D. Salway, Y.K. Ip, S.F. Chew, S.A. Warren, J.S. Ballantyne, J. A. Stuart, Upregulation of intracellular antioxidant enzymes in brain and heart during estivation in the African lungfish *Protopterus dolloi*, *J. Comp. Physiol. B* 180 (2010) 361–369.
- [161] B. Paital, Antioxidant and oxidative stress parameters in brain of *Heteropneustes fossilis* under air exposure condition; role of mitochondrial electron transport chain, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95 (2013) 69–77.

- [162] B. Paital, Modulation of redox regulatory molecules and electron transport chain activity in muscle of air breathing fish *Heteropneustes fossilis* under air exposure stress, *J. Comp. Physiol. B* 184 (2014) 65–76.
- [163] C.-H. Pan, Y.-H. Chien, Y.-J. Wang, The antioxidant capacity response to hypoxia stress during transportation of characins (*Hypophossobrycon callistus* Boulenger) fed diets supplemented with carotenoids, *Aquac. Res.* 41 (2010) 973–981.
- [164] T.M. Pannunzio, K.B. Storey, Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221 (1998) 277–292. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00132-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00132-9).
- [165] D.P. Parrilla-Taylor, T. Zenteno-Savín, Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation, *Aquaculture* 318 (2011) 379–383.
- [166] A. Pérez-Jiménez, H. Peres, V.C. Rubio, A. Oliva-Teles, The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea, *Comp. Biochem. Physiol. C* 155 (2012) 506–516.
- [167] E.E.R. Philipp, W. Wessels, H. Gruber, J. Strahl, A.E. Wagner, I.M.A. Ernst, G. Rimbach, L. Kraemer, S. Schreiber, D. Abele, et al., Gene expression and physiological changes of different populations of the long-lived bivalve *Arctica islandica* under low oxygen conditions, *PLoS One* 7 (2012) e44621.
- [168] H. Piontkivska, J.S. Chung, A.V. Ivanina, E.P. Sokolov, S. Techa, I.M. Sokolova, Molecular characterization and mRNA expression of two key enzymes of hypoxia-sensing pathways in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin): hypoxia-inducible factor α (HIF- α) and HIF-prolyl hydroxylase (PHD), *Comp. Biochem. Physiol. D* 6 (2011) 103–114.
- [169] J.J. Poderoso, M.C. Carreras, C. Lisdero, N. Riobó, F. Schöpfer, A. Boveris, Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles, *Arch. Biochem. Biophys.* 328 (1996) 85–92.
- [170] R. Poyton, M. Hendrickson, Crosstalk between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways: an update, *Res. Rep. Biochem.* (2015) 147.
- [171] R.O. Poyton, K.A. Ball, P.R. Castello, Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling, *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (2009) 332–340.
- [172] X. Qiu, K. Brown, M.D. Hirsche, E. Verdin, D. Chen, Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation, *Cell Metab.* 12 (2010) 662–667.
- [173] C.J. Ramnanan, K.B. Storey, Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation during hypometabolism, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339 (2006) 7–16.
- [174] G.R. Ramos-Vasconcelos, M. Hermes-Lima, Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*, *J. Exp. Biol.* 206 (2003) 675–685.
- [175] G.R. Ramos-Vasconcelos, L.A. Cardoso, M. Hermes-Lima, Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*, *Comp. Biochem. Physiol. C* 140 (2005) 165–174.
- [176] P.S. Rao, M.V. Cohen, H.S. Mueller, Production of free radicals and lipid peroxides in early experimental myocardial ischemia, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15 (1983) 713–716.
- [177] B.B. Rees, J.A. Bowman, P.M. Schulte, Structure and sequence conservation of a putative hypoxia response element in the lactate dehydrogenase-B gene of *Fundulus*, *Biol. Bull.* 200 (2001) 247–251.
- [178] B.D. Reilly, A.J.R. Hickey, R.L. Cramp, C.E. Franklin, Decreased hydrogen peroxide production and mitochondrial respiration in skeletal muscle but not cardiac muscle of the green-striped burrowing frog, a natural model of muscle disuse, *J. Exp. Biol.* 217 (2014) 1087–1093.
- [179] B.D. Reilly, D.I. Schlipalius, R.L. Cramp, P.R. Ebert, C.E. Franklin, Frogs and estivation: transcriptional insights into metabolism and cell survival in a natural model of extended muscle disuse, *Physiol. Genomics* 45 (2013) 377–388.
- [180] S.G. Rhee, K.-S. Yang, S.W. Kang, H.A. Woo, T.-S. Chang, Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification, *Antioxid. Redox Signal.* 7 (2005) 619–626.
- [181] M.E. Rice, R.E. Forman, B.T. Chen, M.V. Avshalumov, S.J. Cragg, K.L. Drew, Brain antioxidant regulation in mammals and anoxia-tolerant reptiles: balanced for neuroprotection and neuromodulation, *Comp. Biochem. Physiol. C* 133 (2002) 515–525.
- [182] G.A. Rivera-Ingraham, U. Bickmeyer, D. Abele, The physiological response of the marine platyhelminth *Macrostomum lignano* to different environmental oxygen concentrations, *J. Exp. Biol.* 216 (2013) 2741–2751.
- [183] G.A. Rivera-Ingraham, I. Rocchetta, S. Meyer, D. Abele, Oxygen radical formation in anoxic transgression and anoxia-reoxygenation: foe or phantom? Experiments with a hypoxia tolerant bivalve, *Mar. Environ. Res.* 92 (2013) 110–119.
- [184] A.M. Rizzo, M. Negroni, T. Altiero, G. Montorfano, P. Corsetto, P. Berselli, B. Berra, R. Guidetti, L. Rebecchi, Antioxidant defences in hydrated and dehydrated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*, *Comp. Biochem. Physiol. B* 156 (2010) 115–121.
- [185] M.C. Romero, M. Ansaldo, G.A. Lovrich, Effect of aerial exposure on the antioxidant status in the subantarctic stone crab *Paralomis granulosa* (Decapoda: Anomura), *Comp. Biochem. Physiol. C* 146 (2007) 54–59.
- [186] T. Rui, P.R. Kviety, NF- κ B and AP-1 differentially contribute to the induction of Mn-SOD and eNOS during the development of oxidant tolerance, *FASEB J* 19 (2005) 1908–1910.
- [187] K.D. Salway, G.J. Tattersall, J.A. Stuart, Rapid upregulation of heart antioxidant enzymes during arousal from estivation in the Giant African snail (*Achatina fulica*), *Comp. Biochem. Physiol. A* 157 (2010) 229–236.
- [188] S. Schülke, D. Dreidax, A. Malik, T. Burmester, E. Nevo, M. Band, A. Avivi, T. Hankeln, Living with stress: regulation of antioxidant defense genes in the subterranean, hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax*, *Gene* 500 (2012) 199–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.019>.
- [189] G.L. Semenza, HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia, *J. Appl. Physiol.* 88 (2000) 1474–1480.
- [190] G.L. Semenza, G.L. Wang, A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 5447–5454.
- [191] S. Singh, T. Okamura, F. Ali-Osman, Serine phosphorylation of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) by PKC α enhances GSTP1-dependent cisplatin metabolism and resistance in human glioma cells, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 1343–1355.
- [192] J.G. Soñanez-Organis, A.B. Peregrino-Uriarte, S. Gómez-Jiménez, A. López-Zavala, H.J. Forman, G. Yepiz-Plascencia, Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia, *Comp. Biochem. Physiol. C* 150 (2009) 395–405.
- [193] C. Soria-Valles, B. Caballero, I. Vega-Naredo, V. Sierra, C. Huidobro-Fernández, D.D. Gonzalo-Calvo, D. Tolivia, M.J. Rodríguez-Colunga, A. Joel, A. Coto-Montes, et al., Antioxidant responses to variations of oxygen by the Harderian gland of different species of the superspecies *Spalax ehrenbergi*, *Can. J. Zool.* 88 (2010) 803–807.
- [194] S. Spange, T. Wagner, T. Heinzel, O.H. Krämer, Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 185–198.
- [195] J.F. Staples, L.T. Buck, Matching cellular metabolic supply and demand in energy-stressed animals, *Comp. Biochem. Physiol. A* 153 (2009) 95–105.
- [196] K.B. Storey, Oxidative stress: animal adaptations in nature, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29 (1996) 1715–1733.
- [197] K.B. Storey, Biochemical adaptation, in: K.B. Storey (Ed.), *Functional metabolism: regulation and adaptation*, Wiley, Hoboken, NJ, 2004, pp. 383–413.
- [198] K.B. Storey, J.M. Storey, Putting life on “pause”—molecular regulation of hypometabolism, *J. Exp. Biol.* 210 (2007) 1700–1714.
- [199] K.B. Storey, J.M. Storey, Heat shock proteins and hypometabolism: adaptive strategy for proteome preservation, *Res. Rep. Biol.* 2 (2011) 57–68.
- [200] K.B. Storey, J.M. Storey, Aestivation: signaling and hypometabolism, *J. Exp. Biol.* 215 (2012) 1425–1433.
- [201] K.B. Storey, C.-W. Wu, Stress response and adaptation: a new molecular toolkit for the 21st century, *Comp. Biochem. Physiol. A* 165 (2013) 417–428.
- [202] K.B. Storey, B. Lant, O.O. Anozie, J.M. Storey, Metabolic mechanisms for anoxia tolerance and freezing survival in the intertidal gastropod, *Littorina littorea*, *Comp. Biochem. Physiol. A* 165 (2013) 448–459.
- [203] J. Sun, H. Mu, H. Zhang, K.H. Chandramouli, P.-Y. Qian, C.K.C. Wong, J.-W. Qiu, Understanding the regulation of estivation in a freshwater snail through iTRAQ-based comparative proteomics, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 5271–5280.
- [204] W.M. Sun, Z.Z. Huang, S.C. Lu, Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation, *Biochem. J.* 320 (1996) 321–328.
- [205] Z. Sun, Y.E. Chin, D.D. Zhang, Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 2658–2672.
- [206] R. Sussarellu, C. Fabioux, G. Le Moullac, E. Fleury, D. Moraga, Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia, *Mar. Genomics* 3 (2010) 133–143.
- [207] T. Suzuki, Y. Takagi, H. Osanai, L. Li, M. Takeuchi, Y. Katoh, M. Kobayashi, M. Yamamoto, Pi class glutathione S-transferase genes are regulated by Nrf2 through an evolutionarily conserved regulatory element in zebrafish, *Biochem. J.* 388 (2005) 65–73.
- [208] M. Tanaka, H. Fujiwara, K. Yamasaki, S. Sasayama, Superoxide dismutase and N-2-mercapto-propionyl glycine attenuate infarct size limitation effect of ischaemic preconditioning in the rabbit, *Cardiovasc. Res.* 28 (1994) 980–986.
- [209] M. Tan, S. Li, M. Swaroop, K. Guan, L.W. Oberley, Y. Sun, Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 12061–12066.
- [210] R. Tao, M.C. Coleman, J.D. Pennington, O. Ozden, S.-H. Park, H. Jiang, H.-S. Kim, C.R. Flynn, S. Hill, W. Hayes McDonald, et al., Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress, *Mol. Cell* 40 (2010) 893–904.
- [211] T. Teixeira, M. Diniz, R. Calado, R. Rosa, Coral physiological adaptations to air exposure: heat shock and oxidative stress responses in *Veretillum cynomorium*, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 439 (2013) 35–41.
- [212] C.H. Trasviña-Arenas, A. García-Triana, A.B. Peregrino-Uriarte, G. Yepiz-Plascencia, White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation, *Comp. Biochem. Physiol. B* 164 (2013) 44–52.
- [213] R.K. Tripathi, V. Mohindra, A. Singh, R. Kumar, R.M. Mishra, J.K. Jena, Physiological responses to acute experimental hypoxia in the air-breathing Indian catfish, *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758), *J. Biosci.* 38 (2013) 373–383.
- [214] K. Trübenbach, T. Teixeira, M. Diniz, R. Rosa, Hypoxia tolerance and antioxidant defense system of juvenile jumbo squids in oxygen minimum zones, *Deep Sea Res. II* 95 (2013) 209–217.
- [215] A.H.H. Tseng, S.-S. Shieh, D.L. Wang, SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage, *Free Radic. Biol. Med.* 63 (2013) 222–234.

- [216] J.F. Turrens, Possible role of the NADH-fumarate reductase in superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma brucei*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 25 (1987) 55–60.
- [217] J.F. Turrens, Mitochondrial formation of reactive oxygen species, *J. Physiol.* 552 (2003) 335–344.
- [218] T.L. Vanden Hoek, L.B. Becker, Z. Shao, C. Li, P.T. Schumacker, Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18092–18098. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.29.18092>.
- [219] J.P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín, R. Elsner, R.M. Ortiz, Coping with physiological oxidative stress: a review of antioxidant strategies in seals, *J. Comp. Physiol. B* 182 (2012) 741–750.
- [220] M.-L. Vidal, A. Bassères, J.-F. Narbonne, Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller), *Comp. Biochem. Physiol. C* 132 (2002) 93–104.
- [221] É. Vig, J. Nemcsók, The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpio* L., *J. Fish Biol.* 35 (1989) 23–25.
- [222] Y. Voituron, S. Servais, C. Rostaing, T. Douki, H. Barré, Oxidative DNA damage and antioxidant defenses in the European common lizard (*Lacerta vivipara*) in supercooled and frozen states, *Cryobiology* 52 (2006) 74–82.
- [223] A. Vosloo, A. Laas, D. Vosloo, Differential responses of juvenile and adult South African abalone (*Haliotis midae* Linnaeus) to low and high oxygen levels, *Comp. Biochem. Physiol. A* 164 (2013) 192–199.
- [224] G.B. Waypa, N.S. Chandel, P.T. Schumacker, Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing, *Circ. Res.* 88 (2001) 1259–1266.
- [225] A.F. Welker, D.C. Moreira, É.G. Campos, M. Hermes-Lima, Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability, *Comp. Biochem. Physiol. A* 165 (2013) 384–404.
- [226] J.D. West, L.J. Marnett, Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death, *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2006) 173–194.
- [227] D. Wilhelm Filho, M.A. Torres, E. Zaniboni-Filho, R.C. Pedrosa, Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847), *Aquaculture* 244 (2005) 349–357.
- [228] W.G. Willmore, K.B. Storey, Glutathione systems and anoxia tolerance in turtles, *Am. J. Physiol.* 273 (1997) R219–R225.
- [229] D.A. Windrem, W.Z. Plachy, The diffusion-solubility of oxygen in lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 600 (1980) 655–665.
- [230] S. Woo, V. Denis, H. Won, K. Shin, G. Lee, T.-K. Lee, S. Yum, Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mollusca) exposed to hypoxia, *Zool. Stud.* 52 (2013) 15.
- [231] S. Woo, H.-Y. Jeon, S.R. Kim, S. Yum, Differentially displayed genes with oxygen depletion stress and transcriptional responses in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*, *Comp. Biochem. Physiol. D* 6 (2011) 348–356.
- [232] Z.J. Xiong, K.B. Storey, Regulation of liver lactate dehydrogenase by reversible phosphorylation in response to anoxia in a freshwater turtle, *Comp. Biochem. Physiol. B* 163 (2012) 221–228.
- [233] H. Yin, L. Xu, N.A. Porter, Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis, *Chem. Rev.* 111 (2011) 5944–5972.
- [234] K.M. Young, R.L. Cramp, C.E. Franklin, Each to their own: skeletal muscles of different function use different biochemical strategies during aestivation at high temperature, *J. Exp. Biol.* 216 (2013) 1012–1024.
- [235] T. Zenteno-Savín, J.P. Vázquez-Medina, N. Cantó-Medellín, P.J. Ponganis, R. Elsner, Ischemia/reperfusion in diving birds and mammals: how they avoid oxidative damage, in: D. Abele, J.P. Vázquez-Medina, T. Zenteno-Savín (Eds.), *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, Wiley, Chichester, UK, 2011, pp. 178–189.
- [236] J. Zhang, K.K. Biggar, K.B. Storey, Regulation of p53 by reversible post-transcriptional and post-translational mechanisms in liver and skeletal muscle of an anoxia tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*, *Gene* 513 (2013) 147–155.
- [237] Y. Zhang, S. Liang, J. He, Y. Bai, Y. Niu, X. Tang, D. Li, Q. Chen, Oxidative stress and antioxidant status in a lizard *Phrynocephalus vlangalii* at different altitudes or acclimated to hypoxia, *Comp. Biochem. Physiol. A* 190 (2015) 9–14.
- [238] X. Zhu, L. Zuo, A.J. Cardounel, J.L. Zweier, G. He, Characterization of *in vivo* tissue redox status, oxygenation, and formation of reactive oxygen species in posts ischemic myocardium, *Antioxid. Redox Signal.* 9 (2007) 447–455.
- [239] Y. Zhu, S.-H. Park, O. Ozden, H.-S. Kim, H. Jiang, A. Vassilopoulos, D.R. Spitz, D. Gius, Exploring the electrostatic repulsion model in the role of Sirt3 in directing MnSOD acetylation status and enzymatic activity, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 828–833.
- [240] J.L. Zweier, J.T. Flaherty, M.L. Weisfeldt, Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 1404–1407.

3 CAPÍTULO 3 – DISTRIBUIÇÃO DO FENÔMENO DE PREPARO PARA O ESTRESSE OXIDATIVO NO REINO ANIMAL

3.1 Resumo

Muitas espécies animais tolerantes a hipóxia apresentam aumentos da atividade e/ou expressão de antioxidantes endógenos durante situações de privação de O₂ – um fenômeno chamado de “Preparo para o Estresse Oxidativo” (POS). Este fenômeno é observado durante a exposição ao congelamento, desidratação severa, exposição aérea de organismo de respiração aquática e estivação. Apesar do grande número de relatos do POS nestas condições, a prevalência do POS dentro do reino animal nunca foi analisada. Uma dificuldade importante é a própria definição do fenômeno do POS, já que em muitos casos há registros de aumentos de níveis de antioxidantes simultaneamente com registros de queda durante estresses de baixa de O₂ e estivação. Portanto, foram estabelecidos três critérios de classificação, com diferentes graus de restrição, com o objetivo de analisar a ocorrência do POS entre animais.

Critério 1 – POS-positivo: ocorrência de um aumento do nível de qualquer antioxidante de qualquer magnitude em qualquer tecido na fase de privação de O₂. POS-negativo: ocorrência de queda do nível de um antioxidante qualquer sem eventos de aumento. POS-neutro: se não há mudanças.

Critério 2 – POS-positivo: ocorrência de um aumento do nível de qualquer antioxidante maior que 50% (em relação ao controle) em qualquer tecido na fase de privação de O₂. POS-negativo: ocorrência de uma queda do nível de um antioxidante qualquer maior que 25% (em relação ao controle) sem eventos de aumento. POS-neutro: se não há mudanças acima dos limiares.

Critério 3 – POS-positivo: ocorrência de mais eventos de aumento do nível de qualquer antioxidante maior que 50% (em relação ao controle) do que eventos de queda maior que 25% (em relação ao controle). POS-negativo: ocorrência de mais eventos de queda do que eventos de aumento. POS-neutro: se não há mudanças acima dos limiares, ou se há o mesmo número de eventos de queda e aumento.

Com base nestes critérios, foram analisados todos os estudos sobre a modulação de antioxidantes durante a privação de O₂ disponíveis em diferentes bancos de dados. As espécies foram classificadas como POS-positivas, POS-negativas ou POS-neutras. A prevalência de animais POS-positivos (em um universo

de 102 espécies de 8 filos) foi dependente do estresse, Nos casos de estivação e desidratação a prevalência foi de 91-100%; para hipóxia foi de 37,5-53%, dependendo do critério usado. O percentual de espécies POS-positivas foi de 54-77%, 64-77% e 75-86% nos casos de exposição aérea, anoxia e congelamento respectivamente. A análise global de todos as situações em conjunto resultou em uma prevalência de espécies POS-positivas de 58-68%. A alta prevalência do fenômeno do POS em animais aponta para um papel fundamental da modulação dos sistemas antioxidantes durante estresses de baixa de O₂.

3.2 How Widespread is Preparation for Oxidative Stress in the Animal Kingdom?

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 200 (2016) 64–78



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpa



How widespread is preparation for oxidative stress in the animal kingdom?☆



Daniel C. Moreira^a, Larissa P.R. Venancio^b, Marcus A.C.T. Sabino^{a,c}, Marcelo Hermes-Lima^{a,*}

^a Laboratório de Radicais Livres, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, 70910-900, DF, Brazil

^b Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOPB), Barreiras, 47805-100, BA, Brazil

^c Faculdade da Ceilândia, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, 72220-140, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 November 2015

Received in revised form 26 January 2016

Accepted 29 January 2016

Available online 4 February 2016

Keywords:

Air exposure

Anoxia

Antioxidant

Dehydration

Estivation

Freezing

Glutathione

Hypoxia

Oxidative stress

Reactive oxygen species

ABSTRACT

It is well known that many anoxia/hypoxia tolerant species when exposed to anoxia/hypoxia respond by increasing the activity/expression of antioxidant enzymes and/or glutathione levels—a phenomenon called “preparation for oxidative stress” (POS). This phenomenon was also observed during freezing exposure, severe dehydration, aerial exposure of water-breathing animals and estivation. However, as far as we know, there is no analysis available of the prevalence of POS among animal species. A major problem is the very definition of POS, since many animal species show both increases and decreases of antioxidants during low oxygen stress and estivation. Therefore, we established three different criteria; from inclusive to restrictive and analyzed how widespread the POS phenomenon is in the animal kingdom. We analyzed all available papers in several databases about the modulation of antioxidant defenses during oxygen deprivation or estivation. Based on the magnitude of change (as % change) during the specific low oxygen stresses or estivation, we classified each species as POS-positive, POS-negative or POS-neutral, considering the three different criteria. The prevalence of POS-positive animals (102 species from 8 phyla) was stress-dependent: in estivation and dehydration it was 91–100%, while in hypoxia it was 37.5–53%, depending on the criteria. In the case of air exposure, anoxia and freezing the proportions of POS-positive species were 54–77%, 64–77% and 75–86%, respectively. Overall, the prevalence of POS was 58 to 68% when all stresses and all species were analyzed together. The results indicate the key importance of POS as a survival strategy of animals exposed to freezing, dehydration and estivation, and, to a lesser extent, to oxygen deprivation itself (i.e. hypoxia and anoxia).

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The introduction of molecular oxygen in the atmosphere and its use as a final electron acceptor (as well as the concomitant production of reactive oxygen species) shaped the way life evolved on Earth. As a result, animals were able to produce energy more efficiently, but became highly dependent on oxygen and sensitive to changes in oxygen availability. However, many animal species escape this rule, in special ectothermic animals that developed mechanisms to endure/survive extreme conditions, in which the oxygen availability is low or even absent (hypoxia, anoxia, freezing, severe dehydration and aerial exposure of water-breathing animals; Krivoruchko and Storey, 2015; Welker et al., 2013).

In order to understand the biochemical mechanisms responsible for the adaptation to oxygen deprivation, a large number of research

groups have analyzed the activity or expression of antioxidant enzymes, as well as levels of glutathione (GSH), in animals under low oxygen stress or estivation (for review see Hermes-Lima et al., 2015). Antioxidant defenses (antioxidant enzymes and GSH) are important for the management of reactive oxygen species (ROS) and the control of oxidative damage. Moreover, they appear to play a very important role in the biochemical adaptation of animal species that tolerate oxygen deprivation (Krivoruchko and Storey, 2015). In many studies, it was observed that exposure to low oxygenation or estivation bring about the increase in activity/expression of antioxidant enzymes and/or GSH levels (e.g. Almeida et al., 2005; Hermes-Lima and Storey, 1995, 1996, 1998; Joannis and Storey, 1996; Teixeira et al., 2013).

After the observation of increased endogenous antioxidant levels under low oxygenation and in conditions of metabolic depression, Hermes-Lima et al. (1998) named this phenomenon as “preparation for oxidative stress” (POS). This preventive measure would be the way these animals avoid the potential damage caused by the expected ROS overgeneration at the moment of reoxygenation after oxygen deprivation. However, there are many pieces of evidence indicating that ROS formation may also be increased under low oxygen stress for both hypoxia-sensitive and hypoxia-tolerant species (e.g. increased levels

☆ This paper was presented at the 'Second International Conference on Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems' held in LaPaz, Baja California Sur, Mexico, November 11–14, 2015.

* Corresponding author at: Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900, Brasília, DF, Brazil. Tel.: +55 61 3107 3103.

E-mail addresses: hermes@unb.br, hermes.unb@gmail.com (M. Hermes-Lima).

of lipid hydroperoxides, carbonyl protein, disulfide glutathione and markers of DNA damage; Almeida et al., 2005; Hermes-Lima and Storey, 1996, 1998; Lushchak and Bagnyukova, 2006, 2007; Pannunzio and Storey, 1998; Romero et al., 2007).

Based on these observations, it was proposed that the activation of endogenous antioxidants during low oxygen stress could be triggered by an increase in mitochondrial ROS generation during oxygen deprivation (Welker et al., 2013). Recently, this explanation was further developed and new features were added to the POS concept. It was proposed that the events that underlie the increased expression of endogenous antioxidants in response to oxygen restriction (and during estivation) are related to (1) a temporarily increase in generation of superoxide radicals and H₂O₂ as a result of a more reduced state of the mitochondrial electron transport chain components, (2) the increment in ROS levels may cause redox imbalance, oxidation of cellular components, and production of other oxidizing species, (3) the activation of redox-sensitive transcription factors (Nrf2, FoxOs, NF-κB, HIF-1α, and p53), resulting in increased expression of antioxidant enzymes, and (4) the post-translational modifications in both antioxidant enzymes and redox-sensitive transcription factors (Hermes-Lima et al., 2015).

Regardless of the molecular mechanism by which the POS process takes place, it is clear that many animals do increase their endogenous antioxidants when exposed to low oxygen stress (Hermes-Lima et al., 2015). On the other hand, it is also clear that there are animal species for which there is no evidence of POS (Leveelahti et al., 2014) and others in which antioxidant levels decrease (Welker et al., 2013). Moreover, within one same species the modulation of antioxidants differs depending on tissue, developmental stage, age, population, and which antioxidant is analyzed. Thus, the present study is an attempt to classify animal species that present POS (POS-positive), animals that do not present it (POS-neutral) and those that respond by decreasing their endogenous antioxidants (POS-negative) when exposed to low oxygen stress or estivation. To do so, we established different criteria; from inclusive to restrictive and analyzed how widespread the POS phenomena is in the animal kingdom. The significance of such criteria and future directions are discussed.

2. Material and methods

We analyzed all available papers in several databases (PubMed, Web of Science, Scopus, Research Gate and Google Scholar) about the modulation of antioxidant defenses during situations of low oxygen stress and estivation. We found 189 papers with original data to start our analysis. Any study that measured the enzymatic antioxidants, catalase, glutathione peroxidase (GPX), selenium-dependent glutathione peroxidase (SeGPX), glutathione transferase (GST), peroxiredoxin (PRX), and superoxide dismutase (SOD, and its isoforms CuZnSOD, MnSOD and cytosolic MnSOD), as well as the non-enzymatic antioxidants glutathione (GSH) and metallothionein (MT) at activity, protein, transcript and/or concentration levels were included in the list. Metallothionein was added to the classical antioxidant defenses due to its antioxidant properties (Hussain et al., 1996) in addition to its metal binding function. Besides their well-known role in detoxification pathways, GSTs are commonly analyzed in studies about oxidative stress due to its functions in redox metabolism (Kalinina et al., 2014). For instance, GSTs are able to reduce organic hydroperoxides and to conjugate lipid peroxidation products (Board and Menon, 2013). Thus, GSTs were included in the antioxidants list. Moreover, the expression of MTs and GSTs is regulated by the antioxidant response element (Niture et al., 2014). Others papers include high throughput approaches such as cDNA arrays and RNA-seq, as well as proteomics. Only papers that measured any of these parameters during the oxygen deprivation (or metabolic depression) phase were considered for a more detailed analysis.

Studies that only compared animals during the recovery phase from the low oxygen stress against the control group were removed from the list of 189 publications (e.g. papers that compare control animals versus

a frozen and thawed group, but did not compare frozen versus control). To take one example, hatchlings of the painted turtle *Chrysemys picta* were exposed to freezing or hypoxia for 48 h, but they were allowed to thaw and/or recover for 24 h before antioxidant capacity was assayed (Baker et al., 2007). Moreover, papers in which the comparison and the statistical significance between the low oxygen stressed (or estivating) group and the control/normoxic (or active) group was not clear were also removed. In the case of estivation, the values of estivating animals were compared to those of animals that were aroused for 24 h (when available). The reason is that the 24 h-aroused groups have been used as reference most often and, thus, it allows a wider comparison among studies. Herein, the term low oxygen stress refers to freezing, dehydration, air, anoxia and hypoxia exposures (Hermes-Lima et al., 2015). Estivation was considered separately.

Other papers about the redox metabolism and hypoxia tolerance that did not fit the requirements described in this section were also removed. These removed papers include studies that compared diving and non-diving species (Vázquez-Medina et al., 2006, 2007; Wilhelm Filho et al., 2002; Zenteno-Savin et al., 2010), mammals with different diving capacities (Cantú-Medellín et al., 2011), animals living permanently in hypoxic conditions (Joyner-Matos et al., 2007), fish inhabiting different depths (Janssens et al., 2000), and mussels inhabiting different heights (Letendre et al., 2009).

2.1. Preparation for oxidative stress criteria

The screening described above (starting with 189 publications) resulted in a smaller list of 142 papers. We collected the magnitude of change (as % change) during the specific low oxygen stress (or estivation) in comparison to the control group. Only statistically significant differences, as stated by the authors, were considered. When the % of change was not stated in the text and the values for each group were not available, the values were estimated from graphs by comparing the height of the column of the experimental group to that of the control group using an image editor software (GIMP v.2.8.14). Such values for animals exposed to freezing are shown in Table 2 (for the values from the other studies see supplementary tables). In some cases, the % change could not be extracted from the papers and in these cases only up-regulation or down-regulation was included in our dataset. Once the % change values were collected, we classified each species as POS-positive, POS-negative or POS-neutral based on three different criteria. This classification was made for each tissue. Importantly, when different activities (total- or selenium-dependent GPX) and isoforms (CuZnSOD, MnSOD and cytosolic MnSOD) were measured, they were considered individually. In the case of GST, however, for which more than five isoforms were measured in a few cases (Krivoruchko and Storey, 2010b; Malik and Storey, 2009; Storey et al., 2013), the average of the % change was calculated and considered for the next steps. Figs. 1 and 2 illustrate all the recorded changes (as %) in antioxidant parameters in tissues of animals species exposed to freezing and during estivation respectively.

2.2. First criterion

The first criterion was the occurrence of at least one statistically significant up-regulation event of antioxidant defense in any tissue at any time-point regardless of what happened in this or other tissues and at other time-points. In this criterion, if no changes occurred at all, the tissue/species was flagged as neutral, but if any down-regulation occurred (and no up-regulation) it was flagged as negative. To take one example, the activity of catalase increased by 35% in the brain of *Heteropneustes fossilis* after 6 h of air exposure (Paital, 2013). Although the activities of GPX and SOD decreased in the same tissue at the same time, this species was classified as POS-positive following the first criterion.

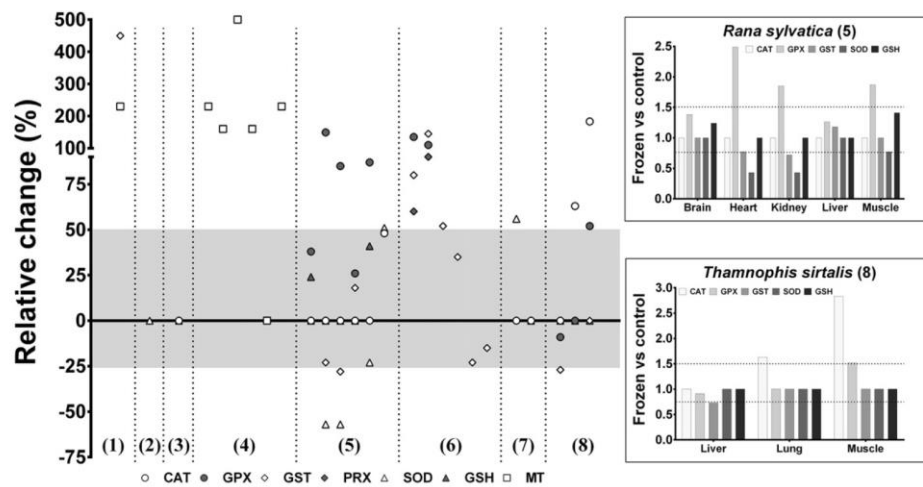


Fig. 1. Relative changes (expressed as the percentage of change) in activity, protein or mRNA levels of antioxidant parameters in tissues from frozen animals compared to control animals. Changes that were not statistically significant are presented as 0% change. Antioxidant parameters are catalase (CAT), total or selenium-dependent glutathione peroxidase (GPX), glutathione transferase isoforms (GST), peroxiredoxins (PRX), superoxide dismutase isoforms (SOD), total or reduced glutathione (GSH), and metallothionein (MT). Different numbers refer to different animal species. (1) *Dendrobaena octaedra* (Fisker et al., 2016); (2) *Belgica antarctica* (Lopez-Martinez et al., 2008); (3) *Eurosta solidaginis* (Joanisse and Storey, 1998); (4) *Littorina littorea* (English and Storey, 2003); (5) *Rana sylvatica* (Dawson and Storey, 2016; Dawson et al., 2015; Joanisse and Storey, 1998; Storey, 2004); (6) *Chrysemys picta* (Krivoruchko and Storey, 2010b; Storey, 2006); (7) *Lacerta vivipara* (Voituron et al., 2006); (8) *Thamnophis sirtalis* (Hermes-Lima and Storey, 1993). Each data point represents a single combination of species, time of exposure, tissue, antioxidant parameter and reference. The shaded area delimits the upper and lower thresholds set in criterion 2. Right panels represent an amplified view for species (5) and (8), in which data are presented as the frozen value over control value (changes not statistically significant are shown as 1.0 value at Y axis) the horizontal dashed lines mark the thresholds for criterion 2. Note the higher abundance of points above the upper threshold in comparison to the lower limit. Raw data used to make this graph is presented in Table 2.

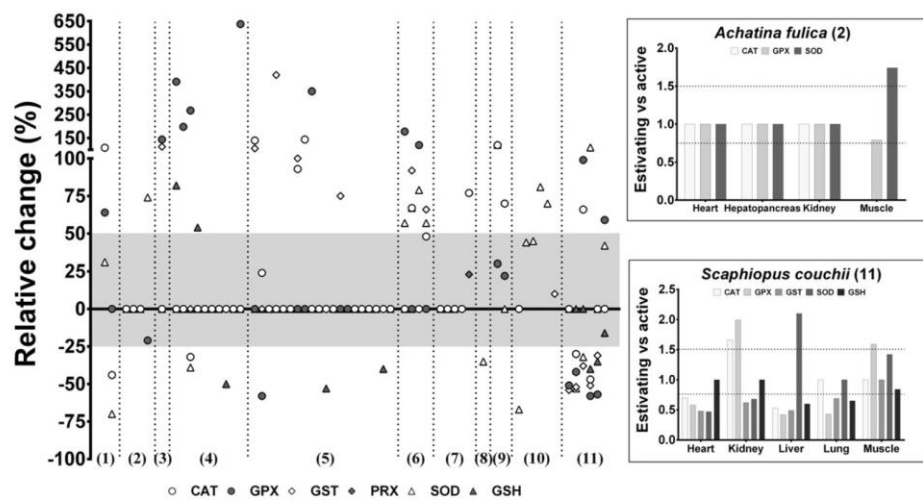


Fig. 2. Relative changes (expressed as the percentage of change) in activity, protein or mRNA levels of antioxidant parameters in tissues from estivating animals compared to control animals. Changes that were not statistically significant are presented as 0% change. Antioxidant parameters are catalase (CAT), total or selenium-dependent glutathione peroxidase (GPX), glutathione transferase isoforms (GST), peroxiredoxins (PRX), superoxide dismutase isoforms (SOD), and total or reduced glutathione (GSH). Different numbers refer to different animal species. (1) *Isostichopus badionotus* (Klanian, 2013); (2) *Achatina fulica* (Salway et al., 2010); (3) *Biomphalaria tenagophila* (Ferreira et al., 2003); (4) *Helix aspersa* (Nowakowska et al., 2011, 2014; Ramos-Vasconcelos et al., 2005; Ramos-Vasconcelos and Hermes-Lima, 2003); (5) *Helix pomatia* (Nowakowska et al., 2009a, 2009b, 2011, 2015); (6) *Otala lactea* (Hermes-Lima and Storey, 1995); (7) *Pomacea canaliculata* (Giraud-Billoud et al., 2013; Sun et al., 2013); (8) *Protopterus annectens* (Hiong et al., 2013, 2015; Loong et al., 2012); (9) *Protopterus dolloi* (Page et al., 2010); (10) *Cyclorana alboguttata* (Hudson et al., 2006; Reilly et al., 2013; Young et al., 2013); (11) *Scaphiopus couchii* (Grundt and Storey, 1998). Each data point represents a single combination of species, time of exposure, tissue, antioxidant parameter and reference. The shaded area delimits the upper and lower thresholds set in criterion 2. Note that for *S. couchii*, although a general trend of decreased antioxidants is observed, the changes in muscle resulted in the classification of this species as POS-positive in all three criteria. Raw data used to make this graph is available in supplementary material.

2.3. Second criterion

The second criterion was based on the definition of thresholds for up- and down-regulation events. This criterion was the occurrence of at least one up-regulation above a 50% threshold in any tissue at any time-point regardless of what happened in this or other tissues. On the other hand, the threshold for down-regulation was set at 25%. Figs. 1 and 2 show how the changes in antioxidant levels were distributed in reference to the thresholds for freezing and estivation, respectively. These threshold values were arbitrary and they are discussed in Section 3.1. Species were classified as in criterion 1, but only considering changes that reached the thresholds. Studies and animal species for which it was impossible to collect the % change were removed. In this criterion, *H. fossilis*, for example, is now classified as POS-negative, because the catalase increase did not reach the 50% threshold and the decrease of GPX was more than 25%.

2.4. Third criterion

The third criterion was the occurrence of more cases of up-regulation in comparison to down-regulation within a tissue at any time-point regardless of what happened in other tissues. Thus, only studies that measured at least two of the antioxidant parameters listed above were considered in criterion 3. In a few cases, we combined papers that had the same experimental procedure with the same animal species (these cases are described in Section 3). It should be noted that this criterion also uses the thresholds defined in the previous. For all three criteria the occurrence of one positive-flagged tissue was enough to classify the species as POS-positive. One limitation of this criterion is that sometimes in high throughput approaches it is not clear if the antioxidant parameters were unaffected by the low oxygen stress, if they were not detected or if it was not possible to identify the protein/transcript. Thus we only considered the changes that were evident in the studies. For some species that have been exposed to more than one kind of stress, when stresses were combined (such as the analysis of merged low oxygen stresses or all stresses together) the classification as POS-positive in one kind of stress was enough to define the species as POS-positive.

2.5. Prevalence of specific antioxidants in POS-positive species

We also analyzed which antioxidant was most commonly up-regulated in these situations of low-oxygen stress (and estivation). For this analysis, we combined all isoforms for one antioxidant. This was the case of GPX (total and selenium dependent), GST (several isoforms) and SOD (CuZnSOD, MnSOD and cytosolic MnSOD). To do so we recorded which antioxidants were up-regulated by any magnitude (criterion 1) in each animal species through the exposure to low oxygen stress or estivation. Thus, each animal generated a specific set of antioxidants that increased during low oxygen stress or estivation. In this way, each animal species could only contribute to one up-regulation event for each antioxidant, regardless if it had been measured and increased several times. The number of times each antioxidant was up-regulated was compared to the total number of up-regulations among animal species.

The case of freezing (Fig. 1) studies is described below to clarify the methodology. First, we recorded which antioxidants were found increased for a given species. To do so we combined observation from different tissues and papers when available. For freezing, the up-regulated antioxidants were: (a) GST and metallothionein for *Dendrobaena octaedra* (Fisker et al., 2016); (b) there was no up-regulation for *Belgica antarctica* (Lopez-Martinez et al., 2008) or *Eurosta solidganis* (Joanisse and Storey, 1998); (c) metallothionein for *Littorina littorea* (English and Storey, 2003); (d) catalase, GPX, GST, GSH, SOD and metallothionein for *Rana sylvatica* (Dawson et al., 2015; Dawson and Storey, 2016; Joanisse and Storey, 1996; Storey, 2004); (e) GPX, GST and PRX for *C. picta* (Storey, 2006); (f) SOD for *Lacerta vivipara* (Voituron et al.,

2006); (g) catalase and GPX for *Thamnophis sirtalis* (Hermes-Lima and Storey, 1993). Second, the numbers of animal species in which a given antioxidant was up-regulated were summed. For freezing, the result was 3 for GPX, 3 for GST, 3 for metallothionein, 2 for catalase, 2 for SOD, 1 for GSH, and 1 for PRX. Then, all these up-regulation events were added together. The result was a total of 15 up-regulation events. Finally, the contribution of each antioxidant was compared to the total number of up-regulation events. For freezing, the result was 20.0% for GPX, 20.0% GST, 20.0% for metallothionein, 13.3% for SOD, 13.3% for catalase, 6.7% for PRX, and 6.7% GSH. This procedure was repeated for the other stresses of anoxia, air exposure, dehydration, estivation and hypoxia.

3. Results and discussion

A total of 102 species from 8 animal phyla (Cnidaria, Nematoda, Annelida, Tardigrada, Arthropoda, Mollusca, Echinodermata, and Chordata) were analyzed from the redox metabolism point of view (Table 1). These species were distributed in the different low oxygen stresses and estivation as follows: 8 species in freezing, 9 species in dehydration, 13 species in air exposure, 11 species in estivation, 23 species in anoxia, and 57 species in hypoxia. Low oxygen stresses only (excluding estivation) accounted for 93 species. Among these, 18 species have been exposed to more than one kind of low oxygen stress or estivation. This is a great increase in comparison to the 14 animal species (removing the two hibernation examples therein) reported in a 2002 review that analyzed these same low oxygen stresses (Hermes-Lima and Zenteno-Savín, 2002). The cumulative number of papers and species studied each year, from 1989 to 2015, are shown in Fig. 3. Note that only papers in the 142 studies-list are considered.

3.1. Criteria

We defined three criteria in order to sort animal species as those that fit in the preparation for oxidative stress response, those that present an opposite response and those that does not respond (from the redox metabolism point of view). With the aim to obtain a fair evaluation, we proceeded from a weak and inclusive requirement to a restrictive and exclusive one. Each one of these criteria has its limitations. Indeed, criterion 1 is inclusive and does not regard what occurred to the antioxidant defense system as a whole. Moreover, very small changes (e.g. 5–20%) raise concerns about the reproducibility and experimental variations, even though differences are statistically significant (for a recent discussion on reproducibility see Nuzzo, 2014). In order to address the problems with criterion 1 we established a second criterion based on thresholds. Our thresholds were arbitrarily determined, since no reference to this kind of analysis was found for similar systems. There is, however, a threshold established for plant systems, in which a 2-fold (100% change) up-regulation of antioxidants was considered as a cut-off value (Blokhina and Fagerstedt, 2010). This cut-off was applied to transcriptomic data only. In contrast, most of studies compiled herein are changes in enzyme activity measurements. Thus, we defined a 50% increase, as well as a 25% decrease as our cut-off level. Still, criterion 2 does not account for what happened with other antioxidants within a tissue. Then, criterion 3 was designed to do so. The definition of third criterion resulted in the exclusion of several studies, because they only measured one of the antioxidants considered herein. One obvious limitation is that data about antioxidants that were not measured is not available. Overall, the problem stems from the definition of POS itself, which proved to be hard define. As can be concluded from Fig. 4, increasing the restrictiveness of the criteria had the general trend to reduce the prevalence of POS-positive species.

3.2. Low oxygen stress

The prevalence of POS-positive species of all low oxygen stresses (anoxia, air exposure, dehydration, freezing and hypoxia) combined

Table 1

Classification as POS-positive ((+)), POS-neutral (0), or POS-negative ([−]) within the three criteria of the 102 species exposed to anoxia (A), dehydration (D), estivation (E), freezing (F), hypoxia (H), or air exposure (R). Species that did not meet the minimum requirements for the criteria are marked with "na". Some species have been exposed to more than one kind of stress.

Species	Stress	Criteria			Reference
		1	2	3	
Cnidaria					
Anthozoa (corals)					
<i>Veretillum cynomorium</i>	R	(+)	(+)	(+)	Teixeira et al. (2013)
Nematoda					
Secernentea (nematodes)					
<i>Aphelenchoides fragariae</i>	D	(+)	(+)	(+)	Fu et al. (2012)
Annelida					
Polychaeta (fan worms and tube worms)					
<i>Arenicola marina</i>	H	[−]	[−]	[−]	Abele-Oeschger and Oeschger (1995)
<i>Heteromastus filiformis</i>	A	(+)	(+)	(+)	Abele et al. (1998)
<i>Nereis diversicolor</i>	A	0	0	0	Abele-Oeschger et al. (1994)
<i>Paralvinella grasslei</i>	H	[−]	[−]	[−]	Marie et al. (2006)
Clitellata (earth worms)					
<i>Dendrobaena octaedra</i>	F	(+)	(+)	(+)	Fisker et al. (2016)
Tardigrada					
Eutardigrada (water bears)					
<i>Milnesium tardigradum</i>	D	(+)	na	na	Schokraie et al. (2012)
<i>Paramacrobiotus richtersi</i>	D	(+)	(+)	(+)	Rizzo et al. (2010)
Arthropoda					
Malacostraca (amphipods, crabs and shrimps)					
<i>Callinectes danae</i>	R	[−]	[−]	[−]	Freire et al. (2011)
<i>Callinectes ornatus</i>	R	(+)	(+)	(+)	Freire et al. (2011)
<i>Callinectes sapidus</i>	H	[−]	[−]	[−]	Brouwer et al. (2004)
<i>Chasmagnathus granulata</i>	A	(+)	(+)	(+)	de Oliveira et al. (2005, 2006)
<i>Euphausia mucronata</i>	H	0	0	0	Tremblay and Abele (2015)
<i>Euphausia pacifica</i>	H	[−]	[−]	[−]	Tremblay and Abele (2015)
<i>Euphausia superba</i>	H	0	0	0	Tremblay and Abele (2015)
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	H	[−]	[−]	[−]	jiang et al. (2009)
<i>Lithodes santolla</i>	H	(+)	(+)	na	Alter et al. (2015)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	H	(+)	(+)	(+)	Multiple references
<i>Macrobrachium nipponense</i>	H	(+)	(+)	(+)	Sun et al. (2015)
<i>Monoporeia affinis</i>	H	(+)	(+)	(+)	Gorokhova et al. (2010, 2013)
<i>Niphargus rhenorhodanensis</i>	A	(+)	(+)	(+)	Lawniczak et al. (2013)
<i>Niphargus rhenorhodanensis</i>	H	(+)	(+)	(+)	Lawniczak et al. (2013)
<i>Palaemonetes pugio</i>	H	[−]	[−]	[−]	Brouwer et al. (2007)
<i>Paralomis granulosa</i>	R	(+)	(+)	(+)	Romero et al. (2007)
<i>Petrolisthes laevigatus</i>	H	(+)	(+)	na	Alter et al. (2015)
Maxillopoda (barnacles)					
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	A	(+)	(+)	(+)	Desai and Prakash (2009)
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	H	(+)	(+)	(+)	Desai and Prakash (2009)
Entognatha (springtails)					
<i>Folsomia candida</i>	D	(+)	na	na	Timmermans et al. (2009)
<i>Megaphorura arctica</i>	D	(+)	(+)	(+)	Clark et al. (2009), Sørensen et al. (2010)
Insecta (insects)					
<i>Anastrepha suspensa</i>	A	(+)	(+)	(+)	Lopez-Martinez and Hahn (2012)
<i>Belgica antarctica</i>	A	[−]	na	na	Lopez-Martinez et al. (2008)
<i>Belgica antarctica</i>	D	(+)	(+)	(+)	Lopez-Martinez et al. (2009)
<i>Belgica antarctica</i>	F	[−]	na	na	Lopez-Martinez et al. (2008)
<i>Chironomus riparius</i>	A	(+)	(+)	(+)	Forcella et al. (2007)
<i>Chironomus riparius</i>	H	(+)	(+)	(+)	Choi et al. (2000)
<i>Epiblema scudderiana</i>	A	0	0	0	Joanisse and Storey (1998)
<i>Eurosta solidaginis</i>	A	0	0	0	Joanisse and Storey (1998)
<i>Eurosta solidaginis</i>	F	0	0	0	Joanisse and Storey (1998)
<i>Polypedilum vanderplanki</i>	D	(+)	(+)	(+)	Cornette et al. (2010)
Mollusca					
Gastropoda (snails and limpets)					
<i>Achatina fulica</i>	E	(+)	(+)	(+)	Salway et al. (2010)
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	A	(+)	[−]	[−]	Ferreira et al. (2003)
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	E	(+)	(+)	(+)	Ferreira et al. (2003)
<i>Haliotis discus</i>	H	(+)	(+)	(+)	De Zoysa et al. (2009)
<i>Haliotis midae</i>	H	[−]	[−]	[−]	Vosloo et al. (2013a, 2013b)
<i>Helix aspersa</i>	A	(+)	(+)	(+)	Welker (2009)
<i>Helix aspersa</i>	E	(+)	(+)	(+)	Multiple references
<i>Helix pomatia</i>	E	(+)	(+)	(+)	Multiple references
<i>Littorina littorea</i>	A	(+)	(+)	(+)	Multiple references
<i>Littorina littorea</i>	F	(+)	(+)	na	English and Storey (2003)
<i>Nacella concinna</i>	H	(+)	[−]	[−]	Weihe et al. (2010)
<i>Nacella concinna</i>	R	(+)	[−]	[−]	Weihe et al. (2010)

Table 1 (continued)

Species	Stress	Criteria			Reference
		1	2	3	
Gastropoda (snails and limpets)					
<i>Nacella deaurata</i>	R	(+)	(+)	(+)	Pöhlmann et al. (2011)
<i>Nacella magellanica</i>	R	(+)	(+)	(+)	Pöhlmann et al. (2011)
<i>Otala lactea</i>	E	(+)	(+)	(+)	Hermes-Lima and Storey (1995)
<i>Pomacea canaliculata</i>	E	(+)	(+)	(+)	Giraud-Billoud et al. (2013), Sun et al. (2013)
Bivalvia (clams, oysters and mussels)					
<i>Arctica islandica</i>	A	(+)	(+)	(+)	Multiple references
<i>Arctica islandica</i>	H	0	0	0	Philipp et al. (2012), Strahl et al. (2011a)
<i>Astarte borealis</i>	H	[–]	[–]	[–]	Abele-Oeschger and Oeschger (1995)
<i>Chamelea gallina</i>	A	[–]	[–]	[–]	Monari et al. (2005)
<i>Chlamys farreri</i>	H	(+)	(+)	na	Chen et al. (2007a)
<i>Chlamys farreri</i>	R	(+)	0	na	Chen et al. (2007b)
<i>Corbicula fluminea</i>	H	(+)	0	0	Vidal et al. (2002)
<i>Crassostrea gigas</i>	H	(+)	(+)	(+)	David et al. (2005), Sussarellu et al. (2010)
<i>Crassostrea gigas</i>	R	(+)	(+)	na	Zhang et al. (2012)
<i>Mercenaria mercenaria</i>	H	0	0	0	Joyner-Matos et al. (2009)
<i>Mytilus edulis</i>	H	0	0	0	Rivera-Ingraham et al. (2013)
<i>Mytilus edulis</i>	R	[–]	[–]	na	Letendre et al. (2008)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	H	(+)	(+)	0	Woo et al. (2011, 2013)
<i>Perna perna</i>	R	(+)	(+)	(+)	Almeida et al. (2005), Almeida and Bainy (2006)
<i>Pinctada fucata</i>	R	[–]	[–]	[–]	Kuchel et al. (2012)
Cephalopoda (squids)					
<i>Dosidicus gigas</i>	H	[–]	[–]	[–]	Trübenbach et al. (2013)
Echinodermata					
Holothuroidea (sea cucumbers)					
<i>Isostichopus badionotus</i>	E	(+)	(+)	(+)	Klanian (2013)
Chordata					
Elasmobranchii (sharks)					
<i>Hemiscyllium ocellatum</i>	H	0	0	0	Levelahti et al. (2014)
Sarcopterygii (lobe-finned fish)					
<i>Protopterus annectens</i>	E	(+)	[–]	na	Multiple references
<i>Protopterus dollai</i>	E	(+)	(+)	(+)	Page et al. (2010)
Actinopterygii (ray-finned fish)					
<i>Benthoema panamense</i>	H	(+)	[–]	[–]	Lopes et al. (2013)
<i>Carassius auratus</i>	A	(+)	(+)	(+)	Lushchak et al. (2001)
<i>Carassius auratus</i>	H	(+)	na	na	Zhong et al. (2009)
<i>Clarias batrachus</i>	H	(+)	(+)	(+)	Tripathi et al. (2013)
<i>Cyprinus carpio</i>	H	(+)	(+)	(+)	Multiple references
<i>Fundulus heteroclitus</i>	H	0	0	0	Ransberry et al. (2016)
<i>Gadus morhua</i>	H	[–]	[–]	[–]	Olsvik et al. (2006)
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	H	[–]	0	0	Levelahti et al. (2011, 2014)
<i>Gillichthys mirabilis</i>	H	(+)	(+)	na	Gracey et al. (2001)
<i>Gillichthys seta</i>	H	[–]	[–]	na	Gracey et al. (2001)
<i>Gymnocephalus cernua</i>	H	(+)	(+)	(+)	Tiedke et al. (2014)
<i>Heteropneustes fossilis</i>	R	(+)	[–]	[–]	Paital (2013, 2014)
<i>Hyphessobrycon callistus</i>	H	(+)	(+)	(+)	Pan et al. (2010)
<i>Leiostomus xanthurus</i>	H	(+)	(+)	(+)	Cooper et al. (2002)
<i>Leporinus elongatus</i>	H	(+)	(+)	(+)	Wilhelm Filho et al. (2005)
<i>Leporinus macrocephalus</i>	H	[–]	[–]	[–]	Riffel et al. (2012)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	A	(+)	0	na	Wulff et al. (2008)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	H	0	0	0	Levelahti et al. (2014)
<i>Oreochromis niloticus</i>	H	0	0	0	Welker et al. (2012)
<i>Oryzias latipes</i>	H	(+)	(+)	na	Oehlers et al. (2007)
<i>Perca flavescens</i>	H	0	0	na	Grasset et al. (2014)
<i>Percottus glenii</i>	H	(+)	(+)	(+)	Lushchak and Bagnyukova (2007)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	H	[–]	[–]	[–]	Multiple references
<i>Platichthys flesus</i>	H	[–]	[–]	[–]	Tiedke et al. (2014)
<i>Porichthys notatus</i>	H	[–]	[–]	na	Craig et al. (2014)
<i>Rhamdia quelen</i>	H	(+)	[–]	[–]	Dolci et al. (2014), Riffel et al. (2014)
<i>Sparus aurata</i>	H	(+)	[–]	[–]	Pérez-Jiménez et al. (2012)
<i>Triphoturus mexicanus</i>	H	(+)	(+)	(+)	Lopes et al. (2013)
Amphibia (salamanders, frogs and toads)					
<i>Calotriton asper</i>	A	[–]	[–]	[–]	Issartel et al. (2009)
<i>Cyclorana alboguttata</i>	E	(+)	(+)	(+)	Multiple references
<i>Proteus anguinus</i>	A	[–]	[–]	[–]	Issartel et al. (2009)
<i>Rana pipiens</i>	A	(+)	(+)	(+)	Hermes-Lima and Storey (1996)
<i>Rana pipiens</i>	D	(+)	(+)	(+)	Hermes-Lima and Storey (1998)
<i>Rana sylvatica</i>	F	(+)	(+)	(+)	Multiple references
<i>Scaphiopus couchii</i>	E	(+)	(+)	(+)	Grundy and Storey (1998)
<i>Xenopus laevis</i>	D	(+)	(+)	(+)	Malik and Storey (2009, 2011)
Reptilia (lizards, snakes and turtles)					
<i>Chrysemys picta</i>	A	(+)	(+)	(+)	Storey (2006)
<i>Chrysemys picta</i>	F	(+)	(+)	(+)	Storey (2006), Krivoruchko and Storey (2010b)
<i>Lacerta vivipara</i>	F	(+)	(+)	(+)	Voituron et al. (2006)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Species	Stress	Criteria			Reference
		1	2	3	
<i>Phrynocephalus vlangalii</i>	H	(+)	(+)	(+)	Zhang et al. (2015)
<i>Thamnophis sirtalis</i>	A	(+)	(+)	(+)	Hermes-Lima and Storey (1993)
<i>Thamnophis sirtalis</i>	F	(+)	(+)	(+)	Hermes-Lima and Storey (1993)
<i>Trachemys scripta</i>	A	(+)	(+)	(+)	Multiple references
Mammalia (mole-rats)					
<i>Spalax galili</i>	H	[–]	[–]	[–]	Soria-Valles et al. (2010), Schülke et al. (2012)
<i>Spalax judaei</i>	H	(+)	(+)	(+)	Soria-Valles et al. (2010), Schülke et al. (2012)

Species with multiple references: *Litopenaeus vannamei* (Felix-Portillo et al., 2014; García-Triana et al., 2010; Kniffin et al., 2014; Li et al., 2016; Parrilla-Taylor and Zenteno-Savín, 2011; Trasviña-Arenas et al., 2013), *Helix aspersa* (Nowakowska et al., 2011, 2014; Ramos-Vasconcelos and Hermes-Lima, 2003; Ramos-Vasconcelos et al., 2005), *Helix pomatia* (Nowakowska et al., 2009a, 2009b, 2010, 2011, 2015), *Littorina littorea* (English and Storey, 2003; Pannunzio and Storey, 1998; Storey et al., 2013), *Arctica islandica* (Philipp et al., 2012; Strahl et al., 2011a, 2011b), *Protoperus annectens* (Hiong et al., 2013, 2015; Loong et al., 2012), *Cyprinus carpio* (Lushchak et al., 2005; Mustafa et al., 2011; Vig and Nemesóok, 1989), *Piaractus mesopotamicus* (Bastos et al., 2013; Hauser-Davis et al., 2014; Sampaio et al., 2008), *Cyclorana alboguttata* (Hudson et al., 2006; Reilly et al., 2013; Young et al., 2013), *Rana sylvatica* (Dawson and Storey, 2016; Dawson et al., 2015; Joannis and Storey, 1996; Storey, 2006), *Trachemys scripta* (Jensen et al., 2014; Krivoruchko and Storey, 2010a, 2013; Willmore and Storey, 1997a, 1997b, 2005).

started at 64.5% for criterion 1 (60 species out of 93), went down to 54.9% for criterion 2 (50 species out of 91), and then to 53.0% for criteria 3 (44 species out of 83) (Fig. 5). Hypoxia had a major effect on these percentages because more than half of animal species exposed to low oxygen stress was from hypoxia studies. Because some species have been exposed to more than one kind of low oxygen stress, comparison between stresses can be made. For example, the limpet *Nacella concinna* was classified as POS-negative (criteria 2 and 3) for both air exposure and hypoxia. Moreover, slight differences can also be identified. Larvae of the midge *Chironomus riparius* were flagged as POS-positive for both anoxia and hypoxia exposures. The identity of the up-regulated antioxidants was different between the two stresses however. Whole body activities of catalase, GPX and GST increased in *C. riparius* larvae exposed to anoxia for 24 h (Forcella et al., 2007). When larvae from the same species were exposed to hypoxia (1.6 mg O₂ L⁻¹), GST, CuZnSOD and MnSOD activities increased in whole body homogenates, while catalase and GPX activities did not change significantly (Choi et al., 2000).

Some species may respond differently when exposed to different stress. This is the case of *B. antarctica*, which was flagged negative, positive, and negative for anoxia, dehydration and freezing stresses respectively following criterion 1 (other criteria could not be applied because the % change was not available). The same antioxidants (catalase and MnSOD at mRNA level) were measured for the three stresses, although the duration of exposures was 48 h for anoxia and freezing, and 12 h or 14 days for dehydration. These cases point out that, although cell oxygen availability is a common feature among these stresses, they may

not be fully comparable when it comes to the modulation of antioxidant defenses/redox metabolism. Among low oxygen stresses, freezing and dehydration had the highest prevalence of positive species. One common feature of these two conditions that could affect the redox metabolism is the osmotic stress caused by the loss of cellular water to the extracellular spaces and/or to the environment. Overall, 53% of the animal species exposed to low oxygen stress (excluding estivation) were flagged as POS-positive (as in criterion 3) indicating that the majority of the analyzed species exposed to low oxygen stress increase their endogenous antioxidants.

As can be seen from the studies that analyzed several tissues, the antioxidant response is tissue-specific in many cases (Supplementary Tables). To take one example, SOD activity decreased in brain, it did not change in muscle, and it increased in liver of the fish *Percottus glenii* after 6 h of hypoxia exposure (Lushchak and Bagnyukova, 2007). Different tissues have different oxygen partial pressures at steady-state conditions (Carreau et al., 2011). Thus, it is expected that the tissues of animals exposed to low oxygen stress experience different degrees of oxygen deprivation and at different times. In addition to the peculiarities regarding the functions of each tissue, such factors could differentially affect the antioxidant response for each tissue.

3.2.1. Anoxia

Anoxia can be considered the most extreme situation of low oxygen stress because oxygen is completely absent in the environment. Within tissues, however, there must be a transition phase between normal oxygenation levels and those resulting from the anoxic exposure. Moreover, due to the polarity of molecular oxygen, O₂ may persist even for long periods of anoxia exposure. The percentage of POS-positive animal species (23 species were analyzed) ranged from 74% to 64% depending

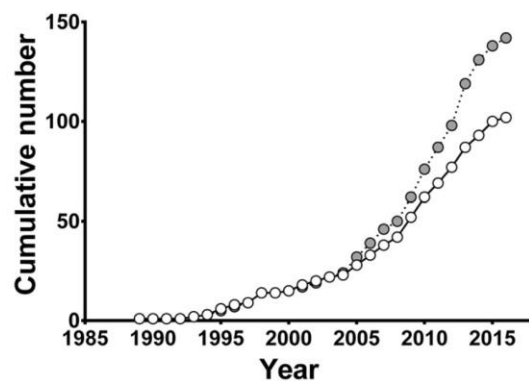


Fig. 3. Cumulative number of animal species (white circles) and publications (gray circles) for each year from 1989 to 2015. Publications dated as 2016 but already available were also included. Only the 142 papers that met the requirements described in Section 2 were considered.

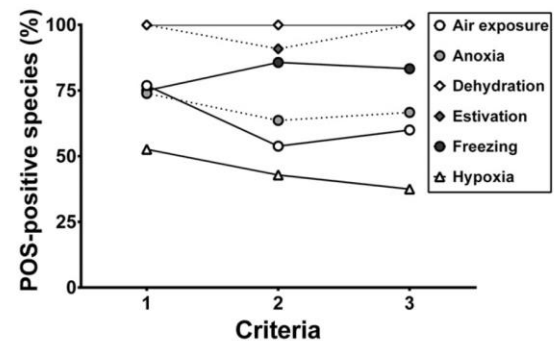


Fig. 4. Effect of criteria restrictiveness on the prevalence of POS-positive animal species for the stresses of air exposure, anoxia, dehydration, estivation, freezing, and hypoxia.

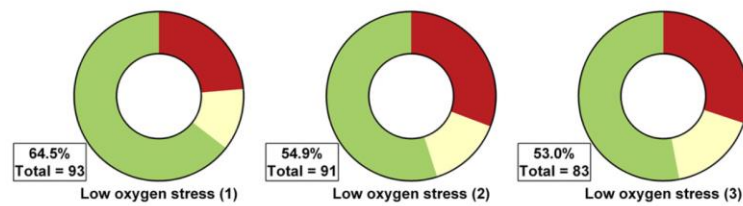


Fig. 5. Distribution of POS-positive (green), POS-neutral (yellow) and POS-negative (red) animal species within the three different criteria for studies on low oxygen stresses (air exposure, anoxia, dehydration, freezing and hypoxia). Prevalence of POS-positive species and the total number of species for each criterion are highlighted in the boxes. Note that the number of species decreases as criteria proceed due to the requirements of each criterion.

on the criterion (Fig. 6). Among anoxia studies, the red-eared slider *Trachemys scripta* has been the most studied species, probably due to its remarkable anoxia-tolerance. Early studies showed a general decrease of the activity many antioxidant enzymes in several tissues (Willmore and Storey, 1997a, 1997b). More recently, studies reported increased transcript levels for catalase (Krivoruchko and Storey, 2013), as well as CuZnSOD and MnSOD (Krivoruchko and Storey, 2010a) when *T. scripta* was exposed to anoxia for 5 h. These increases in the levels of mRNA for antioxidant enzymes were related to the activation of redox-sensitive transcription factors NF- κ B (Krivoruchko and Storey, 2010a) and FoxOs (Krivoruchko and Storey, 2013). The activation of redox-sensitive transcription factor and increased mRNA for antioxidants make *T. scripta* a good example of the activation of antioxidant pathways in response to low oxygen stress. Regarding the criteria application, the 2013 study would be removed following the third criterion, because it only measured one of the antioxidants from our list. Since the exact same anoxia protocol was used, these studies were combined (avoiding the elimination of the study) and the turtle species flagged as POS-positive.

3.2.2. Hypoxia

Hypoxia stress accounted for the majority of studied species (57 animal species), and was also the stress that showed the lowest proportion of POS-positive species (Fig. 4). The percentage of POS-positive ranged from 53% (criterion 1) to 37.5% (criterion 3, with 18 positive-flagged species out of 48) (Fig. 6). In the last criterion the POS-positive and POS-negative shared the same value of 37.5% of the studied species. Hypoxia is also a stress in which protocols vary greatly. For example, when looking at studies on fish species exposure time ranged from 2 h (Lushchak and Bagnyukova, 2007) to 6 weeks (Olsvik et al., 2006), and oxygen levels ranged from 0.28 (Welker et al., 2012) to 6.5 mg O₂ L⁻¹ (Tiedke et al., 2014). Moreover, protocols vary from slow and gradual decrease in oxygen levels to a more rapidly change. Such variations are explained by the different oxygen tensions normally occurring for one species, specific sensitivity to hypoxia and how hypoxia takes place in nature for each species (Nikinmaa, 2013; Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008).

Studies with a single species exposed to oxygen deprivation for different times revealed that the duration of low oxygen stress affects the antioxidant response (Supplementary Tables). For instance, GST activity increased significantly after 2 and 6 h of hypoxia exposure, but did not change significantly after 10 h of hypoxia in the muscle of *P. glenii* (Lushchak and Bagnyukova, 2007). Furthermore, the time of occurrence of up-regulation events in different species ranged from 1 h in the gills of the abalone *Haliotis discus* (De Zoysa et al., 2009) to 14 days in the liver of the fish *Leporinus elongatus* (Wilhelm Filho et al., 2005). Long exposure experiments do not allow the identification of biochemical changes in time, because, in the given example, the changes observed may have happened any time between the first moments and 14 days (i.e. changes in antioxidants parameters may have been missed in these long term exposures with just one determination time). On the other hand, long exposure protocols allow the observation of the

maintenance of biochemical changes for long periods of hypoxia exposure. Such maintenance would be physiologically relevant for long-term hypoxia and reoxygenation events.

In addition to protocol diversity, another potential source of variability in the biochemical response to hypoxia is the occurrence of physiological adjustments that optimize oxygen absorption, delivery and consumption (Porteus et al., 2011). These adaptations may partially or fully compensate the diminished oxygen availability. As a result, hypoxia may take longer to occur in tissues or never happen at all. Since these adaptations are expected to depend on animal species, oxygen levels and exposure time they should also vary among studies with diverse

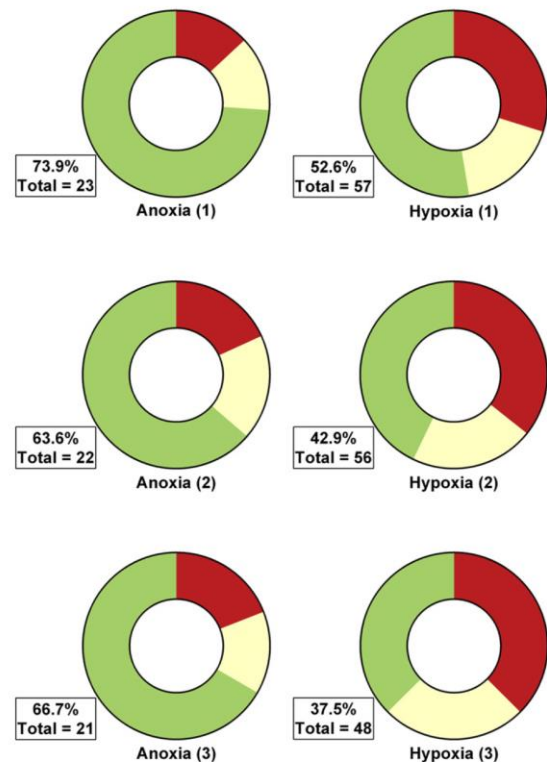


Fig. 6. Distribution of POS-positive (green), POS-neutral (yellow) and POS-negative (red) animal species within the three different criteria for studies on anoxia and hypoxia. Prevalence of POS-positive species and the total number of species for each criterion are highlighted in the boxes. Note that the number of species decreases as criteria proceed due to the requirements of each criterion.

protocols resulting in different outcomes. In summary, there is a set of factors that may affect the response to hypoxia, which are not present in other cases of low oxygen stress, such as freezing and dehydration. This feature is a possible cause of the higher diversity of responses to hypoxia.

3.2.3. Air exposure

Many aquatic animals, sessile or not, are often exposed to air due to periodic variation in tide height. Exposure to air disrupts the ability of water-breathing animals to extract oxygen from the environment and it is expected to cause a hypoxic state (Allen and Burnett, 2008). The percentages of air-exposed species flagged as POS-positive were 77% for criterion 1 (10 species out of 13), 54% for criterion 2 (7 species out of 13), and 60% for criterion 3 (6 species out of 10) (Fig. 7). The analysis of air exposed species revealed some interesting discrepancies between species in the same genus and between populations of the same species. Two crab species of the *Callinectes* genus exposed to air for 3 h were flagged oppositely (Freire et al., 2011). For all three criteria, *Callinectes danae* was classified POS-negative, while *Callinectes ornatus* was classified as POS-positive. This divergence may be explained by the different life history of each species (Freire et al., 2011). Intertidal and subtidal populations of the limpet *Nacella concinna* responded differently to air exposure. Superoxide dismutase activity in gills of the intertidal population decreased by 42% and was not significantly different from control after 6 and 12 h of air exposure respectively (Weihe et al., 2010). In

the subtidal population, however, SOD activity increased by 23% and 33% after 6 and 12 h of air exposure respectively (Weihe et al., 2010). Since the increase in SOD activity did not reach the 50% cut-off value for up-regulation, but the decrease in activity reached its threshold, this species was flagged as POS-negative. Similar differences were observed between high shore and low shore populations of *Mytilus edulis* (Letendre et al., 2009). In this study, high shore animals, which are expected to experience longer periods of air exposure, had higher catalase, GPX, GST, and CuZnSOD activities when both were exposed to air for 2 h (Letendre et al., 2009). This study was not included in our analysis because it did not compare air-exposed mussels to a control submerged group, therefore, it is impossible to conclude if any up-regulation took place. In another limpet (*Nacella magellanica*), geographically distinct population also responded differently. One population was flagged as POS-neutral because no significant changes in catalase or SOD activities occurred in gills after 2, 6 or 12 h (Pöhlmann et al., 2011). The other population was flagged as POS-positive due to a 57% increase in gill SOD activity after 2 h of air exposure (Pöhlmann et al., 2011). Thus, this species was considered POS-positive in the three criteria.

3.2.4. Freezing

Many ectothermic animals survive sub-zero temperatures by allowing and controlling the freezing of extracellular fluids. As intercellular water freezes, breathing, muscle movement and distribution of oxygen to tissues is interrupted and an ischemic condition takes place (Storey and Storey, 2013). Freezing exposure presented a high rate of POS-positive species: 75% for criterion 1 (6 species out of 8), 86% for criterion 2 (6 species out of 7), and 83% for criterion 3 (5 species out of 6) (Fig. 7). Among freeze-tolerant vertebrates, the wood frog *R. sylvatica* is one of the most studied animal species, including studies on the modulation of endogenous antioxidants. Glutathione peroxidase activity increased by 26–149% in several tissues of *R. sylvatica* exposed to freezing for 24 h in comparison with control frogs (Joanisse and Storey, 1996). It was from a freezing study on *R. sylvatica* that the first evidence of post translational regulation of antioxidant enzymes during low oxygen

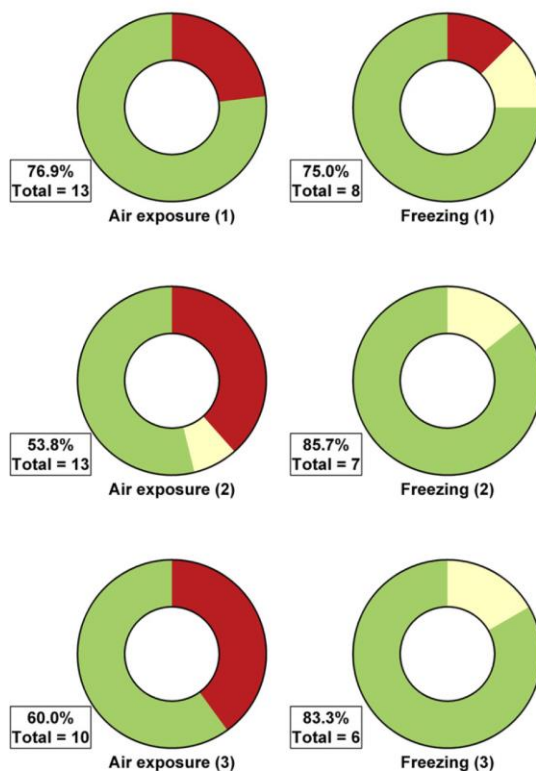


Fig. 7. Distribution of POS-positive (green), POS-neutral (yellow) and POS-negative (red) animal species within the three different criteria for studies on air exposure and freezing. Prevalence of POS-positive species and the total number of species for each criterion are highlighted in the boxes. Note that the number of species decreases as criteria proceed due to the requirements of each criterion.

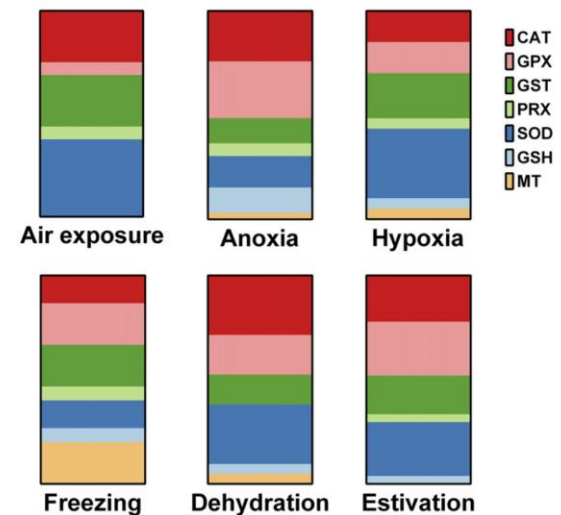


Fig. 8. Relative contribution of each antioxidant within up-regulation events for the stresses of air exposure, anoxia, dehydration, estivation, freezing and hypoxia. Each animal species generated a single set of up-regulated antioxidants. The number of species that presented increased levels for a given antioxidant was compared to the total number of up-regulation events. Antioxidant parameters are catalase (CAT), total or selenium-dependent glutathione peroxidase (GPX), glutathione transferase isoforms (GST), peroxiredoxins (PRX), superoxide dismutase isoforms (SOD), total or reduced glutathione (GSH), and metallothionein (MT). See Section 2.5 for details.

stress was reported. MnSOD extracted from the muscle of frozen frogs had a higher phosphorylation levels than MnSOD from control animals (Dawson et al., 2015). The increased phosphorylation state was related to an increased affinity of MnSOD for superoxide anions, as evidenced by a reduced Km value (Dawson et al., 2015). Similar results were observed for muscle catalase from frozen frogs, whose phosphorylation levels increased in comparison with control animals (Dawson and Storey, 2016). The higher overall phosphorylation state was associated with increased maximal activity and increased affinity for hydrogen peroxide (Dawson and Storey, 2016). Such observations together with the occurrence of oxidative stress responsive kinases (Cao et al., 2003a, 2003b) add a new mechanism to be considered in the context of antioxidant defenses during changes in oxygen availability.

3.2.5. Dehydration

Tolerance to dehydration is widespread in the animal kingdom, ranging, for example, from nematodes to anurans (Table 1). Similar to freezing, dehydration disrupts the circulatory functions of anurans by increasing blood viscosity and reducing blood volume (Hillman, 1978). Thus, oxygen delivery is limited resulting in a situation that resembles ischemic/hypoxic events. All animal species exposed to dehydration were classified as POS-positive in all three criteria (Figs. 4 and S1). The total number of species, however, changed from one criterion to another, due to the requirements of each criterion. Total number of animal species ranged from 9 (criterion 1) to 7 (criteria 2 and 3). The

cellular pathways that led to increased endogenous antioxidants have been elucidated in the African clawed frog *Xenopus laevis*. Severe dehydration elicited the increase of several GST isoforms in six tissues of *X. laevis* (Malik and Storey, 2009). This general activation of GST was related to tissue-specific increases in Nrf2 mRNA levels, protein levels and nuclear translocation (Malik and Storey, 2009). In another study, increases of catalase and MnSOD (at both mRNA and protein levels) were associated with the activation of FoxO1 transcription factor in the liver of dehydrated *X. laevis* (Malik and Storey, 2011).

3.3. Estivation

Estivation is a life-saving metabolic depression state usually associated to arid and relatively hot environments used by animals from sea cucumbers and snails to lungfish and amphibians. The general biochemical mechanisms presented by estivating species are shared with other situations of metabolic depression (Storey and Storey, 2012). Moreover, at least in land snails (Barnhart, 1986) and lungfish (da Silva et al., 2008), plasma oxygen partial pressure drops during estivation, resembling a situation of mild hypoxia. The number of species flagged as POS-positive/total number of species was 11/11, 10/11 and 10/10 by criteria 1, 2 and 3 respectively (Figs. 4 and S1). Such high rates are only comparable to those observed in the dehydration stress. To take one example, when compared to active animals, spadefoot toads *Scaphiopus couchii* presented a general trend of decreased antioxidants

Table 2

Alterations (% change) in antioxidant parameters measured in tissues of animals exposed to freezing compared to control animals. Changes in activity levels are highlighted in bold, changes in protein levels are underlined, and changes in mRNA levels are italicized. When the % change could be estimated only the direction of change is presented as "up" or "down".

Species	Duration	Tissue	CAT	GPX	GST	PRX	SOD	GSH	MT
<i>Dendrobaena octaedra</i> ^a	14 h	Whole body	–	–	<i>450</i>	–	–	–	230
<i>Belgica antarctica</i> ^b	48 h	Whole body	<i>down</i>	–	–	–	<i>0</i>	–	–
<i>Eurosta solidaginis</i> ^c	24 h	Whole body	0	0	0	–	0	0	–
<i>Littorina littorea</i> ^d	1 h	Hepatopancreas	–	–	–	–	–	–	230
		Muscle	–	–	–	–	–	–	160
	12 h	Hepatopancreas	–	–	–	–	–	–	500
		Muscle	–	–	–	–	–	–	160
	24 h	Hepatopancreas	–	–	–	–	–	–	0
		Muscle	–	–	–	–	–	–	230
<i>Rana sylvatica</i> ^e	24 h	Brain	0	38	0	–	0	24	–
		Heart	0	149	–23	–	–57	0	–
		Kidney	0	85	–28	–	–57	0	–
		Liver	0	26	18	–	0	0	–
		Muscle	0	87	0	–	–23	41	–
<i>Rana sylvatica</i> ^f	24 h	Muscle	48	–	–	–	51	–	–
<i>Rana sylvatica</i> ^g	24 h	Heart	–	–	<i>up</i>	–	–	–	<i>up</i>
<i>Chrysemys picta</i> ^h	5 h	Heart	–	135	80	60	–	–	–
		Liver	–	110	145	90	–	–	–
<i>Chrysemys picta</i> ⁱ	5 h	Brain	–	–	52	–	–	–	–
		Gut	–	–	35	–	–	–	–
		Liver	–	–	–23	–	–	–	–
		Muscle	–	–	–15	–	–	–	–
<i>Lacerta vivipara</i> ^j	20 h	Liver	0	0	–	–	56	–	–
		Muscle	0	0	–	–	0	–	–
<i>Thamnophis sirtalis</i> ^k	5 h	Liver	0	–9	–27	–	0	0	–
		Lung	63	0	0	–	0	0	–
		Muscle	183	52	0	–	0	0	–

Abbreviations: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione transferase (GST), peroxidoredoxin (PRX), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), metallothionein (MT).

^a Metallothionein change is the average of the increases in transcript levels for MT1 (100%) and MT2 (360%) (Fisker et al., 2016).

^b Change recorded for MnSOD (Lopez-Martinez et al., 2008).

^c Total GPX and total SOD activities, and total GSH levels (Joanisse and Storey, 1998).

^d English and Storey (2003).

^e Total GPX and total SOD activities, and total GSH levels (Joanisse and Storey, 1996).

^f Catalase, CuZnSOD and MnSOD were first isolated from muscle of frozen frogs. CuZnSOD maximal activity increased by 51%, while no changes in Vmax were observed for MnSOD (Dawson et al., 2015). Protein and transcript levels for both SOD isoforms did not change (Dawson et al., 2015). Catalase overall phosphorylation state increased in frozen animals and this was associated with a 48% increase in its maximal activity (Dawson and Storey, 2016).

^g Results from cDNA array screening (Storey, 2004).

^h Results from cDNA array screening. Specific alterations were GPX1 (80–140%); GSTM5 (170%); GSTA2 (120%); PRX1 (70–110%) in liver, and GPX1 (120–150%); GSTM5 (70–90%); GSTA2 (80%); PRX1 (60%) in heart (Storey, 2006).

ⁱ Six different GST isoforms were analyzed (Krivoruchko and Storey, 2010b). The average for these six values is shown.

^j CuZnSOD activity increased by 56%, while MnSOD activity did not change significantly (Voituron et al., 2006).

^k SeGPX and total SOD activities, and total GSH levels (Hermes-Lima and Storey, 1993).

Table 3
Distribution of POS-positive animals species within major animal groups as classified by criterion 3 for all low oxygen stresses and estivation combined. Note that only 91 of the 102 species had the minimum requirement for criterion 3.

Animal group	POS classification			Total
	Positive	Neutral	Negative	
Cnidaria				
Corals	1	0	0	1
Nematoda				
Nematodes	1	0	0	1
Annelida				
Polychaetes	1	1	2	4
Earthworms	1	0	0	1
Tardigrada				
Water bears	1	0	0	1
Arthropoda				
Crustaceans	8	2	5	15
Springtails	1	0	0	1
Insects	4	2	0	6
Mollusca				
Gastropods	10	0	2	12
Bivalves	3	4	3	10
Cephalopods	0	0	1	1
Echinodermata				
Sea cucumbers	1	0	0	1
Chordata				
Fish	10	5	8	23
Amphibians	5	0	2	7
Reptiles	5	0	0	5
Mammals	1	0	1	2
Total	53	14	24	91

after 60 days of estivation, in contrast to few enzymes that were up-regulated (Grundy and Storey, 1998). Cardiac muscle, for example, had decreased catalase, GPX, GST and SOD activities by 30–53%. On the other hand, skeletal muscle had increased GPX activity (by 59%) and SOD activity (by 42%), whereas the activities of catalase and GST remained unchanged and total GSH levels decreased only by 16% (insufficient decrease as defined in criterion 3). Thus, although several tissues presented a down-regulation of their endogenous antioxidants, *S. couchii* was considered as a POS-positive species in criterion 3 due to the results recorded for the skeletal muscle. This classification disagrees with a former classification of this toad species as a POS-negative case (Hermes-Lima and Zenteno-Savín, 2002).

In the case of the giant African snail *Achatina fulica*, catalase, SeGPX, CuZnSOD and MnSOD did not change significantly in heart, hepatopancreas and kidney after 4 weeks estivation in comparison to snails aroused for 24 h (Salway et al., 2010). In muscle of estivating snails, however, SeGPX activity fell by 21% (did not reach criterion 3 cut-off), MnSOD activity did not change significantly, and CuZnSOD increased

by 74% compared with 24 h aroused group (Salway et al., 2010). Thus, *A. fulica*, together with the other snail species *Biomphalaria tenagophila*, *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Otala lactea*, and *Pomacea canaliculata* were flagged as POS-positive by all three criteria.

3.4. Antioxidants

The antioxidant that was up-regulated in most animal species for each stress was GPX for anoxia (27%), SOD for air exposure (37.5%), catalase and SOD for dehydration (both with 29%), GPX and SOD for estivation (both with 26%), GPX, GST and metallothionein for freezing (all with 20%), and SOD for hypoxia (33%) (Fig. 8). Table 2 shows the raw data for freezing stress. Superoxide dismutase contributed to most of the up-regulation events in 3 of the five low oxygen stress, as well as in estivation. One problem of this approach is that not all antioxidant were measured in all studies, i.e. enzymes measured more often are overrepresented. Peroxiredoxins make one interesting example. This group of enzymes is considered to be crucial in redox signaling pathways and the maintenance of redox balance in cells (Cox et al., 2010). In contrast to its essential role, only 10 of the 142 studies presented data about PRXs. This is partially explained by methodological difficulties associated to the measurement of PRX activity in non-purified preparations. Indeed, from the papers analyzed herein, data were for Prx mRNA levels or PRX protein levels, not activity (Supplementary Tables). On the other hand, the activity of the core antioxidant defenses, catalase, GPX, GST and SOD, are routinely measured by classical methods.

Other interesting point is the case of glutathione levels. Although total or reduced glutathione levels have been measured very often, these parameters are rarely increased and barely appear in the set of up-regulated antioxidants (Fig. 8). For example, both reduced and total GSH levels increased in the hepatopancreas of *L. littorea* exposed to anoxia for 6 days (Pannunzio and Storey, 1998) and in muscle of *T. sirtalis* exposed to anoxia for 10 h (Hermes-Lima and Storey, 1993). Noteworthy, the ratio between disulfide and total glutathione, which is a reliable indicator of redox state, has been shown to be altered in animals exposed to low oxygen availability (Hermes-Lima et al., 2015).

4. Conclusion

Overall, regardless of the criteria used to define a species as positive, neutral or negative, it is evident that a large number of species are classified as POS-positive. When low oxygen stresses and estivation were combined the prevalence of POS-positive animal species was 67.6% for criterion 1 (69 out of 102), 59.6% for criterion 2 (59 out of 99), and 58.2% for criterion 3 (53 out of 91; Table 4). Even following the most restrictive criterion, all eight phyla analyzed in the present study (i.e.

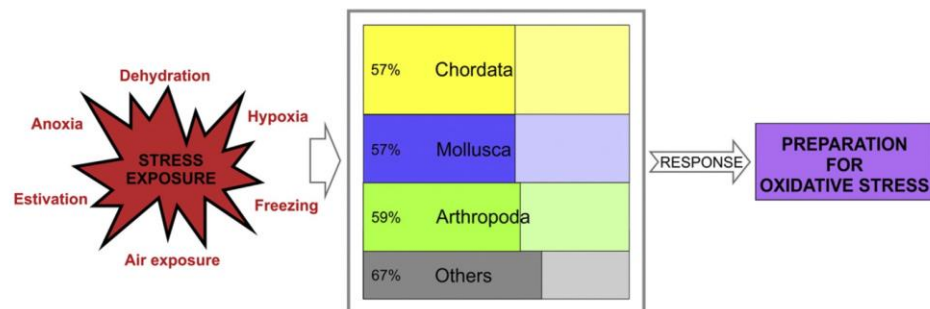


Fig. 9. Animal species from 8 different phyla were found to increase their levels of endogenous antioxidants when exposed to low oxygen stresses (anoxia, air exposure, dehydration, freezing and hypoxia) or estivation. This is the POS-positive response. The proportions of POS-positive animal species in the different phyla are 57% for Chordata (21 out of 37 studied species), 57% for Mollusca (13 out of 23 species), 59% for Arthropoda (13 out of 22 species), and 67% for others (Cnidaria, Nematoda, Annelida, Tardigrada and Echinodermata combined; 6 out of 9 species), as classified by criterion 3.

Table 4

Proportions and total number of species (inside brackets) classified as positive, neutral or negative for all stresses combined under each criteria.

Criteria	POS classification			Total
	Positive	Neutral	Negative	
1	67.6% (69)	10.8% (11)	21.6% (22)	102
2	59.6% (59)	13.1% (13)	27.3% (27)	99
3	58.2% (53)	15.4% (14)	26.4% (24)	91

phyla that had been studied from the redox point of view) had at least one species classified as POS-positive (Table 3). The prevalence of POS-positive animal species, as well as the identity of the antioxidant that is induced, depend on the stress to which animals are exposed. On the other hand, phylogenetic differences do not seem to influence the rate of POS-positive species. For the three phyla with at least 20 species analyzed herein, the proportion of animal species classified as positive were 59%, 57% and 57% for arthropods, mollusks and chordates, respectively (Fig. 9). These proportions are very similar to the proportion for all studied animals combined, which is 58.2%.

These observations indicate a crucial role for antioxidant defenses during low oxygen stress and estivation, otherwise antioxidants would be suppressed as other cell processes are in order to spare energy. Interestingly, responses similar to POS were also reported for many plant species (Blokina and Fagerstedt, 2010; Blokina et al., 2003) and also yeast cells (França et al., 2007) when exposed to low oxygen stress. Therefore, POS-positive organisms may be found outside the animal kingdom, making it even more widespread than expected.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.023>.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF; 193.000.040/2013 and 193.000.947/2015) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; projeto Universal 478648/2013-8). Daniel Moreira and Marcus Sabino receive scholarships from CAPES. Larissa Venancio received a post-doctoral scholarship from FAPESP (2012/14048-2). We thank André L. Vieira (Universidade de Brasília) for assistance with literature, Georgina A. Rivera-Ingraham (Université de Montpellier) for the study presentation at La Paz, Mexico, and Maximiliano Giraud-Billoud (Universidad Nacional de Cuyo) for artwork on Fig. 9. This work is dedicated to the memory of Artur Montanha Carneiro

References

- Abele, D., Großpietsch, H., Pörtner, H.O., 1998. Temporal fluctuations and spatial gradients of environmental PO_2 , temperature, H_2O_2 and H_2S in its intertidal habitat trigger enzymatic antioxidant protection in the capitellid worm *Heteromastus filiformis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 163, 179–191. <http://dx.doi.org/10.3354/meps163179>.
- Abele-Oeschger, D., Oeschger, R., 1995. Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin in the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulphide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 187, 63–80. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)00172-A](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(94)00172-A).
- Abele-Oeschger, D., Oeschger, R., Theede, H., 1994. Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 106, 101–110.
- Allen, S.M., Burnett, L.E., 2008. The effects of intertidal air exposure on the respiratory physiology and the killing activity of hemocytes in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 357, 165–171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2008.01.013>.
- Almeida, E.A., Bairy, A.C.D., 2006. Effects of aerial exposure on antioxidant defenses in the brown mussel *Perna perna*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49, 225–229.
- Almeida, E.A., Bairy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 318, 21–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2004.12.007>.
- Alter, K., Paschke, K., Gebauer, P., Cumillaf, J.P., Pörtner, H.-O., 2015. Differential physiological responses to oxygen availability in early life stages of decapods developing in

- distinct environments. *Mar. Biol.* 162, 1111–1124. <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-015-2654-4>.
- Baker, P.J., Costanzo, J.P., Lee, R.E., 2007. Oxidative stress and antioxidant capacity of a terrestrially hibernating hatchling turtle. *J. Comp. Physiol. B* 177, 875–883. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-007-0185-0>.
- Barnhart, M.C., 1986. Respiratory gas tensions and gas exchange in active and dormant land snails, *Otala lactea*. *Physiol. Zool.* 59, 733–745. <http://dx.doi.org/10.2307/30158619>.
- Bastos, F.F., Tobar, S.A.L., Dantas, R.F., Silva, E.S., Nogueira, N.P.A., Paes, M.C., Righi, B.D.P., Bastos, J.C., Bastos, V.L.F.C., 2013. Melatonin affects conjugation of 4-hydroxynonenal with glutathione in liver of pacu, a hypoxia-tolerant fish. *Fish Physiol. Biochem.* 39, 1205–1214. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-013-9776-8>.
- Blokina, O., Fagerstedt, K.V., 2010. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 359–373. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.007>.
- Blokina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91, 179–194. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcf118>.
- Board, P.G., Menon, D., 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3267–3288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.019>.
- Brouwer, M., Brown-Peterson, N.J., Larkin, P., Patel, V., Denslow, N., Manning, S., Brouwer, T.H., 2007. Molecular and whole animal responses of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 341, 16–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2006.10.049>.
- Brouwer, M., Larkin, P., Brown-Peterson, N., King, C., Manning, S., Denslow, N., 2004. Effects of hypoxia on gene and protein expression in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Mar. Environ. Res.* 58, 787–792. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.094>.
- Cantú-Medellín, N., Byrd, B., Hohn, A., Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T., 2011. Differential antioxidant protection in tissues from marine mammals with distinct diving capacities. Shallow/short vs. deep/long divers. *Comp. Biochem. Physiol. A* 158, 438–443. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.029>.
- Cao, C., Leng, Y., Kufe, D., 2003b. Catalase activity is regulated by c-abl and arg in the oxidative stress response. *J. Biol. Chem.* 278, 29667–29675. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M301292200>.
- Cao, C., Leng, Y., Huang, W., Liu, X., Kufe, D., 2003a. Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 39609–39614. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M305770200>.
- Carreau, A., Hafny-Rahbi, B.E., Matejuk, A., Grillon, C., Kieda, C., 2011. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1239–1253. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x>.
- Chen, J., Mai, K., Ma, H., Wang, X., Deng, D., Liu, X., Xu, W., Liufu, Z., Zhang, W., Tan, B., Ai, Q., 2007a. Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston). *Fish Shellfish Immunol.* 22, 272–281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.003>.
- Chen, M.-Y., Yang, H.-S., Delaporte, M., Zhao, S.-J., Xing, K., 2007b. Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 345, 52–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2007.01.007>.
- Choi, J., Roche, H., Caquet, T., 2000. Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* mg. (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 495–500. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620190231>.
- Clark, M.S., Thorne, M.A., Purać, J., Burns, G., Hillyard, G., Popović, Ž.D., Grubor-Lajisic, G., Worland, M.R., 2009. Surviving the cold: molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the Arctic springtail *Megaphorura arctica* (Tullberg). *BMC Genomics* 10, 328. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-328>.
- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., West, T.L., 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 279, 1–20. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00329-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00329-5).
- Cornette, R., Kanamori, Y., Watanabe, M., Nakahara, Y., Gusev, O., Mitsumasa, K., Kadono-Okuda, K., Shimomura, M., Mita, K., Kikawada, T., Okuda, T., 2010. Identification of anhydrobiosis-related genes from an expressed sequence tag database in the cryptobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* (Diptera: Chironomidae). *J. Biol. Chem.* 285, 35889–35899. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.50623>.
- Cox, A.G., Winterbourn, C.C., Hampton, M.B., 2010. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J.* 425, 313–325. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20091541>.
- Craig, P.M., Fitzpatrick, J.L., Walsh, P.J., Wood, C.M., McClelland, G.B., 2014. Coping with aquatic hypoxia: how the plainfin midshipman (*Porichthys notatus*) tolerates the intertidal zone. *Environ. Biol. Fish* 97, 163–172. <http://dx.doi.org/10.1007/s10641-013-0137-3>.
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D., 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J.* 272, 5635–5652. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04960.x>.
- Dawson, N.J., Storey, K.B., 2016. A hydrogen peroxide safety valve: The reversible phosphorylation of catalase from the freeze-tolerant North American wood frog, *Rana sylvatica*. *Biochim. Biophys. Acta* 1860, 476–485. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.12.007>.
- Dawson, N.J., Katzenback, B.A., Storey, K.B., 2015. Free-radical first responders: The characterization of CuZnSOD and MnSOD regulation during freezing of the freeze-tolerant North American wood frog, *Rana sylvatica*. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 97–106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.003>.
- De Zoysa, M., Whang, I., Lee, Y., Lee, S., Lee, J.-S., Lee, J., 2009. Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress. *Comp. Biochem. Physiol. B* 154, 387–395. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.08.002>.

- Desai, D.V., Prakash, S., 2009. Physiological responses to hypoxia and anoxia in *Balanus amphitrite* (Cirrropedia: Thoracica). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 390, 157–166. <http://dx.doi.org/10.3354/meps08155>.
- Dolci, G.S., Vey, L.T., Schuster, A.J., Roversi, K., Roversi, K., Dias, V.T., Pase, C.S., Barcelos, R.C.S., Antoniazzi, C.T.D., Golombieski, J.I., Glanzner, W.G., Anezi Junior, P.A., Gonçalves, P.B.D., Nunes, M.A.G., Dressler, V.L., Baldisserotto, B., Burger, M.E., 2014. Hypoxia acclimation protects against oxidative damage and changes in prolactin and somatolactin expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to manganese. *Aquat. Toxicol.* 157, 175–185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.015>.
- English, T.E., Storey, K.B., 2003. Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Biol.* 206, 2517–2524. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.00465>.
- Felix-Portillo, M., Martínez-Quintana, J.A., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., 2014. The metallothionein gene from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and expression in response to hypoxia. *Mar. Environ. Res.* 101, 91–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.09.005>.
- Ferreira, M.V.R., Alencastro, A.C.R., Hermes-Lima, M., 2003. Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Can. J. Zool.* 81, 1239–1248. <http://dx.doi.org/10.1139/z03-104>.
- Fisker, K.V., Holmstrup, M., Sørensen, J.G., 2016. Freezing of body fluids induces metallothionein gene expression in earthworms (*Dendrobaena octaedra*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 179, 44–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.08.008>.
- Forcella, M., Berra, E., Giacchini, R., Parenti, P., 2007. Antioxidant defenses preserve membrane transport activity in *Chironomus riparius* larvae exposed to anoxia. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 65, 181–194. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.20197>.
- França, M.B., Panek, A.D., Eleuthero, E.C.A., 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146, 621–631. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.030>.
- Freire, C.A., Togni, V.G., Hermes-Lima, M., 2011. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress, in crabs (*Callinectes danae* and *C. ornatus*) with different estuarine distributions. *Comp. Biochem. Physiol. A* 160, 291–300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.024>.
- Fu, Z., Agudelo, P., Wells, C.E., 2012. Induction of glutaredoxin expression in response to desiccation stress in the foliar nematode *Aphelenchoides fragariae*. *J. Nematol.* 44, 370–376.
- García-Triana, A., Zenteno-Savín, T., Peregrino-Uriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., 2010. Hypoxia, reoxygenation and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD) silencing in *Litopenaeus vannamei*: effects on cMnSOD transcripts, superoxide dismutase activity and superoxide anion production capacity. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 1230–1235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2010.06.018>.
- Giraud-Billoud, M., Vega, I.A., Tosi, M.E.R., Abud, M.A., Calderon, M.L., Castro-Vazquez, A., 2013. Antioxidant and molecular chaperone defences during estivation and arousal in the South American apple snail *Pomacea canaliculata*. *J. Exp. Biol.* 216, 614–622. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.075655>.
- Gorokhova, E., Löf, M., Halldörsson, H.P., Tjärnlund, U., Lindström, M., Elfving, T., Sundelin, B., 2010. Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 99, 263–274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.005>.
- Gorokhova, E., Löf, M., Reutgard, M., Lindström, M., Sundelin, B., 2013. Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia. *Aquat. Toxicol.* 127, 46–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.022>.
- Gracey, A.Y., Troll, J.V., Somero, G.N., 2001. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1993–1998. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.98.4.1993>.
- Grasset, J., Bougas, B., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., Couture, P., MacLachey, D., 2014. Temperature, oxygen, and diet modulate gene transcription and metabolic capacities in yellow perch. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 71, 1635–1641. <http://dx.doi.org/10.1139/cjfas-2014-0059>.
- Grundy, J.E., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*. *J. Comp. Physiol. B* 168, 132–142.
- Hauser-Davis, R.A., Bastos, F.F., Dantas, R.F., Tobar, S.A.L., da Cunha Bastos Neto, J., da Cunha Bastos, V.L.F., Zioli, R.L., Arruda, M.A.Z., 2014. Behaviour of the oxidant scavenger metallothionein in hypoxia-induced neotropical fish, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 103, 24–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.015>.
- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1993. Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Phys.* 265, R646–R652.
- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Phys.* 268, R1386–R1393.
- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1996. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in the frog *Rana pipiens*. *Am. J. Phys.* 271, R918–R925.
- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1998. Role of antioxidant defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*. *Mol. Cell. Biochem.* 189, 79–89. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006868208476>.
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133, 537–556.
- Hermes-Lima, M., Moreira, D.C., Rivera-Ingraham, G., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos, T.C., Campos, É.G., 2015. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 1122–1143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156>.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol. B* 120, 437–448.
- Hillman, S.S., 1978. The roles of oxygen delivery and electrolyte levels in the dehydration death of *Xenopus laevis*. *J. Comp. Physiol. B* 128, 169–175. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00689481>.
- Hiong, K.C., Ip, Y.K., Wong, W.P., Chew, S.F., 2013. Differential gene expression in the brain of the African lungfish, *Protopterus annectens*, after six days or six months of aestivation in air. *PLoS One* 8, e71205. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071205>.
- Hiong, K.C., Ip, Y.K., Wong, W.P., Chew, S.F., 2015. Differential gene expression in the liver of the African lungfish, *Protopterus annectens*, after 6 months of aestivation in air or 1 day of arousal from 6 months of aestivation. *PLoS One* 10, e0121224. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121224>.
- Hudson, N.J., Lehnert, S.A., Ingham, A.B., Symonds, B., Franklin, C.E., Harper, G.S., 2006. Lessons from an estivating frog: sparing muscle protein despite starvation and disuse. *Am. J. Phys.* 290, R836–R843. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00380.2005>.
- Hussain, S., Slikker, W., Ali, S.F., 1996. Role of metallothionein and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection. *Neurochem. Int.* 29, 145–152. [http://dx.doi.org/10.1016/0197-0186\(95\)00114-x](http://dx.doi.org/10.1016/0197-0186(95)00114-x).
- Issartel, J., Hervant, F., de Fraipont, M., Clobert, J., Voituron, Y., 2009. High anoxia tolerance in the subterranean salamander *Proteus anguinus* without oxidative stress nor activation of antioxidant defenses during reoxygenation. *J. Comp. Physiol. B* 179, 543–551. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-008-0338-9>.
- Janssens, B.J., Childress, J.J., Bague, F., Rees, J.F., 2000. Reduced enzymatic antioxidative defense in deep-sea fish. *J. Exp. Biol.* 203, 3717–3725.
- Jensen, F.B., Hansen, M.N., Montesanti, G., Wang, T., 2014. Nitric oxide metabolites during anoxia and reoxygenation in the anoxia-tolerant vertebrate *Trachemys scripta*. *J. Exp. Biol.* 217, 423–431. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.093179>.
- Jiang, H., Li, F., Xie, Y., Huang, B., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, C., Li, S., Xiang, J., 2009. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress. *Proteomics* 9, 3353–3367. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200800518>.
- Joanisse, D.R., Storey, K.B., 1996. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. *Am. J. Phys.* 271, R545–R553.
- Joanisse, D.R., Storey, K.B., 1998. Oxidative stress and antioxidants in stress and recovery of cold-hardy insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 23–30. [http://dx.doi.org/10.1016/s0965-1748\(97\)00070-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0965-1748(97)00070-2).
- Joyner-Matos, J., Andrzejewski, J., Briggs, L., Baker, S.M., Downs, C.A., Julian, D., 2009. Assessment of cellular and functional biomarkers in bivalves exposed to ecologically relevant abiotic stressors. *J. Aquat. Anim. Health* 21, 104–116. <http://dx.doi.org/10.1577/H08-066.1>.
- Joyner-Matos, J., Chapman, L.J., Downs, C.A., Hofer, T., Leeuwenburgh, C., Julian, D., 2007. Stress response of a freshwater clam along an abiotic gradient: too much oxygen may limit distribution. *Funct. Ecol.* 21, 344–355. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01230.x>.
- Kalinina, E.V., Chernov, N.N., Novichkova, M.D., 2014. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc)* 79, 1562–1583. <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297914130082>.
- Klanian, M.G., 2013. Physiological and immunological conditions of the sea cucumber *Isostichopus badionotus* (Selenka, 1867) during dormancy. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 444, 31–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2013.03.008>.
- Kniffin, C.D., Burnett, L.E., Burnett, K.G., 2014. Recovery from hypoxia and hypercapnic hypoxia: impacts on the transcription of key antioxidants in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 170, 43–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.01.006>.
- Krivoruchko, A., Storey, K.B., 2010a. Molecular mechanisms of turtle anoxia tolerance: a role for NF-κB. *Gene* 450, 63–69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2009.10.005>.
- Krivoruchko, A., Storey, K.B., 2010b. Activation of antioxidant defenses in response to freezing in freeze-tolerant painted turtle hatchlings. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 662–668. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.015>.
- Krivoruchko, A., Storey, K.B., 2013. Anoxia-responsive regulation of the FoxO transcription factors in freshwater turtles, *Trachemys scripta elegans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4990–4998. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.034>.
- Krivoruchko, A., Storey, K.B., 2015. Turtle anoxia tolerance: biochemistry and gene regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 1188–1196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.02.001>.
- Kuchel, R.P., Nair, S., Raftos, D.A., 2012. Changes in the transcriptional expression of oxidative stress response genes in Akoya pearl oysters (*Pinctada fucata*) exposed to air and mechanical agitation. *Aquaculture* 362–363, 33–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.027>.
- Lawniczak, M., Romestaing, C., Roussel, D., Maazouzi, C., Renault, D., Hervant, F., 2013. Preventive antioxidant responses to extreme oxygen level fluctuation in a subterranean crustacean. *Comp. Biochem. Physiol. A* 165, 299–303. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.028>.
- Letendre, J., Chouquet, B., Manduzio, H., Marin, M., Bultelle, F., Le Boulenger, F., Durand, F., 2009. Tidal height influences the levels of enzymatic antioxidant defenses in *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* 67, 69–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.11.003>.
- Letendre, J., Chouquet, B., Rocher, B., Manduzio, H., Le Boulenger, F., Durand, F., 2008. Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 148, 211–216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.05.012>.
- Levelahti, L., Leskinen, P., Leder, E.H., Waser, W., Nikinmaa, M., 2011. Responses of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) transcriptome to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. D* 6, 370–381. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbd.2011.08.001>.
- Levelahti, L., Rytönen, K.T., Renshaw, G.M.C., Nikinmaa, M., 2014. Revisiting redox-active antioxidant defenses in response to hypoxic challenge in both hypoxia-tolerant and hypoxia-sensitive fish species. *Fish Physiol. Biochem.* 40, 183–191. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-013-9835-1>.

- Li, Y., Wei, L., Cao, J., Qiu, L., Jiang, X., Li, P., Song, Q., Zhou, H., Han, Q., Diao, X., 2016. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere* 144, 234–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.051>.
- Loong, A.M., Hiong, K.C., Wong, W.P., Chew, S.F., Ip, Y.K., 2012. Differential gene expression in the liver of the African lungfish, *Protopterus annectens*, after 6 days of estivation in air. *J. Comp. Physiol. B* 182, 231–245. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-011-0613-z>.
- Lopes, A.R., Trübenbach, K., Teixeira, T., Lopes, V.M., Pires, V., Baptista, M., Repolho, T., Galado, R., Diniz, M., Rosa, R., 2013. Oxidative stress in deep scattering layers: heat shock response and antioxidant enzymes activities of myctophid fishes thriving in oxygen minimum zones. *Deep-Sea Res. I* 82, 10–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr.2013.07.014>.
- Lopez-Martinez, G., Hahn, D.A., 2012. Short-term anoxic conditioning hormesis boosts antioxidant defenses, lowers oxidative damage following irradiation and enhances male sexual performance in the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *J. Exp. Biol.* 215, 2150–2161. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.065631>.
- Lopez-Martinez, G., Benoit, J.B., Rinehart, J.P., Elmitsky, M.A., Lee, R.E., Denlinger, D.L., 2009. Dehydration, rehydration, and overhydration alter patterns of gene expression in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *J. Comp. Physiol. B* 179, 481–491. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-008-0334-0>.
- Lopez-Martinez, G., Elmitsky, M.A., Benoit, J.B., Lee, R.E., Denlinger, D.L., 2008. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*, and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 796–804. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.05.006>.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B* 144, 283–289. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.014>.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2007. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Percottius glenii*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 148, 390–397. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.07.007>.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, J.M., Storey, K.B., 2005. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1319–1330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.006>.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M., 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Phys.* 280, R100–R107.
- Malik, A.I., Storey, K.B., 2009. Activation of antioxidant defense during dehydration stress in the African clawed frog. *Gene* 442, 99–107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2009.04.007>.
- Malik, A.I., Storey, K.B., 2011. Transcriptional regulation of antioxidant enzymes by FoxO1 under dehydration stress. *Gene* 485, 114–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.014>.
- Marie, B., Genard, B., Rees, J.-F., Zal, F., 2006. Effect of ambient oxygen concentration on activities of enzymatic antioxidant defences and aerobic metabolism in the hydrothermal vent worm, *Paralvinella grasslei*. *Mar. Biol.* 150, 273–284. <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-006-0338-9>.
- Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Marin, M.G., Cattani, O., 2005. Exposure to anoxia of the clam, *Chamelea gallina*. II: Modulation of superoxide dismutase activity and expression in haemocytes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 325, 175–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2005.05.001>.
- Mustafa, S.A., Al-Subiai, S.N., Davies, S.J., Jha, A.N., 2011. Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Ecotoxicology* 20, 1455–1466. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-011-0702-5>.
- Nikinmaa, M., 2013. What is hypoxia? *Acta Physiol. (Oxf.)* 209, 1–4. <http://dx.doi.org/10.1111/apha.12146>.
- Niture, S.K., Khatri, R., Jaiswal, A.K., 2014. Regulation of Nr2-an update. *Free Radic. Biol. Med.* 66, 36–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008>.
- Nowakowska, A., Caputa, M., Rogalska, J., 2010. Natural aestivation and antioxidant defence in *Helix pomatia*: effect of acclimation to various external conditions. *J. Molluscan Stud.* 76, 354–359. <http://dx.doi.org/10.1093/mollus/eyq024>.
- Nowakowska, A., Caputa, M., Rogalska, J., 2011. Defence against oxidative stress in two species of land snails (*Helix pomatia* and *Helix aspersa*) subjected to estivation. *J. Exp. Zool. A* 315, 593–601. <http://dx.doi.org/10.1002/jez.713>.
- Nowakowska, A., Gralikowska, P., Rogalska, J., Ligaszewski, M., Caputa, M., 2014. Effect of induced spring aestivation on antioxidant defence in *Helix aspersa* O. F. Müller, 1774 (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae). *Folia Malacol.* 22, 41–48. <http://dx.doi.org/10.12657/foimal.022.004>.
- Nowakowska, A., Rogalska, J., Caputa, M., 2015. Adaptability of antioxidant defence system in *Helix pomatia* snails: effect of forced aestivation during early spring. *J. Molluscan Stud.* eyv032. <http://dx.doi.org/10.1093/mollus/eyv032>.
- Nowakowska, A., Świdarska-Kolacz, G., Rogalska, J., Caputa, M., 2009a. Effect of winter torpor upon antioxidative defence in *Helix pomatia*. *Can. J. Zool.* 87, 471–479. <http://dx.doi.org/10.1139/Z09-025>.
- Nowakowska, A., Świdarska-Kolacz, G., Rogalska, J., Caputa, M., 2009b. Antioxidants and oxidative stress in *Helix pomatia* snails during estivation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 150, 481–486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.07.005>.
- Nuzzo, R., 2014. Scientific method: statistical errors. *Nature* 506, 150–152. <http://dx.doi.org/10.1038/506150a>.
- Oehlers, L.P., Perez, A.N., Walter, R.B., 2007. Detection of hypoxia-related proteins in mekaka (*Oryzias latipes*) brain tissue by difference gel electrophoresis and de novo sequencing of 4-sulfolophenyl isothiocyanate-derivatized peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol. C* 145, 120–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.06.005>.
- de Oliveira, U.O., Belló-Klein, A., Kucharski, L.C., 2006. Oxidative balance and immunodetection of antioxidant enzymes in the hepatopancreas of the crab *Chasmagnathus granulata* subjected to anoxia and reoxygenation. *Can. J. Zool.* 84, 677–684. <http://dx.doi.org/10.1139/z06-041>.
- de Oliveira, U.O., da Rosa Araújo, A.S., Belló-Klein, A., da Silva, R.S.M., Kucharski, L.C., 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 140, 51–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.026>.
- Olsvik, P.A., Kristensen, T., Waagbø, R., Tollefsen, K.E., Rosseland, B.O., Tøften, H., 2006. Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. *J. Exp. Biol.* 209, 2893–2901. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.02320>.
- Page, M.M., Salway, K.D., Ip, Y.K., Chew, S.F., Warren, S.A., Ballantyne, J.S., Stuart, J.A., 2010. Upregulation of intracellular antioxidant enzymes in brain and heart during estivation in the African lungfish *Protopterus dolloi*. *J. Comp. Physiol. B* 180, 361–369. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-009-0416-7>.
- Paital, B., 2013. Antioxidant and oxidative stress parameters in brain of *Heteropneustes fossilis* under air exposure condition; role of mitochondrial electron transport chain. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 69–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.016>.
- Paital, B., 2014. Modulation of redox regulatory molecules and electron transport chain activity in muscle of air breathing fish *Heteropneustes fossilis* under air exposure stress. *J. Comp. Physiol. B* 184, 65–76. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-013-0778-8>.
- Pan, C.-H., Chien, Y.-H., Wang, Y.-J., 2010. The antioxidant capacity response to hypoxia stress during transportation of characins (*Hyphessobrycon callistus* Boulenger) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquac. Res.* 41, 973–981. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02380.x>.
- Pannunzio, T.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221, 277–292. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00132-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00132-9).
- Parrilla-Taylor, D.P., Zenteno-Savín, T., 2011. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquaculture* 318, 379–383. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.015>.
- Pérez-Jiménez, A., Peres, H., Rubio, V.C., Oliva-Teles, A., 2012. The effect of hypoxia on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed on diets supplemented with methionine and white tea. *Comp. Biochem. Physiol. C* 155, 506–516. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.005>.
- Philipp, E.E.R., Wessels, W., Gruber, H., Strahl, J., Wagner, A.E., Ernst, I.M.A., Rimbach, G., Kraemer, L., Schreiber, S., Abele, D., Rosenstiel, P., 2012. Gene expression and physiological changes of different populations of the long-lived bivalve *Arctica islandica* under low oxygen conditions. *PLoS One* 7, e44621. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044621>.
- Pöhlmann, K., Koenigstein, S., Alter, K., Abele, D., Held, C., 2011. Heat-shock response and antioxidant defense during air exposure in Patagonian shallow-water limpets from different climatic habitats. *Cell Stress Chaperones* 16, 621–632. <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-011-0272-8>.
- Porteus, C., Hedrick, M.S., Hicks, J.W., Wang, T., Milsom, W.K., 2011. Time domains of the hypoxic ventilatory response in ectothermic vertebrates. *J. Comp. Physiol. B* 181, 311–333. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-011-0554-6>.
- Ramos-Vasconcelos, G.R., Hermes-Lima, M., 2003. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *J. Exp. Biol.* 206, 675–685. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.00124>.
- Ramos-Vasconcelos, G.R., Cardoso, L.A., Hermes-Lima, M., 2005. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140, 165–174. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.015>.
- Ransberry, V.E., Blewett, T.A., McClelland, G.B., 2016. The oxidative stress response in freshwater-acclimated killifish (*Fundulus heteroclitus*) to acute copper and hypoxia exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 179, 11–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.08.001>.
- Reilly, B.D., Schlupalius, D.I., Cramp, R.L., Ebert, P.R., Franklin, C.E., 2013. Frogs and estivation: transcriptional insights into metabolism and cell survival in a natural model of extended muscle disuse. *Physiol. Genomics* 45, 377–388. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00163.2012>.
- Riffel, A.P.K., Garcia, L.O., Finamor, I.A., Saccol, E.M.H., Meira, M., Kolberg, C., Horst, A., Partata, W., Llesuy, S., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., 2012. Redox profile in liver of *Leporinus macrocephalus* exposed to different dissolved oxygen levels. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 797–805. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-011-9563-3>.
- Riffel, A.P.K., Saccol, E.M.H., Finamor, I.A., Ourique, G.M., Gressler, L.T., Parodi, T.V., Goulart, L.O.R., Llesuy, S.F., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A., 2014. Humic acid and moderate hypoxia alter oxidative and physiological parameters in different tissues of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *J. Comp. Physiol. B* 184, 469–482. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-014-0808-1>.
- Rivera-Ingraham, G.A., Rocchetta, I., Meyer, S., Abele, D., 2013. Oxygen radical formation in anoxic transgression and anoxia-reoxygenation: foe or phantom? Experiments with a hypoxia tolerant bivalve. *Mar. Environ. Res.* 92, 110–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.09.007>.
- Rizzo, A.M., Negroni, M., Altiero, T., Montorfano, G., Corsetto, P., Berselli, P., Berra, B., Guidetti, R., Rebecchi, L., 2010. Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 156, 115–121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.02.009>.
- Romero, M.C., Ansaldo, M., Lovrich, G.A., 2007. Effect of aerial exposure on the antioxidant status in the subantarctic stone crab *Paralomis granulosa* (Decapoda: Anomura). *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 54–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.06.009>.

- Salway, K.D., Tattersall, G.J., Stuart, J.A., 2010. Rapid upregulation of heart antioxidant enzymes during arousal from estivation in the Giant African snail (*Achatina fulica*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 157, 229–236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.188>.
- Sampaio, F.G., de Boijink, C.L., Oba, E.T., Santos, L.R.B., Kalinin, A.L., Rantin, F.T., 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 43–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.07.009>.
- Schokraie, E., Warnken, U., Hotz-Wagenblatt, A., Grohme, M.A., Hengherr, S., Förster, F., Schill, R.O., Frohme, M., Dandekar, T., Schnölzer, M., 2012. Comparative proteome analysis of *Milnesium tardigradum* in early embryonic state versus adults in active and anhydrobiotic state. *PLoS One* 7, e45682. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0045682>.
- Schülke, S., Dreidax, D., Malik, A., Burmester, T., Nevo, E., Band, M., Avivi, A., Hankeln, T., 2012. Living with stress: regulation of antioxidant defense genes in the subterranean, hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax*. *Gene* 500, 199–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.019>.
- da Silva, G.D.S.F., Giusti, H., Sanchez, A.P., do Carmo, J.M., Glass, M.L., 2008. Aestivation in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*: effects on cardiovascular function, blood gases, osmolality and leptin levels. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 164, 380–385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2008.08.009>.
- Sørensen, J.G., Heckmann, L.-H., Holmstrup, M., 2010. Temporal gene expression profiles in a palaearctic springtail as induced by desiccation, cold exposure and during recovery. *Funct. Ecol.* 24, 838–846. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01687.x>.
- Soria-Valles, C., Caballero, B., Vega-Naredo, I., Sierra, V., Huidobro-Fernández, C., Gonzalo-Calvo, D.D., Toliya, D., Rodríguez-Colunga, M.J., Joel, A., Coto-Montes, A., Avivi, A., 2010. Antioxidant responses to variations of oxygen by the Harderian gland of different species of the superspecies *Spalax ehrenbergi*. *Can. J. Zool.* 88, 803–807. <http://dx.doi.org/10.1139/Z10-049>.
- Storey, K.B., 2004. Strategies for exploration of freeze responsive gene expression: advances in vertebrate freeze tolerance. *Cryobiology* 48, 134–145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.008>.
- Storey, K.B., 2006. Reptile freeze tolerance: metabolism and gene expression. *Cryobiology* 52, 1–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.09.005>.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 2012. Aestivation: signaling and hypometabolism. *J. Exp. Biol.* 215, 1425–1433. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.054403>.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 2013. Molecular biology of freezing tolerance. *Compr. Physiol.* 3, 1283–1308. <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c130007>.
- Storey, K.B., Lant, B., Anozie, O.O., Storey, J.M., 2013. Metabolic mechanisms for anoxia tolerance and freezing survival in the intertidal gastropod, *Littorina littorea*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 165, 448–459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.009>.
- Strahl, J., Brey, T., Philipp, E.E.R., Thorarindóttir, G., Fischer, N., Wessels, W., Abele, D., 2011a. Physiological responses to self-induced burrowing and metabolic rate depression in the ocean quahog *Arctica islandica*. *J. Exp. Biol.* 214, 4223–4233. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.055178>.
- Strahl, J., Dringen, R., Schmidt, M.M., Hardenberg, S., Abele, D., 2011b. Metabolic and physiological responses in tissues of the long-lived bivalve *Arctica islandica* to oxygen deficiency. *Comp. Biochem. Physiol. A* 158, 513–519. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.12.015>.
- Sun, J., Mu, H., Zhang, H., Chandramouli, K.H., Qian, P.-Y., Wong, C.K.C., Qiu, J.-W., 2013. Understanding the regulation of estivation in a freshwater snail through iTRAQ-based comparative proteomics. *J. Proteome Res.* 12, 5271–5280. <http://dx.doi.org/10.1021/pr400570a>.
- Sun, S., Xuan, F., Fu, H., Zhu, J., Ge, X., Gu, Z., 2015. Transcriptomic and histological analysis of hepatopancreas, muscle and gill tissues of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in response to chronic hypoxia. *BMC Genomics* 16, 843. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1701-3>.
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E., Moraga, D., 2010. Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Mar. Genomics* 3, 133–143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2010.08.005>.
- Teixeira, T., Diniz, M., Calado, R., Rosa, R., 2013. Coral physiological adaptations to air exposure: heat shock and oxidative stress responses in *Veretillum cynomorium*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 439, 35–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2012.10.010>.
- Tiedke, J., Thiel, R., Burmester, T., 2014. Molecular response of estuarine fish to hypoxia: a comparative study with ruffe and flounder from field and laboratory. *PLoS One* 9, e90778. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090778>.
- Timmermans, M.J.T.N., Roelofs, D., Nota, B., Ylstra, B., Holmstrup, M., 2009. Sugar sweet springtails: on the transcriptional response of *Folsomia candida* (Collembola) to desiccation stress. *Insect Mol. Biol.* 18, 737–746. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00916.x>.
- Trasviña-Arenas, C.H., García-Triana, A., Peregrino-Urriarte, A.B., Yepiz-Plascencia, G., 2013. White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation. *Comp. Biochem. Physiol. B* 164, 44–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.10.004>.
- Tremblay, N., Abele, D., 2015. Response of three krill species to hypoxia and warming: an experimental approach to oxygen minimum zones expansion in coastal ecosystems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 519, 209–217. <http://dx.doi.org/10.1111/maec.12258> (n/a–n/a).
- Tripathi, R.K., Mohindra, V., Singh, A., Kumar, R., Mishra, R.M., Jena, J.K., 2013. Physiological responses to acute experimental hypoxia in the air-breathing Indian catfish, *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758). *J. Biosci.* 38, 373–383. <http://dx.doi.org/10.1007/s12038-013-9304-0>.
- Trübenbach, K., Teixeira, T., Diniz, M., Rosa, R., 2013. Hypoxia tolerance and antioxidant defense system of juvenile jumbo squids in oxygen minimum zones. *Deep-Sea Res. II Top. Stud. Oceanogr.* 95, 209–217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2012.10.001>.
- Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M., 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15452–15457. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0803833105>.
- Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T., Elsner, R., 2006. Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. *Comp. Biochem. Physiol. C* 142, 198–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.09.004>.
- Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savín, T., Elsner, R., 2007. Glutathione protection against dive-associated ischemia/reperfusion in ringed seal tissues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 345, 110–118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2007.02.003>.
- Vidal, M.-L., Bassères, A., Narbonne, J.-F., 2002. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller). *Comp. Biochem. Physiol. C* 132, 93–104.
- Vig, É., Nemcsók, J., 1989. The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.* 35, 23–25. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1989.tb03389.x>.
- Voituron, Y., Servais, S., Romestaing, C., Douli, T., Barré, H., 2006. Oxidative DNA damage and antioxidant defenses in the European common lizard (*Lacerta vivipara*) in supercooled and frozen states. *Cryobiology* 52, 74–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.09.006>.
- Vosloo, A., Laas, A., Vosloo, D., 2013a. Differential responses of juvenile and adult South African abalone (*Haliotis midae* Linnaeus) to low and high oxygen levels. *Comp. Biochem. Physiol. A* 164, 192–199. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.09.002>.
- Vosloo, D., van Rensburg, L., Vosloo, A., 2013b. Oxidative stress in abalone: the role of temperature, oxygen and L-proline supplementation. *Aquaculture* 416–417, 265–271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.031>.
- Weibe, E., Kriews, M., Abele, D., 2010. Differences in heavy metal concentrations and in the response of the antioxidant system to hypoxia and air exposure in the Antarctic limpet *Nacella concinna*. *Mar. Environ. Res.* 69, 127–135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.09.003>.
- Welker, A.F., 2009. Efeito da flutuação da disponibilidade de oxigênio e da privação alimentar sobre o metabolismo de radicais livres (PhD thesis) Universidade de São Paulo.
- Welker, A.F., Campos, E.G., Cardoso, L.A., Hermes-Lima, M., 2012. Role of catalase on the hypoxia/reoxygenation stress in the hypoxia-tolerant Nile tilapia. *Am. J. Phys.* 302, R111–R118. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00243.2011>.
- Welker, A.F., Moreira, D.C., Campos, E.G., Hermes-Lima, M., 2013. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comp. Biochem. Physiol. A* 165, 384–404. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.003>.
- Wilhelm Filho, D., Sell, F., Ribeiro, L., Ghislandi, M., Carrasquedo, F., Fraga, C.G., Wallauer, J.P., Simões-Lopes, P.C., Uhart, M.M., 2002. Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving mammals. *Comp. Biochem. Physiol. A* 133, 885–892.
- Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Zaniboni-Filho, E., Pedrosa, R.C., 2005. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture* 244, 349–357. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.024>.
- Willmore, W.G., Storey, K.B., 1997a. Antioxidant systems and anoxia tolerance in a freshwater turtle *Trachemys scripta elegans*. *Mol. Cell. Biochem.* 170, 177–185.
- Willmore, W.G., Storey, K.B., 1997b. Glutathione systems and anoxia tolerance in turtles. *Am. J. Phys.* 273, R219–R225.
- Willmore, W.G., Storey, K.B., 2005. Purification and properties of the glutathione S-transferases from the anoxia-tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. *FEBS J.* 272, 3602–3614. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04783.x>.
- Woo, S., Denis, V., Won, H., Shin, K., Lee, G., Lee, T.-K., Yum, S., 2013. Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mollusca) exposed to hypoxia. *Zool. Stud.* 52, 15. <http://dx.doi.org/10.1186/1810-522X-52-15>.
- Woo, S., Jeon, H.-Y., Kim, S.R., Yum, S., 2011. Differentially displayed genes with oxygen depletion stress and transcriptional responses in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. D* 6, 348–356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbd.2011.07.003>.
- Wulff, T., Jessen, F., Roepstorff, P., Hoffmann, E.K., 2008. Long term anoxia in rainbow trout investigated by 2-DE and MS/MS. *Proteomics* 8, 1009–1018. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.200700460>.
- Young, K.M., Cramp, R.L., Franklin, C.E., 2013. Each to their own: skeletal muscles of different function use different biochemical strategies during aestivation at high temperature. *J. Exp. Biol.* 216, 1012–1024. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.072827>.
- Zenteno-Savín, T., St Leger, J., Pongonis, P.J., 2010. Hypoxic and ischemic tolerance in emperor penguins. *Comp. Biochem. Physiol. C* 152, 18–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.02.007>.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11413>.
- Zhang, Y., Liang, S., He, J., Bai, Y., Niu, Y., Tang, X., Li, D., Chen, Q., 2015. Oxidative stress and antioxidant status in a lizard *Phrynacephalus vlangalii* at different altitudes or acclimated to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 190, 9–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.08.013>.
- Zhong, X.-P., Wang, D., Zhang, Y.-B., Gui, J.-F., 2009. Identification and characterization of hypoxia-induced genes in *Carassius auratus* blastulae embryonic cells using suppression subtractive hybridization. *Comp. Biochem. Physiol. B* 152, 161–170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.10.013>.

4 CAPÍTULO 4 – EFEITO DA ESTIVAÇÃO EM AMBIENTE NATURAL SOBRE O METABOLISMO REDOX DE ANUROS DA CAATINGA

4.1 Introdução

A habilidade de diminuir a taxa metabólica é uma importante estratégia de sobrevivência de animais desafiados por ambientes extremos (Withers e Cooper 2010). A supressão do metabolismo é atingida pela inibição global de diversos processos celulares, por exemplo, metabolismo intermediário, transporte ativo de íons, transcrição de genes e tradução de proteínas (Storey 2015). Desta forma, a necessidade por recursos é amplamente reduzida, maximizando o tempo de sobrevivência até o retorno de condições ambientais favoráveis. Devido à redução do *turnover* de biomoléculas, a implementação de vias de preservação celular, incluindo a indução de antioxidantes e chaperonas, é crucial e comum em estados de hipometabolismo (Storey e Storey 2011, 2012). A deflagração de uma resposta antioxidante em animais com taxa metabólica reduzida é definida como “preparo para o estresse oxidativo” (Hermes-Lima, Storey, e Storey 1998; Hermes-Lima et al. 2015). De fato, a maioria das espécies investigadas do ponto de vista redox até o momento mostram o aumento de pelo menos um antioxidante durante a depressão metabólica em resposta a hipóxia, congelamento, desidratação e estivação (Moreira et al. 2016).

A estivação é um estado de supressão metabólica aeróbica em resposta a ambientes áridos, comumente associada à baixa disponibilidade de água e alimento (Storey 2002). As adaptações bioquímicas associadas à estivação têm sido investigadas majoritariamente em caramujos pulmonados (Hermes-Lima e Storey 1995; Ramos-Vasconcelos, Cardoso, e Hermes-Lima 2005), peixes pulmonados (Frick et al. 2008b; Page et al. 2010) e anuros. Dentre os anuros, os estudos concentram-se na indução artificial da estivação em laboratório de espécies australianas *Neobatrachus* spp. (Fuery et al. 1998; Withers 1993) e *Cyclorana* spp. (Withers 1993; Reilly et al. 2013) e a espécie norte americana *Scaphiopus couchii* (McClanahan 1967; Cowan et al. 2000). Durante períodos de seca, estes animais enterram-se em busca de um microhabitat mais favorável e permanecem inativos por vários meses ou até alguns anos (McClanahan 1967; Withers 1993). Neste período, o consumo de O₂ por anuros dos gêneros *Cyclorana*, *Neobatrachus* e *Scaphiopus* apresenta queda de 60-80% em comparação com animais ativos (Seymour 1973;

Withers 1993). Com a chegada das chuvas, os anuros emergem de seus abrigos subterrâneos e deslocam-se para corpos d'água, onde iniciam atividades intensas de alimentação e reprodução.

O estudo dessas espécies revelou importantes adaptações fisiológicas e bioquímicas envolvidas no hipometabolismo em anuros. Por exemplo, durante a estivação, há queda do consumo de O_2 pelo tecido muscular isolado (Flanigan, Withers, e Guppy 1991); inibição de vias metabólicas dependentes de O_2 (Hudson et al. 2006; Berner et al. 2009); supressão da síntese de proteínas (Fuery et al. 1998), via fosforilação do fator de iniciação eucarótico (eIF2 α) (Pakay et al. 2003); aumento dos níveis de fatores silenciadores epigenéticos (Hudson et al. 2008); incremento da taxa de acoplamento mitocondrial (Kayes et al. 2009); menor produção de H_2O_2 mitocondrial (Reilly et al. 2014); e maior atividade de enzimas antioxidantes em determinados tecidos (Grundy e Storey 1998). O tecido muscular esquelético de anuros estivadores tem recebido ênfase especial, devido à sua peculiar resistência a atrofia por jejum e desuso em comparação com modelos animais, tais como, ratos, camundongos, porquinhos-da-índia e cães (Hudson e Franklin 2002). A tolerância à atrofia muscular parece estar associada, parcialmente, ao papel de antioxidantes endógenos ao longo da depressão metabólica em ambientes semiáridos (Hudson e Franklin 2002; Reilly e Franklin 2016).

A Caatinga é um bioma semiárido exclusivamente brasileiro que ocupa aproximadamente 10% do território nacional dentro da faixa de latitude de 2°54' a 17°21' S (Prado 2003). Este domínio morfoclimático é caracterizado por alta incidência de radiação solar, elevada temperatura média anual, baixa umidade relativa e, principalmente, regime de chuvas irregulares (Prado 2003). A estação chuvosa é limitada a um período de poucos meses, geralmente com início em Janeiro. O padrão de precipitação, entretanto, é extremamente variável, de maneira que a duração da estiagem é incerta ano a ano. Na Caatinga, é comum que algumas regiões permaneçam sem qualquer chuva ao longo de anos inteiros (Nimer 1972). Ainda assim, o número de espécies de anfíbios que habitam este bioma extremo é estimado entre 73 e 120 espécies (Camardelli e Napoli 2012; Toledo e Batista 2012). Os anuros residentes em fitofisionomias secas da Caatinga apresentam adaptações morfológicas, comportamentais e fisiológicas para manter a viabilidade durante longos períodos de seca (Navas, Antoniazzi, e Jared 2004). Assim como as espécies australianas e norte americanas, alguns anuros da Caatinga enterram-se e reduzem

o consumo de O₂ durante a estiagem, utilizando a estivação como estratégia de sobrevivência (Carvalho, Navas, e Pereira 2010).

Apenas recentemente, ajustes fisiológicos e do metabolismo energético têm sido investigados durante a estivação de espécies da Caatinga, com ênfase no equilíbrio hídrico (Pereira 2009, 2016). Alterações do metabolismo redox, i.e. produção de espécies reativas e controle por antioxidantes, ainda não foram estudadas neste bioma. Desta forma, considerando o papel do controle de espécies reativas por antioxidantes endógenos em resposta a depressão metabólica, o objetivo deste estudo é investigar adaptações do metabolismo redox em anuros da Caatinga durante a estivação. Todos os dados disponíveis na literatura de anuros estivadores são de animais induzidos a estivar em condições artificialmente controladas. Por outro lado, neste estudo, usamos uma abordagem diferente, na qual os animais são coletados diretamente na natureza durante períodos de atividade ou de hipometabolismo. Espera-se que os resultados de tal abordagem tenham maior relevância ecológica que os gerados em laboratório. Este é o primeiro estudo que analisou a modulação de antioxidantes endógenos em animais estivando no ambiente natural sem intervenção experimental humana.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Local do Estudo

Os animais investigados neste estudo foram coletados em uma propriedade privada denominada Fazenda São Miguel (5°30'43"S, 36°36'18"W), localizada a 156 km de Natal, no distrito de Angicos, Rio Grande do Norte. Dentro da fazenda, há uma ampla área de Caatinga onde ocorrem a formação e o desaparecimento de riachos temporários, como consequência de períodos de chuva e estiagem. O comportamento dos anuros residentes acompanha a formação e secagem de corpos d'água. Durante a estação chuvosa, um grande número de anuros é encontrado em poças d'água forrageando ou reproduzindo (Pereira 2009). Já na temporada de seca, algumas espécies de anuros são encontradas no subsolo de leitos de rios secos em estivação. A distância da superfície em que os animais estivam varia de 30 a 112 cm (seção 4.2.3), podendo atingir 180 cm (Pereira 2009). A concentração de O₂ no solo, na faixa de 25 a 150 cm, é relativamente estável, atingindo valor mínimo de aproximadamente 20,7% na maior profundidade (Carvalho, Navas, e Pereira 2010)

(Figura 17A). A profundidade em que os animais são encontrados tende a aumentar conforme a estação seca avança (Pereira 2009) (Figura 17B). Este fenômeno pode ser explicado pela maior umidade relativa do solo em maiores profundidades. Por exemplo, durante fase de estiagem, a umidade relativa no solo é de 92 e 65% nas profundidades de 80 e 40 cm respectivamente (Pereira 2009).

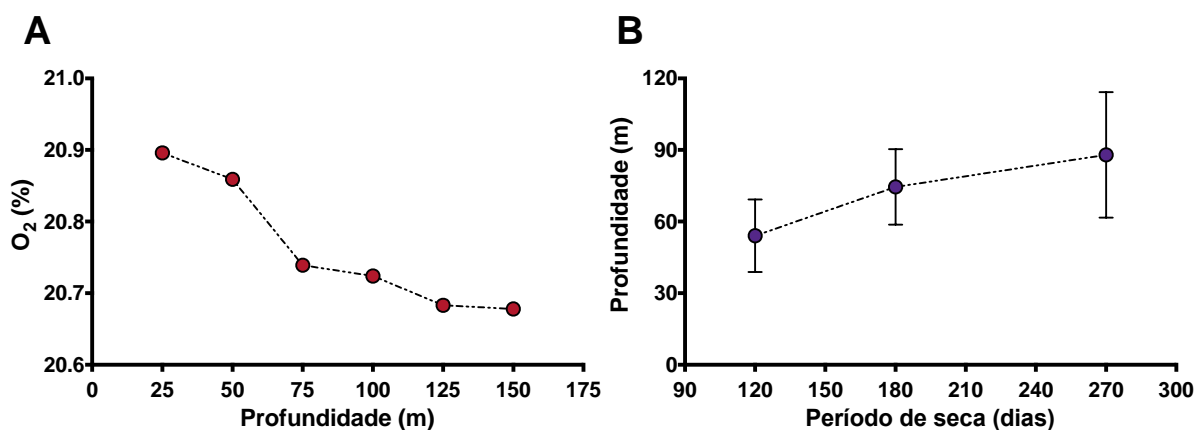


Figura 17. Disponibilidade de O₂ no solo e profundidade onde *P. diplolistris* é encontrado durante a estação seca. (A) Concentração de O₂ na faixa de profundidade onde os animais abrigam-se durante a estação seca. O nível de O₂ cai significativamente a partir de 75 cm. (B) Profundidade na qual *P. diplolistris* é encontrado no período de estiagem em relação à data da última chuva. Dados de Pereira (2009).

Nesta área são registradas três espécies de anuros que apresentam o comportamento de estivação durante a estação seca: *Pleurodema diplolistris* (Anura: Leptodactylidae, Leiuperinae), *Proceratophrys cristiceps* (Anura: Odontophrynidae) e *Physalaemus albifrons* (Anura: Leptodactylidae, Leiuperinae). Neste estudo, somente as duas primeiras espécies foram analisadas. Ambas as espécies, *P. diplolistris* e *P. cristiceps*, entram em estivação no subsolo, quando deprimem o consumo de oxigênio em repouso em aproximadamente 50% quando comparados aos animais ativos durante as chuvas (Pereira 2016) (Figura 18A). Nota-se que o consumo de oxigênio em repouso em *P. cristiceps* é cerca de 70% menor que o de *P. diplolistris* (Pereira 2016) (Figura 18A). Quando são forçados a se locomover, indivíduos *P. diplolistris* ativos e estivando consomem O₂ em taxas similares (Pereira 2016). Por outro lado, indivíduos *P. cristiceps* durante a estivação, mesmo em atividade forçada, consomem 70% menos O₂ (Pereira 2016) (Figura 18B). Estes dados de respirometria corroboram as observações de diferenças na responsividade entre as espécies. Quando desenterrados, anuros *P. diplolistris* prontamente retomam a atividade (Pereira 2016). No caso, de *P. cristiceps*, mesmo após manipulação os

animais permanecem imóveis. Portanto, mesmo ocupando o mesmo microhabitat estas duas espécies apresentam importantes diferenças fisiológicas.

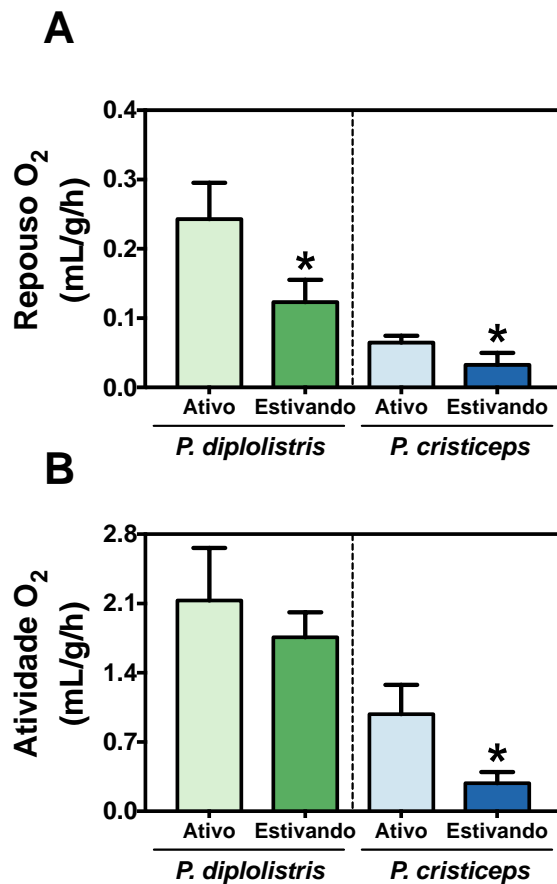


Figura 18. Taxas de consumo de O₂ em *P. diplolistris* e *P. cristiceps* durante a atividade e estivação. (A) Consumo de O₂ em repouso. (B) Consumo de O₂ em atividade forçada. Os asteriscos indicam diferença significativa em animais ativos versus estivando. Dados de Pereira (2016).

4.2.2 Coleta 1

Indivíduos adultos das espécies *P. diplolistris* e *P. cristiceps* foram coletados pela equipe do professor Carlos Navas (IB/USP) no interior da fazenda São Miguel (**Figura 19**). A coleta foi realizada sob a autorização do IBAMA (02010.003380/04-82 e 14836-1) e registro no comitê de ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (168/2012). Os animais *P. diplolistris* em estivação (estação seca) foram coletados no mês de novembro (2012). O grupo de animais ativos (estação chuvosa) dessa mesma espécie foi coletado em dezembro (2005). Este grupo de animais estava ativo na superfície do solo mesmo sem a ocorrência de precipitação significativa. Para a espécie *P. cristiceps*, o grupo de animais ativos foi coletado no mês de abril (2007). Já os anfíbios *P. cristiceps* que estavam estivando foram coletados no mês de agosto (2012). Os animais estivando foram coletados manualmente após escavação de regiões do leito seco do rio Sobradinho (5°30'43"S, 36°36'8"W), identificados e eutanasiados imediatamente por imersão em nitrogênio

líquido e armazenados a -80°C até serem analisados. Foram coletados ao todo 12 animais *P. diplolistris* pesando $4,18 \pm 0,44$ g (media \pm desvio padrão) e com comprimento rostro-cloacal de $3,18 \pm 0,13$ cm. No caso de *P. cristiceps*, foram coletados 12 animais com peso de $9,44 \pm 3,21$ g e comprimento de $3,92 \pm 0,32$ cm.

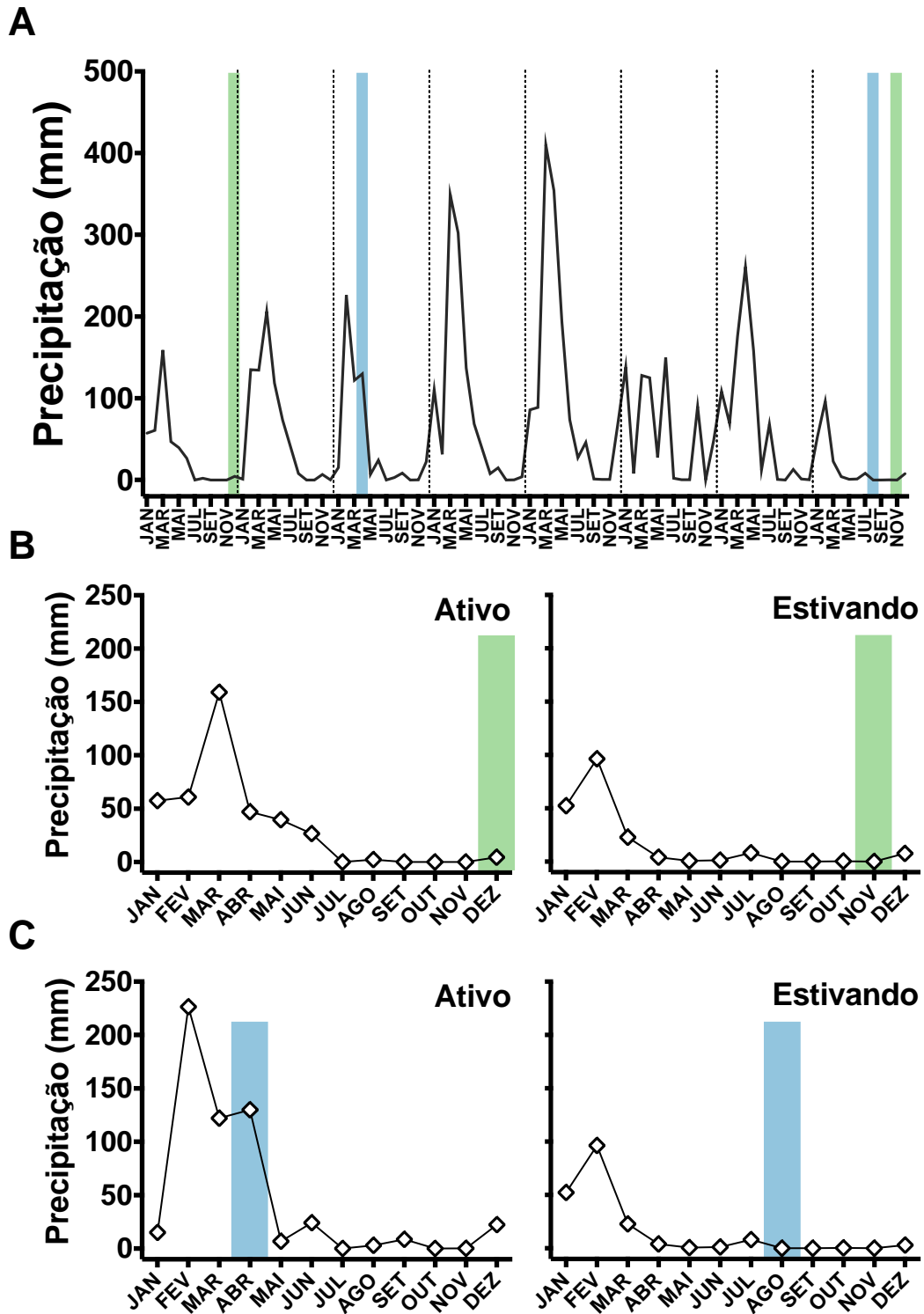


Figura 19. Precipitação mensal total de janeiro de 2005 a dezembro de 2012. Dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) coletados na

estação Florânia (06°6'36"S; 36°48'36"W, altitude 324 m) há 60 km dos locais de coleta durante o período da coleta 1. **(A)** Precipitação mensal total no intervalo da coleta 1. **(B)** O painel à esquerda mostra o ano de 2005 quando animais *P. displolistris* ativos foram coletados no mês de dezembro. **(B)** O painel à direita mostra o ano de 2012 quando animais *P. displolistris* estivando foram coletados no mês de novembro. **(C)** O painel à esquerda mostra o ano de 2007 quando animais *P. cristiceps* ativos foram coletados no mês de abril. **(C)** O painel à direita mostra o ano de 2012 quando animais *P. cristiceps* estivando foram coletados no mês de agosto.

4.2.3 Coleta 2

Uma segunda coleta foi realizada em dezembro de 2015, quando indivíduos adultos das espécies *P. diplolistris* e *P. cristiceps* foram coletados na estação seca em dois locais diferentes dentro da área de caatinga na Fazenda São Miguel, denominados pelos residentes como “Várzea do B” (05°41'27,6"S; 036°26'19,8"W, altitude 150 m) e “Cacimba do Garajau” (05°41'57.4"S; 036°28'03.2"W, altitude 146 m) (Figura 20).



Figura 20. Localização dos sítios de coleta de animais da coleta 2. Várzea do B (05°41'27,6"S; 036°26'19,8"W, altitude 150 m) e Cacimba do Garajau (05°41'57.4"S; 036°28'03.2"W, altitude 146 m) fazem parte de uma propriedade privada denominada Fazenda São Miguel. Uma das entradas da fazenda fica na BR-304.

A coleta foi realizada com o apoio da equipe do professor Adrian Garda (UFRN), com a participação fundamental do biólogo Willianilson P. da Silva (UFRN) e

sob a autorização do IBAMA (19828-4). Os animais foram coletados manualmente após escavação de leitos de rios secos (**Figuras 21 e 22**).

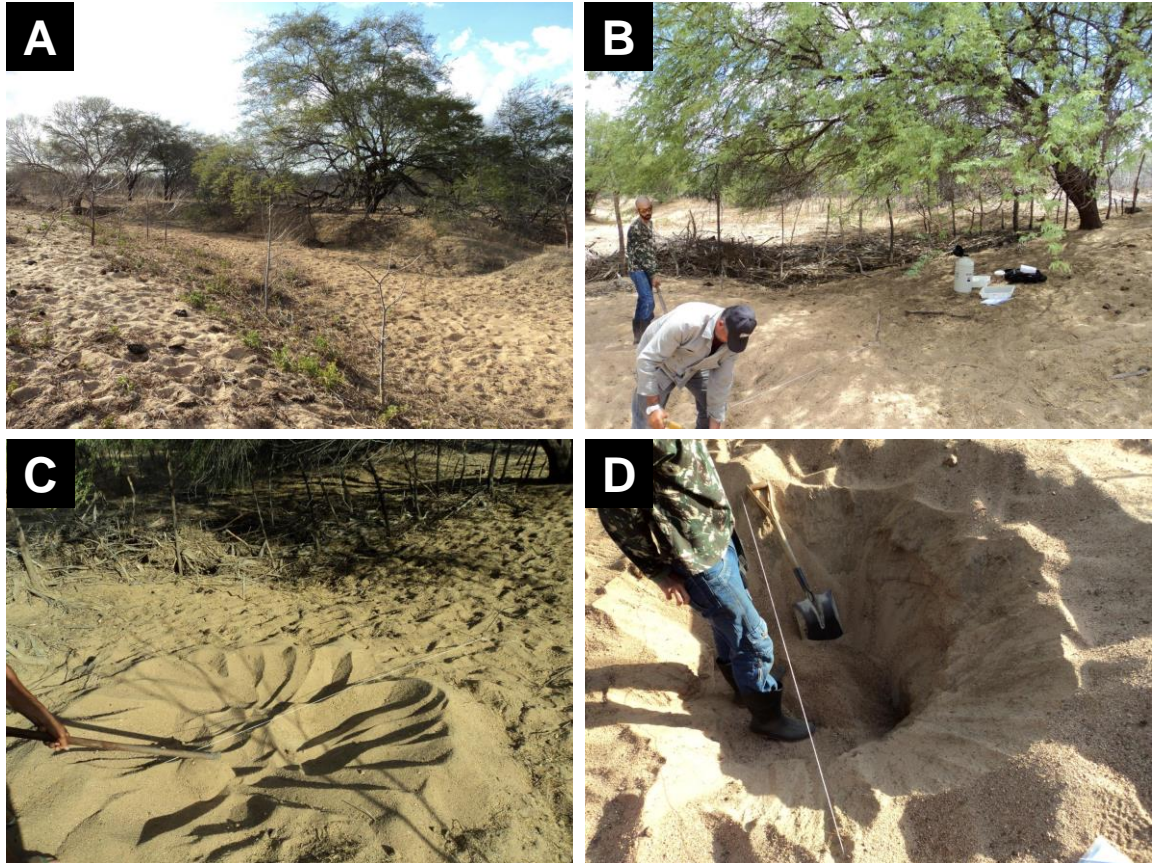


Figura 21. Fotos da Cacimba do Garajau, um dos sítios da coleta 2. (A) Leito de rio seco no auge da estação seca em dezembro de 2015. **(B)** Preparo para a escavação do leito do rio. O senhor assis (de boné) e o biólogo Will dão início à escavação. Ao fundo, botijão de nitrogênio líquido, bandeijas e demais materiais de campo. **(C)** Um barbante marcava o nível da superfície em cada escavação realizada. **(D)** Destaque para o solo extremamente seco mesmo a aproximadamente 75 cm de profundidade.

Uma vez localizado, a profundidade em que foi encontrado era registrada, e o animal era embalado rapidamente em papel alumínio e imerso em nitrogênio líquido. Nesta expedição foram encontrados indivíduos das espécies *P. diplolistris*, *P. cristiceps* e *Physalaemus* sp. Entretanto, foram coletados apenas indivíduos *P. diplolistris* e *P. cristiceps* conforme **tabela 5**.

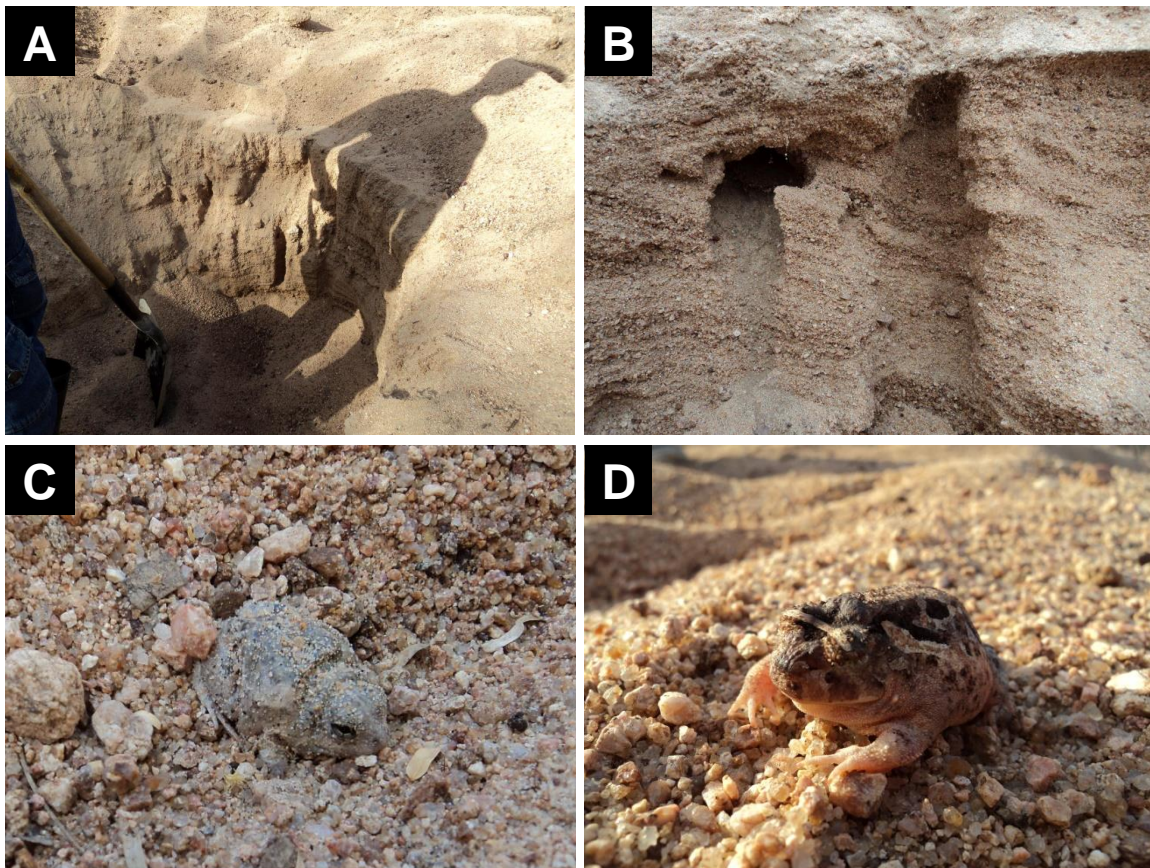


Figura 22. Fotos de uma das escavações e os animais encontrados durante a coleta 2. (A) Escavação na Cacimba do Garajau onde se pode observar o rastro deixado pela movimentação vertical do animal. (B) Ampliação de rastros deixados pela movimentação vertical dos animais. Devido à movimentação do animal, o solo fica menos compacto, desabando quando o solo abaixo é removido. (C) Espécime de *P. diplosistris* instantes após a perturbação da escavação. Note que o animal abre os olhos imediatamente e salta se perturbado. (D) Espécime de *P. cristiceps* instantes após a perturbação da escavação. Este animal, mesmo após a manipulação e posicionamento na superfície do solo, não apresenta sinais de despertar (e.g. abertura dos olhos ou movimentação).

Tabela 5. Número de indivíduos coletados na coleta de dezembro de 2015 por local de coleta e por espécie.

Local	<i>P. diplosistris</i>	<i>P. cristiceps</i>	Total
Várzea do B	34	7	41
Cacimba do Garajau	5	6	11
Total	39	13	52

A temperatura do ar durante a coleta oscilou dentro da faixa de 35-38°C. A temperatura na superfície do solo oscilou dentro da faixa de 41-53°C. Foram coletados animais em profundidades de 30 a 112 cm (**Figura 23**). A temperatura do solo a partir de 30 cm da superfície permaneceu estável entre 32 e 33°C até a profundidade de 100 cm. Os animais coletados nesta expedição encontram-se armazenados em ultrafreezer e ainda não foram analisados.

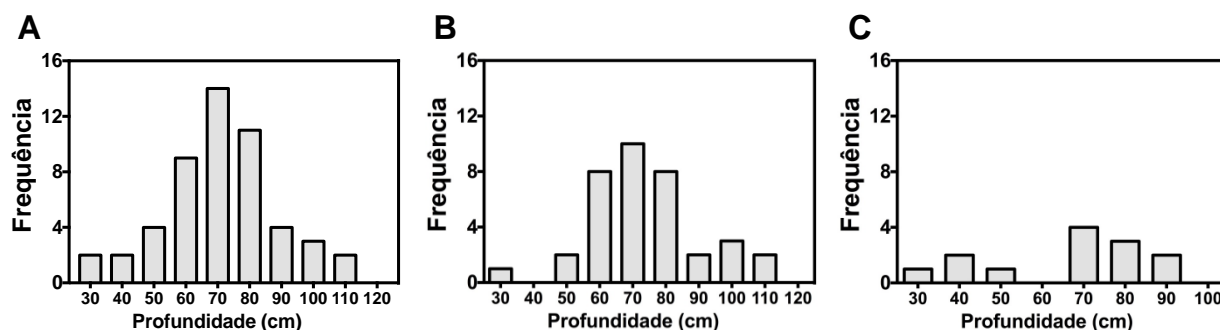


Figura 23. Distribuição de indivíduos *P. diploistris* e *P. cristiceps* estivendo durante estação seca coletados em diferentes profundidades. Dados da coleta 2 de dezembro de 2015: (A) ambas espécies combinadas, (B) *P. diploistris*, e (C) *P. cristiceps*.

4.2.4 Ensaios de Atividade Enzimática

Os ensaios de atividade enzimática utilizaram homogeneizados de músculo de *P. diploistris* e *P. cristiceps* provenientes da coleta 1. Um fêmur de cada animal foi separado do restante do corpo em nitrogênio líquido e armazenado em -80°C . No dia do ensaio, cada fêmur foi retirado do ultrafreezer e imediatamente imerso solução em tampão A em placa de petri sobre o gelo. Com o membro totalmente submerso no tampão gelado, o tecido muscular foi dissecado do membro, removendo os vasos sanguíneos, o fêmur e a pele. Toda a massa muscular que envolve o fêmur (i.e. bíceps femoral, tríceps femoral, semimembranoso, gracilis maior, gracilis menor, sartorio, ileofibular e adutor magno) dos animais foi homogeneizada em tampão A com o uso de homogeneizador elétrico OMNI Tissue Master 125. Aproximadamente 0,2 g de tecido muscular foi homogeneizado em 1 mL de tampão A. O tampão A continha 58.8 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF e 1:500 coquetel inibidor de protease (P8340, Sigma-Aldrich). O procedimento de homogeneização foi feito em gelo e durou 1.5 minutos. Após a homogeneização, o homogeneizado foi centrifugado a $10.000 \times g$ a 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e mantidos em gelo até serem usados nos ensaios de atividade enzimáticas realizados sempre no mesmo dia em que ocorreu a homogeneização. Com a exceção da catalase, todos os experimentos de atividade enzimática foram realizados em placas de 96 poços de fundo chato e lidos no espectrofotômetro Spectramax M3 (Molecular Devices). No caso da catalase, as reações foram feitas em cubeta de quartzo e lidas no mesmo equipamento que os demais ensaios.

A atividade de citrato sintase (CS) foi determinada pelo monitoramento da velocidade de formação do grupo CoA pela reação deste grupo com o 5,5'-ditiobis-

ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) (Srere 1969) (**Figura 24**). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão tris (pH 8,0), 0,1 mM acetil-CoA, 0,5 mM oxaloacetato e 0,1 mM DTNB. Em um volume reacional final de 100 μL , foram adicionados 2 μL de homogeneizado de músculo diluído 1:30 (p:v). A absorbância em 412 nm foi acompanhada no modo cinético por 75 segundos. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Uma unidade (U) de CS foi definida como a quantidade de enzima que forma 1 μmol de TNB por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{412}) 14,15 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Riddles, Blakeley, e Zerner 1983). As taxas de ensaios controle (i) ausência de homogeneizado e (ii) ausência de substrato (oxaloacetato) foram subtraídas das taxas do ensaio completo, corrigindo alterações independentes da atividade da enzima.

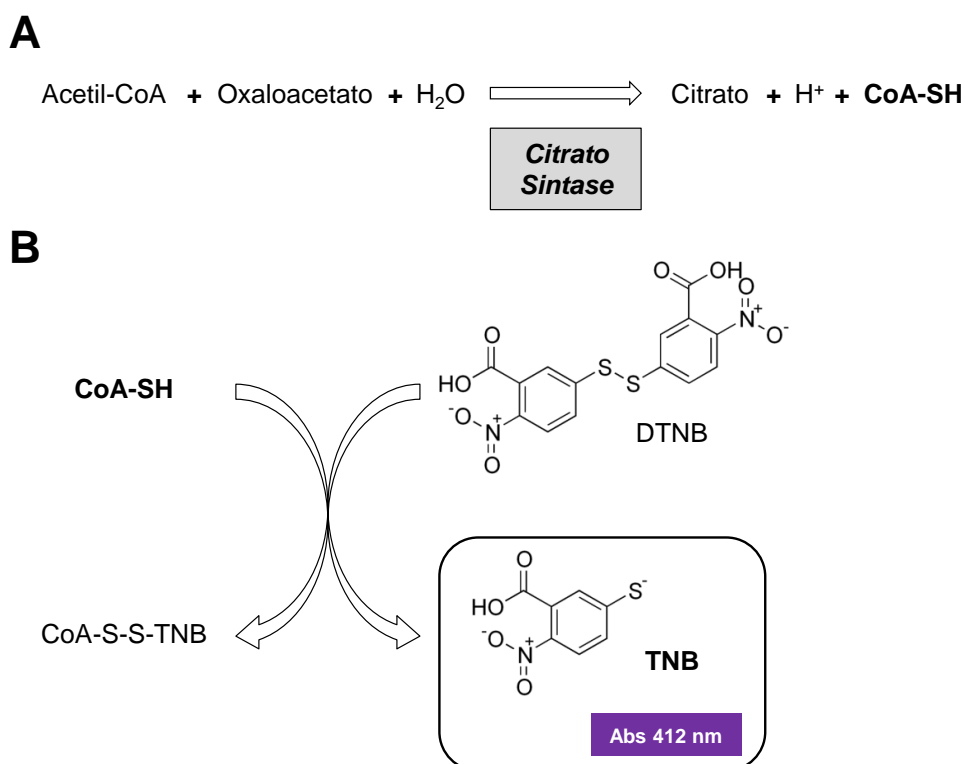


Figura 24. Esquema reacional do ensaio de atividade de citrato sintase (CS). (A) A CS catalisa a reação de condensação entre acetil-CoA e oxaloacetato, produzindo citrato e coenzima A. (B) A coenzima-A possui um grupo tiol livre que, no ensaio, reage com 5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico (DTNB), produzindo ácido 2-nitrobenzóico (TNB). A velocidade de produção de TNB é monitorada em 412 nm e é proporcional a atividade de CS na amostra.

A atividade de isocitrato desidrogenase (ICDH) foi determinada pelo monitoramento da velocidade da redução de NADP^+ a NADPH em 340 nm (Cowan et al. 2000) (**Figura 25**). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão

imidazol (pH 7,2), 5 mM MgSO₄, 0,4 mM NADP⁺ e 2 mM D,L-isocitrato. Em um volume reacional final de 200 µL, foram adicionados 5 µL de homogeneizado de músculo diluído 1:5 (p:v). A absorbância em 340 nm foi acompanhada no modo cinético por 90 segundos. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Uma unidade (U) de ICDH foi definida como a quantidade de enzima que forma 1 µmol de NADPH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) 6,22 mM⁻¹cm⁻¹. As taxas de ensaios controle (i) ausência de homogeneizado e (ii) ausência de substrato (isocitrato) foram subtraídas das taxas do ensaio completo, corrigindo alterações independentes da atividade da enzima.

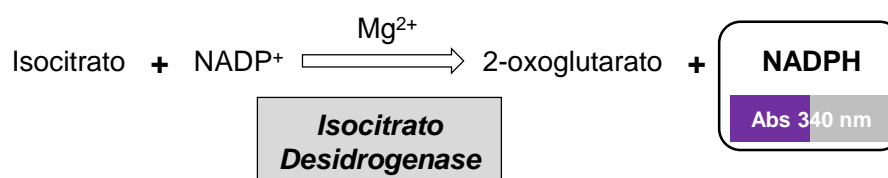


Figura 25. Esquema reacional do ensaio de atividade de isocitrato desidrogenase (ICDH). A ICDH catalisa a reação de descarboxilação oxidativa do isocitrato, produzindo 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato) e NADPH. Íons magnésio agem como cofator. A velocidade de produção de NADPH é monitorada em 340 nm e é proporcional a atividade de ICDH na amostra.

A atividade de piruvato quinase (PK) foi determinada pelo monitoramento da velocidade da queda da absorbância em 340 nm resultante da oxidação do NADH a NAD⁺ em um sistema de reações acopladas (Cowan et al. 2000) (**Figura 26**). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão imidazol (pH 7,2), 100 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 1 mM ADP, 0,2 mM NADH, 1 mM fosfoenolpiruvato, e 3 U/mL L-lactato desidrogenase. Em um volume reacional final de 200 µL, foram adicionados 10 µL de homogeneizado de músculo diluído 1:2.000 (p:v). A absorbância em 340 nm foi acompanhada no modo cinético por 90 segundos. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Uma unidade (U) de PK foi definida como a quantidade de enzima que resulta no consumo de 1 µmol de NADH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) 6,22 mM⁻¹cm⁻¹. As taxas de ensaios controle (i) ausência de homogeneizado e (ii) ausência de substrato (fosfoenolpiruvato) foram subtraídas das taxas do ensaio completo, corrigindo alterações independentes da atividade da enzima.

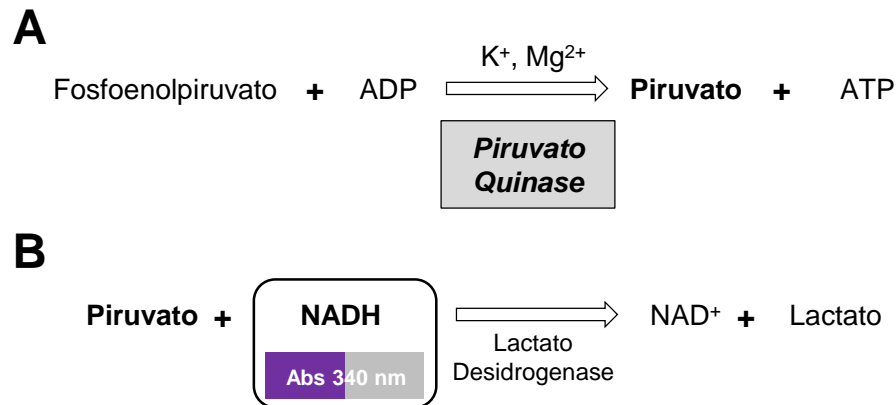


Figura 26. Esquema reacional do ensaio de atividade de piruvato quinase (PK). (A) A PK catalisa a transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato ao ADP, produzindo ATP e piruvato. Íons magnésio e potássio agem como cofatores. (B) O piruvato gerado pela PK é reduzido a lactato, consumindo NADH. A velocidade de consumo de NADH é monitorada em 340 nm e é proporcional a atividade de PK na amostra.

A atividade de creatina quinase (CK) foi determinada pelo monitoramento da velocidade de aumento da absorbância em 340 nm resultante da formação de NADPH em um sistema de reações acopladas (Cowan et al. 2000) (**Figura 27**). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão imidazol (pH 7,2), 10 mM MgSO_4 , 100 mM fosfocreatina, 1 mM ADP, 5 mM glicose, 1 mM NADP^+ , 1,25 U/mL hexoquinase, e 1,25 U/mL glicose 6-fosfato desidrogenase. Em um volume reacional final de 200 μL , foram adicionados 5 μL de homogeneizado de músculo diluído 1:1.500 (p:v). A absorbância em 340 nm foi acompanhada no modo cinético por 90 segundos. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Uma unidade (U) de CK foi definida como a quantidade de enzima que resulta na produção de 1 μmol de NADPH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) 6,22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. As taxas de ensaios controle (i) ausência de homogeneizado e (ii) ausência de substrato (fosfocreatina) foram subtraídas das taxas do ensaio completo, corrigindo alterações independentes da atividade da enzima.

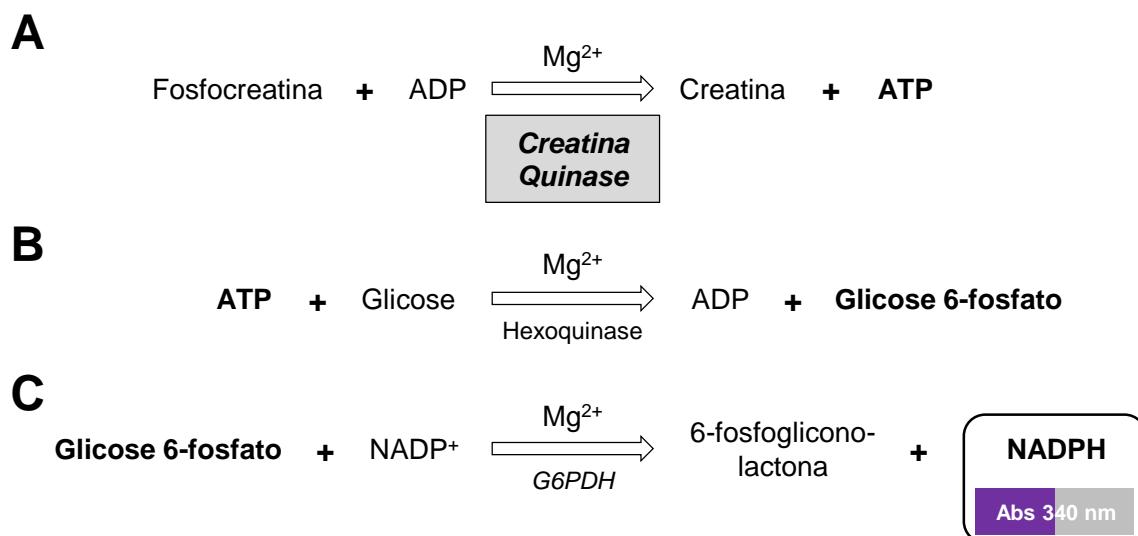


Figura 27. Esquema reacional do ensaio de atividade de creatina quinase (CK). (A) A CK catalisa a transferência do grupo fosfato da fosfocreatina ao ADP, produzindo ATP e creatina. (B) O ATP gerado pela CK é utilizado pela hexoquinase para fosforilar a glicose, produzindo glicose 6-fosfato. (C) A G6PDH catalisa a reação de oxidação da glicose 6-fosfato, produzindo 6-fosfoglicono-lactona e NADPH. A velocidade de produção de NADPH é monitorada em 340 nm e é proporcional a atividade de CK na amostra. Íons magnésio agem como cofatores.

A atividade de lactato desidrogenase (LDH) foi determinada pelo monitoramento da velocidade da queda da absorbância em 340 nm resultante da oxidação do NADH a NAD^+ (Cowan et al. 2000) (**Figura 28**). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão imidazol (pH 7,2), 2 mM piruvato, 5 mM DTT, e 0,2 mM NADH. Em um volume reacional final de 200 μL , foram adicionados 10 μL de homogeneizado de músculo diluído 1:2.000 (p:v). A absorbância em 340 nm foi acompanhada no modo cinético por 90 segundos. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Uma unidade (U) de LDH foi definida como a quantidade de enzima que resulta no consumo de 1 μmol de NADH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) 6,22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. As taxas de ensaios controle (i) ausência de homogeneizado e (ii) ausência de substrato (piruvato) foram subtraídas das taxas do ensaio completo, corrigindo alterações independentes da atividade da enzima.

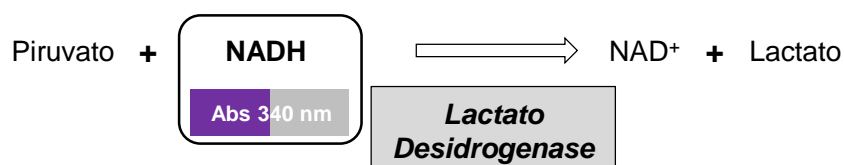


Figura 28. Esquema reacional do ensaio de atividade de lactato desidrogenase (LDH). A LDH catalisa a reação reversível de redução do piruvato, produzindo lactato e

consumindo NADH. A velocidade de consumo de NADH é monitorada em 340 nm e é proporcional a atividade de LDH na amostra.

A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo monitoramento da inibição da oxidação de NADH por radicais superóxido gerados por um sistema químico (Paoletti et al. 1986) (**Figura 29**). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão fosfato (pH 7,4), 5 mM EDTA, 2,5 mM $MnCl_2$, 0,25 mM NADH, e 4 mM 2-mercaptoetanol. Em um volume reacional final de 100 μL , foram adicionados diferentes volumes (1 – 32 μL) de homogeneizado de músculo diluído 1:35 (p:v), resultando em um curva de inibição. A absorbância em 340 nm foi acompanhada no modo cinético por 15 minutos. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Uma unidade (U) de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do NADH a NAD^+ por radicais superóxido gerados pelo sistema 2-mercaptoetanol, O_2 e Mn^{2+} .

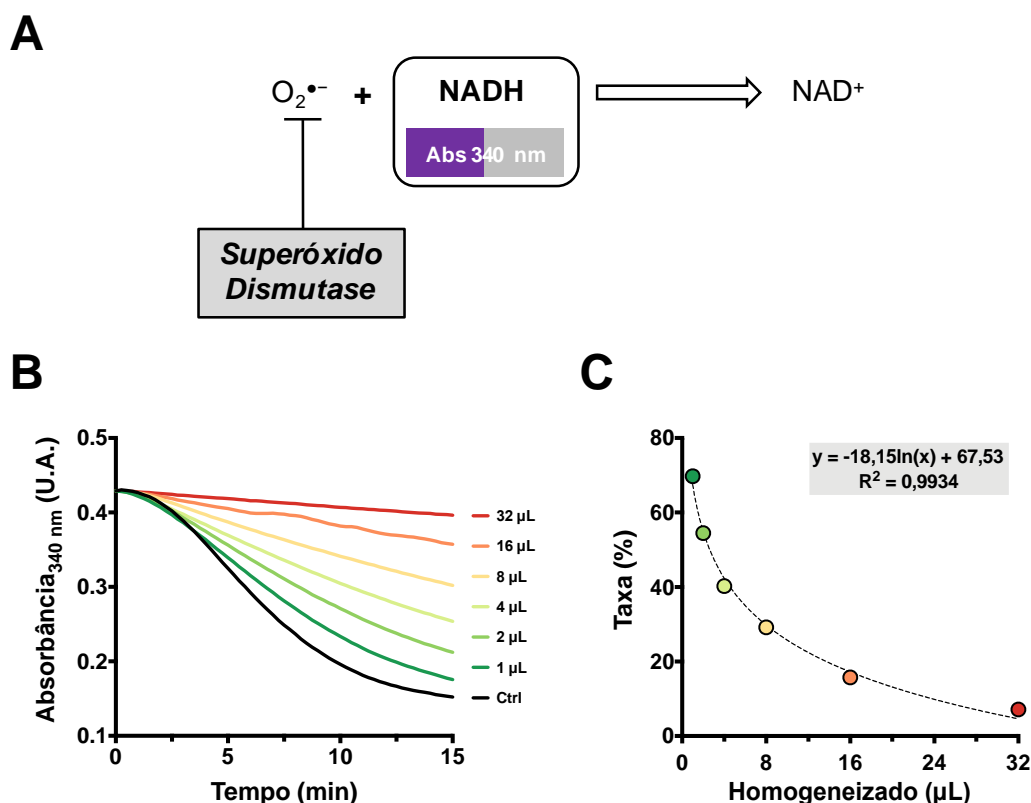


Figura 29. Esquema reacional do ensaio de atividade de superóxido dismutase (SOD). (A) Os radicais superóxido, gerados pelo sistema Mn^{2+} -EDTA, O_2 e 2-mercaptoetanol, oxidam o NADH. Quando presente, a SOD reduz a disponibilidade de radicais superóxido, inibindo a oxidação de NADH. (B) Efeito de diferentes volumes de homogeneizado de músculo de *P. diplolistris* na taxa de consumo de NADH. Quanto maior o volume de

homogeneizado, menor a velocidade de consumo de NADH. **(C)** Taxa de consumo de NADH relativa ao controle (sem homogeneizado) em resposta à adição de diferentes volumes de homogeneizado. A atividade de SOD é obtida ao calcular, usando a equação, a quantidade de homogeneizado que inibe em 50% o consumo de NADH.

A atividade de catalase foi determinada pelo monitoramento da decomposição do peróxido de hidrogênio em 240 nm (Aebi 1984) (**Figura 30**). Em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, foram adicionados 50 mM tampão fosfato de potássio (pH 7.2), 1 mM EDTA e 10 mM peróxido de hidrogênio. O volume de homogeneizado foi ajustado para cada amostra de maneira que resultasse em uma taxa próxima a $-0,025$ absorbância/minuto. Em um volume reacional final de 800 μL , foram adicionados em média 20 μL de homogeneizado de músculo diluído 1:200 (p:v). Após a adição de todos os reagentes, a cubeta foi vedada com Parafilm®, revirada e inserida no espectrofotômetro. A leitura no modo cinética foi feita por 40 segundos. A atividade de catalase foi calculada usando o coeficiente de absorvidade molar para H_2O_2 em 240 nm de $0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Aebi 1984). As taxas de ensaios controle (i) ausência de homogeneizado e (ii) ausência de substrato (H_2O_2) foram subtraídas das taxas do ensaio completo, corrigindo alterações independentes da atividade da enzima.

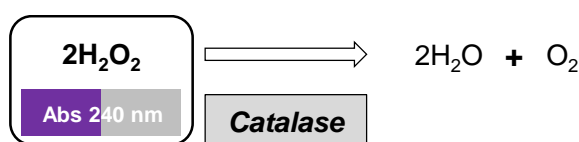


Figura 30. Esquema reacional do ensaio de atividade de catalase. A catalase catalisa a decomposição de duas moléculas de peróxido de hidrogênio, formando duas moléculas de água e uma de oxigênio molecular. O volume de homogeneizado foi ajustado de maneira a resultar uma taxa próxima de $0,025 \text{ min}^{-1}$ com o objetivo de evitar alterações bruscas da concentração de substrato. A velocidade de consumo de H_2O_2 é monitorada em 240 nm e é proporcional a atividade de catalase na amostra.

A atividade de glutathiona peroxidase (GPX) foi determinada pelo monitoramento da velocidade da queda da absorbância em 340 nm resultante do consumo de NADPH em um sistema de reações acopladas (Paglia e Valentine 1967)

(Figura 31). Inicialmente foi acompanhada a variação da absorbância em 340 nm do meio reacional na ausência de hidroperóxidos contendo 50 mM tampão fosfato (pH 7,2), 0,5 mM EDTA, 4 mM NaN_3 , 5 mM GSH, 0,5 U/mL GR, 0,25 mM NADPH e homogeneizado. Em um volume reacional final de 200 μL , foram adicionados 5 μL de homogeneizado de músculo diluído 1:5 (p:v). A azida inibe a atividade de outras peroxidases (e.g. catalase) abolindo potenciais interferências no ensaio. Após dois minutos, quando a taxa de oxidação do NADPH estava estável, era adicionado o substrato e a taxa A_{340}/min registrada. Dois substratos foram utilizados, o cumeno hidroperóxido (1 mM) para a detecção da atividade de GPX sobre peróxidos orgânicos (também chamada na literatura de GPX-total) e o H_2O_2 (0,5 mM) para a detecção da atividade de GPX sobre H_2O_2 comumente denominada de GPX dependente de selênio. Uma unidade (U) de GPX foi definida como a quantidade de enzima que resulta no consumo de 1 μmol de NADPH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. As taxas de ensaios controle (i) ausência de homogeneizado e (ii) ausência de substrato (H_2O_2 ou cumeno hidroperóxido) foram subtraídas das taxas do ensaio completo, corrigindo alterações independentes da atividade da enzima.

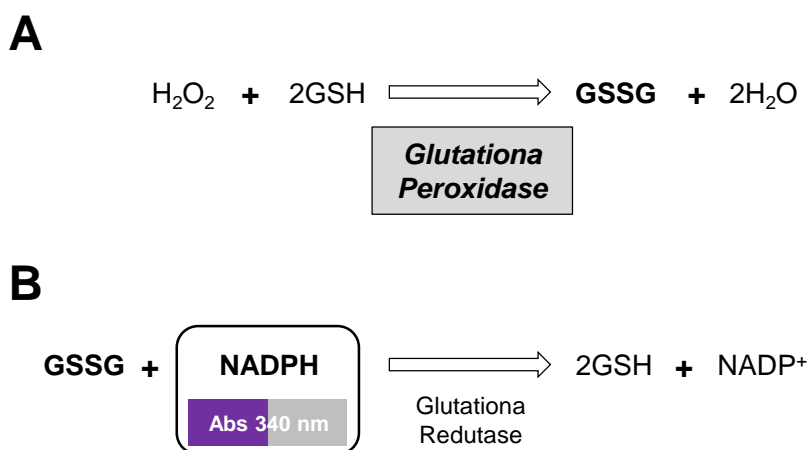


Figura 31. Esquema reacional do ensaio de atividade de glutaciona peroxidase (GPX). (A) As enzimas com atividade GPX reduzem hidroperóxidos orgânicos aos seus respectivos álcoois, ou, no caso do H_2O_2 , à água. Para tanto, a GPX utiliza potencial redutor de moléculas de glutaciona reduzida (GSH), formando glutaciona dissulfeto (GSSG). (B) A GSSG produzida pela GPX é reduzida pela glutaciona redutase (GR), consumindo NADPH. A velocidade de consumo de NADPH é monitorada em 340 nm e é proporcional a atividade de GPX na amostra.

A atividade de glutatona transferase (GST) foi determinada pelo monitoramento em 340 nm da velocidade de formação de 2,4-dinitrofenil-S-glutationa (DNP-SG), um conjugado entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig, Pabst, e Jakoby 1974) (**Figura 32**). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão fosfato (pH 6,8), 0,5 mM EDTA, 5 mM GSH, e 1 mM CDNB. Em um volume reacional final de 200 μL , foram adicionados 5 μL de homogeneizado de músculo diluído 1:5 (p:v). A absorbância em 340 nm foi acompanhada no modo cinético por 90 segundos. Uma unidade (U) de GST foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol do conjugado por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) 9,6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. As taxas de ensaios controle na ausência de homogeneizado foram subtraídas das taxas do ensaio completo, corrigindo a contribuição da reação espontânea entre CDNB e GSH.

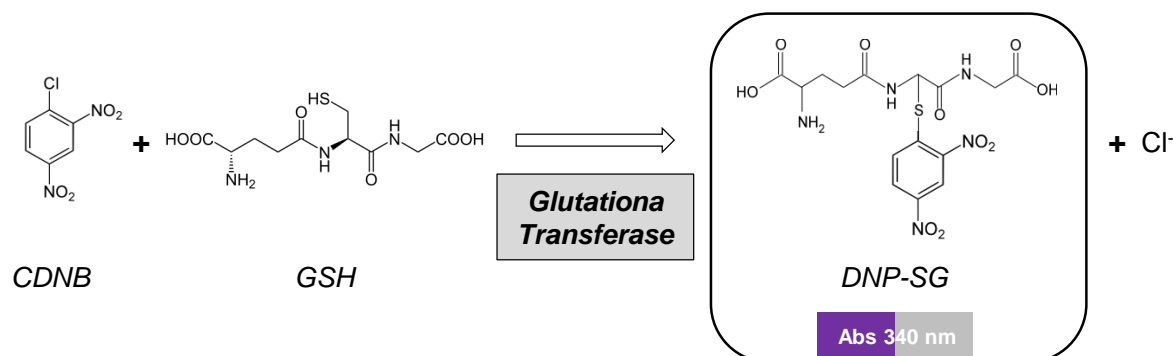


Figura 32. Esquema reacional do ensaio de atividade de glutatona transferase (GST). A GST catalisa a conjugação de moléculas de glutatona reduzida (GSH) a compostos eletrofílicos (e.g. 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, CDNB). No caso do CDNB, produz-se o conjugado 2,4-dinitrofenil-S-glutationa (DNP-SG). A velocidade de produção de DNP-SG é monitorada em 340 nm e é proporcional a atividade de GST na amostra.

A atividade de enzima málica (ME) foi determinada pelo monitoramento da velocidade de aumento da absorbância em 340 nm resultante da redução de NADP^+ a NADPH (Cowan et al. 2000) (**Figura 33**). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão imidazol (pH 7,2), 2 mM malato, 5 mM MgSO_4 , e 0,4 mM NADP^+ . Em um volume reacional final de 200 μL , foram adicionados 5 μL de homogeneizado de músculo diluído 1:5 (p:v). A absorbância em 340 nm foi acompanhada no modo cinético por 90 segundos. Uma unidade (U) de ME foi definida como a quantidade de enzima que resulta na produção de 1 μmol de NADPH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) 6,22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. As taxas de ensaios controle (i) ausência de homogeneizado e (ii) ausência de

substrato (malato) foram subtraídas das taxas do ensaio completo, corrigindo alterações independentes da atividade da enzima.

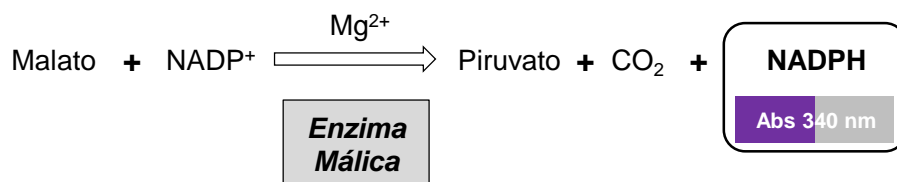


Figura 33. Esquema reacional do ensaio de atividade da enzima málica (ME). A ME catalisa a reação de oxidação do malato, produzindo piruvato, CO_2 e NADPH. Íons magnésio agem como cofator. A velocidade de produção de NADPH é monitorada em 340 nm e é proporcional a atividade de ME na amostra.

A atividade de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi determinada pelo monitoramento da velocidade da redução de NADP^+ a NADPH em 340 nm (Glock e McLean 1953) (**Figura 34**). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão imidazol (pH 7,2), 5 mM glicose 6-fosfato, 5 mM MgSO_4 , e 0,4 mM NADP^+ . Em um volume reacional final de 100 μL , foram adicionados até 20 μL de homogeneizado de músculo diluído 1:5 (p:v). A absorbância em 340 nm foi acompanhada no modo cinético por 90 segundos. Não houve diferença entre as taxas de ensaios controle (i) ausência de homogeneizado e (ii) ausência de substrato (glicose 6-fosfato) em relação ao ensaio completo contendo homogeneizado e substrato. Portanto, não foi possível detectar a atividade de G6PDH.

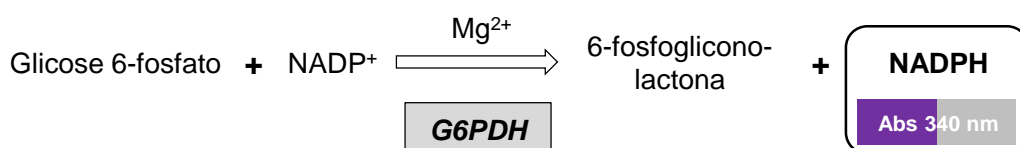


Figura 34. Esquema reacional do ensaio de atividade de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH). A G6PDH catalisa a reação de oxidação da glicose 6-fosfato, produzindo 6-fosfoglicono-lactona e NADPH. Íons magnésio agem como cofator. A velocidade de produção de NADPH é monitorada em 340 nm e é proporcional a atividade de G6PDH na amostra.

A atividade de glutatona redutase (GR) foi determinada pelo monitoramento da velocidade de consumo de NADPH em 340 nm (Carlberg e Mannervik 1975) (**Figura 35**). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão fosfato (pH 7,2), 1 mM EDTA, 5 mM GSSG e 0,2 mM NADPH. Em um volume reacional final de 100 μL , foram adicionados até 20 μL de homogeneizado de músculo diluído 1:5 (p:v).

A absorbância em 340 nm foi acompanhada no modo cinético por 90 segundos. Não houve diferença entre as taxas de ensaios controle (i) ausência de homogeneizado e (ii) ausência de substrato (GSSG) em relação ao ensaio completo contendo homogeneizado e substrato. Portanto, não foi possível detectar a atividade de GR.



Figura 35. Esquema reacional do ensaio de atividade de glutatona redutase (GR). A GR catalisa a redução de glutatona dissulfeto (GSSG) à glutatona reduzida (GSH) utilizando o potencial redutor do NADPH. A velocidade de consumo de NADPH é monitorada em 340 nm e é proporcional a atividade de GR na amostra.

Em cada homogeneizado usado para a determinação de atividade enzimática, foi medida a concentração de proteínas solúveis pela reação do sobrenadante com azul de Coomassie G-250 (Bradford 1976). Em uma placa de 96 poços de fundo chato, foram adicionadas alíquotas de 10 µL de sobrenadante ou de soluções-padrão de albumina do soro bovino em concentrações de 0,05 a 0,40 mg/mL. Então, foram adicionados 250 µL de reagente de Bradford. A placa foi agitada por 30 segundos e mantida em temperatura ambiente protegida da luz por 5 minutos. Ao final deste tempo, a absorbância em 595 nm foi registrada. A concentração de proteínas no homogeneizado foi determinada ao comparar a absorbância em 595 nm da amostra a uma curva-padrão. Em paralelo, o ensaio também foi realizado com 10 µL de tampão A na mesma diluição que as amostras para descontar qualquer interferência. As atividades enzimáticas foram normalizadas pela concentração de proteínas no tecido.

4.2.5 Determinação dos Níveis de Glutatona e Proteínas Carboniladas

Para o ensaios de determinação dos níveis de glutatona livre (formas reduzida e dissulfeto) e proteínas carboniladas foram usadas diferentes frações de um mesmo homogeneizado ácido. Um fêmur de cada animal foi separado do restante do corpo em nitrogênio líquido e armazenado em -80°C . No dia do ensaio, cada fêmur foi retirado do ultrafreezer e imediatamente imerso solução de 10% (p/v) ácido tricloroacético (TCA) previamente gelado em placa de petri sobre o gelo. Com

o membro totalmente submerso em solução ácida, o tecido muscular foi dissecado do membro, removendo os vasos sanguíneos, o fêmur e a pele. Todo o tecido muscular ao redor do fêmur (~200 mg) foi homogeneizado em uma concentração final de 10% (p/v) TCA na proporção de 1 parte de tecido e 4 partes de solução ácida. Em gelo, a amostra de músculo foi homogeneizado usando um homogeneizador vidro-vidro do tipo Tenbroeck. Após a homogeneização, o homogeneizado foi centrifugado a $10.000 \times g$ a 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e mantidos em gelo até serem usados para a determinação dos níveis de glutathiona no mesmo dia da homogeneização. Os pellets foram armazenados a -80°C para posterior determinação dos níveis de proteínas carboniladas (dois tubos) e de proteínas totais (um tubo).

A determinação da concentração glutathiona reduzida (GSH), glutathiona dissulfeto (GSSG) e glutathiona total ($\text{GSH-eq} = [\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}]$) foi realizada pelo método enzimático “reciclador” (Tietze 1969; Griffith 1980) com adaptações para microplacas (Rahman et al. 2006). O princípio do método é a capacidade de grupos tiol (SH) em seu estado reduzido de reduzir a ligação dissulfeto do DTNB, produzindo TNB, um composto que absorve luz em 412 nm (**Figura 36**). Em um meio reacional contendo glutathiona (GSH e/ou GSSG), DTNB, glutathiona redutase (GR) e NADPH, a velocidade da alteração da absorbância em 412 nm (Δ_{A412}/min) é linearmente proporcional à concentração total de glutathiona. Para aferir somente a concentração de GSSG, as amostras são pré-incubadas com 2-vinilpiridina (2-VP), que liga-se apenas à GSH e impede reações posteriores (Griffith 1980) (**Figura 37**).

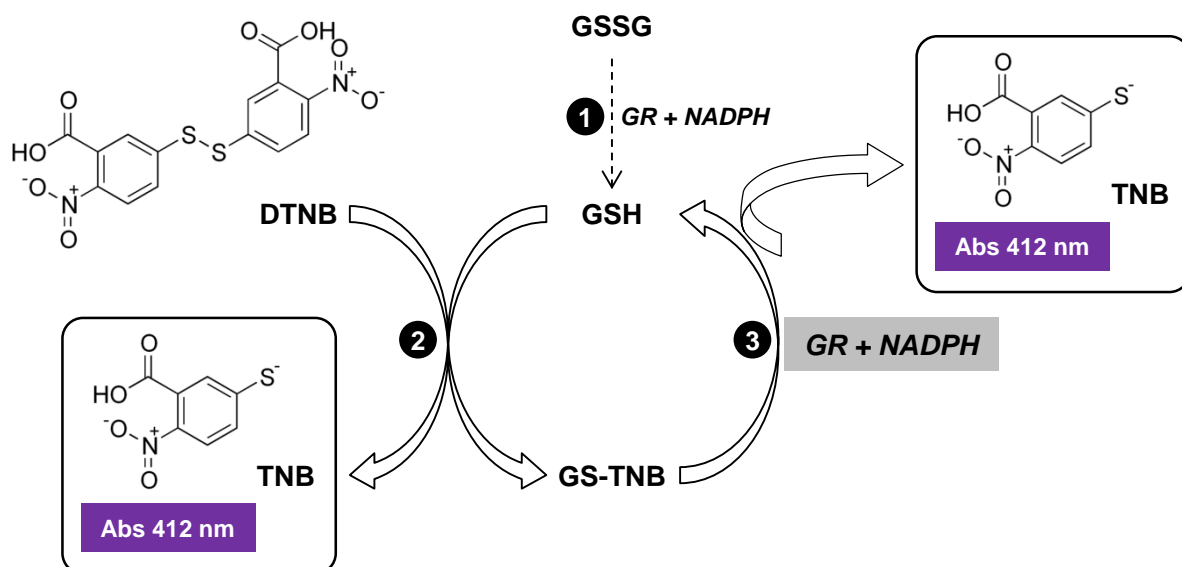


Figura 36. Esquema reacional do ensaio de determinação dos níveis de glutatona. (1) A glutatona dissulfeto (GSSG) presente na amostra é reduzida pela ação da glutatona redutase (GR) na presença de NADPH, produzindo glutatona reduzida (GSH). (2) A GSH presente na amostra, assim como a GSH proveniente da redução da GSSG, reage com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), produzindo o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), que absorve luz em 412 nm, e o aduto entre GSH e TNB (GS-TNB). (3) Adicionalmente, a GR reduz a ligação dissulfeto do aduto GS-TNB, produzindo TNB e regenerando a GSH. Nestas condições, a velocidade de aumento da absorbância em 412 nm é linearmente proporcional a quantidade de glutatona total na amostra. Figura modificada de Rahman et al. (2006).

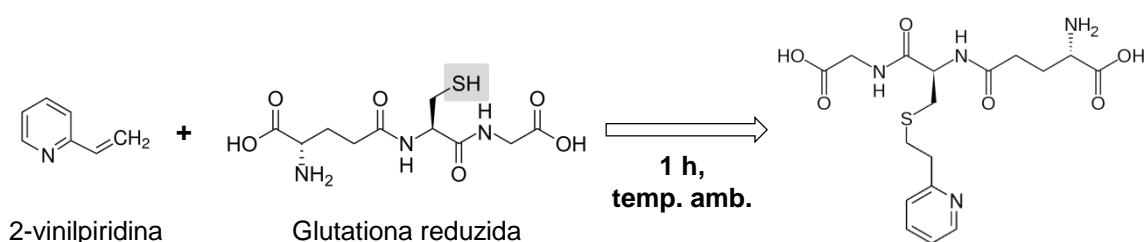


Figura 37. Efeito da 2-vinilpiridina sobre a glutatona reduzida (GSH). Para a medição da glutatona em sua forma dissulfeto (GSSG) as amostras são incubadas com 24 mM 2-vinilpiridina (2-VP). Após uma hora de incubação em temperatura ambiente, a 2-VP liga-se covalentemente ao grupo SH da glutatona reduzida (GSH), impedindo a reação com o DTNB. Durante o ensaio, a GSSG é reduzida a GSH, que reage com o DTNB causando aumento da absorbância em 412 nm. Assim, a taxa de aumento da absorbância depende somente da concentração de GSSG.

Para a determinação de GSH-eq, soluções padrão de GSH foram preparadas em tubos em 10% (p/v) TCA nas concentrações 5, 10, 20, 40 e 80 μM . Foi construída uma curva padrão aplicando 10 μL de cada solução padrão em 200 μL de volume final de um meio reacional contendo 125 mM tampão fosfato (pH 7,0), 1,25 mM EDTA, 0,5% (p/v) TCA, 0,2 mM NADPH, 0,27 mM DTNB, 0,27 U/mL GR. No caso das amostras, o padrão foi substituído por 5 μL de sobrenadante ácido, completando o volume restante com 10% TCA para manter a concentração final. Cada ponto da curva e das amostras foi feito em triplicata em uma microplaca de 96 poços. A reação era disparada pela adição de NADPH e a absorbância em 412 nm monitorada por dois minutos (**Figura 38A e B**). A leitura da curva e das amostras foi realizada simultaneamente na mesma placa.

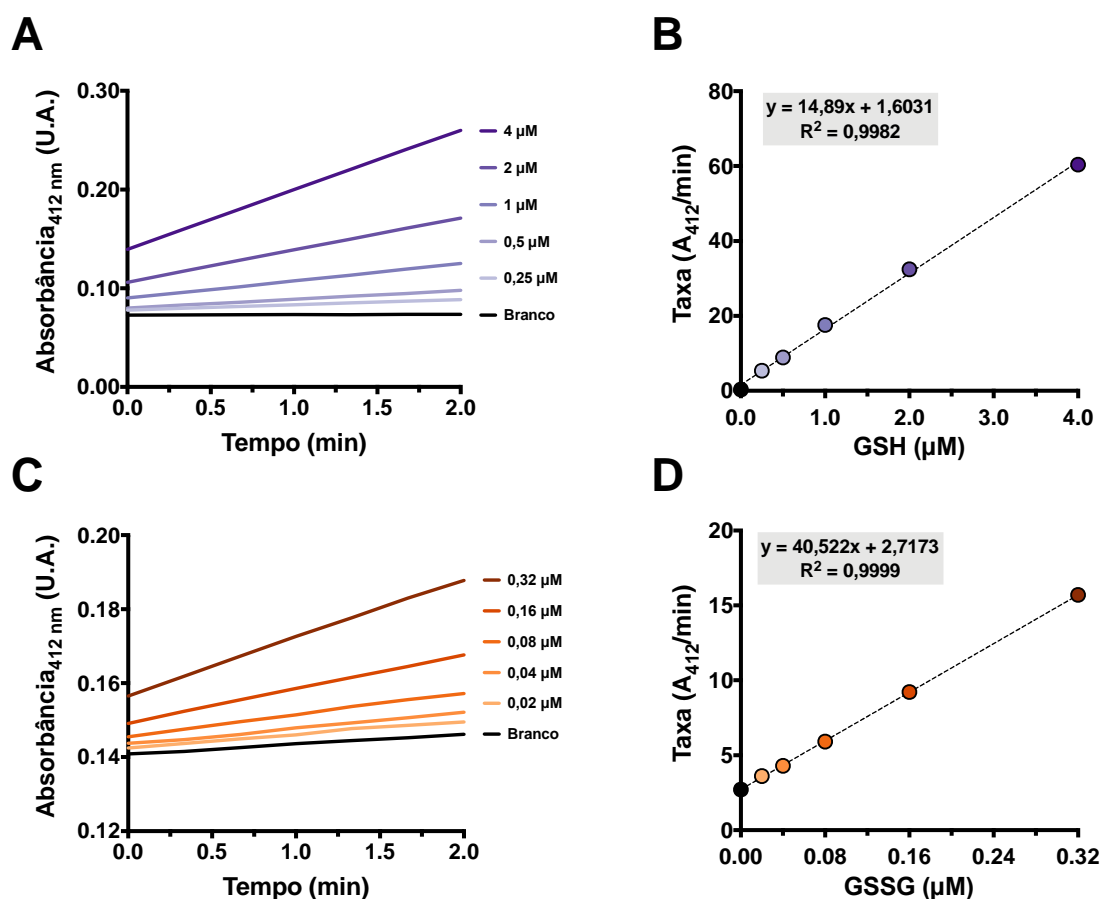


Figura 38. Curvas-padrão para glutationa em suas formas reduzida (GSH) e dissulfeto (GSSG). (A) Variação da absorbância em 412 nm em resposta a diferentes concentrações de GSH (0,25 – 4,00 μM). (B) Curva-padrão de GSH: no eixo Y, taxa de variação da absorbância em 412 nm por minuto (inclinação da reta do gráfico A); no eixo X, concentração de GSH. (C) Variação da absorbância em 412 nm em resposta a diferentes concentrações de GSSG (0,02 – 0,32 μM). (D) Curva-padrão de GSSG: no eixo Y, taxa de variação da absorbância em 412 nm por minuto (inclinação da reta do gráfico C); no eixo X, concentração de GSSG.

Para a determinação de GSSG, soluções padrão de GSSG foram preparadas em tubos eppendorf em solução niveladora (2,4% (p/v) TCA, 357 mM KPi, 4,8% (v/v) etanol) nas seguintes concentrações 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 μM . A solução niveladora foi utilizada para reproduzir as condições das amostras destinadas à determinação de GSSG são submetidas. Foi construída uma curva padrão aplicando 20 μL de cada solução padrão em 200 μL de volume final de um meio reacional contendo 125 mM tampão fosfato (pH 7,0), 1,25 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, 0,4 mM DTNB, 0,4 U/mL GR. As amostras para a medição de GSSG foram pré-tratadas ao adicionar 50 μL de sobrenadante ácido, 150 μL de 500 mM KPi (pH 7.0) e 10 μL de 500 mM 2-vinilpiridina (2-VP, solubilizada em etanol). As amostras foram agitadas vigorosamente e incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Para a leitura das amostras, o padrão foi substituído por 20 μL de amostra tratada com 2-VP. Cada ponto da curva e das amostras foi feito em triplicata em uma microplaca de 96 poços. A reação era disparada pela adição de NADPH e a absorbância em 412 nm monitorada por dois minutos (**Figura 38C e D**). A leitura da curva e das amostras foi realizada simultaneamente na mesma placa. As taxas de variação da absorbância das amostras foram comparadas às curvas-padrão e as concentrações de GSH-eq e GSSG calculadas. A concentração de GSH reduzida foi obtida pela subtração GSH-eq - GSSG e a razão GSSG/GSH-eq pela divisão entre os valores.

Os pellets provenientes da homogeneização em TCA descrita acima, contendo as proteínas precipitadas, foram usados para a aferição do grau de dano oxidativo a proteínas. Para tanto, foi medida a concentração de proteínas carboniladas ao reagir o pellet com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Fields e Dixon, 1971). O produto dessa reação de condensação é a 2,4-dinitrofenilhidrazona, que absorve luz em 370 nm, covalentemente ligada à proteína (**Figura 39**). Os pellets foram ressuspensos com 500 μL de 10 mM DNPH em 2 M HCL (tubo teste) ou 500 μL de 2 M HCl (tubo branco). Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente protegidos da luz por uma hora, e agitados a cada 15 minutos. Após esta incubação, foram adicionados 500 μL de 20% (p/v) TCA gelado em ambos os tubos e estes mantidos em gelo por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 10.000 \times g por 10 minutos a 4° C e os sobrenadantes descartados.

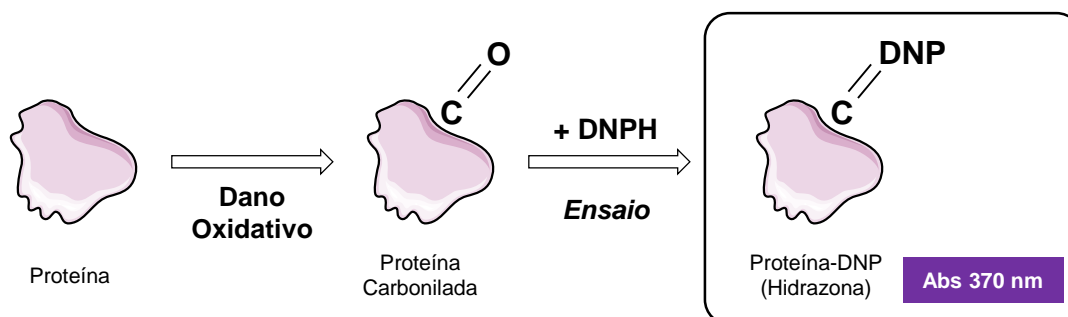


Figura 39. Ensaio de determinação dos níveis de proteínas carboniladas.
Figura elaborada com formas adaptadas de Servier Medical Art.

Os pellets foram ressuspensos em 1 mL de uma solução 1:1 (v/v) etanol:acetato de etila, agitados vigorosamente e centrifugados a $10.000\times g$ por 10 minutos a $4^\circ C$. O sobrenadante foi descartado e este procedimento de lavagem repetido mais duas vezes. Ao final da última lavagem os pellets foram deixados em capela de exaustão para a evaporação do etanol:acetato de etila e acrescidos de 1 mL de 6 M cloreto de guanidina em 20 mM tampão fosfato (pH 2,3). As amostras foram agitadas até a completa solubilização dos pellets e centrifugados a $10.000\times g$ por 10 minutos a $4^\circ C$. Alíquotas de 200 μL foram transperidas para placas de 96 poços e a absorbância em 370 nm registrada. A concentração de proteínas carboniladas foi calculada pela subtração da absorbância do tubo branco daquela do tubo teste, seguida da divisão pelo coeficiente de absorvidade molar $\epsilon_{370} = 22.000 M^{-1}cm^{-1}$.

Para normalizar a concentração de proteínas carboniladas e de glutathiona em relação ao conteúdo de proteínas totais de cada amostra, a concentração de proteínas totais foi estimada em um dos pellets produzidos do homogeneizado em TCA. O pellet foi ressuspensado em 500 μL 100 mM NaOH e incubado em banho ultrassônico por 15 minutos a $50^\circ C$. Após completa solubilização do pellet, uma alíquota de 20 μL foi adicionada a 180 μL de 50 mM fosfato de potássio, pH 7,0, e utilizado para determinação de proteínas pelo método de Bradford conforme descrito na seção 4.2.4 (Bradford 1976).

4.2.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente usando o programa GraphPad Prism 7, considerando um nível de significância de $p < 0,05$. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. As comparações foram feitas dentro

de uma mesma espécie entre os grupos ativo e estivado utilizando os testes t (paramétrico) e teste Mann-Whitney (não paramétrico) de acordo com a distribuição dos dados. Cada parâmetro foi aferido com $N=6$, considerando cada indivíduo como uma unidade experimental. Os resultados estão apresentados na forma de “*box plot*”, onde a linha central representa a mediana, a caixa inferior o primeiro quartil, a caixa superior o terceiro quartil, a barra superior o valor máximo e a barra inferior o valor mínimo. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada considerando todas as variáveis bioquímicas aferidas, utilizando o *software* Minitab 17. Devido à forte relação entre os níveis de glutathiona total (GSH-eq) e glutathiona reduzida (GSH), os valores da GSH-eq foram removidos antes da análise de PCA.

4.3 Resultados e Discussão

A atividade de citrato sintase (CS), enzima que catalisa a primeira reação do ciclo do ácido cítrico (via metabólica dependente de O_2), é um indicador de densidade mitocondrial e capacidade oxidativa do tecido. Durante a estivação, foram observadas quedas de 36% na atividade desta enzima em ambas as espécies em relação aos animais ativos (**Figura 40A**). Outro parâmetro indicador da capacidade de vias aeróbias, é a isocitrato desidrogenase (ICDH), cuja atividade caiu em 48% e 25% no período de seca em *P. diploslistris* e *P. cristiceps* respectivamente (**Figura 40B**). A depressão de vias oxidativas está de acordo com os ajustes observados em situações de depressão metabólica, onde vias dependentes de O_2 são suprimidas e o consumo de O_2 é reduzido. Quedas na atividade de CS também foram observadas em músculos do membro posterior de rãs australianas *Cyclorana alboguttata* após seis meses de estivação (Mantle et al. 2010). Em outro modelo de estivação, o peixe pulmonado africano *Protopterus dolloi*, a atividade de CS muscular cai na fase hipometabólica (Frick et al. 2008b). Em oposição a estas observações, a atividade de ambas enzimas, CS e ICDH, aumenta no músculo do sapo norte americano *Scaphiopus couchii* durante a estivação (Cowan et al. 2000).

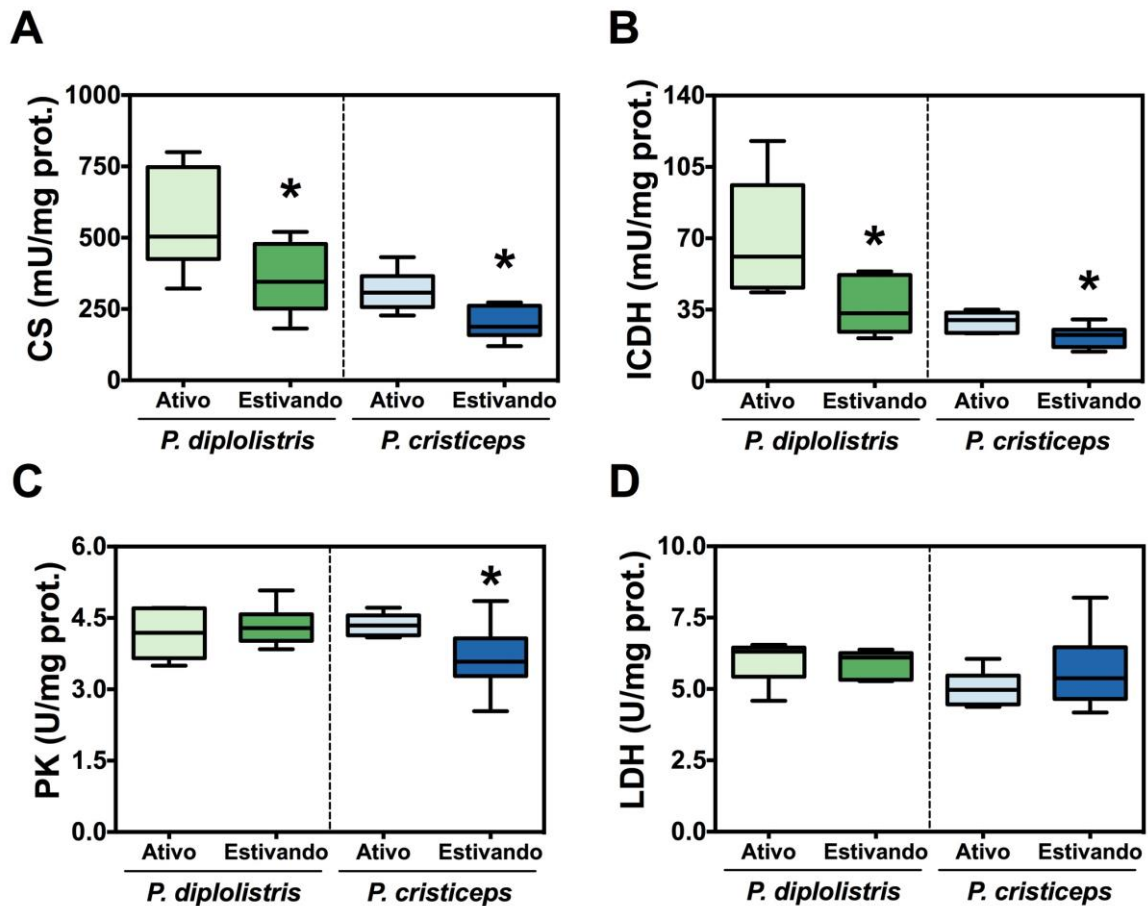


Figura 40. Atividade de enzimas metabólicas no músculo de membros posteriores de *Pleurodema diplolistris* e *Proceratophrys cristiceps*. (A) Citrato sintase (CS), (B) isocitrato desidrogenase-NADP⁺ (ICDH), (C) piruvato quinase (PK), (D) lactato desidrogenase (LDH). N=6. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos ativo e estivando dentro de uma mesma espécie (p<0,05).

Por outro lado, a atividade de piruvato quinase (PK), enzima da glicólise, manteve-se relativamente constante na estivação em ambas as espécies, apresentando uma ligeira queda de 16% apenas em *P. cristiceps* (Figura 40C). A capacidade da via glicolítica, aferida pelas atividades de PK e hexoquinase, também é mantida no músculo de *P. dolloi* durante a estivação. Tais observações contrastam com os dados de *S. couchii*, cuja estivação está associada a um drástico aumento da atividade de PK (Cowan et al. 2000) regulada por fosforilação (Cowan e Storey 1999). Em condições de limitação de O₂, o piruvato produzido pela glicólise é convertido a lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDH). A capacidade desta via anaeróbica não foi afetada pela estivação nos músculos de *P. diplolistris* e *P. cristiceps* (Figura 40D). De maneira similar, a atividade muscular de LDH é inalterada no músculo de peixes pulmonados *P. dolloi* durante a estivação (Frick et

al. 2008a). Dependendo do tipo muscular, a atividade de LDH pode ser semelhante ou menor em rãs *C. alboguttata* estivando quando comparadas ao grupo ativo (Mantle et al. 2010). A manutenção da capacidade desta via anaeróbica concorda com a observação da manutenção da disponibilidade de O₂ no solo da Caatinga durante a estiagem.

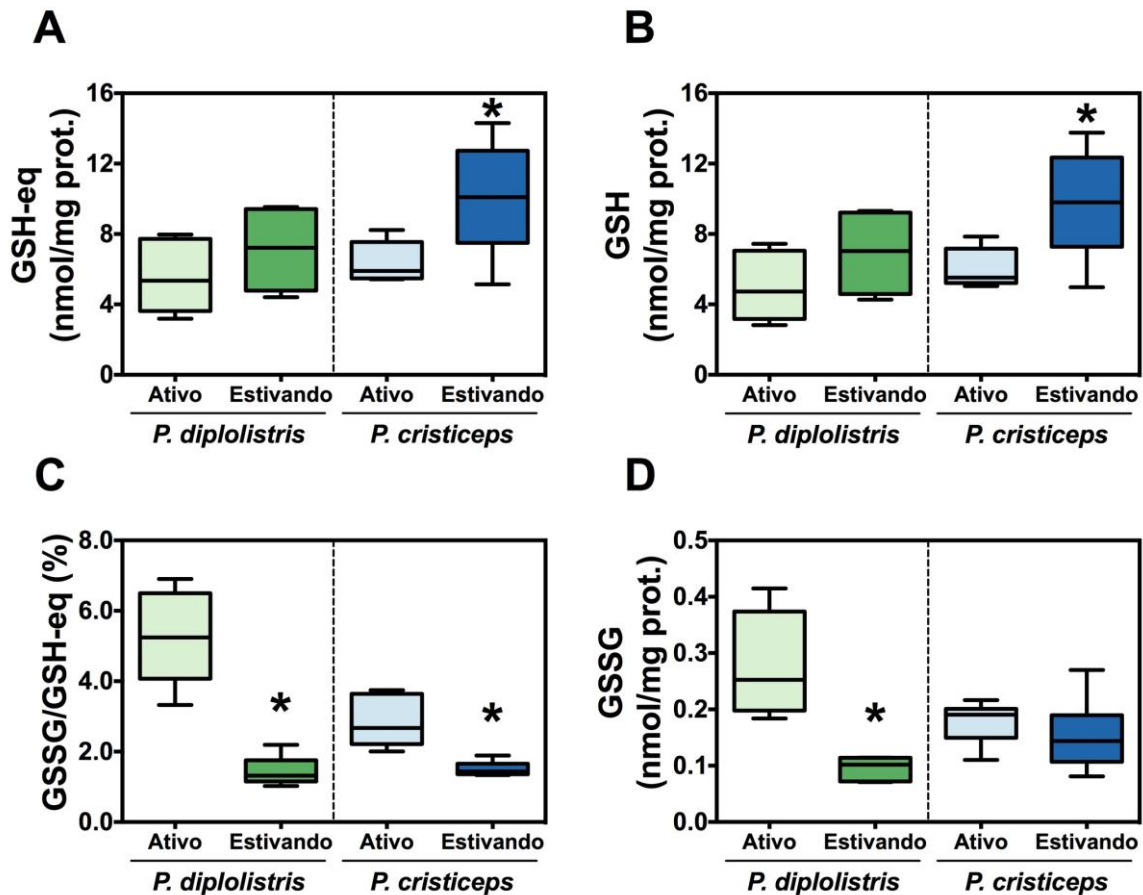


Figura 41. Parâmetros relacionados à glutatona no músculo de membros posteriores de *Pleurodema diplolistris* e *Proceratophrys cristiceps*. (A) conteúdo total de equivalentes de glutatona (GSH-eq), (B) glutatona reduzida (GSH), (C) glutatona dissulfeto (GSSG), (D) razão entre GSSG e GSH-eq (GSSG/GSH-eq). N=6. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos ativo e estivando dentro de uma mesma espécie (p<0,05).

A glutatona é um tripeptídeo presente em concentrações milimolares que tem papel central no metabolismo redox de organismos aeróbicos. No músculo de *P. diplolistris*, não houve alteração significativa do conteúdo total de glutatona (GSH-eq, Figura 5.3.2A). Já em *P. cristiceps*, animais estivando têm 57% mais GSH-eq muscular do que indivíduos ativos (**Figura 41A**). Tal aumento em *P. cristiceps* pode ser explicado pela elevação de 61% da concentração de glutatona reduzida (GSH) durante a estivação em relação aos animais da estação chuvosa (**Figura 41B**). A

estivação de ambas as espécies resultou em um ambiente celular mais reduzido, i.e. menores valores de GSSG/GSH-eq (**Figura 41C**). Em *P. diplolistris* a queda foi de 72% e em *P. cristiceps* de 47% (**Figura 41C**). Entretanto, estas quedas tiveram diferentes causas em cada espécie. Enquanto em *P. diplolistris* a causa foi a redução da concentração de GSSG (**Figura 41D**), em *P. cristiceps* a causa foi o aumento de GSH (**Figura 41B**). O panorama no músculo de sapos *S. couchii* é bem diferente na estivação, quando os níveis de GSH-eq e GSH caem e os níveis de GSSG e GSSG/GSH-eq são mantidos (Grundy e Storey 1998). No caso do peixe pulmonado *Protopterus annectens*, ocorre um aumento dos quatro parâmetros (GSH-eq, GSH, GSSG e GSSG/GSH-eq) após seis meses de estivação em relação aos animais mantidos na água (Jasmine 2016). No caso da GSSG e da razão GSSG/GSH-eq musculares este aumento já é observado nos primeiros 6 dias de estivação do peixe *P. annectens* (Jasmine 2016).

A atividade de superóxido dismutase total (i.e. a soma das contribuições citosólica e mitocondrial) muscular não foi afetada pelo estado metabólico de *P. diplolistris* e *P. cristiceps* (**Figura 42A**). Por outro lado, a atividade de três enzimas antioxidantes com atividade sobre peróxidos aumentou em ambas as espécies da Caatinga na estação seca *versus* animais ativos. A atividade de catalase foi 74% e 48% maior em *P. diploslistris* e *P. cristiceps* respectivamente (**Figura 42B**). No caso da glutathiona peroxidase total (tGPX), a atividades aumentam 74% em *P. diploslistris* e 57% em *P. cristiceps* durante a estivação (**Figura 42C**). Já a atividade de glutathiona peroxidase sobre H₂O₂ (GPX) foi 73% e 78% maior em *P. diploslistris* e *P. cristiceps* respectivamente (**Figura 42D**).

A indução da atividade dessas três enzimas antioxidantes em *P. diplolistris* e *P. cristiceps* encaixa-se na resposta do “preparo para o estresse oxidativo”. De fato, a estivação é uma situação em que 100% das espécies estudadas do ponto de vista redox, aumentam os níveis de antioxidantes em pelo menos um tecido analisado (**capítulo 3**). O metabolismo redox em músculo esquelético de vertebrados durante a estivação foi estudado em poucas espécies: no peixe pulmonado *P. annectens* e nos anuros *S. couchii* e *C. alboguttata*. De forma similar aos anuros da Caatinga, as atividades de GPX e tGPX aumentam e a atividade de tSOD é mantida após 6 meses de estivação no músculo de *P. annectens* (Jasmine 2016). No músculo de *S. couchii*, a estivação por um período de 2 meses causa um aumento das atividades de SOD e tGPX (Grundy e Storey 1998).

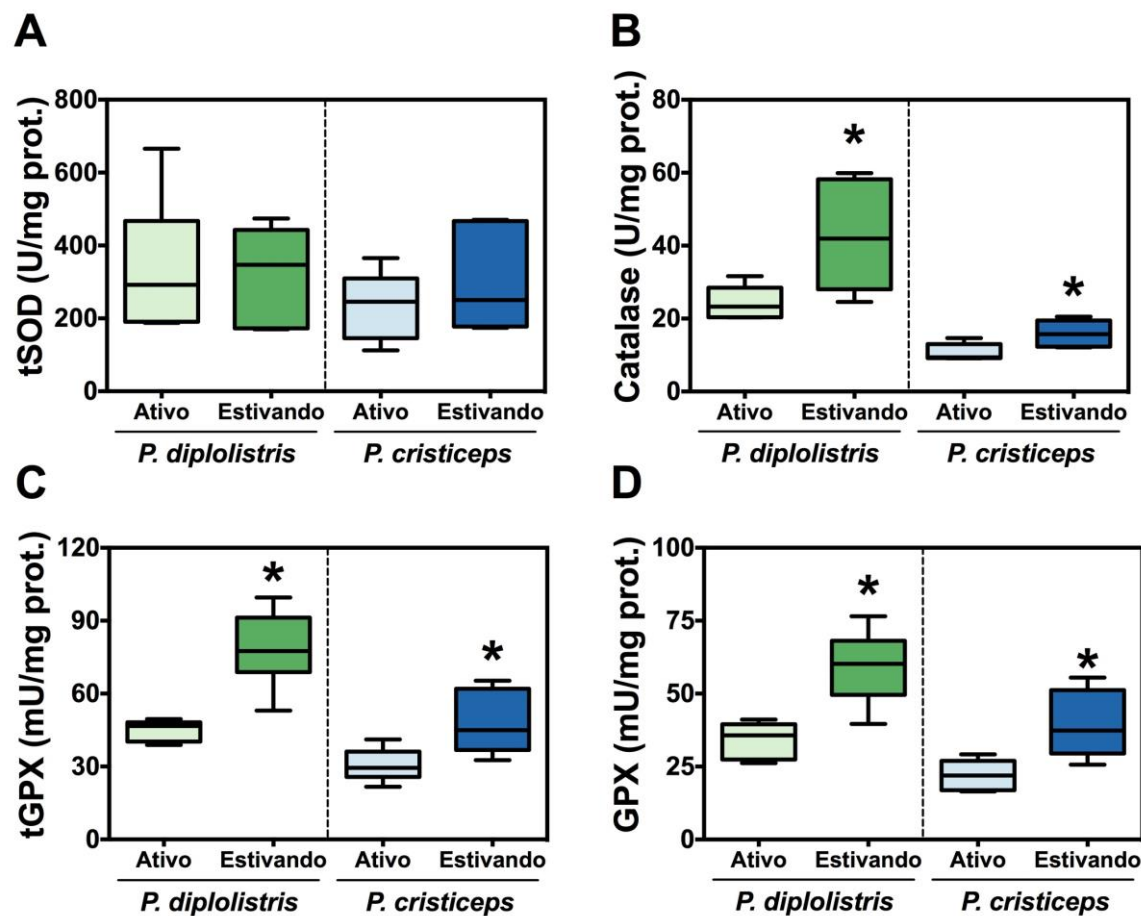


Figura 42. Atividade de enzimas antioxidantes no músculo de membros posteriores de *Pleurodema diplolistris* e *Proceratophrys cristiceps*. (A) Superóxido dismutase total (tSOD), (B) catalase, (C) glutaciona peroxidase total (tGPX), (D) glutaciona peroxidase-H₂O₂ (GPX). *N*=6. No caso da catalase, o grupo ativo *P. cristiceps* teve *N*=5. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos ativo e estivando dentro de uma mesma espécie (*p*<0,05).

No caso de *C. alboguttata*, a quantidade de transcritos no tecido muscular para catalase e GPX não se alteram significativamente após seis meses de estivação, enquanto o número de transcritos para a SOD mitocondrial cai em relação aos animais ativos (Hudson et al. 2006). Ainda nesta espécie, não há diferença na atividade de SOD entre animais ativos e estivando, ambos mantidos a 24°C (Young, Cramp, e Franklin 2013). Por outro lado, uma análise transcriptômica revelou a ativação da transcrição de genes sob regulação do fator de transcrição Nrf2 após quatro meses de estivação (Reilly et al. 2013). Dentre os alvos induzidos estão a glutaciona transferase omega, a subunidade regulatória da glutamato cisteína ligase e a sulfiredoxina 1 (Reilly et al. 2013). Entretanto, a produção de H₂O₂ (importante sinalizador na ativação de respostas antioxidantes) por fibras musculares

permeabilizadas é menor após quatro meses de estivação em relação a rãs *C. alboguttata* ativas (Reilly et al. 2014).

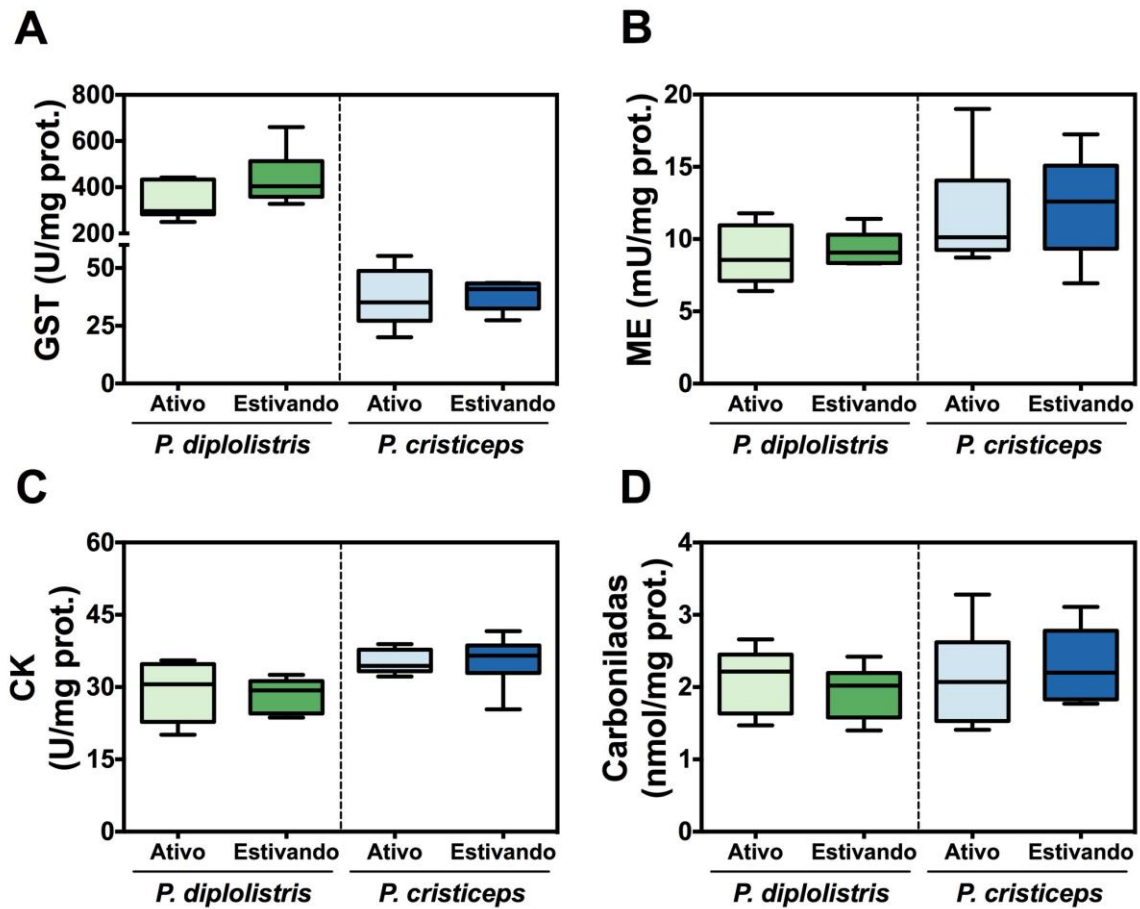


Figura 43. Níveis de glutationa transferase, enzima málica e danos oxidativos a proteínas no músculo de membros posteriores de *Pleurodema diplolistris* e *Proceratophrys cristiceps*. (A) Atividade de glutationa transferase (GST), (B) atividade de enzima málica (ME), (C) atividade de creatina quinase (CK), e (D) concentração de proteínas carboniladas. Note a quebra de escala no eixo y no gráfico A. $N=6$.

Outros parâmetros medidos no presente estudo não demonstraram mudanças em resposta à estivação de *P. diplolistris* e *P. cristiceps* (**Figura 43**). A atividade de glutationa transferase (GST) foi nove vezes maior em *P. diplolistris* do que em *P. cristiceps* ambos em atividade (**Figura 43A**). Em outros modelos vertebrados, *P. annectens* (Jasmine 2016) e *S. couchii* (Grundy e Storey 1998) a atividade de GST muscular não é afetada pela estivação. A atividade de enzima málica (ME), que catalisa uma das quatro reações responsáveis pelo provimento de NADPH para o sistema antioxidante, mostrou-se inalterada em ambas espécies da Caatinga durante a estivação (**Figura 43B**). A manutenção da atividade de ME também é observada no músculo de peixes pulmonados após dois meses de estivação (Frick et al. 2008b).

Já em *S. couchii* a atividade de ME aumenta após dois meses de estivação (Cowan et al. 2000). A atividade de creatina quinase (CK) não foi afetada pela estivação em ambas as espécies (**Figura 43C**). Neste estudo, não foi possível detectar a atividade de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), outra enzima fundamental para a produção de NADPH, no músculo das espécies da Caatinga. Tal limitação deve-se a baixa atividade constitutiva de G6PDH no músculo de anuros, que aumenta durante a estivação de *S. couchii* (Cowan et al. 2000).

O marcador de dano oxidativo a proteínas, proteínas carboniladas, teve sua concentração inalterada em *P. diplolistris* e *P. cristiceps* estivando quando comparados aos grupos ativos (**Figura 43D**). Da mesma forma, o conteúdo de proteínas carboniladas no músculo não muda durante a estivação de *P. annectens* (Jasmine 2016). O grau de danos a lipídeos também é mantido neste peixe pulmonado (Jasmine 2016). De maneira similar, as concentrações de proteínas carboniladas e de malondialdeído (marcador de peroxidação lipídica) são mantida no músculo gastrocnêmio de rãs *C. alboguttata* durante a estivação (Young, Cramp, e Franklin 2013). Tal manutenção não é observada no sapo *S. couchii*, cujos níveis de peroxidação lipídica aumentam durante a estivação em comparação com animais ativos (Grundy e Storey 1998). A atividade de glutathiona redutase não foi detectada em homogeneizados de músculo de *P. diplolistris* e *P. cristiceps*. De fato, a atividade desta enzima é bem baixa em músculo de anfíbios (Cowan et al. 2000).

A análise de componentes principais foi capaz de segregar os dados experimentais da seguinte forma: *P. diplolistris* ativos no quadrante superior direito, *P. displolistris* estivando no quadrante inferior direito, *P. cristiceps* ativos no quadrante superior esquerdo, e *P. cristiceps* estivando no quadrante inferior esquerdo (**Figura 44**). O primeiro componente principal foi efetivo na separação dos dados das espécies animais (independentemente do estado metabólico), cujas variáveis com maior coeficiente foram as atividades das enzimas citrato sintase, isocitrato desidrogenase e glutathiona transferase (**Tabela 6**). Já o segundo componente, foi capaz de separar os dados de animais ativos e de animais em estivação, independente da espécie (**Figura 44**). O segundo componente é majoritariamente uma combinação de razão GSSG/GSH-eq e das atividades de GPX e tGPX (**Tabela 6**).

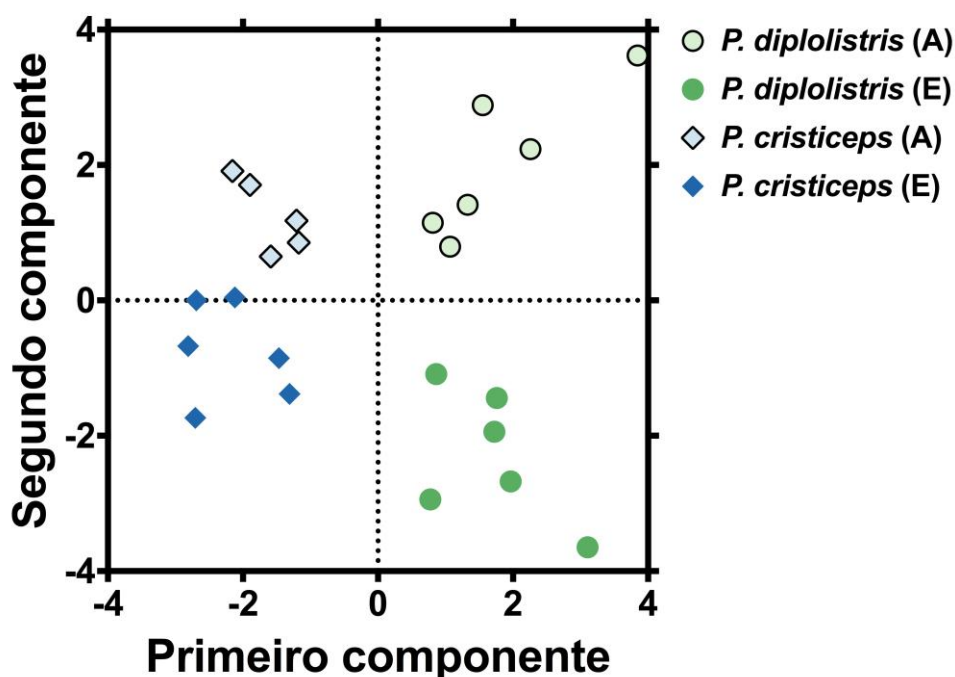


Figura 44. Análise de componentes principais utilizando 15 parâmetros bioquímicos aferidos em animais ativos (A) ou estivando (E). Cada símbolo corresponde a um indivíduo conforme legenda no canto superior direito. Note que o grupo de anuros *P. cristiceps* ativos apresenta apenas 5 indivíduos, uma vez que uma das variáveis analisadas (atividade de catalase) foi aferida em apenas 5 animais deste grupo. Os dois primeiros componentes principais foram eficazes na separação dos quatro grupos experimentais.

Tabela 6. Coeficientes de cada variável utilizada na análise de componentes principais para os cinco primeiros componentes.

Variável	Componente				
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Citrato sintase	0.364	0.263	-0.164	-0.04	-0.061
Enzima málica	-0.212	-0.063	-0.447	0.261	-0.248
Isocitrato desidrogenase	0.358	0.281	-0.136	-0.06	-0.014
Piruvato quinase	0.153	0.058	0.394	0.476	-0.008
Lactato desidrogenase	0.137	-0.064	-0.155	0.638	-0.15
Creatina quinase	-0.329	0.01	0.285	-0.282	0.026
Glutationa (reduzida)	-0.247	-0.237	-0.15	0.325	0.383
Glutationa transferase	0.447	-0.136	0.046	-0.008	0.078
Glutationa peroxidase (total)	0.247	-0.415	0.011	-0.089	0.162
Glutationa peroxidase (H ₂ O ₂)	0.215	-0.413	-0.031	-0.138	0.197
Superóxido dismutase (total)	0.094	-0.043	-0.61	-0.223	-0.15
Catalase	0.333	-0.307	0.104	-0.003	0.094
Proteínas carboniladas	-0.121	0.063	-0.292	-0.016	0.666
GSSG/GSH-eq	0.201	0.441	0.01	-0.06	0.152
Glutatione (dissulfeto)	0.035	0.358	0	0.164	0.443

4.4 Conclusão e Perspectivas

Em resumo, observam-se a supressão de vias metabólicas oxidativas, a manutenção da capacidade glicolítica e a ausência de ativação de vias anaeróbicas no tecido muscular de *P. diplolistris* e *P. cristiceps* durante a estivação na Caatinga. Estas alterações concordam com o estado de depressão metabólica e menor consumo de oxigênio característicos do fenômeno da estivação. Além disso, respostas semelhantes são observadas no peixe pulmonado *P. dolloi* e na rã *C. alboguttata*. Do ponto de vista redox, os anuros da Caatinga são capazes de entrar em um estado de depressão metabólica, quando o consumo de O₂ cai pela metade, e permanecer neste estado por meses, sem mostrar sinais de desequilíbrio redox e danos oxidativos. Apesar das diferenças fisiológicas e comportamentais, ambos *P. diplolistris* e *P. cristiceps* têm resposta similar do sistema antioxidante, cujas enzimas são induzidas durante a estivação.

A análise de enzimas metabólicas, enzimas antioxidantes, glutatona e marcadores de estresse oxidativo em outros tecidos dos anuros da Caatinga comporá um quadro mais completo dos ajustes redox da estivação. Além disso, a verificação do envolvimento de fatores de transcrição sensíveis a alterações redox pode contribuir neste sentido. Desta forma, será possível explorar com maior profundidade as semelhanças e diferenças entre as duas espécies da Caatinga, assim como em relação a outros vertebrados estivadores.

Os resultados da coleta 1 indicam que o fenômeno do “preparo para o estresse oxidativo” (POS) faz parte das adaptações bioquímicas envolvidas na estivação de dois anuros da Caatinga. Assim, duas novas espécies, *P. diplolistris* e *P. cristiceps*, entram na lista de animais POS-positivos, mantendo a prevalência de 100% dentro grupo de animais que estiveram (**capítulo 3**). O mecanismo proposto para a ativação do POS envolve um aumento de espécies reativas (**capítulo 2**). Em contraste, os dados disponíveis para músculo de anuros indicam uma redução da produção de H₂O₂ na estivação (Reilly et al. 2014). Tais medidas, entretanto, foram feitas meses após o início da estivação. É possível, que, semelhante ao que ocorre na hipóxia (**capítulo 1**), a sinalização via espécies reativas ocorra nos primeiros momentos da estivação. Em concordância, no início da estivação do peixe pulmonado *P. annectens* há um desequilíbrio redox no tecido muscular (Jasmine 2016). Contudo, alterações redox nas primeiras horas da estivação ainda precisam

ser investigadas. Independente do mecanismo de indução, os resultados aqui apresentados são a primeira evidência da ocorrência do fenômeno do POS em animais estivando livremente na natureza.

5 CAPÍTULO 5 – PREPARO PARA O ESTRESSE OXIDATIVO: DESAFIOS E PERSPECTIVAS

5.1 Resumo

A sobrevivência em condições de estresse ambiental, tais como hipóxia, anóxia, congelamento, desidratação e exposição aérea de organismos de respiração aquática e estivação, está frequentemente associada à indução de antioxidantes endógenos; fenômeno denominado de “Preparo para o Estresse Oxidativo” (POS). A ampla distribuição de espécies animais que apresentam o POS indica que a regulação do metabolismo redox é crucial nestas condições. Recentemente, foi publicada um modelo molecular de acionamento do POS. O modelo é fundamentado em dois processos: (i) maior produção de espécies reativas durante a privação de O_2 e (ii) ativação de fatores de transcrição e vias de sinalização, induzindo a expressão de antioxidantes endógenos. Neste trabalho, discutimos o estado da arte no contexto do POS e as direções futuras da pesquisa nesta área. Há três desafios científicos principais relacionados ao POS: identificar experimentalmente o mecanismos molecular de acionamento do POS; identificar a origem evolutiva do POS no reino animal; e determinar a ocorrência do POS em ambientes naturais. Primeiro, discutimos a ausência de evidências experimentais diretas da maior produção de espécies reativas durante a hipóxia. Em seguida, discutimos a posição do POS na evolução animal há 700 milhões de anos, ao identificar o POS em cnidários. Por fim, apresentamos os primeiros registros do POS diretamente na natureza. A investigação destes desafios contribuirá para o entendimento da evolução de adaptações do metabolismo redox em animais e como estas adaptações podem ser importantes para organismos expostos a ambientes em mudança no planeta.

5.2 Current Trends and Research Challenges Regarding ‘Preparation for Oxidative Stress’



Current Trends and Research Challenges Regarding “Preparation for Oxidative Stress”

Daniel C. Moreira^{1,2}, Marcus F. Oliveira³, Lara Liz-Guimarães¹, Nilda Diniz-Rojas⁴, Élda G. Campos¹ and Marcelo Hermes-Lima^{1*}

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, ² Área de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, ³ Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴ Departamento de Genética e Morfologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Narasaiah Kolliputi,
University of South Florida,
United States

Reviewed by:

Helaine Mary Alessio,
Miami University, United States
Michalis G. Nikolaidis,
Aristotle University of Thessaloniki,
Greece

*Correspondence:

Marcelo Hermes-Lima
hermes@unb.br;
hermes.unb@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Oxidant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 22 June 2017

Accepted: 31 August 2017

Published: 25 September 2017

Citation:

Moreira DC, Oliveira MF,
Liz-Guimarães L, Diniz-Rojas N,
Campos ÉG and Hermes-Lima M
(2017) Current Trends and Research
Challenges Regarding “Preparation for
Oxidative Stress”.
Front. Physiol. 8:702.
doi: 10.3389/fphys.2017.00702

Survival under stress, such as exposure to hypoxia, anoxia, freezing, dehydration, air exposure of water breathing organisms, and estivation, is commonly associated to enhanced endogenous antioxidants, a phenomenon coined “preparation for oxidative stress” (POS). The regulation of free radical metabolism seems to be crucial under these selective pressures, since this response is widespread among animals. A hypothesis of how POS works at the molecular level was recently proposed and relies on two main processes: increased reactive species production under hypoxia, and activation of redox-sensitive transcription factors and signaling pathways, increasing the expression of antioxidants. The present paper brings together the current knowledge on POS and considers its future directions. Data indicate the presence of POS in 83 animal species (71.6% among investigated species), distributed in eight animal phyla. Three main research challenges on POS are presented: (i) to identify the molecular mechanism(s) that mediate/induce POS, (ii) to identify the evolutionary origins of POS in animals, and (iii) to determine the presence of POS in natural environments. We firstly discuss the need of evidence for increased RS production in hypoxic conditions that underlie the POS response. Secondly, we discuss the phylogenetic origins of POS back 700 million years, by identifying POS-positive responses in cnidarians. Finally, we present the first reports of the POS adaptation strategy in the wild. The investigation of these research trends and challenges may prove useful to understand the evolution of animal redox adaptations and how they adapt to increasing stressful environments on Earth.

Keywords: antioxidant, biochemical adaptation, estivation, hypoxia, oxidative stress, reactive oxygen species

INTRODUCTION

Animals are naturally submitted to environmental stresses that act as selective pressures leading to fixation of many behavioral, physiological, and biochemical adaptations. One situation that many animals endure is the periodic reduction in oxygen availability, which can last from hours to days/weeks. This occurs in animals during several natural events, including exposure to hypoxic/anoxic environments, exposure to freezing, or severe dehydration (which resemble ischemia), air exposure of water breathing organisms and estivation. These conditions are termed as “low oxygen stress” (Hermes-Lima et al., 2015).

Several biochemical adaptations, including metabolic depression, use of anaerobic pathways, epigenetic modifications, and changes in redox metabolism are conserved among many animal species that tolerate low oxygen stress (Staples and Buck, 2009; Storey and Storey, 2012; Biggar and Storey, 2015; Storey, 2015). In the last 25 years, researchers have been studying the role of redox metabolism in the survival machinery of animals under low oxygen stress and estivation. It was observed that many animal species from eight phyla (including vertebrates and invertebrates) upregulate endogenous antioxidant levels during low oxygen stress (Moreira et al., 2016). Phenotypically, studies from many laboratories have shown increases in catalase, superoxide dismutases, and glutathione peroxidases activities, and also in the levels of reduced glutathione (GSH), under stress conditions. The biological phenomenon of antioxidant upregulation in response to low oxygen availability is referred to as “preparation for oxygen stress” (POS; Hermes-Lima et al., 1998, 2001; Hermes-Lima and Zenteno-Savín, 2002).

The first observation of such phenomenon was an 183% increase in catalase activity in muscle samples from garter snakes (*Thamnophis sirtalis*) upon 5 h freezing exposure (Hermes-Lima and Storey, 1993). Further investigations showed that many other animal species, from cnidarians to vertebrates, enhance their endogenous antioxidants when exposed to different low oxygen stress conditions (Welker et al., 2013; Moreira et al., 2016). The reports of animals expanded from just six species in the 1990s (Storey, 1996; Hermes-Lima et al., 1998) to 69 species exhibiting POS as a general response to low oxygen stresses (Moreira et al., 2016). The present article updates the list to 83 animal species (see section The Prevalence of POS in 8 Animal Phyla—A Brief Update). The widespread distribution of POS in the animal kingdom indicates that the regulation of free radical metabolism is crucial under such selective pressures posed by abiotic stresses.

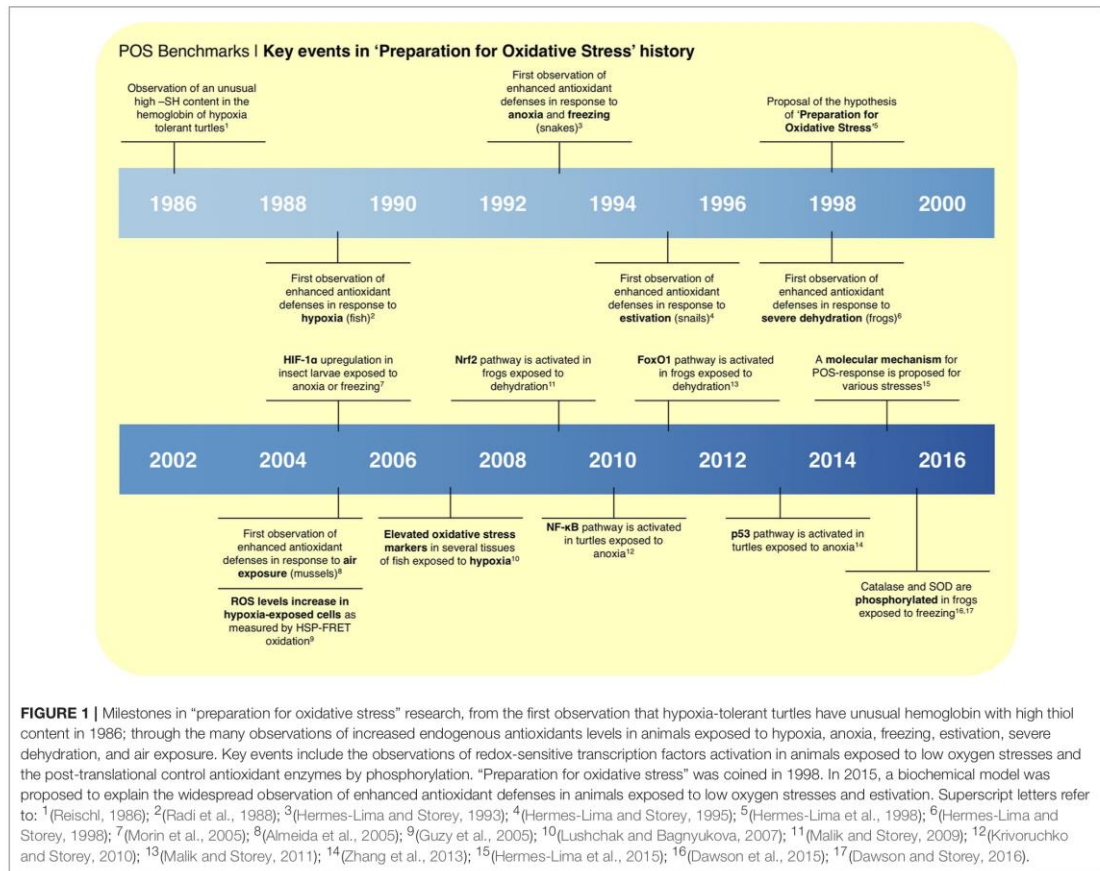
In the present article, we discuss the current trends and research challenges on redox adaptation in animals exposed to low oxygen stress. We report the state of the art as well as the key research challenges regarding the POS phenomena.

Reviewing the Biochemical Model for POS

At the time POS was coined, in 1990s, the term “preparation” referred to the build-up of antioxidant defenses in advance to the upcoming “oxidative stress” that would occur only when O₂ availability is resumed. Thus, animals would prepare themselves, in the absence of an apparent oxidative stimulus, avoiding the reoxygenation stress. For a long time, the identity of the molecular signal to trigger the boost in antioxidant defenses was unknown and speculated to be a “non-radical” signal (Hermes-Lima and Storey, 1993). This was mainly due to the premise that reactive (oxygen/nitrogen) species (RS) production would necessarily decrease under hypoxia. Because the only known condition to activate endogenous antioxidants was oxidative stress (and increased RS formation), the POS phenomenon remained without a biochemical mechanism of activation.

This changed in the comparative biology field around 2005–2007, when a growing number of studies considered that RS formation could actually increase during low oxygen availability (Bickler and Buck, 2007; Lushchak and Bagnyukova, 2007). Despite of the evidence (e.g., Chandel et al., 1998; Guzy et al., 2005), researchers remained resistant to accept the idea of elevated RS production during hypoxia (Clanton, 2005). Currently, it is well-known that oxygen deprivation itself, and not only the reoxygenation event, poses an oxidative insult to cells (Waypa et al., 2016). Based on data from comparative biology, as well as from medical science, a biochemical model involving redox signaling was recently proposed to explain the boost in antioxidant defenses during low oxygen stress in hypoxia-tolerant species (Hermes-Lima et al., 2015). Regardless of the current understanding that hypoxia may also be a condition of oxidative stress, besides reoxygenation, the term “preparation” is still used because it became widely used in the literature, especially in hypoxia tolerance research.

Several events mark the transitions from the early observations of enhanced endogenous antioxidants (Figure 1), to the current molecular model in the comparative biology field (Figure 2A). This model is the result of the compilation of different observations from the literature: (i) RS formation may increase in biological systems exposed to oxygen deprivation; (ii) several hypoxia-tolerant animals show signs of oxidative stress during hypoxia; (iii) the expression of antioxidant defenses is controlled by redox-sensitive transcription factors, such as Nrf2, NF-κB, and FOXOs; and (iv) the observations that these same transcription factors are activated in hypoxia-tolerant animals exposed to low oxygen stress (Hermes-Lima et al., 2015). In this context, RS (and oxidative damage by-products) would act as signaling molecules that activate redox-sensitive transcriptional factors, and then antioxidant enzymes (Welker et al., 2013; Hermes-Lima et al., 2015; Figure 2A). Such transcription factors are well-known to respond to oxidative challenges in many biological systems (Sena and Chandel, 2012; Scotcher et al., 2013; Espinosa-Diez et al., 2015; Klotz et al., 2015). Another consequence of oxidative challenges is the activation of protein kinases that targets catalase, GPX and SOD (Cao et al., 2003a,b) and decreased phosphatase activity (Machado et al., 2017). Recently, it was shown that phosphorylation activates MnSOD (Dawson et al., 2015) and catalase (Dawson and Storey, 2016) in wood frogs (*Rana sylvatica*) exposed to freezing. Thus, the same cellular pathways involved in the oxidative stress response in conventional models (e.g., mice and mammalian cells) would operate in animals that are naturally tolerant to severe O₂ deprivation. The redox imbalance during hypoxia would act as a hormetic signal, boosting antioxidant defenses, which would mitigate the expected RS burst during reoxygenation. Such effect resembles that of mammalian cardiac pre-conditioning (Zhou et al., 1996) or mild oxidative challenges in working muscle, in which exposure to mild oxidative stress improves cellular function and preservation mechanisms (Nikolaidis et al., 2012).



FIRST CHALLENGE—ARE RS LEVELS INCREASED IN HYPOXIA AND THE TRIGGERS FOR POS?

Increased RS production under hypoxia has been measured in tissues and cells from hypoxia sensitive model organisms (e.g., probes or oxidation products; reviewed in Hermes-Lima et al. (2015) and Waypa et al. (2016). For instance, RS production in response to acute hypoxia increases in endothelial cells (Hernansanz-Agustín et al., 2014). Moreover, the kinetics of such RS overproduction is in the scale of minutes and depends on the degree of hypoxia (Hernansanz-Agustín et al., 2014). When the experiment was performed using endothelial cells without a functional mitochondria there was no rise in RS formation, indicating that such burst in RS emanates from mitochondria (Hernansanz-Agustín et al., 2014). This kind of evidence, however, is lacking for hypoxia tolerant animals that exhibit the POS-response (i.e., antioxidant upregulation) to low oxygen stress. Thus, the first scientific challenge in POS research

is the verification of the hypothesis that mitochondrial RS formation increases in animal species that enhance endogenous antioxidants during hypoxic challenges.

While mitochondrial superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), and H_2O_2 , are candidate initiators in our model (Hermes-Lima et al., 2015), other reactive species, as well as other cellular sources of RS, may also play a role. Nitric oxide, for example, may reversibly inhibit components of the mitochondrial respiratory chain and alter the rate of RS formation (Cleeter et al., 1994). Also, mitochondrial RS production is highly regulated by different factors, including the electron flux, the magnitude of the protonmotive force, the oxygen and substrate availability, and the NADH/NAD⁺ ratio in the matrix (Boveris and Chance, 1973; Korshunov et al., 1997; Nishikawa et al., 2000; Miwa et al., 2003; Yu et al., 2006; Aon et al., 2010; Ronchi et al., 2013).

In contrast to the numerous reports of enhanced endogenous antioxidants in response to low oxygen stress, there is no direct evidence that the proposed increase in mitochondrial RS formation actually occurs in species that present POS as a

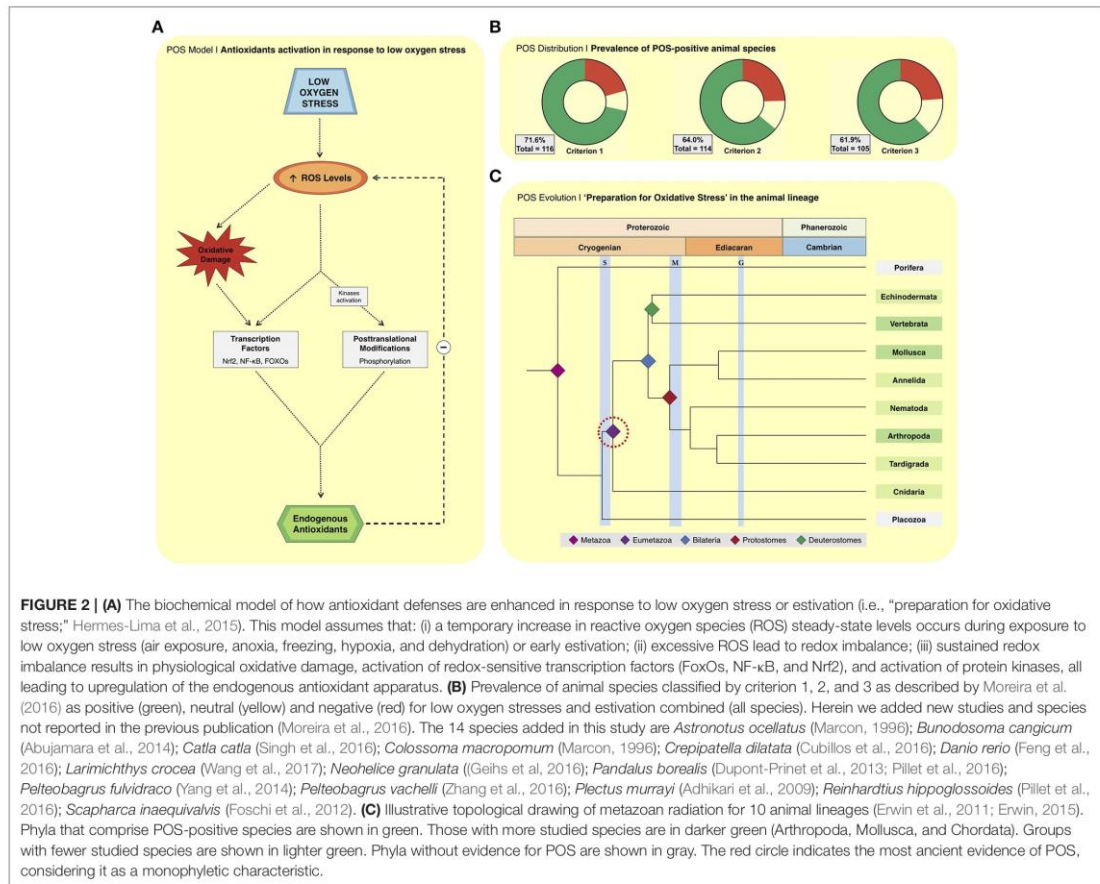


FIGURE 2 | (A) The biochemical model of how antioxidant defenses are enhanced in response to low oxygen stress or estivation (i.e., "preparation for oxidative stress;" Hermes-Lima et al., 2015). This model assumes that: (i) a temporary increase in reactive oxygen species (ROS) steady-state levels occurs during exposure to low oxygen stress (air exposure, anoxia, freezing, hypoxia, and dehydration) or early estivation; (ii) excessive ROS lead to redox imbalance; (iii) sustained redox imbalance results in physiological oxidative damage, activation of redox-sensitive transcription factors (FoxOs, NF-κB, and Nrf2), and activation of protein kinases, all leading to upregulation of the endogenous antioxidant apparatus. **(B)** Prevalence of animal species classified by criterion 1, 2, and 3 as described by Moreira et al. (2016) as positive (green), neutral (yellow) and negative (red) for low oxygen stresses and estivation combined (all species). Herein we added new studies and species not reported in the previous publication (Moreira et al., 2016). The 14 species added in this study are *Astronotus ocellatus* (Marcon, 1996); *Bunodosoma cangicum* (Abujamara et al., 2014); *Catla catla* (Singh et al., 2016); *Colossoma macropomum* (Marcon, 1996); *Crepidatella dilatata* (Cubillos et al., 2016); *Danio rerio* (Feng et al., 2016); *Larimichthys crocea* (Wang et al., 2017); *Neohelice granulata* (Geihs et al., 2016); *Pandalus borealis* (Dupont-Prinet et al., 2013; Pillet et al., 2016); *Pelteobagrus fulvidraco* (Yang et al., 2014); *Pelteobagrus vachelli* (Zhang et al., 2016); *Plectus murrayi* (Adhikari et al., 2009); *Reinhardtius hippoglossoides* (Pillet et al., 2016); *Scapharca inaequivalvis* (Foschi et al., 2012). **(C)** Illustrative topological drawing of metazoan radiation for 10 animal lineages (Erwin et al., 2011; Erwin, 2015). Phyla that comprise POS-positive species are shown in green. Those with more studied species are in darker green (Arthropoda, Mollusca, and Chordata). Groups with fewer studied species are shown in lighter green. Phyla without evidence for POS are shown in gray. The red circle indicates the most ancient evidence of POS, considering it as a monophyletic characteristic.

response. However, scattered evidence indicates the occurrence of redox imbalance and oxidative stress during hypoxia, as several oxidative stress markers are elevated during low oxygen stress (Hermes-Lima et al., 2015). To our knowledge, there are three studies that quantified RS production in oxygen deprived non-conventional models. These studies, however, do not indicate any increase in RS production under hypoxia exposure for those specific time-points. In one study, cerebral RS formation, determined as salicylate hydroxylation in cerebrospinal fluid, presented a trend for decrease in the first hour and significantly decreased to nearly zero within 4 h of anoxia exposure in *Trachemys scripta* turtles (Milton et al., 2007). In another study, RS formation was evaluated in the marine platyhelminth *Macrostomum lignano* exposed to near-anoxia for 1.5 h. Superoxide levels, determined as DHE staining, were unaffected by anoxia exposure (Rivera-Ingraham et al., 2013a). However, oxidant generation (assessed by C-H₂DFFDA staining) in anoxia-exposed worms decreased by 78% when compared to normoxic animals (Rivera-Ingraham et al., 2013a). The same

probes (DHE and C-H₂DFFDA) were used to measure RS levels in the gills of blue mussels under near-anoxia for 48 and 72 h. The results from both probes indicated a reduction in RS formation (Rivera-Ingraham et al., 2013b). Together, these studies indicate either a reduction or maintenance of oxidant levels *in vivo* in anoxia/hypoxia challenged animals. Thus, the proposed increase in RS generation was not observed in POS-responsive species yet.

SECOND CHALLENGE—OCCURRENCE AND EVOLUTION OF POS IN THE ANIMAL KINGDOM

Recently, we mapped the prevalence of POS in various animal species that had their antioxidant response assessed under low oxygen stress or estivation (Moreira et al., 2016). To do so, we developed three criteria to classify species as positive, neutral or negative. First criterion: species are classified as positive if there is at least one upregulation event of antioxidant defense,

regardless of other alterations. Second criterion: species are classified as positive if there is at least one upregulation above a 50% threshold; or as negative if there is no upregulation event, but downregulation events above a 25% threshold. Third criterion: species are classified as positive only if there are more events of upregulation (above 50%) in comparison to downregulation (above 25%) within a tissue, if the number of up and downregulation matches, the species is classified as neutral. Applying the first criterion, in a list of 102 species from eight animal phyla, there were observations of increased levels of antioxidant enzymes in 68% of these species (69 out of 102) under low oxygen stress or estivation (Moreira et al., 2016). This first glance at the responses to low oxygen stress and estivation of a great number of animal species—vertebrates and invertebrates—evidenced the recurrent nature of POS phenomena. Such high prevalence of animals that spend resources on endogenous antioxidants in such energy-limited situations indicates a key adaptive role of POS. Below, we update this list to 83 species that fit the POS criteria.

The Prevalence of POS in 8 Animal Phyla—A Brief Update

Because new studies have been published and a few other works were missed, the percentages of POS-positive species changed in comparison to our last analysis (Moreira et al., 2016). The current list presents 116 animal species, 83 classified as POS-positive in criteria 1 (72%; **Figure 2B**). We are, however, more focused on those species considered for the most restrictive criteria 3 ($n = 105$, 62% POS-positive). The prevalence of POS-positive species tended to increase in comparison to the previous values (Moreira et al., 2016). For instance, all studied species under estivation or severe dehydration are classified as POS-positive according to criterion 3. In the case of freezing, anoxia, and air exposure, the prevalence of POS-positive species is 83, 67, and 60%, respectively. The prevalence of POS-positive species is lowest in animals exposed to hypoxia (47%), which is the stress with most species studied ($n = 70$) and also with highly variable protocols. Thus, the prevalence of POS-positive species varies depending on the stress to which animals are exposed.

From a phylogenetic point of view, it is noteworthy that from the 65 animal species currently classified as POS-positive (in criterion 3), 57 of them were from only three phyla: Mollusca, Arthropoda, and Chordata. Mollusks had 25 species analyzed and 14 of them (56%) are considered POS-positive. POS-positive arthropods were 58%. In the case of Chordata, 64% of the analyzed species are POS-positive. Moreover, the presence of the POS mechanism in cnidarians is of special relevance in terms of evolution because the phylogenetic line of these animals started to evolve hundreds of millions of years ago (Erwin, 2015). Noteworthy, the expression of several key components of the hypoxia tolerance machinery and POS-response are present in cnidarians. Indeed, HIF-1 and other redox-sensitive transcription factors crucial for the POS-response—FoxO, Nrf2, and NF- κ B—have been found in several cnidarians (Sullivan et al., 2007; Meyer et al., 2009; Baumgarten et al., 2015; Malafoglia et al., 2016). Since most molecular mediators for POS seems to be

working in cnidarians, it is possible that this process is controlled in hypoxia-tolerant species of this Phylum by a mechanism very similar to that we proposed to major bilaterian groups.

Animal Evolution and POS

To place the origin of the “POS phenotype” in animal evolution is the second challenge in POS research. The POS-response was observed in cnidarians, which is an ancient animal group. Teixeira et al. (2013) reported the activation of antioxidant defenses in the octocoral *Veretillum cynomorium* as a consequence of aerial exposure. In another study, Abujamara et al. (2014) reported a significant increase in SOD activity upon exposure of anemones *Bunodosoma cangicum* to hypoxia. Since POS is present in many bilaterian groups and in cnidarians, it is reasonable that it was already present in the last common ancestor of both groups. It is estimated that the divergence of Cnidaria and Bilateria happened about 700 million years ago (Ma), before the Marinoan glaciation (**Figure 2C**; Erwin et al., 2011; Shu et al., 2014; Erwin, 2015). Moreover, even though there are unequivocal fossil records of cnidarians dated from the Fortunian epoch of the Cambrian, there is much uncertainty whether other fossils from the late Ediacaran could be identified as cnidarian (Shu et al., 2014). In any case, many more studies are needed on low oxygen stress and POS-response in cnidarians since there is only two POS-positive species in this Phylum. It would also be valuable to assess alterations of the redox metabolism in hypoxia-tolerant species from basal phyla, such as Porifera.

THIRD CHALLENGE—ASSESSMENT OF POS IN THE WILDERNESS

The third scientific challenge for POS research is to verify whether the POS-phenotype is present in animals in their natural environment in contrast to animals studied in the laboratory. Most published studies were conducted in the laboratory under artificially controlled conditions, being in some cases not ecologically relevant. Our preliminary results show that when the frogs *Pleurodema diplolistris* and *Proceratophrys cristiceps* naturally estivate under dry riverbeds of a semi-arid region in Northeast Brazil there is a 50–75% increase in muscular catalase activity—in comparison with active animals in the same site, but in rainy season (Moreira et al., 2017). In another example of POS under natural settings, mussels *Brachidontes solisianus* increased their whole-body GSH levels in response to air exposure for 4 h compared to animals underwater in Southern Brazil (Sabino et al., 2015). These examples indicate that POS may occur in the wild. However, studies with other animal species are needed to show more evidence that the POS-phenotype is not restricted to laboratory conditions, and that it indeed happens in nature.

FINAL STATEMENTS

As stated in *On the Origin of Species*: “Climate plays an important part in determining the average numbers of a species, and periodical seasons of extreme cold or drought, I believe to

be the most effective of all checks" (Darwin, 1859). That is, the environment and its changing conditions have a critical role in shaping life forms, acting as major selective pressures. As discussed herein, the regulation of redox metabolism seems to be crucial for adaptation. Preparation for oxidative stress is a phenomenon that happens in 62–72% of animal species tolerant to low oxygen stress or estivation that were analyzed for the antioxidant regulation. This prevalence is also dependent on the animal taxon and the kind of stress-response. Future studies will likely change the prevalence of POS in the animal kingdom—so far, 116 species were analyzed.

It has been a long way from the initial proposals of this redox adaptation strategy (Reischl, 1986; Hermes-Lima et al., 1998) to the current molecular model (Welker et al., 2013; Hermes-Lima et al., 2015). The current investigative path is, first, to identify the molecular trigger of POS, possibly increased superoxide/H₂O₂ formation. The redox imbalance caused by such increase during low oxygen stress may activate a protective response against a forthcoming challenge in reoxygenation—fitting into the hormesis concept (Costantini, 2014). Second, it is crucial to place POS in the history of life. We suggest that POS could have been present at least ~700 Ma, in the last common ancestor of cnidarians and bilaterians (Figure 2C), a period where oxygen was 1–3% of the present levels (Erwin, 2015). Finally, it is a priority to determine whether POS happens in the wild. Preliminary determinations in estivating frogs and air-exposed mussels suggest the answer is “yes,” however, more species must be studied.

There are other issues related to POS that deserve investigation. For example, the occurrence of hypoxia in freshwater and coastal environments is an expanding threat to aquatic life (Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008). Deeper knowledge about how POS works and evolved may prove useful

to understand how ecosystems will respond to this growing global problem. Would it induce selective pressure favoring POS-positive organisms? This represents a look onto how POS would affect animals in the future.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DM, MO, ÉC, and MH contributed to the eco-physiological and molecular concepts of the work. ND, LL, and MH contributed with the evolutionary ideas. All authors reviewed the bibliography and discussed the overall data/concepts. DM and MH drafted the manuscript, which was reviewed and approved by all authors.

FUNDING

This work was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF, Brazil, grant 193.000.947/2015), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, grant 478648/2013-8) and the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil, grant E-26/102.333/2013). We also acknowledge financial support from DPP/Universidade de Brasília and Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC, grant 145/2017).

ACKNOWLEDGMENTS

This article is in honor of late Peter Hochachka on the occasion of his 80th birthday. He shaped the way we look on how the constantly changing environment influence animal physiology. Thank you Peter!

REFERENCES

- Abumamara, L. D., de Freitas Prazeres, M., Borges, V. D., and Bianchini, A. (2014). Influence of copper pre-exposure on biochemical responses of the sea anemone *Bunodosoma cangicum* to changes in oxygen availability. *Comp. Biochem. Physiol. C* 162, 34–42. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.03.003
- Adhikari, B. N., Wall, D. H., and Adams, B. J. (2009). Desiccation survival in an Antarctic nematode: molecular analysis using expressed sequenced tags. *BMC Genomics* 10:69. doi: 10.1186/1471-2164-10-69
- Almeida, E. A., Bains, A. C. D., Dafré, A. L., Gomes, O. F., Medeiros, M. H. G., and Di Mascio, P. (2005). Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 318, 21–30. doi: 10.1016/j.jembe.2004.12.007
- Aon, M. A., Cortassa, S., and O'Rourke, B. (2010). Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 865–877. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.016
- Baumgarten, S., Simakov, O., Esherrick, L. Y., Liew, Y. J., Lehnert, E. M., Michell, C. T., et al. (2015). The genome of *Aiptasia*, a sea anemone model for coral symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 11893–11898. doi: 10.1073/pnas.1513318112
- Bickler, P. E., and Buck, L. T. (2007). Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 145–170. doi: 10.1146/annurev.physiol.69.031905.162529
- Biggar, K. K., and Storey, K. B. (2015). Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. *J. Exp. Biol.* 218, 1281–1289. doi: 10.1242/jeb.104828
- Boveris, A., and Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707–716. doi: 10.1042/bj1340707
- Cao, C., Leng, Y., Huang, W., Liu, X., and Kufe, D. (2003a). Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 39609–39614. doi: 10.1074/jbc.M305770200
- Cao, C., Leng, Y., Liu, X., Yi, Y., Li, P., and Kufe, D. (2003b). Catalase is regulated by ubiquitination and proteasomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *Biochemistry* 42, 10348–10353. doi: 10.1021/bi035023f
- Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C., and Schumacker, P. T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11715–11720.
- Clanton, T. (2005). Yet another oxygen paradox. *J. Appl. Physiol.* 99, 1245–1246. doi: 10.1152/jappphysiol.00609.2005
- Cleeter, M. W., Cooper, J. M., Darley-Usmar, V. M., Moncada, S., and Schapira, A. H. (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345, 50–54. doi: 10.1016/0014-5793(94)00424-2
- Costantini, D. (2014). *Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology*. Berlin; Heidelberg: Springer.
- Cubillos, V., Chaparro, O., Segura, C., Montory, J., Cruces, E., and Burritt, D. (2016). Isolation-hypoxia and re-oxygenation of the pallial cavity of female

- Crepipatella dilatata* during estuarine salinity changes requires increased glyoxylase activity and antioxidant metabolism to avoid oxidative damage to female tissues and developing embryos. *Mar. Environ. Res.* 119, 59–71. doi: 10.1016/j.marenvres.2016.05.008
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or, the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*, 1st Edn. London: John Murray.
- Dawson, N. J., Katzenback, B. A., and Storey, K. B. (2015). Free-radical first responders: the characterization of CuZnSOD and MnSOD regulation during freezing of the freeze-tolerant North American wood frog, *Rana sylvatica*. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 97–106. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.10.003
- Dawson, N. J., and Storey, K. B. (2016). A hydrogen peroxide safety valve: the reversible phosphorylation of catalase from the freeze-tolerant North American wood frog, *Rana sylvatica*. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subjects* 1860, 476–485. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.12.007
- Dupont-Prinet, A., Pillet, M., Chabot, D., Hansen, T., Tremblay, R., and Audet, C. (2013). Northern shrimp (*Pandalus borealis*) oxygen consumption and metabolic enzyme activities are severely constrained by hypoxia in the estuary and Gulf of St. Lawrence. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 448, 298–307. doi: 10.1016/j.jembe.2013.07.019
- Erwin, D. H. (2015). Early metazoan life: divergence, environment and ecology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 370:20150036. doi: 10.1098/rstb.2015.0036
- Erwin, D. H., Laflamme, M., Tweedt, S. M., Sperling, E. A., Pisani, D., and Peterson, K. J. (2011). The cambrian conundrum: early divergence and later ecological success in the early history of animals. *Science* 334, 1091–1097. doi: 10.1126/science.1206375
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., et al. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 6, 183–197. doi: 10.1016/j.redox.2015.07.008
- Feng, J., Guo, Y., Gao, Y., and Zhu, L. (2016). Effects of hypoxia on the physiology of zebrafish (*Danio rerio*): initial responses, acclimation and recovery. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 96, 43–48. doi: 10.1007/s00128-015-1668-4
- Foschi, J., Mancini, G., Fabbri, M., Rosmini, R., Serrazanetti, G. P., and Monari, M. (2012). Antioxidant defences role during post anoxic recovery in bivalve mollusc *Scapharca inaequivalvis*. *J. Biol. Res. Bull. Soc. It. Biol. Sper.* 84, 25–29. doi: 10.4081/jbr.2011.4483
- Geiths, M. A., Vargas, M. A., Maciel, F. E., Vakkuri, O., Meyer-Rochow, V. B., Allodi, S., et al. (2016). Effects of hypoxia and reoxygenation on the antioxidant defense system of the locomotor muscle of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). *J. Comp. Physiol. B* 186, 569–579. doi: 10.1007/s00360-016-0976-2
- Guzy, R. D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K. D., et al. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 1, 401–408. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.001
- Hermes-Lima, M., Moreira, D. C., Rivera-Ingraham, G. A., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos, T. C., and Campos, E. G. (2015). Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 1122–1143. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156
- Hermes-Lima, M., Storey, J. M., and Storey, K. B. (1998). Antioxidant defenses and metabolic depression: the hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol. B* 120, 437–448. doi: 10.1016/S0305-0491(98)10053-6
- Hermes-Lima, M., Storey, J. M., and Storey, K. B. (2001). "Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress," in *Protein Adaptations and Signal Transduction*, eds K. B. Storey and J. M. Storey (Amsterdam: Elsevier), 263–287.
- Hermes-Lima, M., and Storey, K. B. (1993). Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Physiol.* 265, R646–R652.
- Hermes-Lima, M., and Storey, K. B. (1995). Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.* 268, R1386–R1393.
- Hermes-Lima, M., and Storey, K. B. (1998). Role of antioxidant defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans: the case of the leopard frog *Rana pipiens*. *Mol. Cell. Biochem.* 189, 79–89. doi: 10.1023/A:1006868208476
- Hermes-Lima, M., and Zenteno-Savin, T. (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133, 537–556. doi: 10.1016/S1532-0456(02)00080-7
- Hernansanz-Agustín, P., Izquierdo-Álvarez, A., Sánchez-Gómez, F. J., Ramos, E., Villa-Piña, T., Lamas, S., et al. (2014). Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free Radic. Biol. Med.* 71, 146–156. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.011
- Klotz, L.-O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., and Monsalve, M. (2015). Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* 6, 51–72. doi: 10.1016/j.redox.2015.06.019
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15–18. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01159-9
- Krivoruchko, A., and Storey, K. B. (2010). Molecular mechanisms of turtle anoxia tolerance: a role for NF- κ B. *Gene* 450, 63–69. doi: 10.1016/j.gene.2009.10.005
- Lushchak, V. I., and Bagnyukova, T. V. (2007). Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 148, 390–397. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.07.007
- Machado, L. E. S. F., Shen, T.-L., Page, R., and Peti, W. (2017). The KIM-family protein-tyrosine phosphatases use distinct reversible oxidation intermediates: intramolecular or intermolecular disulfide bond formation. *J. Biol. Chem.* 292, 8786–8796. doi: 10.1074/jbc.M116.774174
- Malafoglia, V., Traversetti, L., Del Grosso, F., Scalici, M., Lauro, F., Russo, V., et al. (2016). Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) mediates nociceptive-like responses in *Hydra vulgaris*. *PLoS ONE* 11:e0151386. doi: 10.1371/journal.pone.0151386
- Malik, A. I., and Storey, K. B. (2009). Activation of antioxidant defense during dehydration stress in the African clawed frog. *Gene* 442, 99–107. doi: 10.1016/j.gene.2009.04.007
- Malik, A. I., and Storey, K. B. (2011). Transcriptional regulation of antioxidant enzymes by FoxO1 under dehydration stress. *Gene* 485, 114–119. doi: 10.1016/j.gene.2011.06.014
- Marcon, J. L. (1996). *Estresse oxidativo em duas espécies de teleosteos amazônicos, Astronotus ocellatus e Colossoma macropomum, expostos a diferentes tensões de oxigênio: uma abordagem comparativa*. Doctoral thesis, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil.
- Meyer, E., Aglyamova, G. V., Wang, S., Buchanan-Carter, J., Abrego, D., Colbourne, J. K., et al. (2009). Sequencing and *de novo* analysis of a coral larval transcriptome using 454 GSFLX. *BMC Genomics* 10:219. doi: 10.1186/1471-2164-10-219
- Milton, S. L., Nayak, G., Kesaraaju, S., Kara, L., and Prentice, H. M. (2007). Suppression of reactive oxygen species production enhances neuronal survival *in vitro* and *in vivo* in the anoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta*. *J. Neurochem.* 101, 993–1001. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04466.x
- Miwa, S., St-Pierre, J., Partridge, L., and Brand, M. D. (2003). Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 938–948. doi: 10.1016/S0891-5849(03)00464-7
- Moreira, D. C., Borges, A. L. V., Carvalho, J. E., Navas, C. A., and Hermes-Lima, M. (2017). "Modulation of antioxidants and central metabolism during month-long estivation of a frog in a semi-arid environment (Abstract)," in *38th World Congress of the International Union of Physiological Sciences* (Rio de Janeiro).
- Moreira, D. C., Venancio, L. P. R., Sabino, M. A. C. T., and Hermes-Lima, M. (2016). How widespread is preparation for oxidative stress in the animal kingdom? *Comp. Biochem. Physiol. A* 200, 64–78. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.01.023
- Morin, P., McMullen, D. C., and Storey, K. B. (2005). HIF-1 α involvement in low temperature and anoxia survival by a freeze tolerant insect. *Mol. Cell. Biochem.* 280, 99–106. doi: 10.1007/s11010-005-8236-x
- Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., Spanou, C., Paschalis, V., Theodorou, A. A., and Vrabas, I. S. (2012). Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues. *J. Exp. Biol.* 215, 1615–1625. doi: 10.1242/jeb.067470
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., et al. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787–790. doi: 10.1038/35008121
- Pillet, M., Dupont-Prinet, A., Chabot, D., Tremblay, R., and Audet, C. (2016). Effects of exposure to hypoxia on metabolic pathways in northern shrimp (*Pandalus borealis*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 483, 88–96. doi: 10.1016/j.jembe.2016.07.002

- Radi, A. A. R., Matkovic, B., and Csengeri, I. (1988). Effects of various oxygen concentrations on antioxidant enzymes and the quantity of tissue phospholipid fatty acids in the carp. *Acta Biol. Hung.* 39, 109–119.
- Reischl, E. (1986). High sulfhydryl content in turtle erythrocytes: is there a relation with resistance to hypoxia? *Comp. Biochem. Physiol. B* 85, 723–726. doi: 10.1016/0305-0491(86)90167-7
- Rivera-Ingraham, G. A., Bickmeyer, U., and Abele, D. (2013a). The physiological response of the marine plathyhelminth *Macrostomum lignano* to different environmental oxygen concentrations. *J. Exp. Biol.* 216, 2741–2751. doi: 10.1242/jeb.081984
- Rivera-Ingraham, G. A., Rocchetta, I., Meyer, S., and Abele, D. (2013b). Oxygen radical formation in anoxic transgression and anoxia-reoxygenation: foe or phantom? Experiments with a hypoxia tolerant bivalve. *Mar. Environ. Res.* 92, 110–119. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.09.007
- Ronchi, J. A., Figueira, T. R., Ravagnani, F. G., Oliveira, H. C. F., Vercesi, A. E., and Castilho, R. F. (2013). A spontaneous mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene of C57BL/6j mice results in mitochondrial redox abnormalities. *Free Radic. Biol. Med.* 63, 446–456. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.049
- Sabino, M. A. C. T., Moreira, D. C., Rios, L. P., Freire, C. A., and Hermes-Lima, M. (2015). "Glutathione metabolism in the mussel *Brachidontes solisianus* (Mytilidae) during a natural tidal cycle in Southern Brazil," in *Second International Conference on Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* (La Paz).
- Scotcher, J., Clarke, D. J., Mackay, C. L., Hupp, T., Sadler, P. J., and Langridge-Smith, P. R. R. (2013). Redox regulation of tumour suppressor protein p53: identification of the sites of hydrogen peroxide oxidation and glutathionylation. *Chem. Sci.* 4, 1257–1269. doi: 10.1039/c2sc21702c
- Sena, L. A., and Chandel, N. S. (2012). Physiological Roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell* 48, 158–167. doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.025
- Shu, D., Isozaki, Y., Zhang, X., Han, J., and Maruyama, S. (2014). Birth and early evolution of metazoans. *Gondwana Res.* 25, 884–895. doi: 10.1016/j.gr.2013.09.001
- Singh, S. P., Sharma, J., Ahmad, T., and Chakrabarti, R. (2016). Oxygen stress: impact on innate immune system, antioxidant defence system and expression of HIF-1 α and ATPase 6 genes in *Catla catla*. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 673–688. doi: 10.1007/s10695-015-0168-0
- Staples, J. F., and Buck, L. T. (2009). Matching cellular metabolic supply and demand in energy-stressed animals. *Comp. Biochem. Physiol. A* 153, 95–105. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.02.010
- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715–1733.
- Storey, K. B. (2015). Regulation of hypometabolism: insights into epigenetic controls. *J. Exp. Biol.* 218, 150–159. doi: 10.1242/jeb.106369
- Storey, K. B., and Storey, J. M. (2012). Aestivation: signaling and hypometabolism. *J. Exp. Biol.* 215, 1425–1433. doi: 10.1242/jeb.054403
- Sullivan, J. C., Kalaitzidis, D., Gilmore, T. D., and Finnerty, J. R. (2007). Rel homology domain-containing transcription factors in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev. Genes Evol.* 217, 63–72. doi: 10.1007/s00427-006-0111-6
- Teixeira, T., Diniz, M., Calado, R., and Rosa, R. (2013). Coral physiological adaptations to air exposure: heat shock and oxidative stress responses in *Veretillum cymnorum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 439, 35–41. doi: 10.1016/j.jembe.2012.10.010
- Vaquero-Sunyer, R., and Duarte, C. M. (2008). Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15452–15457. doi: 10.1073/pnas.0803833105
- Wang, Q.-F., Shen, W.-L., Hou, C.-C., Liu, C., Wu, X.-F., and Zhu, J.-Q. (2017). Physiological responses and changes in gene expression in the large yellow croaker *Larimichthys crocea* following exposure to hypoxia. *Chemosphere* 169, 418–427. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.099
- Waypa, G. B., Smith, K. A., and Schumacker, P. T. (2016). O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: the fog is lifting. *Mol. Aspects Med.* 47–48, 76–89. doi: 10.1016/j.mam.2016.01.002
- Welker, A. F., Moreira, D. C., Campos, É. G., and Hermes-Lima, M. (2013). Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comp. Biochem. Physiol. A* 165, 384–404. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.04.003
- Yang, K., Fan, Q., Zhang, L., Li, B., Gao, Y., Zeng, K., et al. (2014). Effect of dissolved oxygen levels on growth performance, energy budget and antioxidant responses of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson). *Aquacult. Res.* 46, 2025–2033. doi: 10.1111/are.12359
- Yu, T., Robotham, J. L., and Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2653–2658. doi: 10.1073/pnas.0511154103
- Zhang, G., Mao, J., Liang, F., Chen, J., Zhao, C., Yin, S., et al. (2016). Modulated expression and enzymatic activities of *Darkbarbel catfish, Pelteobagrus vachelli* for oxidative stress induced by acute hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere* 151, 271–279. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.072
- Zhang, J., Biggar, K. K., and Storey, K. B. (2013). Regulation of p53 by reversible post-transcriptional and post-translational mechanisms in liver and skeletal muscle of an anoxia tolerant turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Gene* 513, 147–155. doi: 10.1016/j.gene.2012.10.049
- Zhou, X., Zhai, X., and Ashraf, M. (1996). Direct evidence that initial oxidative stress triggered by preconditioning contributes to second window of protection by endogenous antioxidant enzyme in myocytes. *Circulation* 93, 1177–1184. doi: 10.1161/01.CIR.93.6.1177

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Moreira, Oliveira, Liz-Guimarães, Diniz-Rojas, Campos and Hermes-Lima. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

6 CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Entender como animais prosperam em um amplo espectro de condições ambientais, expostos a variações periódicas extremas de parâmetros abióticos, é o tema de inúmeras linhas de pesquisa mundialmente (Hochachka e Somero 2002). Dentro desta temática, destaca-se o estudo de animais que toleram amplas variações na disponibilidade de oxigênio como eventos pertencentes a suas histórias de vida. Células e tecidos humanos sofrem danos severos quando o suprimento de O_2 é interrompido (e.g. eventos isquêmicos) já nos primeiros minutos, além disso, quando o suprimento é restabelecido (e.g. reperfusão), este é acompanhado de intensos danos oxidativos (Granger e Kvietys 2015). Por outro lado, diversos animais toleram severa privação dos níveis de O_2 , por longos períodos (desde horas à semanas) e com frequência variável, desde diária à anualmente. A primeira proposta de que adaptações bioquímicas do metabolismo redox suportariam a tolerância de animais à privação de oxigênio e reoxigenação foi feita em 1986. Baseado na observação de um alto teor de grupos $-SH$ na hemoglobina de cágados *Phrynops hilarii*, espécie tolerante à hipóxia, foi postulado que tais grupos teriam um importante papel de tamponamento, resistindo a possíveis alterações redox associadas à hipóxia e a reoxigenação (Reischl 1986).

Posteriormente, a ideia de que animais tolerantes teriam adaptações bioquímicas de antioxidantes foi investigada com maior profundidade em serpentes *Thamnophis sirtalis*. Foi observado que estes animais apresentavam maiores níveis de enzimas antioxidantes durante estresses de privação de O_2 em relação à serpentes controle (Hermes-Lima e Storey 1993). A investigação de outras seis espécies animais submetidas a diferentes estresses de privação de oxigênio e estivação revelou que estas também aumentavam sua capacidade antioxidante, levando à hipótese do “Preparo para o Estresse Oxidativo” (POS) em 1998 (Hermes-Lima, Storey, e Storey 1998). Segundo a hipótese do POS, animais aumentariam suas defesas antioxidantes durante a falta de O_2 como um mecanismo de proteção que atuaria durante a reoxigenação. Apesar deste fenômeno ter sido observado em dezenas de outras espécies, o mecanismo molecular pelo qual o POS é acionado permaneceu elusivo até recentemente (**Figura 45**). Postulava-se que o fenótipo do POS seria mediado por compostos de natureza não-radicalar, pois, na época, pensava-se que a produção de espécies reativas seria necessariamente reduzida na

hipóxia. Com o passar do tempo, houve uma transição da ideia de um mensageiro não-radicalar para a hipótese de que espécies reativas (incluindo radicais) seriam o sinal de acionamento do POS (**Figura 45**). O **capítulo 2** trata com detalhes desta mudança de paradigma.



Figura 45. Transição da argumentação na literatura da biologia comparada no contexto do POS. Desde a primeira proposta de adaptações do metabolismo redox em animais tolerantes a hipóxia (Reischl 1986), passando pela primeira observação (Hermes-Lima e Storey 1993) e posterior nascimento da hipótese do POS (Hermes-Lima, Storey, e Storey 1998), o mecanismo pretendo de ativação do antioxidantes saiu

da ideia de um mensageiro “não-radicalar” até a ideia de ROS como os sinais ativadores do POS. ¹(Reischl 1986); ²(Hermes-Lima e Storey 1993); ³(Hermes-Lima e Storey 1995); ⁴(Hermes-Lima, Storey, e Storey 1998); ⁵(Lushchak et al. 2001); ⁶(Ferreira, Alencastro, e Hermes-Lima 2003); ⁷(Almeida et al. 2005); ⁸(Almeida e Bainy 2006); ⁹(Lushchak e Bagnyukova 2006); ¹⁰(Lushchak e Bagnyukova 2007); ¹¹(Forcella et al. 2007); ¹²(De Zoysa et al. 2009); ¹³(Sussarellu et al. 2010); ¹⁴(Krivoruchko e Storey 2010); ¹⁵(Mustafa et al. 2011); ¹⁶(Pérez-Jiménez et al. 2012); ¹⁷(Trasviña-Arenas et al. 2013); ¹⁸(Leveelahti et al. 2014); ¹⁹(Hermes-Lima et al. 2015).

Com base em um conjunto de observações experimentais fragmentadas na literatura, foi proposto que o mecanismo de ativação de defesas antioxidantes durante a privação de oxigênio (i.e. POS) dependeria da ação de ROS, que seriam superproduzidos durante a hipóxia (**capítulo 2**). Durante a falta de oxigênio, animais tolerantes a hipóxia apresentam algumas respostas que suportam tal proposta: sinais de danos oxidativos, ativação de fatores de transcrição sensíveis a alterações redox, aumento da atividade ou concentração de antioxidantes endógenos. Paralelamente, aumentos na produção de ROS mitocondriais foram observados em vários tipos celulares expostos à hipóxia (Waypa, Smith, e Schumacker 2016). Cabe ressaltar, que algumas espécies não apresentam qualquer sinal de aumento de antioxidantes durante a privação de O₂. Este é o caso de três espécies de peixes, *Hemiscyllium ocellatum*, *Gasterosteus aculeatus* e *Oncorhynchus mykiss*, cujas atividades de enzimas antioxidantes (catalase, SOD, GPX e GST) não se alteraram quanto expostos à hipóxia (Leveelahti et al. 2014). Dentre as espécies que apresentaram aumento de antioxidantes, nem todas apresentaram sinais de dano oxidativo. Por exemplo, peixes dourados *Carassius auratus* expostos à anóxia apresentam aumento da atividade de catalase hepática e de GPX cerebral, sem alteração no grau de peroxidação lipídica nestes tecidos (Lushchak et al. 2001). Além disso, há exemplos de aumento de dano oxidativo sem a ativação de antioxidantes em alguns casos de animais privados de O₂. Este é o caso de carpas *Cyprinus carpio*, onde a hipóxia causou dano ao DNA de eritrócitos e alterações morfológicas hepáticas, sem alterar a atividade de GPX no sangue ou no fígado (Mustafa et al. 2011). Tais divergências, podem ser causadas, pelo menos parcialmente, pela variação de protocolos experimentais (especialmente na intensidade da privação de O₂ e na escolha dos intervalos de amostragem) e características do organismo em estudo. Supondo hipoteticamente a sequência de eventos: (i) queda dos níveis de O₂, (ii) aumento dos níveis de ROS, (iii) aumento dos marcadores de danos oxidativos e (iv) ativação de defesas antioxidantes,

variações do protocolo experimental e do sistema em questão podem levar a resultados diferentes (**Figura 46**).

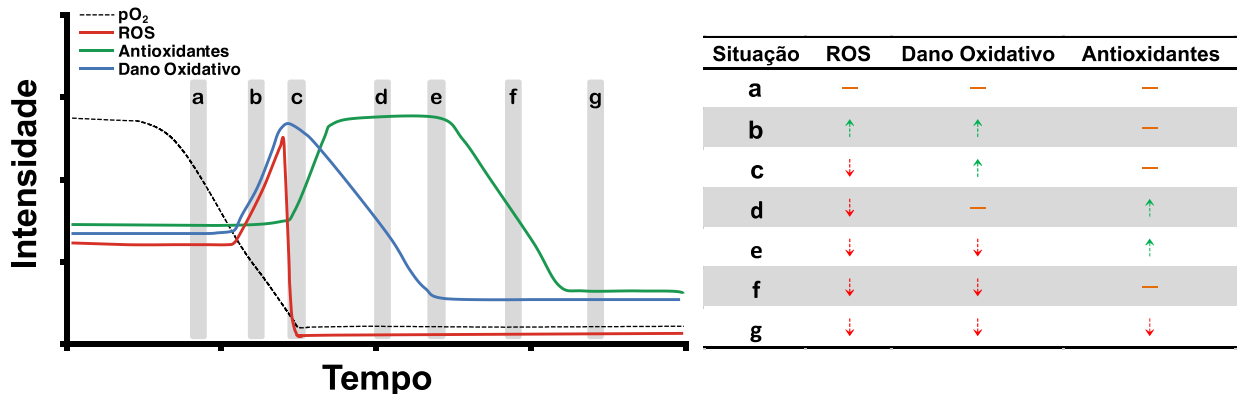


Figura 46. Sequência hipotética de eventos que levariam a ativação do POS segundo a proposta de maior produção de ROS na hipóxia. A queda da disponibilidade de O₂ resultaria em uma redução gradual da pO₂ em um dado tecido. Ao atingir um limiar específico, o baixo teor de O₂ resultaria em uma maior produção temporária de ROS mitocondriais (processo detalhado em (Welker et al. 2013)). O maior nível de ROS, causaria um desequilíbrio redox e um aumento nos marcadores de estresse oxidativo, ativando a expressão de componentes do sistema antioxidante. Note que dependendo do momento em que o sistema é analisado, diferentes conjuntos de observações podem ser obtidos.

A principal limitação do modelo de ativação do POS *via* ROS (**capítulo 2**) é o fato de não haver qualquer evidência direta de maior produção de ROS em animais tolerantes à falta de oxigênio (limitação discutida no **capítulo 5**). Os únicos três estudos realizados envolvendo espécies tolerantes utilizaram longos períodos de exposição à hipóxia (na escala horas) (Milton et al. 2007; Rivera-Ingraham et al. 2013; Rivera-Ingraham, Bickmeyer, e Abele 2013). Se a maior produção de ROS (hipotética) seguir o que é observado em estudos com células, tal superprodução ocorre nos primeiros minutos (10-30 min) do insulto hipóxico (Hernansanz-Agustín et al. 2014). Deste modo, a hipótese ainda não foi adequadamente testada experimentalmente. Para tanto, é necessária a aferição dos níveis de espécies reativas nos primeiros minutos de exposição à privação de O₂ ou de entrada na estivação. Um modelo em que isto pode ser convenientemente testado em laboratório é o gastropode terrestre *Helix aspersa*, cujas respostas do metabolismo redox à anoxia (Welker, Moreira, e Hermes-Lima 2016) e a estivação (Ramos-Vasconcelos e Hermes-Lima 2003; Ramos-Vasconcelos, Cardoso, e Hermes-Lima 2005) são conhecidas. Enquanto tal experimento não é realizado, a ausência de evidência da maior produção de ROS em animais que apresentam o POS não permite o descarte de mecanismos/hipóteses alternativos.

Uma explicação alternativa, igualmente hipotética, seria a da ativação de fatores transcrição sensíveis a alterações redox independentemente dos níveis de ROS. Tais fatores transcrição são ativados, por exemplo, por aldeídos, hidroperóxidos lipídicos e dissulfetos, cujos níveis podem se alterar mesmo na ausência de mudanças na produção de ROS (Jones 2008). Sistemas de reparo de macromoléculas oxidadas e vias de redução de dissulfetos dependem do provimento de NADPH e ATP (**seção 1.3.5**). O potencial redutor na forma de NADPH é fundamental para o funcionamento dos sistemas dependentes de glutathione (**seção 1.3.3**) e de tioredoxina (**seção 1.3.4**). Uma menor oferta, esperada pelo reduzido *turnover* de ATP e presumida menor produção de NADPH em situações de depressão metabólica (Hochachka e Somero 2002; Bickler e Buck 2007), poderia, em tese, debilitar estes sistemas. Por exemplo, a deficiência de produção de NADPH leva a desequilíbrio redox e estresse oxidativo (Pandolfi et al. 1995; Zhang et al. 2010). De fato, tal hipótese já foi anteriormente levantada para explicar o aumento de dano oxidativo em animais expostos a privação de O₂. No caso de rã leopardo *Rana pipiens* submetidas a desidratação severa, o aumento da proporção de glutathione em sua forma dissulfeto foi atribuído a um menor fornecimento de NADPH (Hermes-Lima e Storey 1998). Em outro caso, o aumento dos níveis de proteínas carboniladas durante a estivação de *H. aspersa* foi atribuído a uma possível supressão da degradação de proteínas oxidadas durante a estivação (Ramos-Vasconcelos e Hermes-Lima 2003). Assim como no caso da hipótese de maior produção de ROS, a proposta de um mecanismo com base em vias de reparo e reciclagem de tióis ineficientes não tem suporte de dados experimentais diretos. Cabe ressaltar que, ao contrário dos antioxidantes, são raros os estudos que fizeram medidas experimentais da modulação de sistemas de reparo em animais expostos à hipóxia e/ou a depressão metabólica. Ainda dentro desta hipótese, o menor suprimento de NADPH afetaria a capacidade dos sistemas antioxidantes de gerenciar os níveis de ROS (**seção 1.3.3 e 1.3.4**). O resultado seria um *maior nível de estado estacionário* de ROS, e não, necessariamente, *uma maior produção* de ROS. Por fim, a ocorrência de um mecanismo ou outro, ou, até mesmo, uma combinação ainda carece de dados experimentais.

Apesar da incerteza do mecanismo molecular, está evidente que o POS é uma estratégia de adaptação bioquímica utilizada amplamente no reino animal (**capítulos 3 e 5**). A prevalência de animais classificados como POS-positivos,

neutros ou negativos está em constante atualização. Por exemplo, no intervalo entre uma publicação (Moreira et al. 2016) e outra (Moreira et al. 2017), a prevalência de espécies POS-positivas aumentou de 68% para 72% seguindo o critério 1. Espécies animais de 8 filos, de cnidários a mamíferos, submetidas a diferentes estresses de privação de oxigênio apresentam o POS. Do ponto de vista, filogenético, chama a atenção a ocorrência do fenômeno em filos basais, tal como Cnidaria. Esta observação indica um surgimento precoce do POS na evolução animal. Entretanto, uma conclusão mais robusta sobre o POS em linhagens animais requer o estudo de mais espécies de filos basais (e.g. Cnidaria, apenas duas espécies estudadas), assim como mais espécies de filos subrepresentados (e.g. Echinodermata).

Mesmo presente em dezenas de espécies, pouco se sabe sobre a ocorrência e as características do POS no ambiente natural. Isto deve-se ao fato da maioria dos estudos sobre modulação de antioxidantes em animais expostos à privação de O₂ terem sido realizados em condições artificiais de laboratório. A vantagem de experimentos em laboratório é a capacidade de controle rigoroso de variáveis, o que permite a reprodutibilidade e o delineamento de causalidade (Spicer 2014). Por outro lado, a investigação de animais diretamente do campo está sujeita a interferências externas não controladas, enfraquecendo o estabelecimento de relações de causa e efeito (Spicer 2014). Análises no laboratório e no campo podem ser complementares uma à outra. Entretanto, os resultados de animais analisados diretamente na natureza tem maior probabilidade de serem ecologicamente significativos. Todavia, o número de estudos em laboratório supera em larga escala o de estudo de animais no campo. Em muitos casos, a resposta fisiológica de indivíduos no campo difere daquela de indivíduos de uma espécie em laboratório, em alguns exemplos, animais do campo apresentam respostas opostas àquelas de animais no laboratório (Calisi e Bentley 2009). Portanto, extrapolações baseadas em experimentos de laboratório para animais em seus habitats naturais devem ser feitas com cautela.

Neste contexto, foi mostrado que duas espécies de anuros da Caatinga apresentam o POS como uma resposta bioquímica durante a estivação (**capítulo 4**). Tal observação está de acordo com os 100% de prevalência de espécies POS-positivas registrada para o caso de animais expostos à estivação (**capítulo 3**). Neste caso, mesmo se tratando de diferentes espécies, os dados de animais do campo concordaram com os dados de animais de laboratório. Com o objetivo de explorar mais a fundo o POS na natureza, já está em andamento o estudo de mexilhões

Mytilaster solisianus no ambiente intermarés, onde durante a maré baixa os animais são expostos ao ar impedindo uma obtenção de oxigênio de forma eficiente. Observamos que outros fatores abióticos (e.g. radiação solar), além da disponibilidade de oxigênio *per se*, podem ter papel fundamental sobre a resposta dos antioxidantes de animais no campo (Sabino et al. 2017). Mostramos que há um aumento de 50% na concentração de glutathione quando o animal está exposto ao ar por 4 horas em dia de intensa radiação solar. O aumento de glutathione não foi observado quando a exposição aérea ocorreu em um dia com baixa radiação. Uma explicação possível é que a radiação UV, em associação com a hipóxia funcional, induza a biossíntese de glutathione pela formação de ROS e ativação de Nrf2 (Hermes-Lima *comunicação pessoal*). Outro ambiente com grande potencial para estudos do POS na natureza é a Amazônia, onde há diferentes ecossistemas aquáticos que apresentam variações amplas dos níveis de oxigênio (além de outras variáveis físico-químicas) em diferentes escalas de tempo (**Figura 2B e C**; (Val e Almeida-Val 1995; Val, Fearnside, e Almeida-Val 2016). Ainda assim, estes locais são habitados por espécies altamente tolerantes a hipóxia (e.g. *Astronotus ocellatus* (Muusze et al. 1998). Portanto, diferentes ecossistemas podem ser explorados por mais investigações do fenômeno do POS em animais na natureza, sem intervenção experimental, a fim de contribuir para o entendimento do fenômeno no “mundo real”.

Por fim, animais tolerantes aos extremos ambientais são importantes exemplos de sistemas biológicos capazes de tolerar e responder a amplas perturbações de processos biológicos, mantendo a homeostase. São modelos valiosos para entender a regulação e os limites naturais de tais processos em organismos vivos (Navas e Carvalho 2010). O estudo dessas espécies, além de possibilitar a compreensão de como a natureza funciona, pode levar à identificação de mecanismos gerais de vias biológicas, podendo ser aplicados, inclusive, na prevenção e tratamento de lesões e patologias em humanos (van Breukelen e Martin 2015; Nathaniel et al. 2015; Nayak, Prentice, e Milton 2016), “da selva para a clínica” (Ramirez, Folkow, e Blix 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abele, D. 2002. "Toxic Oxygen: The Radical Life-Giver". *Nature* 420 (6911):27. <https://doi.org/10.1038/420027a>.
- Aebi, H. 1984. "Catalase in Vitro". *Methods in Enzymology* 105:121–26.
- Alfonso-Prieto, M., X. Biarnés, P. Vidossich, e C. Rovira. 2009. "The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction". *Journal of the American Chemical Society* 131 (33):11751–61. <https://doi.org/10.1021/ja9018572>.
- Allen, E.M.G., e J.J. Mieyal. 2012. "Protein-Thiol Oxidation and Cell Death: Regulatory Role of Glutaredoxins". *Antioxidants & Redox Signaling* 17 (12):1748–63. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4644>.
- Almeida, E.A., e A.C.D. Bainy. 2006. "Effects of aerial exposure on antioxidant defenses in the brown mussel *Perna perna*". *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49 (2):225–29. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000300007>.
- Almeida, E.A., A.C.D. Bainy, A.L. Dafre, O.F. Gomes, M.H.G. Medeiros, e P. Di Mascio. 2005. "Oxidative Stress in Digestive Gland and Gill of the Brown Mussel (*Perna Perna*) Exposed to Air and Re-Submersed". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 318 (1):21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.12.007>.
- Archer, S.L., D.P. Nelson, e E.K. Weir. 1989. "Simultaneous Measurement of O₂ Radicals and Pulmonary Vascular Reactivity in Rat Lung". *Journal of Applied Physiology* 67 (5):1903–11.
- Archer, S.L., H.L. Reeve, E. Michelakis, L. Puttagunta, R. Waite, D.P. Nelson, M.C. Dinauer, e E.K. Weir. 1999. "O₂ Sensing Is Preserved in Mice Lacking the gp91 Phox Subunit of NADPH Oxidase". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (14):7944–49.
- Arieli, R. 1979. "The Atmospheric Environment of the Fossorial Mole Rat (*Spalax ehrenbergi*): Effects of Season, Soil Texture, Rain, Temperature and Activity". *Comparative Biochemistry and Physiology A* 63 (4):569–75. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(79\)90197-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(79)90197-X).
- Arnér, E.S., e A. Holmgren. 2000. "Physiological Functions of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase". *European Journal of Biochemistry* 267 (20):6102–9.
- Bachhawat, A.K., A. Thakur, J. Kaur, e M. Zulkifli. 2013. "Glutathione Transporters". *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (5):3154–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.018>.
- Bachi, A., I. Dalle-Donne, e A. Scaloni. 2013. "Redox Proteomics: Chemical Principles, Methodological Approaches and Biological/Biomedical Promises". *Chemical Reviews* 113 (1):596–698. <https://doi.org/10.1021/cr300073p>.
- Banchero, N., R.F. Grover, e J.A. Will. 1971. "Oxygen Transport in the Llama (*Lama glama*)". *Respiration Physiology* 13 (1):102–15. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(71\)90067-3](https://doi.org/10.1016/0034-5687(71)90067-3).
- Barnhart, M.C. 1986. "Respiratory Gas Tensions and Gas Exchange in Active and Dormant Land Snails, *Otala lactea*". *Physiological Zoology* 59 (6):733–45.
- Bartberger, M.D., W. Liu, E. Ford, K.M. Miranda, C. Switzer, J.M. Fukuto, P.J. Farmer, D.A. Wink, e K.N. Houk. 2002. "The Reduction Potential of Nitric Oxide (NO) and Its Importance to NO Biochemistry". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (17):10958–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.162095599>.

- Berndt, C., C.H. Lillig, e L. Flohé. 2014. "Redox regulation by glutathione needs enzymes". *Frontiers in Pharmacology* 5 (julho). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00168>.
- Berner, N.J., P.L. Else, A.J. Hulbert, B.L. Mantle, R.L. Cramp, e C.E. Franklin. 2009. "Metabolic Depression during Aestivation Does Not Involve Remodelling of Membrane Fatty Acids in Two Australian Frogs". *Journal of Comparative Physiology B* 179 (7):857–66. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0368-y>.
- Bickler, P.E., e L.T. Buck. 2007. "Hypoxia Tolerance in Reptiles, Amphibians, and Fishes: Life with Variable Oxygen Availability". *Annual Review of Physiology* 69:145–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.162529>.
- Bierl, C., B. Voetsch, R.C. Jin, D.E. Handy, e J. Loscalzo. 2004. "Determinants of Human Plasma Glutathione Peroxidase (GPx-3) Expression". *The Journal of Biological Chemistry* 279 (26):26839–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401907200>.
- Biggar, K.K., e K.B. Storey. 2012. "Evidence for Cell Cycle Suppression and microRNA Regulation of Cyclin D1 during Anoxia Exposure in Turtles". *Cell Cycle* 11 (9):1705–13. <https://doi.org/10.4161/cc.19790>.
- Blacker, T.S., e M.R. Duchon. 2016. "Investigating Mitochondrial Redox State Using NADH and NADPH Autofluorescence". *Free Radical Biology & Medicine* 100 (novembro):53–65. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.010>.
- Board, P.G., e D. Menon. 2013. "Glutathione Transferases, Regulators of Cellular Metabolism and Physiology". *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (5):3267–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.019>.
- Bogdanova, A., I.Y. Petrushanko, P. Hernansanz-Agustín, e A. Martínez-Ruiz. 2016. "‘Oxygen Sensing’ by Na,K-ATPase: These Miraculous Thiols". *Frontiers in Physiology* 7:314. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00314>.
- Bota, D.A., e K.J.A. Davies. 2002. "Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism". *Nature Cell Biology* 4 (9):674–80. <https://doi.org/10.1038/ncb836>.
- Bradford, M.M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Analytical Biochemistry* 72 (1–2):248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brand, M.D. 2016. "Mitochondrial Generation of Superoxide and Hydrogen Peroxide as the Source of Mitochondrial Redox Signaling". *Free Radical Biology & Medicine* 100 (novembro):14–31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>.
- Breukelen, F. van, e S.L. Martin. 2015. "The Hibernation Continuum: Physiological and Molecular Aspects of Metabolic Plasticity in Mammals". *Physiology* 30 (4):273–81. <https://doi.org/10.1152/physiol.00010.2015>.
- Brigelius-Flohé, R., e M. Maiorino. 2013. "Glutathione Peroxidases". *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (5):3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>.
- Broniowska, K.A., A.R. Diers, e N. Hogg. 2013. "S-Nitrosoglutathione". *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (5):3173–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.004>.
- Brown, G.C. 1999. "Nitric Oxide and Mitochondrial Respiration". *Biochimica et Biophysica Acta* 1411 (2–3):351–69.

- Brown, G.C., e C.E. Cooper. 1994. "Nanomolar Concentrations of Nitric Oxide Reversibly Inhibit Synaptosomal Respiration by Competing with Oxygen at Cytochrome Oxidase". *FEBS Letters* 356 (2–3):295–98.
- Buege, J.A., e S.D. Aust. 1978. "Microsomal Lipid Peroxidation". *Methods in Enzymology* 52:302–10. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- Buettner, G.R. 1993. "The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, Alpha-Tocopherol, and Ascorbate". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300 (2):535–43. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>.
- Calisi, R.M., e G.E. Bentley. 2009. "Lab and Field Experiments: Are They the Same Animal?" *Hormones and Behavior* 56 (1):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.02.010>.
- Calnan, D.R., e A. Brunet. 2008. "The FoxO code". *Oncogene* 27 (16):2276–88. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.21>.
- Camardelli, M., e M.F. Napoli. 2012. "Amphibian conservation in the Caatinga biome and semiarid region of Brazil". *Herpetologica* 68 (1):31–47.
- Candas, D., M. Fan, D. Nantajit, A.T. Vaughan, J.S. Murley, G.E. Woloschak, D.J. Grdina, e J.J. Li. 2013. "CyclinB1/Cdk1 Phosphorylates Mitochondrial Antioxidant MnSOD in Cell Adaptive Response to Radiation Stress". *Journal of Molecular Cell Biology* 5 (3):166–75. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs062>.
- Canfield, D.E., e A. Teske. 1996. "Late Proterozoic Rise in Atmospheric Oxygen Concentration Inferred from Phylogenetic and Sulphur-Isotope Studies". *Nature* 382 (6587):127–32. <https://doi.org/10.1038/382127a0>.
- Cannon, W.B. 1932. *The wisdom of the body*. New York: W. W. Norton & Company.
- Cao, C., Y. Leng, W. Huang, X. Liu, e D. Kufe. 2003. "Glutathione Peroxidase 1 Is Regulated by the c-Abl and Arg Tyrosine Kinases". *The Journal of Biological Chemistry* 278 (41):39609–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305770200>.
- Cao, C., Y. Leng, e D. Kufe. 2003. "Catalase Activity Is Regulated by c-Abl and Arg in the Oxidative Stress Response". *The Journal of Biological Chemistry* 278 (32):29667–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301292200>.
- Carlberg, I., e B. Mannervik. 1975. "Purification and Characterization of the Flavoenzyme Glutathione Reductase from Rat Liver". *The Journal of Biological Chemistry* 250 (14):5475–80.
- Carreau, A., B. El Hafny-Rahbi, A. Matejuk, C. Grillon, e C. Kieda. 2011. "Why Is the Partial Oxygen Pressure of Human Tissues a Crucial Parameter? Small Molecules and Hypoxia". *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15 (6):1239–53. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x>.
- Carvalho, J.E., C.A. Navas, e I.C. Pereira. 2010. "Energy and Water in Aestivating Amphibians". In *Aestivation*, organizado por Carlos A. Navas e José E. Carvalho, 49:141–69. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02421-4_7.
- Cary, S.P.L., J.A. Winger, E.R. Derbyshire, e M.A. Marletta. 2006. "Nitric Oxide Signaling: No Longer Simply on or off". *Trends in Biochemical Sciences* 31 (4):231–39. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.02.003>.
- Chance, B., e G. Hollunger. 1961. "The Interaction of Energy and Electron Transfer Reactions in Mitochondria. I. General Properties and Nature of the Products of Succinate-Linked Reduction of Pyridine Nucleotide". *The Journal of Biological Chemistry* 236 (maio):1534–43.
- Chandel, N.S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C.E. Mathieu, M.C. Simon, e P.T. Schumacker. 1998. "Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-

- Induced Transcription". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (20):11715–20.
- Chandel, N.S., D.S. McClintock, C.E. Feliciano, T.M. Wood, J.A. Melendez, A.M. Rodriguez, e P.T. Schumacker. 2000. "Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-Inducible Factor-1 α during Hypoxia: A Mechanism of O₂ Sensing". *The Journal of Biological Chemistry* 275 (33):25130–38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001914200>.
- Cheng, X., C.H. Ku, e R.C. Siow. 2013. "Regulation of the Nrf2 Antioxidant Pathway by microRNAs: New Players in Micromanaging Redox Homeostasis". *Free Radical Biology & Medicine* 64 (setembro):4–11. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.025>.
- Chouchani, E.T., V.R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijević, S.Y. Sundier, E.L. Robb, A. Logan, et al. 2014. "Ischaemic Accumulation of Succinate Controls Reperfusion Injury through Mitochondrial ROS". *Nature* 515 (7527):431–35. <https://doi.org/10.1038/nature13909>.
- Clanton, T.L. 2005. "Yet Another Oxygen Paradox". *Journal of Applied Physiology* 99 (4):1245–46. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00609.2005>.
- . 2007. "Hypoxia-Induced Reactive Oxygen Species Formation in Skeletal Muscle". *Journal of Applied Physiology* 102 (6):2379–88. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01298.2006>.
- Cleeter, M.W., J.M. Cooper, V.M. Darley-Usmar, S. Moncada, e A.H. Schapira. 1994. "Reversible Inhibition of Cytochrome c Oxidase, the Terminal Enzyme of the Mitochondrial Respiratory Chain, by Nitric Oxide. Implications for Neurodegenerative Diseases". *FEBS Letters* 345 (1):50–54.
- Clegg, J. 1997. "Embryos of *Artemia Franciscana* Survive Four Years of Continuous Anoxia: The Case for Complete Metabolic Rate Depression". *The Journal of Experimental Biology* 200 (Pt 3):467–75.
- Colavitti, R., G. Pani, B. Bedogni, R. Anzevino, S. Borrello, J. Waltenberger, e T. Galeotti. 2002. "Reactive Oxygen Species as Downstream Mediators of Angiogenic Signaling by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2/KDR". *The Journal of Biological Chemistry* 277 (5):3101–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107711200>.
- Cooper, C.E., R.P. Patel, P.S. Brookes, e V.M. Darley-Usmar. 2002. "Nanotransducers in Cellular Redox Signaling: Modification of Thiols by Reactive Oxygen and Nitrogen Species". *Trends in Biochemical Sciences* 27 (10):489–92. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02191-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02191-6).
- Corcoran, A., e T.G. Cotter. 2013. "Redox Regulation of Protein Kinases". *The FEBS Journal* 280 (9):1944–65. <https://doi.org/10.1111/febs.12224>.
- Corongiu, F.P., e S. Banni. 1994. "Detection of Conjugated Dienes by Second Derivative Ultraviolet Spectrophotometry". *Methods in Enzymology* 233:303–10.
- Cowan, K.J., J.A. MacDonald, J.M. Storey, e K.B. Storey. 2000. "Metabolic Reorganization and Signal Transduction during Estivation in the Spadefoot Toad". *Experimental Biology Online* 5 (1):1–25. <https://doi.org/10.1007/s00898-000-0001-8>.
- Cowan, K.J., e K.B. Storey. 1999. "Reversible Phosphorylation Control of Skeletal Muscle Pyruvate Kinase and Phosphofructokinase during Estivation in the Spadefoot Toad, *Scaphiopus couchii*". *Molecular and Cellular Biochemistry* 195 (1–2):173–81.

- Dalle-Donne, I., R. Rossi, G. Colombo, D. Giustarini, e A. Milzani. 2009. "Protein S-Glutathionylation: A Regulatory Device from Bacteria to Humans". *Trends in Biochemical Sciences* 34 (2):85–96. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.11.002>.
- Darwin, C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection, or, The preservation of favoured races in the struggle for life* /. London : John Murray, . <https://doi.org/10.5962/bhl.title.68064>.
- David, S.S., V.L. O'Shea, e S. Kundu. 2007. "Base-excision repair of oxidative DNA damage". *Nature* 447 (7147):941–50. <https://doi.org/10.1038/nature05978>.
- Davies, K.J. 2001. "Degradation of Oxidized Proteins by the 20S Proteasome". *Biochimie* 83 (3–4):301–10.
- Dawson, N.J., e K.B. Storey. 2016. "A Hydrogen Peroxide Safety Valve: The Reversible Phosphorylation of Catalase from the Freeze-Tolerant North American Wood Frog, *Rana sylvatica*". *Biochimica et Biophysica Acta* 1860 (3):476–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.12.007>.
- De Zoysa, M., I. Whang, Y. Lee, S. Lee, J.S. Lee, e J. Lee. 2009. "Transcriptional Analysis of Antioxidant and Immune Defense Genes in Disk Abalone (*Haliotis discus discus*) during Thermal, Low-Salinity and Hypoxic Stress". *Comparative Biochemistry and Physiology B* 154 (4):387–95. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.08.002>.
- Denlinger, D.L. 2002. "Regulation of Diapause". *Annual Review of Entomology* 47:93–122. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145137>.
- Denu, J.M., e K.G. Tanner. 1998. "Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation". *Biochemistry* 37 (16):5633–42. <https://doi.org/10.1021/bi973035t>.
- Deponte, M. 2013. "Glutathione Catalysis and the Reaction Mechanisms of Glutathione-Dependent Enzymes". *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (5):3217–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>.
- Di Meo, S., T.T. Reed, P. Venditti, e V.M. Victor. 2016. "Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:1–44. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>.
- Diamant, B., J. Karlsson, e B. Saltin. 1968. "Muscle Tissue Lactate after Maximal Exercise in Man". *Acta Physiologica Scandinavica* 72 (3):383–84. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1968.tb03861.x>.
- Dietrich, L.E.P., M.M. Tice, e D.K. Newman. 2006. "The Co-Evolution of Life and Earth". *Current Biology* 16 (11):R395–400. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.017>.
- Dizdaroglu, M., P. Jaruga, M. Birincioglu, e H. Rodriguez. 2002. "Free Radical-Induced Damage to DNA: Mechanisms and Measurement". *Free Radical Biology & Medicine* 32 (11):1102–15.
- Dole, M. 1965. "The natural history of oxygen". *The Journal of General Physiology* 49 (1):5–27.
- Dröge, W. 2002. "Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function". *Physiological Reviews* 82 (1):47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
- Espinosa-Diez, C., V. Miguel, D. Mennerich, T. Kietzmann, P. Sánchez-Pérez, S. Cadenas, e S. Lamas. 2015. "Antioxidant Responses and Cellular Adjustments to Oxidative Stress". *Redox Biology* 6 (dezembro):183–97. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.008>.

- Esterbauer, H., R.J. Schaur, e H. Zollner. 1991. "Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes". *Free Radical Biology & Medicine* 11 (1):81–128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6).
- Faucher, F., S. Doublé, e Z. Jia. 2012. "8-Oxoguanine DNA Glycosylases: One Lesion, Three Subfamilies". *International Journal of Molecular Sciences* 13 (12):6711–29. <https://doi.org/10.3390/ijms13066711>.
- Ferreira, M.V.R, A.C.R Alencastro, e M. Hermes-Lima. 2003. "Role of Antioxidant Defenses during Estivation and Anoxia Exposure in the Freshwater Snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835)". *Canadian Journal of Zoology* 81 (7):1239–48. <https://doi.org/10.1139/z03-104>.
- Fields, R., e H.B. Dixon. 1971. "Micro Method for Determination of Reactive Carbonyl Groups in Proteins and Peptides, Using 2,4-Dinitrophenylhydrazine". *The Biochemical Journal* 121 (4):587–89.
- Finkel, T. 1998. "Oxygen Radicals and Signaling". *Current Opinion in Cell Biology* 10 (2):248–53.
- Finkel, T. 2012. "From Sulfenylation to Sulfhydration: What a Thiolate Needs to Tolerate". *Science Signaling* 5 (215):pe10. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002943>.
- Flanigan, J.E., P.C. Withers, e M. Guppy. 1991. "In vitro metabolic depression of tissues from the aestivating frog *Neobatrachus pelobatoides*". *The Journal of Experimental Biology* 161:273–83.
- Flohé, L. 2013. "The Fairytale of the GSSG/GSH Redox Potential". *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (5):3139–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.020>.
- Forcella, M., E. Berra, R. Giacchini, e P. Parenti. 2007. "Antioxidant Defenses Preserve Membrane Transport Activity in *Chironomus riparius* Larvae Exposed to Anoxia". *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 65 (4):181–94. <https://doi.org/10.1002/arch.20197>.
- Forman, H.J., O. Augusto, R. Brigelius-Flohe, P.A. Dennery, B. Kalyanaraman, H. Ischiropoulos, G.E. Mann, et al. 2015. "Even Free Radicals Should Follow Some Rules: A Guide to Free Radical Research Terminology and Methodology". *Free Radical Biology & Medicine* 78 (janeiro):233–35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504>.
- Forman, H.J., M. Maiorino, e F. Ursini. 2010. "Signaling Functions of Reactive Oxygen Species". *Biochemistry* 49 (5):835–42. <https://doi.org/10.1021/bi9020378>.
- Förstermann, U., e W.C. Sessa. 2012. "Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function". *European Heart Journal* 33 (7):829–837, 837a–837d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.
- Fox, D. 2016. "What sparked the Cambrian explosion?" *Nature* 530 (7590):268–70. <https://doi.org/10.1038/530268a>.
- Frick, N.T., J.S. Bystriansky, Y.K. Ip, S.F. Chew, e J.S. Ballantyne. 2008a. "Carbohydrate and Amino Acid Metabolism in Fasting and Aestivating African Lungfish (*Protopterus dolloi*)". *Comparative Biochemistry and Physiology A* 151 (1):85–92. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.003>.
- . 2008b. "Lipid, Ketone Body and Oxidative Metabolism in the African Lungfish, *Protopterus Dolloi* Following 60 Days of Fasting and Aestivation". *Comparative Biochemistry and Physiology A* 151 (1):93–101. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.004>.

- Fridovich, I. 1995. "Superoxide Radical and Superoxide Dismutases". *Annual Review of Biochemistry* 64:97–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>.
- . 2004. "Mitochondria: Are They the Seat of Senescence?" *Aging Cell* 3 (1):13–16.
- Fuery, C.J., P.C. Withers, A.A. Hobbs, e M. Guppy. 1998. "The Role of Protein Synthesis during Metabolic Depression in the Australian Desert Frog *Neobatrachus centralis*". *Comparative Biochemistry and Physiology A* 119 (2):469–76.
- Fuhrmann, D.C., e B. Brüne. 2017. "Mitochondrial Composition and Function under the Control of Hypoxia". *Redox Biology* 12 (agosto):208–15. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.012>.
- Fukai, T., e M. Ushio-Fukai. 2011. "Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases". *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (6):1583–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>.
- Ganote, C.E., R. Seabra-Gomes, W.G. Nayler, e R.B. Jennings. 1975. "Irreversible Myocardial Injury in Anoxic Perfused Rat Hearts". *The American Journal of Pathology* 80 (3):419–50.
- Garcia Sampaio, F., C.L. Boijink, E.T. Oba, L.R.B. Santos, A.L. Kalinin, e F.T. Rantin. 2008. "Antioxidant Defenses and Biochemical Changes in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in Response to Single and Combined Copper and Hypoxia Exposure". *Comparative Biochemistry and Physiology C* 147 (1):43–51. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.07.009>.
- García-Giménez, J.L., J. Markovic, F. Dasí, G. Queval, D. Schnaubelt, C.H. Foyer, e F.V. Pallardó. 2013. "Nuclear Glutathione". *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (5):3304–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.10.005>.
- Garcia-Ruiz, C., e J.C. Fernandez-Checa. 2006. "Mitochondrial Glutathione: Hepatocellular Survival-Death Switch". *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21 Suppl 3 (outubro):S3-6. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04570.x>.
- Garlick, P.B., M.J. Davies, D.J. Hearse, e T.F. Slater. 1987. "Direct Detection of Free Radicals in the Reperfused Rat Heart Using Electron Spin Resonance Spectroscopy". *Circulation Research* 61 (5):757–60.
- Ghosh, S., M.J. May, e E.B. Kopp. 1998. "NF- κ B AND REL Proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses". *Annual Review of Immunology* 16 (1):225–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.225>.
- Ginneken, V.J. van, G.E. van Den Thillart, H.J. Muller, S. van Deursen, M. Onderwater, J. Visée, V. Hopmans, G. van Vliet, e K. Nicolay. 1999. "Phosphorylation State of Red and White Muscle in Tilapia during Graded Hypoxia: An in Vivo ^{31}P -NMR Study". *American Journal of Physiology* 277 (5 Pt 2):R1501-1512.
- Glock, G.E., e P. McLean. 1953. "Further Studies on the Properties and Assay of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase of Rat Liver". *The Biochemical Journal* 55 (3):400–408.
- Goncalves, R.L.S., C.L. Quinlan, I.V. Perevoshchikova, M. Hey-Mogensen, e M.D. Brand. 2015. "Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Muscle Mitochondria Assessed Ex Vivo under Conditions Mimicking Rest and Exercise". *The Journal of Biological Chemistry* 290 (1):209–27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619072>.

- Gorrini, C., I.S. Harris, e T.W. Mak. 2013. "Modulation of Oxidative Stress as an Anticancer Strategy". *Nature Reviews Drug Discovery* 12 (12):931–47. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>.
- Granger, D.N., e P.R. Kvietys. 2015. "Reperfusion Injury and Reactive Oxygen Species: The Evolution of a Concept". *Redox Biology* 6 (dezembro):524–51. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>.
- Griffith, O.W. 1980. "Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine". *Analytical Biochemistry* 106 (1):207–12.
- Grundy, J.E., e K.B. Storey. 1998. "Antioxidant Defenses and Lipid Peroxidation Damage in Estivating Toads, *Scaphiopus couchii*". *Journal of Comparative Physiology B* 168 (2):132–42. <https://doi.org/10.1007/s003600050129>.
- Guan, Y., R.T. Worrell, T.A. Pritts, e M.H. Montrose. 2009. "Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury: Reversible and Irreversible Damage Imaged in Vivo". *American Journal of Physiology* 297 (1):G187–96. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90595.2008>.
- Guppy, M., C.J. Fuery, e J.E. Flanigan. 1994. "Biochemical Principles of Metabolic Depression". *Comparative Biochemistry and Physiology B* 109 (2–3):175–89. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90001-9).
- Guzy, R.D., B. Hoyos, E. Robin, H. Chen, L. Liu, K.D. Mansfield, M.C. Simon, U. Hammerling, e p.T. Schumacker. 2005. "Mitochondrial Complex III Is Required for Hypoxia-Induced ROS Production and Cellular Oxygen Sensing". *Cell Metabolism* 1 (6):401–8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.001>.
- Habig, W.H., M.J. Pabst, e W.B. Jakoby. 1974. "Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation". *The Journal of Biological Chemistry* 249 (22):7130–39.
- Halliwell, B., e J.M.C. Gutteridge. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5 edição. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.
- Hansford, R.G., B.A. Hogue, e V. Mildaziene. 1997. "Dependence of H₂O₂ Formation by Rat Heart Mitochondria on Substrate Availability and Donor Age". *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29 (1):89–95.
- Hayden, M.S. 2004. "Signaling to NF- κ B". *Genes & Development* 18 (18):2195–2224. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704>.
- Hayes, J.D., J.U. Flanagan, e I.R. Jowsey. 2005. "Glutathione Transferases". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45:51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
- He, L., e G.J. Hannon. 2004. "MicroRNAs: Small RNAs with a Big Role in Gene Regulation". *Nature Reviews Genetics* 5 (7):522–31. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>.
- Hermes-Lima, Marcelo. 2004a. "Oxidative Stress and Medical Sciences". In *Functional Metabolism*, organizado por K. B. Storey, 369–82. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch13>.
- . 2004b. "Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals". In *Functional Metabolism*, organizado por K. B. Storey, 319–68. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch12>.
- Hermes-Lima, M., D.C. Moreira, G.A. Rivera-Ingraham, M. Giraud-Billoud, T.C. Genaro-Mattos, e É.G. Campos. 2015. "Preparation for Oxidative Stress under Hypoxia and Metabolic Depression: Revisiting the Proposal Two Decades Later". *Free Radical Biology & Medicine* 89 (dezembro):1122–43. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156>.

- Hermes-Lima, M., J.M. Storey, e K.B. Storey. 1998. "Antioxidant Defenses and Metabolic Depression. The Hypothesis of Preparation for Oxidative Stress in Land Snails". *Comparative Biochemistry and Physiology B* 120 (3):437–48.
- Hermes-Lima, Marcelo, e K. B. Storey. 1993. "Antioxidant Defenses in the Tolerance of Freezing and Anoxia by Garter Snakes". *American Journal of Physiology* 265 (3 Pt 2):R646-652.
- . 1995. "Antioxidant Defenses and Metabolic Depression in a Pulmonate Land Snail". *American Journal of Physiology* 268 (6 Pt 2):R1386-1393.
- . 1996. "Relationship between Anoxia Exposure and Antioxidant Status in the Frog *Rana pipiens*". *American Journal of Physiology* 271 (4 Pt 2):R918-925.
- . 1998. "Role of Antioxidant Defenses in the Tolerance of Severe Dehydration by Anurans. The Case of the Leopard Frog *Rana pipiens*". *Molecular and Cellular Biochemistry* 189 (1–2):79–89.
- Hermes-Lima, M., W.G. Willmore, e K.B. Storey. 1995. "Quantification of Lipid Peroxidation in Tissue Extracts Based on Fe(III)xylenol Orange Complex Formation". *Free Radical Biology & Medicine* 19 (3):271–80.
- Hermes-Lima, M., e T. Zenteno-Savín. 2002. "Animal Response to Drastic Changes in Oxygen Availability and Physiological Oxidative Stress". *Comparative Biochemistry and Physiology C* 133 (4):537–56.
- Hernansanz-Agustín, P., A. Izquierdo-Álvarez, F.J. Sánchez-Gómez, E. Ramos, T. Villa-Piña, S. Lamas, A. Bogdanova, e A. Martínez-Ruiz. 2014. "Acute Hypoxia Produces a Superoxide Burst in Cells". *Free Radical Biology & Medicine* 71 (junho):146–56. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.011>.
- Hernansanz-Agustín, P., E. Ramos, E. Navarro, E. Parada, N. Sánchez-López, L. Peláez-Aguado, J.D. Cabrera-García, et al. 2017. "Mitochondrial Complex I Deactivation Is Related to Superoxide Production in Acute Hypoxia". *Redox Biology* 12 (agosto):1040–51. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.025>.
- Hochachka, P.W., e G.N. Somero. 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. New York: Oxford University Press.
- Holland, H.D. 2002. "Volcanic Gases, Black Smokers, and the Great Oxidation Event". *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66 (21):3811–26. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)00950-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)00950-X).
- Holmström, K.M., e T. Finkel. 2014. "Cellular Mechanisms and Physiological Consequences of Redox-Dependent Signalling". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (6):411–21. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>.
- Horst, A. van der, e B.M.T. Burgering. 2007. "Stressing the Role of FoxO Proteins in Lifespan and Disease". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (6):440–50. <https://doi.org/10.1038/nrm2190>.
- Hsia, C.C.W., A. Schmitz, M. Lambertz, S.F. Perry, e J.N. Maina. 2013. "Evolution of Air Breathing: Oxygen Homeostasis and the Transitions from Water to Land and Sky". In *Comprehensive Physiology*, organizado por Ronald Terjung. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120003>.
- Huang, C.S., L.S. Chang, M.E. Anderson, e A. Meister. 1993. "Catalytic and Regulatory Properties of the Heavy Subunit of Rat Kidney Gamma-Glutamylcysteine Synthetase". *The Journal of Biological Chemistry* 268 (26):19675–80.

- Hudson, N.J., e C.E. Franklin. 2002. "Maintaining Muscle Mass during Extended Disuse: Aestivating Frogs as a Model Species". *The Journal of Experimental Biology* 205 (Pt 15):2297–2303.
- Hudson, N.J., S.A. Lehnert, A.B. Ingham, B. Symonds, C.E. Franklin, e G.S. Harper. 2006. "Lessons from an Estivating Frog: Sparing Muscle Protein despite Starvation and Disuse". *American Journal Physiology* 290 (3):R836–43. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00380.2005>.
- Hudson, N.J., T.G.A. Lonhienne, C.E. Franklin, G.S. Harper, e S.A. Lehnert. 2008. "Epigenetic Silencers Are Enriched in Dormant Desert Frog Muscle". *Journal of Comparative Physiology B* 178 (6):729–34. <https://doi.org/10.1007/s00360-008-0261-0>.
- Hwang, C., A.J. Sinskey, e H.F. Lodish. 1992. "Oxidized Redox State of Glutathione in the Endoplasmic Reticulum". *Science* 257 (5076):1496–1502.
- Ivanovic, Z. 2009. "Hypoxia or in Situ Normoxia: The Stem Cell Paradigm". *Journal of Cellular Physiology* 219 (2):271–75. <https://doi.org/10.1002/jcp.21690>.
- Jasmine, O.L.Y. 2016. "A Molecular Study on Some Genes Known to be Related to Disuse Muscle Atrophy in the African Lungfish, *Protopterus annectens*, during Three Phases of Aestivation." Tese, National University of Singapore.
- Jennings, R.B., C.E. Murry, C. Steenbergen, e K.A. Reimer. 1990. "Development of Cell Injury in Sustained Acute Ischemia". *Circulation* 82 (3 Suppl):II2-12.
- Jeong, W., S.H. Bae, M.B. Toledano, e S.G. Rhee. 2012. "Role of Sulfiredoxin as a Regulator of Peroxiredoxin Function and Regulation of Its Expression". *Free Radical Biology and Medicine* 53 (3):447–56. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.020>.
- Joanisse, D.R., e K.B. Storey. 1996. "Oxidative Damage and Antioxidants in *Rana sylvatica*, the Freeze-Tolerant Wood Frog". *American Journal of Physiology* 271 (3 Pt 2):R545-553.
- Jones, D.P. 2006. "Redefining Oxidative Stress". *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (9–10):1865–79. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>.
- . 2008. "Radical-Free Biology of Oxidative Stress". *American Journal of Physiology* 295 (4):C849-868. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2008>.
- Joyner-Matos, J., L.J. Chapman, C.A. Downs, T. Hofer, C. Leeuwenburgh, e D. Julian. 2007. "Stress Response of a Freshwater Clam along an Abiotic Gradient: Too Much Oxygen May Limit Distribution". *Functional Ecology* 21 (2):344–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01230.x>.
- Kaltschmidt, B., T. Sparna, e C. Kaltschmidt. 1999. "Activation of NF- κ B by Reactive Oxygen Intermediates in the Nervous System". *Antioxidants & Redox Signaling* 1 (2):129–44. <https://doi.org/10.1089/ars.1999.1.2-129>.
- Kang, M., A. Kobayashi, N. Wakabayashi, S.G. Kim, e M. Yamamoto. 2004. "Scaffolding of Keap1 to the Actin Cytoskeleton Controls the Function of Nrf2 as Key Regulator of Cytoprotective Phase 2 Genes". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (7):2046–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308347100>.
- Kansanen, E., H.K. Jyrkkänen, e A.L. Levonen. 2012. "Activation of Stress Signaling Pathways by Electrophilic Oxidized and Nitrated Lipids". *Free Radical Biology & Medicine* 52 (6):973–82. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.038>.
- Kayes, S.M., R.L. Cramp, N.J. Hudson, e C.E. Franklin. 2009. "Surviving the Drought: Burrowing Frogs Save Energy by Increasing Mitochondrial Coupling".

- The Journal of Experimental Biology* 212 (Pt 14):2248–53. <https://doi.org/10.1242/jeb.028233>.
- Keizer, P.L.J., B.M.T. Burgering, e T.B. Dansen. 2011. “Forkhead Box O as a Sensor, Mediator, and Regulator of Redox Signaling”. *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (6):1093–1106. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3403>.
- Kim, G., S.J. Weiss, e R.L. Levine. 2014. “Methionine Oxidation and Reduction in Proteins”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840 (2):901–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.038>.
- Kim, S.C., R. Sprung, Y. Chen, Y. Xu, H. Ball, J. Pei, T. Cheng, et al. 2006. “Substrate and Functional Diversity of Lysine Acetylation Revealed by a Proteomics Survey”. *Molecular Cell* 23 (4):607–18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.026>.
- Klotz, L.O., C. Sánchez-Ramos, I. Prieto-Arroyo, P. Urbánek, H. Steinbrenner, e M. Monsalve. 2015. “Redox Regulation of FoxO Transcription Factors”. *Redox Biology* 6 (dezembro):51–72. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.019>.
- Kourie, J.I. 1998. “Interaction of Reactive Oxygen Species with Ion Transport Mechanisms”. *American Journal of Physiology* 275 (1 Pt 1):C1-24.
- Kowaltowski, A.J., N.C. Souza-Pinto, R.F. Castilho, e A.E. Vercesi. 2009. “Mitochondria and Reactive Oxygen Species”. *Free Radical Biology & Medicine* 47 (4):333–43. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004>.
- Kristensen, T., B.O. Rosseland, A. Kiessling, B. Djordevic, e J.C. Massabau. 2010. “Lack of Arterial PO₂ Downregulation in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) during Long-Term Normoxia and Hyperoxia”. *Fish Physiology and Biochemistry* 36 (4):1087–95. <https://doi.org/10.1007/s10695-010-9386-7>.
- Krivoruchko, A., e K.B. Storey. 2010. “Molecular Mechanisms of Turtle Anoxia Tolerance: A Role for NF-κB”. *Gene* 450 (1–2):63–69. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.10.005>.
- Krogh, A. 1959. *The Comparative Physiology of Respiratory Mechanisms*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press.
- Kuijk, F.J.G.M. van, A. Sevanian, G.J. Handelman, e E.A. Dratz. 1987. “A New Role for Phospholipase A2: Protection of Membranes from Lipid Peroxidation Damage”. *Trends in Biochemical Sciences* 12 (janeiro):31–34. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(87\)90014-4](https://doi.org/10.1016/0968-0004(87)90014-4).
- Lampert, W., e U. Sommer. 2007. *Limnoecology*. 2nd ed. Oxford: New York: Oxford University Press Inc.
- Lando, D., D.J. Peet, J.J. Gorman, D.A. Whelan, M.L. Whitelaw, e R.K. Bruick. 2002. “FIH-1 Is an Asparaginyl Hydroxylase Enzyme That Regulates the Transcriptional Activity of Hypoxia-Inducible Factor”. *Genes & Development* 16 (12):1466–71. <https://doi.org/10.1101/gad.991402>.
- Larson, J., K.L. Drew, L.P. Folkow, S.L. Milton, e T.J. Park. 2014. “No Oxygen? No Problem! Intrinsic Brain Tolerance to Hypoxia in Vertebrates”. *The Journal of Experimental Biology* 217 (Pt 7):1024–39. <https://doi.org/10.1242/jeb.085381>.
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson, e M.M. Cox. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th ed. New York: W.H. Freeman.
- Leon, J., K. Sakumi, E. Castillo, Z. Sheng, S. Oka, e Y. Nakabeppu. 2016. “8-Oxoguanine Accumulation in Mitochondrial DNA Causes Mitochondrial Dysfunction and Impairs Neuritogenesis in Cultured Adult Mouse Cortical Neurons under Oxidative Conditions”. *Scientific Reports* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/srep22086>.

- Letendre, J., B. Chouquet, B. Rocher, H. Manduzio, F. Leboulenger, e F. Durand. 2008. "Differential Pattern of Cu/Zn Superoxide Dismutase Isoforms in Relation to Tidal Spatio-Temporal Changes in the Blue Mussel *Mytilus edulis*". *Comparative Biochemistry and Physiology C* 148 (3):211–16. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.05.012>.
- Leveelahti, L., K.T. Rytönen, G.M.C. Renshaw, e M. Nikinmaa. 2014. "Revisiting Redox-Active Antioxidant Defenses in Response to Hypoxic Challenge in Both Hypoxia-Tolerant and Hypoxia-Sensitive Fish Species". *Fish Physiology and Biochemistry* 40 (1):183–91. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9835-1>.
- Lighton, J.R.B. 2008. *Measuring Metabolic Rates: a Manual for Scientists*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Lipton, P. 1999. "Ischemic Cell Death in Brain Neurons". *Physiological Reviews* 79 (4):1431–1568.
- Lopert, P., e M. Patel. 2014. "Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (Nnt) Links the Substrate Requirement in Brain Mitochondria for Hydrogen Peroxide Removal to the Thioredoxin/Peroxiredoxin (Trx/Prx) System". *The Journal of Biological Chemistry* 289 (22):15611–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.533653>.
- Lopes, A.R., K. Trübenbach, T. Teixeira, V.M. Lopes, V. Pires, M. Baptista, T. Repolho, R. Calado, M. Diniz, e R. Rosa. 2013. "Oxidative Stress in Deep Scattering Layers: Heat Shock Response and Antioxidant Enzymes Activities of Myctophid Fishes Thriving in Oxygen Minimum Zones". *Deep Sea Research* 182 (dezembro):10–16. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2013.07.014>.
- Love, S. 1999. "Oxidative Stress in Brain Ischemia". *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 9 (1):119–31.
- Lu, Shelly C. 2013. "Glutathione Synthesis". *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (5):3143–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>.
- Lushchak, V.I., e T.V. Bagnyukova. 2006. "Effects of Different Environmental Oxygen Levels on Free Radical Processes in Fish". *Comparative Biochemistry and Physiology B* 144 (3):283–89. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.014>.
- . 2007. "Hypoxia Induces Oxidative Stress in Tissues of a Goby, the Rotan *Perccottus glenii*". *Comparative Biochemistry and Physiology B* 148 (4):390–97. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.07.007>.
- Lushchak, V.I., T.V. Bagnyukova, O.V. Lushchak, J.M. Storey, e K.B. Storey. 2005. "Hypoxia and Recovery Perturb Free Radical Processes and Antioxidant Potential in Common Carp (*Cyprinus carpio*) Tissues". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (6):1319–30. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.006>.
- Lushchak, V.I., L.P. Lushchak, A.A. Mota, e M. Hermes-Lima. 2001. "Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Goldfish *Carassius auratus* during Anoxia and Reoxygenation". *American Journal of Physiology* 280 (1):R100-107.
- Lutgens, F.K., e E.J. Tarbuck. 2015. *Essentials of Geology*. Twelfth edition. Boston: Pearson.
- Lyons, T.W., C.T. Reinhard, e N.J. Planavsky. 2014. "The Rise of Oxygen in Earth's Early Ocean and Atmosphere". *Nature* 506 (7488):307–15. <https://doi.org/10.1038/nature13068>.
- Mahadev, K., X. Wu, A. Zilbering, L. Zhu, J.T. Lawrence, e B.J. Goldstein. 2001. "Hydrogen Peroxide Generated during Cellular Insulin Stimulation Is Integral to Activation of the Distal Insulin Signaling Cascade in 3T3-L1 Adipocytes".

- The Journal of Biological Chemistry* 276 (52):48662–69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105061200>.
- Malard, F., e F. Hervant. 1999. “Oxygen Supply and the Adaptations of Animals in Groundwater”. *Freshwater Biology* 41 (1):1–30. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1999.00379.x>.
- Malik, A.I., e K.B. Storey. 2011. “Transcriptional Regulation of Antioxidant Enzymes by FoxO1 under Dehydration Stress”. *Gene* 485 (2):114–19. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.014>.
- Mantle, B.L., H. Guderley, N.J. Hudson, e C.E. Franklin. 2010. “Enzyme Activity in the Aestivating Green-Striped Burrowing Frog (*Cyclorana alboguttata*)”. *Journal of Comparative Physiology B* 180 (7):1033–43. <https://doi.org/10.1007/s00360-010-0471-0>.
- Marinho, H. S., C. Real, L. Cyrne, H. Soares, e F. Antunes. 2014. “Hydrogen Peroxide Sensing, Signaling and Regulation of Transcription Factors”. *Redox Biology* 2:535–62. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.006>.
- Marshall, C., A.J. Mamary, A.J. Verhoeven, e B.E. Marshall. 1996. “Pulmonary Artery NADPH-Oxidase Is Activated in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction”. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 15 (5):633–44. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.15.5.8918370>.
- McClanahan, L. 1967. “Adaptations of the Spadefoot Toad, *Scaphiopus couchii*, to Desert Environments”. *Comparative Biochemistry and Physiology* 20:73–99.
- McMahon, M., N. Thomas, K. Itoh, M. Yamamoto, e J.D. Hayes. 2004. “Redox-Regulated Turnover of Nrf2 Is Determined by at Least Two Separate Protein Domains, the Redox-Sensitive Neh2 Degron and the Redox-Insensitive Neh6 Degron”. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (30):31556–67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403061200>.
- Meir, J.U., C.D. Champagne, D.P. Costa, C.L. Williams, e P.J. Ponganis. 2009. “Extreme Hypoxemic Tolerance and Blood Oxygen Depletion in Diving Elephant Seals”. *American Journal of Physiology* 297 (4):R927–939. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00247.2009>.
- Meredith, M.J., e D.J. Reed. 1982. “Status of the Mitochondrial Pool of Glutathione in the Isolated Hepatocyte”. *The Journal of Biological Chemistry* 257 (7):3747–53.
- Messina, J.P., e D.A. Lawrence. 1989. “Cell Cycle Progression of Glutathione-Depleted Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Is Inhibited at S Phase”. *Journal of Immunology* 143 (6):1974–81.
- Milton, S.L., G. Nayak, S. Kesaraju, L. Kara, e H.M. Prentice. 2007. “Suppression of Reactive Oxygen Species Production Enhances Neuronal Survival in Vitro and in Vivo in the Anoxia-Tolerant Turtle *Trachemys scripta*”. *Journal of Neurochemistry* 101 (4):993–1001. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04466.x>.
- Mitchell, P. 1961. “Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism”. *Nature* 191 (julho):144–48.
- Moreira, D.C., M.F. Oliveira, L. Liz-Guimarães, N. Diniz-Rojas, É.G. Campos, e M. Hermes-Lima. 2017. “Current Trends and Research Challenges Regarding ‘Preparation for Oxidative Stress’”. *Frontiers in Physiology* 8 (setembro). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00702>.
- Moreira, D.C., L.P.R. Venancio, M.A.C.T. Sabino, e M. Hermes-Lima. 2016. “How Widespread Is Preparation for Oxidative Stress in the Animal Kingdom?”

- Comparative Biochemistry and Physiology A* 200 (outubro):64–78. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.023>.
- Morgan, M.J., e Z.G. Liu. 2011. “Crosstalk of Reactive Oxygen Species and NF- κ B Signaling”. *Cell Research* 21 (1):103–15. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>.
- Morin, P., e K.B. Storey. 2006. “Evidence for a Reduced Transcriptional State during Hibernation in Ground Squirrels”. *Cryobiology* 53 (3):310–18. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.08.002>.
- Muir, T.J., J.P. Costanzo, e R.E. Lee. 2007. “Osmotic and Metabolic Responses to Dehydration and Urea-Loading in a Dormant, Terrestrially Hibernating Frog”. *Journal of Comparative Physiology B* 177 (8):917–26. <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0190-3>.
- Munro, D., e J.R. Treberg. 2017. “A Radical Shift in Perspective: Mitochondria as Regulators of Reactive Oxygen Species”. *The Journal of Experimental Biology* 220 (Pt 7):1170–80. <https://doi.org/10.1242/jeb.132142>.
- Murphy, M.P. 2009. “How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species”. *Biochemical Journal* 417 (1):1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
- Mustacich, D., e G. Powis. 2000. “Thioredoxin Reductase”. *The Biochemical Journal* 346 Pt 1 (fevereiro):1–8.
- Mustafa, S.A., S.N. Al-Subiai, S.J. Davies, e A.N. Jha. 2011. “Hypoxia-Induced Oxidative DNA Damage Links with Higher Level Biological Effects Including Specific Growth Rate in Common Carp, *Cyprinus carpio* L.” *Ecotoxicology* 20 (6):1455–66. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0702-5>.
- Muusze, B., J. Marcon, G. van den Thillart, e V. Almeida-Val. 1998. “Hypoxia Tolerance of Amazon Fish: Respirometry and Energy Metabolism of the Cichlid *Astronotus ocellatus*”. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 120 (1):151–56. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10023-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10023-5).
- Nathaniel, T.I., A. Williams-Hernandez, A.L. Hunter, C. Liddy, D.M. Peffley, F.E. Umesiri, e A. Imeh-Nathaniel. 2015. “Tissue Hypoxia during Ischemic Stroke: Adaptive Clues from Hypoxia-Tolerant Animal Models”. *Brain Research Bulletin* 114 (maio):1–12. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.02.006>.
- Navas, C.A., M.M. Antoniazzi, e C. Jared. 2004. “A Preliminary Assessment of Anuran Physiological and Morphological Adaptation to the Caatinga, a Brazilian Semi-Arid Environment”. *International Congress Series* 1275 (dezembro):298–305. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2004.08.061>.
- Navas, C.A., e J.E. Carvalho, orgs. 2010. *Aestivation: Molecular and Physiological Aspects*. Progress in molecular and subcellular biology 49. Berlin ; New York: Springer.
- Nayak, G., H.M. Prentice, e S.L. Milton. 2016. “Lessons from Nature: Signalling Cascades Associated with Vertebrate Brain Anoxic Survival”. *Experimental Physiology* 101 (9):1185–90. <https://doi.org/10.1113/EP085673>.
- Neumann, C.A., J. Cao, e Y. Manevich. 2009. “Peroxioredoxin 1 and Its Role in Cell Signaling”. *Cell Cycle* 8 (24):4072–78. <https://doi.org/10.4161/cc.8.24.10242>.
- Ney, P.A. 2015. “Mitochondrial Autophagy: Origins, Significance, and Role of BNIP3 and NIX”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1853 (10):2775–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.022>.
- Niki, E., e Y. Yoshida. 2011. “Linoleic Acid Oxidation Products as Biomarkers of Oxidative Stress *in vivo*”. In *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, organizado por Doris Abele, José Pablo Vázquez-Medina, e Tania Zenteno-Savín, 412–19. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444345988.ch31>.

- Nikolaidis, M.G., A. Kyparos, C. Spanou, V. Paschalis, A.A. Theodorou, e I.S. Vrabas. 2012. "Redox Biology of Exercise: An Integrative and Comparative Consideration of Some Overlooked Issues". *The Journal of Experimental Biology* 215 (10):1615–25. <https://doi.org/10.1242/jeb.067470>.
- Nilsson, L.O., A. Gustafsson, e B. Mannervik. 2000. "Redesign of Substrate-Selectivity Determining Modules of Glutathione Transferase A1-1 Installs High Catalytic Efficiency with Toxic Alkenal Products of Lipid Peroxidation". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (17):9408–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.150084897>.
- Nimer, E. 1972. "Climatologia da região nordeste do Brasil". *Revista Brasileira de Geografia* 34 (2):3–51.
- Niture, S.K., R. Khatri, e A.K. Jaiswal. 2014. "Regulation of Nrf2—an Update". *Free Radical Biology and Medicine* 66 (janeiro):36–44. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008>.
- Oien, D.B., e J. Moskovitz. 2007. "Substrates of the Methionine Sulfoxide Reductase System and Their Physiological Relevance". In *Current Topics in Developmental Biology*, 80:93–133. Elsevier [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(07\)80003-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(07)80003-2).
- Oliveira, U.O., A. Belló-Klein, e L.C. Kucharski. 2006. "Oxidative Balance and Immunodetection of Antioxidant Enzymes in the Hepatopancreas of the Crab *Chasmagnathus granulata* Subjected to Anoxia and Reoxygenation". *Canadian Journal of Zoology* 84 (5):677–84. <https://doi.org/10.1139/z06-041>.
- Oliveira-Marques, V., H. Susana Marinho, L. Cyrne, e F. Antunes. 2009. "Role of Hydrogen Peroxide in NF- κ B Activation: From Inducer to Modulator". *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (9):2223–43. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2601>.
- Olsvik, P.A., T. Kristensen, R. Waagbø, K.E. Tollefsen, B.O. Rosseland, e H. Tøften. 2006. "Effects of Hypo- and Hyperoxia on Transcription Levels of Five Stress Genes and the Glutathione System in Liver of Atlantic Cod *Gadus morhua*". *The Journal of Experimental Biology* 209 (Pt 15):2893–2901. <https://doi.org/10.1242/jeb.02320>.
- Page, M.M., K.D. Salway, Y.K. Ip, S.F. Chew, S.A. Warren, J.S. Ballantyne, e J.A. Stuart. 2010. "Upregulation of Intracellular Antioxidant Enzymes in Brain and Heart during Estivation in the African Lungfish *Protopterus dolloi*". *Journal of Comparative Physiology B* 180 (3):361–69. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0416-7>.
- Paglia, D.E., e W.N. Valentine. 1967. "Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase". *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70 (1):158–69.
- Pakay, J.L., A.A. Hobbs, S.R. Kimball, e M. Guppy. 2003. "The Role of Eukaryotic Initiation Factor 2 α during the Metabolic Depression Associated with Estivation". *The Journal of Experimental Biology* 206 (14):2363–71. <https://doi.org/10.1242/jeb.00422>.
- Paky, A., J.R. Michael, T.M. Burke-Wolin, M.S. Wolin, e G.H. Gurtner. 1993. "Endogenous Production of Superoxide by Rabbit Lungs: Effects of Hypoxia or Metabolic Inhibitors". *Journal of Applied Physiology* 74 (6):2868–74.
- Pamplona, R., e D. Costantini. 2011. "Molecular and Structural Antioxidant Defenses against Oxidative Stress in Animals". *American Journal of Physiology* 301 (4):R843-863. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00034.2011>.

- Pandolfi, P.P., F. Sonati, R. Rivi, P. Mason, F. Grosveld, e L. Luzzatto. 1995. "Targeted Disruption of the Housekeeping Gene Encoding Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD): G6PD Is Dispensable for Pentose Synthesis but Essential for Defense against Oxidative Stress". *The EMBO Journal* 14 (21):5209–15.
- Paoletti, F., D. Aldinucci, A. Mocali, e A. Caparrini. 1986. "A Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Superoxide Dismutase Activity in Tissue Extracts". *Analytical Biochemistry* 154 (2):536–41.
- Paulmier, A., e D. Ruiz-Pino. 2009. "Oxygen Minimum Zones (OMZs) in the Modern Ocean." *Progress in Oceanography* 80 (3–4):113–28. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2008.08.001>.
- Peacock, A.J. 1998. "ABC of Oxygen: Oxygen at High Altitude". *BMJ (Clinical Research Ed.)* 317 (7165):1063–66.
- Pereira, I.C. 2009. "Aspectos fisiológicos e ecológicos da estivação em *Pleurodema diploistris* (Leiuperidae/Anura)". Dissertação, Universidade de São Paulo.
- . 2016. "Estratégias fisiológicas e comportamentais em anuros no semiárido: implicações sobre o balanço energético e hídrico". Tese, Universidade de São Paulo.
- Pérez-Jiménez, A., H. Peres, V.C. Rubio, e A. Oliva-Teles. 2012. "The Effect of Hypoxia on Intermediary Metabolism and Oxidative Status in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Fed on Diets Supplemented with Methionine and White Tea". *Comparative Biochemistry and Physiology C* 155 (3):506–16. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.005>.
- Pérez-Pinzón, M.A., M. Rosenthal, T.J. Sick, P.L. Lutz, J. Pablo, e D. Mash. 1992. "Downregulation of Sodium Channels during Anoxia: A Putative Survival Strategy of Turtle Brain". *American Journal of Physiology* 262 (4 Pt 2):R712–715.
- Poole, L.B., A. Hall, e K.J. Nelson. 2011. "Overview of Peroxiredoxins in Oxidant Defense and Redox Regulation". In *Current Protocols in Toxicology*, organizado por James S. Bus, Lucio G. Costa, Ernest Hodgson, David A. Lawrence, e Donald J. Reed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0709s49>.
- Poot, M., H. Teubert, P.S. Rabinovitch, e T.J. Kavanagh. 1995. "De Novo Synthesis of Glutathione Is Required for Both Entry into and Progression through the Cell Cycle". *Journal of Cellular Physiology* 163 (3):555–60. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041630316>.
- Porteus, C., M.S. Hedrick, J.W. Hicks, T. Wang, e W.K. Milsom. 2011. "Time Domains of the Hypoxic Ventilatory Response in Ectothermic Vertebrates". *Journal of Comparative Physiology B* 181 (3):311–33. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0554-6>.
- Powell, F.L., W.K. Milsom, e G.S. Mitchell. 1998. "Time Domains of the Hypoxic Ventilatory Response". *Respiration Physiology* 112 (2):123–34.
- Prado, D.E. 2003. "As Caatingas da América do Sul". In *Ecologia e conservação da Caatinga*.
- Qiu, X., K. Brown, M.D. Hirschey, E. Verdin, e D. Chen. 2010. "Calorie Restriction Reduces Oxidative Stress by SIRT3-Mediated SOD2 Activation". *Cell Metabolism* 12 (6):662–67. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.11.015>.
- Quinlan, C.L., R.L.S. Goncalves, M. Hey-Mogensen, N. Yadava, V.I. Bunik, e M.D. Brand. 2014. "The 2-Oxoacid Dehydrogenase Complexes in Mitochondria Can Produce Superoxide/Hydrogen Peroxide at Much Higher Rates than Complex

- l". *The Journal of Biological Chemistry* 289 (12):8312–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545301>.
- Quinlan, C.L., A.L. Orr, I.V. Perevoshchikova, J.R. Treberg, B.A. Ackrell, e M.D. Brand. 2012. "Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse Reactions". *The Journal of Biological Chemistry* 287 (32):27255–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374629>.
- Rabalais, N.N., R.E. Turner, e W.J. Wiseman. 2002. "Gulf of Mexico Hypoxia, A.K.A. 'The Dead Zone'". *Annual Review of Ecology and Systematics* 33 (1):235–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150513>.
- Rabilloud, T., M. Heller, M.P. Rigobello, A. Bindoli, R. Aebersold, e J. Lunardi. 2001. "The Mitochondrial Antioxidant Defence System and Its Response to Oxidative Stress". *Proteomics* 1 (9):1105–10. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200109\)1:9<1105::AID-PROT1105>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200109)1:9<1105::AID-PROT1105>3.0.CO;2-M).
- Radi, R., J.F. Turrens, L.Y. Chang, K.M. Bush, J.D. Crapo, e B.A. Freeman. 1991. "Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondria". *The Journal of Biological Chemistry* 266 (32):22028–34.
- Ramirez, J.M., L.P. Folkow, e A.S. Blix. 2007. "Hypoxia Tolerance in Mammals and Birds: From the Wilderness to the Clinic". *Annual Review of Physiology* 69 (1):113–43. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.163111>.
- Ramos-Vasconcelos, G.R., L.A. Cardoso, e M. Hermes-Lima. 2005. "Seasonal Modulation of Free Radical Metabolism in Estivating Land Snails *Helix aspersa*". *Comparative Biochemistry and Physiology C* 140 (2):165–74. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.015>.
- Ramos-Vasconcelos, G.R., e M. Hermes-Lima. 2003. "Hypometabolism, Antioxidant Defenses and Free Radical Metabolism in the Pulmonate Land Snail *Helix aspersa*". *The Journal of Experimental Biology* 206 (Pt 4):675–85.
- Reilly, B.D., e C.E. Franklin. 2016. "Prevention of Muscle Wasting and Osteoporosis: The Value of Examining Novel Animal Models". *The Journal of Experimental Biology* 219 (Pt 17):2582–95. <https://doi.org/10.1242/jeb.128348>.
- Reilly, B.D., A.J.R. Hickey, R.L. Cramp, e C E. Franklin. 2014. "Decreased Hydrogen Peroxide Production and Mitochondrial Respiration in Skeletal Muscle but Not Cardiac Muscle of the Green-Striped Burrowing Frog, a Natural Model of Muscle Disuse". *The Journal of Experimental Biology* 217 (7):1087–93. <https://doi.org/10.1242/jeb.096834>.
- Reilly, B.D., D.I. Schlipalius, R.L. Cramp, P.R. Ebert, e C.E. Franklin. 2013. "Frogs and Estivation: Transcriptional Insights into Metabolism and Cell Survival in a Natural Model of Extended Muscle Disuse". *Physiological Genomics* 45 (10):377–88. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00163.2012>.
- Reischl, E. 1986. "High Sulfhydryl Content in Turtle Erythrocytes: Is There a Relation with Resistance to Hypoxia?" *Comparative Biochemistry and Physiology B* 85 (4):723–26.
- Rena, G., A.R. Prescott, S. Guo, P. Cohen, e T.G. Unterman. 2001. "Roles of the Forkhead in Rhabdomyosarcoma (FKHR) Phosphorylation Sites in Regulating 14-3-3 Binding, Transactivation and Nuclear Targetting". *The Biochemical Journal* 354 (Pt 3):605–12.
- Rhee, S.G., Y.S. Bae, S.R. Lee, e J. Kwon. 2000. "Hydrogen Peroxide: A Key Messenger That Modulates Protein Phosphorylation through Cysteine Oxidation". *Science's Signal Transduction Knowledge Environment* 2000 (53):pe1. <https://doi.org/10.1126/stke.2000.53.pe1>.

- Rhee, S.G., H.Z. Chae, e K. Kim. 2005. "Peroxiredoxins: A Historical Overview and Speculative Preview of Novel Mechanisms and Emerging Concepts in Cell Signaling". *Free Radical Biology & Medicine* 38 (12):1543–52. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.026>.
- Rhee, S.G., K.S. Yang, S.W. Kang, H.A. Woo, e T.S. Chang. 2005. "Controlled Elimination of Intracellular H₂O₂: Regulation of Peroxiredoxin, Catalase, and Glutathione Peroxidase via Post-Translational Modification". *Antioxidants & Redox Signaling* 7 (5–6):619–26. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.619>.
- Ribas, V., C. García-Ruiz, e J.C. Fernandez-Checa. 2014. "Glutathione and mitochondria". *Frontiers in Pharmacology* 5 (julho). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00151>.
- Richier, S., P.L. Merle, P. Furla, D. Pigozzi, F. Sola, e D. Allemand. 2003. "Characterization of Superoxide Dismutases in Anoxia- and Hyperoxia-Tolerant Symbiotic Cnidarians". *Biochimica et Biophysica Acta* 1621 (1):84–91. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00049-7).
- Riddles, P.W., R.L. Blakeley, e B. Zerner. 1983. "Reassessment of Ellman's Reagent". *Methods in Enzymology* 91:49–60.
- Rivera-Ingraham, G.A., U. Bickmeyer, e D. Abele. 2013. "The Physiological Response of the Marine Platyhelminth *Macrostomum lignano* to Different Environmental Oxygen Concentrations". *The Journal of Experimental Biology* 216 (Pt 14):2741–51. <https://doi.org/10.1242/jeb.081984>.
- Rivera-Ingraham, G.A., I. Rocchetta, S. Meyer, e D. Abele. 2013. "Oxygen Radical Formation in Anoxic Transgression and Anoxia-Reoxygenation: Foe or Phantom? Experiments with a Hypoxia Tolerant Bivalve". *Marine Environmental Research* 92 (dezembro):110–19. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.09.007>.
- Roberts, L.J., e J.D. Morrow. 2000. "Measurement of F(2)-Isoprostanes as an Index of Oxidative Stress in Vivo". *Free Radical Biology & Medicine* 28 (4):505–13.
- Rolfe, D.F., e G.C. Brown. 1997. "Cellular Energy Utilization and Molecular Origin of Standard Metabolic Rate in Mammals". *Physiological Reviews* 77 (3):731–58.
- Ruf, T., e F. Geiser. 2015. "Daily Torpor and Hibernation in Birds and Mammals: Daily Torpor and Hibernation". *Biological Reviews* 90 (3):891–926. <https://doi.org/10.1111/brv.12137>.
- Sabino, M.A.C.T., F.T.B. Kuzniewski, D.C. Moreira, O.V. Furtado-Filho, L.P. Rios, C.A. Freire, R. Angelini, e M. Hermes-Lima. 2017. "Metabolismo redox do mexilhão *Brachidontes solisianus* (Mytilidae) no ambiente entremarés no sul do brasil – antioxidantes enzimáticos". *XXXII Reunião Anual da FeSBE*, 2017.
- Salvi, M., Valentina Battaglia, Anna Maria Brunati, Nicoletta La Rocca, Elena Tibaldi, Paola Pietrangeli, Lucia Marcocci, Bruno Mondovì, Carlo A. Rossi, e Antonio Toninello. 2007. "Catalase Takes Part in Rat Liver Mitochondria Oxidative Stress Defense". *The Journal of Biological Chemistry* 282 (33):24407–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701589200>.
- Schafer, F. Q., e G. R. Buettner. 2001. "Redox Environment of the Cell as Viewed through the Redox State of the Glutathione Disulfide/Glutathione Couple". *Free Radical Biology & Medicine* 30 (11):1191–1212.
- Schmidt-Nielsen, K. 2013. *Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente*. <http://site.ebrary.com/id/10849765>.
- Scialò, F., D.J. Fernández-Ayala, e A. Sanz. 2017. "Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease". *Frontiers in Physiology* 8 (junho). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00428>.

- Semenza, G.L. 2007. "Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Pathway". *Science's Signal Transduction Knowledge Environment* 2007 (407):cm8. <https://doi.org/10.1126/stke.4072007cm8>.
- Semenza, G.L. 2012. "Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine". *Cell* 148 (3):399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.021>.
- Sen Gupta, B.K., e M.L. Machain-Castillo. 1993. "Benthic Foraminifera in Oxygen-Poor Habitats". *Marine Micropaleontology* 20 (3–4):183–201. [https://doi.org/10.1016/0377-8398\(93\)90032-S](https://doi.org/10.1016/0377-8398(93)90032-S).
- Sena, L.A., e N.S. Chandel. 2012. "Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species". *Molecular Cell* 48 (2):158–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>.
- Serviddio, G., N. Di Venosa, A. Federici, D. D'Agostino, T. Rollo, F. Prigigallo, E. Altomare, T. Fiore, e G. Vendemiale. 2005. "Brief Hypoxia before Normoxic Reperfusion (Postconditioning) Protects the Heart against Ischemia-Reperfusion Injury by Preventing Mitochondria Peroxyde Production and Glutathione Depletion". *FASEB Journal* 19 (3):354–61. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2338com>.
- Seymour, R.S. 1973. "Energy Metabolism of Dormant Spadefoot Toads (*Scaphiopus*)". *Copeia* 3:435–45.
- Shackelford, R.E., W.K. Kaufmann, e R.S. Paules. 2000. "Oxidative Stress and Cell Cycle Checkpoint Function". *Free Radical Biology & Medicine* 28 (9):1387–1404.
- Shaw, J.P., e I.N. Chou. 1986. "Elevation of Intracellular Glutathione Content Associated with Mitogenic Stimulation of Quiescent Fibroblasts". *Journal of Cellular Physiology* 129 (2):193–98. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041290210>.
- Sies, H., org. 1991. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. London: Academic Press.
- . 2017. "Hydrogen Peroxide as a Central Redox Signaling Molecule in Physiological Oxidative Stress: Oxidative Eustress". *Redox Biology* 11 (abril):613–19. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>.
- Silva, G.S.F., H. Giusti, A.P. Sanchez, J.M. Carmo, e M.L. Glass. 2008. "Aestivation in the South American Lungfish, *Lepidosiren paradoxa*: Effects on Cardiovascular Function, Blood Gases, Osmolality and Leptin Levels". *Respiratory Physiology & Neurobiology* 164 (3):380–85. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.08.009>.
- Siomek, A. 2012. "NF-κB Signaling Pathway and Free Radical Impact". *Acta Biochimica Polonica* 59 (3):323–31.
- Skulachev, V.P. 1998. "Cytochrome c in the Apoptotic and Antioxidant Cascades". *FEBS Letters* 423 (3):275–80.
- Snedden, W., K. LeDez, e H.J. Manson. 1996. "A New Method for the Measurement of Gas Solubility". *Journal of Applied Physiology* 80 (4):1371–78.
- Somero, G.N., B.L. Lockwood, e L. Tomanek. 2016. *Biochemical Adaptation: Response to Environmental Challenges, from Life's Origins to the Anthropocene*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, INC. Publishers.
- Spicer, J.I. 2014. "What Can an Ecophysiological Approach Tell Us about the Physiological Responses of Marine Invertebrates to Hypoxia?" *The Journal of Experimental Biology* 217 (1):46–56. <https://doi.org/10.1242/jeb.090365>.

- Spickett, C.M. 2013. "The Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2-Nonenal: Advances in Chemistry and Analysis". *Redox Biology* 1 (1):145–52. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.007>.
- Srere, P.A. 1969. "Citrate Synthase". *Methods in Enzymology* 13:3–11. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(69\)13005-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(69)13005-0).
- Stadtman, E.R., J. Moskovitz, e R.L. Levine. 2003. "Oxidation of Methionine Residues of Proteins: Biological Consequences". *Antioxidants & Redox Signaling* 5 (5):577–82. <https://doi.org/10.1089/152308603770310239>.
- Stanton, R.C. 2012. "Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival". *IUBMB Life* 64 (5):362–69. <https://doi.org/10.1002/iub.1017>.
- Starkov, A.A. 2008. "The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147 (1):37–52. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.015>.
- Steenken, S., e S.V. Jovanovic. 1997. "How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution". *Journal of the American Chemical Society* 119 (3):617–18. <https://doi.org/10.1021/ja962255b>.
- Storey, K.B. 2002. "Life in the Slow Lane: Molecular Mechanisms of Estivation". *Comparative Biochemistry and Physiology A* 133 (3):733–54.
- . 2004. "Biochemical Adaptation". In *Functional Metabolism*, organizado por K. B. Storey, 383–413. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/047167558X.ch14>.
- . 2015. "Regulation of Hypometabolism: Insights into Epigenetic Controls". *The Journal of Experimental Biology* 218 (Pt 1):150–59. <https://doi.org/10.1242/jeb.106369>.
- Storey, K.B., J.M. Storey, S.P. Brooks, T.A. Churchill, e R.J. Brooks. 1988. "Hatchling Turtles Survive Freezing during Winter Hibernation". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (21):8350–54.
- Storey, K.B., e J.M. Storey. 2007. "Tribute to P. L. Lutz: Putting Life on 'Pause'--Molecular Regulation of Hypometabolism". *The Journal of Experimental Biology* 210 (Pt 10):1700–1714. <https://doi.org/10.1242/jeb.02716>.
- . 2011. "Heat Shock Proteins and Hypometabolism: Adaptive Strategy for Proteome Preservation". *Research and Reports in Biology*, março, 57. <https://doi.org/10.2147/RRB.S13351>.
- . 2012. "Aestivation: Signaling and Hypometabolism". *The Journal of Experimental Biology* 215 (Pt 9):1425–33. <https://doi.org/10.1242/jeb.054403>.
- Suarez, R.K., e C.D. Moyes. 2012. "Metabolism in the Age of 'Omes'". *The Journal of Experimental Biology* 215 (14):2351–57. <https://doi.org/10.1242/jeb.059725>.
- Sussarellu, R., C. Fabioux, G.L. Moullac, E. Fleury, e D. Moraga. 2010. "Transcriptomic Response of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* to Hypoxia". *Marine Genomics* 3 (3–4):133–43. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2010.08.005>.
- Suzuki, T., e M. Yamamoto. 2015. "Molecular Basis of the Keap1–Nrf2 System". *Free Radical Biology & Medicine* 88 (novembro):93–100. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006>.
- Thannickal, V.J., e B.L. Fanburg. 2000. "Reactive Oxygen Species in Cell Signaling". *American Journal of Physiology* 279 (6):L1005-1028.
- Tietze, F. 1969. "Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues". *Analytical Biochemistry* 27 (3):502–22.

- Toien, O, K.L. Drew, M.L. Chao, e M.E. Rice. 2001. "Ascorbate Dynamics and Oxygen Consumption during Arousal from Hibernation in Arctic Ground Squirrels". *American Journal of Physiology* 281 (2):R572-583.
- Toledo, L.F., e R.F. Batista. 2012. "Integrative Study of Brazilian Anurans: Geographic Distribution, Size, Environment, Taxonomy, and Conservation". *Biotropica* 44 (6):785–792. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2012.00866.x>.
- Trasviña-Arenas, C.H., A. Garcia-Triana, A.B. Peregrino-Uriarte, e G. Yepiz-Plascencia. 2013. "White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Catalase: Gene Structure, Expression and Activity under Hypoxia and Reoxygenation". *Comparative Biochemistry and Physiology B* 164 (1):44–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2012.10.004>.
- Turrens, J.F. 2003. "Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species". *The Journal of Physiology* 552 (Pt 2):335–44. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>.
- Turrens, J.F., A. Alexandre, e A.L. Lehninger. 1985. "Ubisemiquinone Is the Electron Donor for Superoxide Formation by Complex III of Heart Mitochondria". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 237 (2):408–14.
- Turrens, J.F., e A. Boveris. 1980. "Generation of Superoxide Anion by the NADH Dehydrogenase of Bovine Heart Mitochondria". *The Biochemical Journal* 191 (2):421–27.
- Uchida, K. 2003. "4-Hydroxy-2-Nonenal: A Product and Mediator of Oxidative Stress". *Progress in Lipid Research* 42 (4):318–43. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00014-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00014-6).
- Ulloa, O., D.E. Canfield, E.F. DeLong, R.M. Letelier, e F.J. Stewart. 2012. "Microbial Oceanography of Anoxic Oxygen Minimum Zones". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (40):15996–3. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205009109>.
- Ursini, F., M. Maiorino, M. Valente, L. Ferri, e C. Gregolin. 1982. "Purification from Pig Liver of a Protein Which Protects Liposomes and Biomembranes from Peroxidative Degradation and Exhibits Glutathione Peroxidase Activity on Phosphatidylcholine Hydroperoxides". *Biochimica et Biophysica Acta* 710 (2):197–211.
- Val, A.L., e V.M.F. de Almeida-Val. 1995. *Fishes of the Amazon and Their Environment: Physiological and Biochemical Aspect*. Berlin; New York: Springer. <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3096540>.
- Val, A.L., P.M. Fearnside, e V.M.F. de Almeida-Val. 2016. "Environmental Disturbances and Fishes in the Amazon: Environment and Fishes in the Amazon". *Journal of Fish Biology* 89 (1):192–93. <https://doi.org/10.1111/jfb.12896>.
- Valle, I., A. Alvarezbarrientos, E. Arza, S. Lamas, e M. Monsalve. 2005. "PGC-1 α Regulates the Mitochondrial Antioxidant Defense System in Vascular Endothelial Cells". *Cardiovascular Research* 66 (3):562–73. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.01.026>.
- Vliet, A., e Y.M.W. Janssen-Heininger. 2014. "Hydrogen Peroxide as a Damage Signal in Tissue Injury and Inflammation: Murderer, Mediator, or Messenger?: Hydrogen Peroxide in Tissue Damage Responses". *Journal of Cellular Biochemistry* 115 (3):427–35. <https://doi.org/10.1002/jcb.24683>.
- Wagner, B.A., S. Venkataraman, e G.R. Buettner. 2011. "The Rate of Oxygen Utilization by Cells". *Free Radical Biology & Medicine* 51 (3):700–712. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.024>.

- Wang, P., H. Chen, H. Qin, S. Sankarapandi, M.W. Becher, P.C. Wong, e J.L. Zweier. 1998. "Overexpression of Human Copper, Zinc-Superoxide Dismutase (SOD1) Prevents Postischemic Injury". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (8):4556–60.
- Wasserman, W.W., e W.E. Fahl. 1997. "Functional Antioxidant Responsive Elements". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (10):5361–66.
- Waypa, G.B., K.A. Smith, e P.T. Schumacker. 2016. "O₂ Sensing, Mitochondria and ROS Signaling: The Fog Is Lifting". *Molecular Aspects of Medicine* 47–48 (março):76–89. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.01.002>.
- Wehr, N.B., e R.L. Levine. 2012. "Quantitation of Protein Carbonylation by Dot Blot". *Analytical Biochemistry* 423 (2):241–45. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.01.031>.
- Weiss, R.F. 1970. "The Solubility of Nitrogen, Oxygen and Argon in Water and Seawater". *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* 17 (4):721–35. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(70\)90037-9](https://doi.org/10.1016/0011-7471(70)90037-9).
- Welker, A.F., D.C. Moreira, É.G. Campos, e M. Hermes-Lima. 2013. "Role of Redox Metabolism for Adaptation of Aquatic Animals to Drastic Changes in Oxygen Availability". *Comparative Biochemistry and Physiology A* 165 (4):384–404. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.003>.
- Welker, A.F., D.C. Moreira, e M. Hermes-Lima. 2016. "Roles of Catalase and Glutathione Peroxidase in the Tolerance of a Pulmonate Gastropod to Anoxia and Reoxygenation". *Journal of Comparative Physiology B* 186 (5):553–68. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-0982-4>.
- Wenger, R.H., e M. Gassmann. 1997. "Oxygen(es) and the Hypoxia-Inducible Factor-1". *Biological Chemistry* 378 (7):609–16.
- Wilhelm Filho, D., M.A. Torres, E. Zaniboni-Filho, e R.C. Pedrosa. 2005. "Effect of Different Oxygen Tensions on Weight Gain, Feed Conversion, and Antioxidant Status in Piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847)". *Aquaculture* 244 (1–4):349–57. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.024>.
- Williams, D.R. 2016. "Earth fact sheet". <https://nssdc.gsfc.nasa.gov/planetary/factsheet/earthfact.html>.
- Withers, P.C. 1993. "Metabolic depression during aestivation in the Australian frogs, *Neobatrachus* and *Cyclorana*". *Australian Journal of Zoology* 41:467–73.
- Withers, P.C., e C.E. Cooper. 2010. "Metabolic Depression: A Historical Perspective". In *Aestivation*, organizado por Carlos A. Navas e José E. Carvalho, 49:1–23. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02421-4_1.
- Wyrski, K. 1962. "The Oxygen Minima in Relation to Ocean Circulation". *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* 9 (1–2):11–23. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(62\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0011-7471(62)90243-7).
- Yan, N., e A. Meister. 1990. "Amino Acid Sequence of Rat Kidney Gamma-Glutamylcysteine Synthetase". *The Journal of Biological Chemistry* 265 (3):1588–93.
- Young, K.M., R.L. Cramp, e C.E. Franklin. 2013. "Each to Their Own: Skeletal Muscles of Different Function Use Different Biochemical Strategies during Aestivation at High Temperature". *The Journal of Experimental Biology* 216 (6):1012–24. <https://doi.org/10.1242/jeb.072827>.
- Zhang, Z., C.W. Liew, D.E. Handy, Y. Zhang, J.A. Leopold, J. Hu, L. Guo, R.N. Kulkarni, J. Loscalzo, e R.C. Stanton. 2010. "High Glucose Inhibits Glucose-6-

- Phosphate Dehydrogenase, Leading to Increased Oxidative Stress and -Cell Apoptosis". *The FASEB Journal* 24 (5):1497–1505. <https://doi.org/10.1096/fj.09-136572>.
- Zweier, J.L., J.T. Flaherty, e M.L. Weisfeldt. 1987. "Direct Measurement of Free Radical Generation Following Reperfusion of Ischemic Myocardium". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (5):1404–7.
- Zweier, J.L., P. Kuppusamy, e G.A. Luty. 1988. "Measurement of Endothelial Cell Free Radical Generation: Evidence for a Central Mechanism of Free Radical Injury in Postischemic Tissues". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (11):4046–50.

APÊNDICE A – Ellagic Acid Inhibits Iron-Mediated Free Radical Formation

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 173 (2017) 910–917



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

Ellagic acid inhibits iron-mediated free radical formation



Luana T. Dalvi^{a,b}, Daniel C. Moreira^a, Roberto Andrade Jr.^a, Janini Ginani^a, Antonio Alonso^c, Marcelo Hermes-Lima^{a,*}

^a Laboratório de Radicais Livres, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

^c Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74690-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2016

Received in revised form 14 October 2016

Accepted 20 October 2016

Available online 21 October 2016

Keywords:

Antioxidant

Free radical

Polyphenol

Iron

Ellagic acid

ABSTRACT

Polyphenols are reported to have some health benefits, which are link to their antioxidant properties. In the case of ellagic acid (EA), there is evidence that it has free radical scavenger properties and that it is able to form complexes with metal ions. However, information on a possible link between the formation of iron-EA complexes and their interference in Haber-Weiss/Fenton reactions was not yet determined. Thus, the present study investigated the *in vitro* antioxidant mechanism of EA in a system containing ascorbate, Fe(III) and different iron ligands (EDTA, citrate and NTA). Iron-mediated oxidative degradation of 2-deoxyribose was poorly inhibited (by 12%) in the presence of EA (50 μ M) and EDTA. When citrate or NTA - which form weak iron complexes - were used, the 2-deoxyribose protection increased to 89–97% and 45%, respectively. EA also presented equivalent inhibitory effects on iron-mediated oxygen uptake and ascorbyl radical formation. Spectral analyses of iron-EA complexes show that EA removes Fe(III) from EDTA within hours, and from citrate within 1 min. This difference in the rate of iron-EA complex formation may explain the antioxidant effects of EA. Furthermore, the EA antioxidant effectiveness was inversely proportional to the Fe(III) concentration, suggesting a competition with EDTA. In conclusion, the results indicate that EA may prevent *in vitro* free radical formation when it forms a complex with iron ions.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polyphenols are widely studied for their antioxidant properties, especially by acting as a free radical scavengers or forming complexes with metal ions [1–3]. Many polyphenols are able to complex metal ions, particularly iron and copper, thereby affecting the ability of these metals to catalyze free radical formation, *via* Haber-Weiss and Fenton reactions. These complexes may behave either as antioxidants or pro-oxidants, depending on factors that have been reviewed by several authors [4–7]. We have previously investigated details of the antioxidant mechanism of pyridoxal isonicotinoyl hydrazine (PIH) and the polyphenols tannic acid (TA) and caffeic acid as metal-chelating compounds [8–12].

We are presently interested in ellagic acid (EA), a polyphenol present in many berries and pomegranate at relatively high concentrations [13,14]. This compound exhibits *anti*-carcinogenic, *anti*-mutagenic and antioxidant activities both *in situ* and *in vivo* [15–17]. Studies performed in cell culture, animal models as well as clinical research showed that EA has beneficial health effects against many oxidative-linked chronic

diseases, including cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases [18–21].

Despite the amount of data amassed in biology on the anti-oxidative stress effects of EA, only few chemical studies have studied the antioxidant activity of EA. These few studies have focused on EA's free radical scavenger capacity. Priyadarsini and coworkers reported the free radical scavenging activity of EA for reactions with azide, DPPH, halocarbonperoxyl and hydroxyl radicals [22]. Recently, Kilic and coworkers confirmed that EA presents DPPH, ABTS, superoxide and H₂O₂ scavenger properties [23]. Moreover, EA is also able to form complexes with several metal ions, including Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Co²⁺ and Cu²⁺ [24,25]. Although the ability of EA to chelate redox-active metal ions has been described, the link between antioxidant activity and this metal chelating capacity has not yet been studied. Such efficient metal complexation could make EA an effective antioxidant by minimizing free radical formation, especially when induced by iron and copper ions, as reported for other polyphenols [7]. For instance, a study involving the kinetics and the stability of metal-EA complexes, especially iron ions, and how they interfere with Haber-Weiss/Fenton reactions has not been made so far. In this work we investigated the possible relationship between the iron-chelating activity of EA and its ability to inhibit *in vitro* oxyradical formation induced by ascorbate and Fe(III). We used iron complexed with EDTA, citrate or nitrilotriacetic acid (NTA) to ensure solubility at the pH used in our assays (pH 7.2) and to mimic

* Corresponding author at: Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, 70910-900 Brasília, DF, Brazil.

E-mail addresses: hermes@unb.br, hermes.unb@gmail.com (M. Hermes-Lima).

APÊNDICE B – Blog Construction as an Effective Tool in Biochemistry Active Learning

Article

Blog Construction as an Effective Tool in Biochemistry Active Learning

Estêvão Cubas
 Rolim†,‡
 Julia Martins de
 Oliveira†,‡
 Luana T. Dalvit
 Daniel C. Moreira†
 Natasha Garcia
 Caldas†,‡
 Felipe Fernandes
 Lobo†,‡
 Démerçon André Polli§
 Élide G. Campost
 Marcelo
 Hermes-Limat*

From the †Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil, ‡Hospital Universitário de Brasília (HUB), Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, §Departamento de Estatística, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil

Abstract

To boost active learning in undergraduate students, they were given the task of preparing blogs on topics of clinical biochemistry. This “experiment” lasted for 12 teaching-semester (from 2008 to 2013), and included a survey on the blogs’ usefulness at the end of each semester. The survey (applied in the 2008-2010 period) used a Likert-like questionnaire with eight questions and a 1-to-6 scale, from “totally disagree” to “fully agree.” Answers of 428 students were analyzed and indicated overall approval of the blog activity: 86% and 35% of the responses scored 4-to-6, respectively.

Considering the survey results, the high grades obtained by students on their blogs (averaging 8.3 in 2008–2010), and the significant increase in average grades of the clinical biochemistry exam after the beginning of the blog system (from 5.5 in 2007 to 6.4 in 2008–2010), we concluded that blogging activity on biochemistry is a promising tool for boosting active learning. © 2016 by The International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 00:000–000, 2016.

Keywords: Education 2.0; active learning; metabolism; medicine; nutrition

Introduction

Weblogs (blogs) are websites that function as online journals and have been serving as a globally widespread communication and discussion tool since the last decade [1, 2]. Even though the most popular blogs are those in which

users add posts about their own lives and experiences, blogs with scientific purposes have become very popular [3]. In 2007, a science blog owner estimated that there were at that time 1,000 to 1,200 science blogs (not considering pseudoscience or computer technology blogs), mostly written by graduate students and postdocs, and to a lesser extent by science teachers and professional journalists [3]—nowadays these numbers are much higher.

Blogs with scientific content are not only a place for presentation and discussion of science, but also as a learning tool for both students and lay citizens [4]. The preparation of scientific blogs by graduate and undergraduate students may enhance and stimulate learning, promote student collaboration, and provide an opportunity for the use of different learning strategies [2–5].

An experience with 60 medical doctors in a Masters course, in which the doctors had to post topics on blogs

Volume 00, Number 00, Month/Month 2016, Pages 00–00

*To whom correspondence should be addressed. Tel.: +55-61-3107-3103. E-mail: hermes@unb.br or hermes.unb@gmail.com
 ECB, JMO, LTD and DCM contributed equally to this work.

ECR and JMO were supported by PIBIC-CNPq studentships. DCM is supported by a PhD scholarship from CAPES-Brazil.

Received 3 February 2016; Revised 6 August 2016; Accepted 8 September 2016

DOI 10.1002/bmb.21028

Published online 00 Month 2016 in Wiley Online Library
 (wileyonlinelibrary.com)

APÊNDICE C – Roles of Catalase and Glutathione Peroxidase in the Tolerance of a Pulmonate Gastropod to Anoxia and Reoxygenation

J Comp Physiol B
DOI 10.1007/s00360-016-0982-4



ORIGINAL PAPER

Roles of catalase and glutathione peroxidase in the tolerance of a pulmonate gastropod to anoxia and reoxygenation

Alexis F. Welker^{1,2} · Daniel C. Moreira¹ · Marcelo Hermes-Lima¹

Received: 3 December 2015 / Revised: 10 March 2016 / Accepted: 19 March 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Humans and most mammals suffer severe damage when exposed to ischemia and reperfusion episodes due to an overproduction of reactive oxygen species (ROS). In contrast, several hypoxia/anoxia-tolerant animals survive very similar situations. We evaluated herein the redox metabolism in the anoxia-tolerant land snail *Helix aspersa* after catalase inhibition by 3-amino-1,2,4-triazole (ATZ) injection during a cycle of wide and abrupt change in oxygen availability. The exposure to anoxia for 5 h caused a change of only one of several parameters related to free radical metabolism: a rise in selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPX) activity in muscle of both saline- and ATZ-injected animals (by 1.9- and 1.8-fold, respectively). Catalase suppression had no effect in animals under normoxia or anoxia. However, during reoxygenation catalase suppression kept high levels of muscle Se-GPX activity (twofold higher than in saline-injected snails up to 30 min reoxygenation) and induced the increase in hepatopancreas SOD activity (by 22 %), indicating higher levels of ROS in both organs than in saline-injected animals. Additionally, catalase-suppressed snails showed 12 % higher levels

of carbonyl protein—a sign of mild oxidative stress—in muscle during reoxygenation than those animals with intact catalase. No changes were observed in glutathione parameters (GSH, GSSG and GSSG:GSH ratio), TBARS, and GST activity in any of the experimental groups, in both organs. These results indicate that catalase inhibition inflicts changes in the free radical metabolism during reoxygenation, prompting a stress-response that is a reorganization in other enzymatic antioxidant defenses to minimize alterations in the redox homeostasis in land snails.

Keywords Free radicals · Glutathione · Hypoxia · Ischemia · Oxidative damage

Introduction

The occurrence of ischemia and reperfusion in mammalian tissues is associated with extensive oxidative damage and it is well known that oxidative injury is caused by overproduction of reactive oxygen species (ROS) (Zweier et al. 1987; Serviddio et al. 2005). However, many hypoxia/anoxia-tolerant animals are able to survive situations analogous to ischemia/reperfusion events, in which higher ROS production is expected, such as during post-hypoxia reoxygenation. The ability of these animals to manage such putative elevated ROS production has been associated with an efficient endogenous antioxidant system, which, in many cases, becomes enhanced by the activation of individual or few antioxidants during hypoxia/anoxia (Welker et al. 2013). The activation of antioxidants under oxygen restriction in many hypoxia-tolerant species has been regarded as a relevant mechanism to control the effects of ROS overproduction that may happen at hypoxia and/or reoxygenation—this general mechanism is known as “preparation for

Communicated by I. D. Hume.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00360-016-0982-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marcelo Hermes-Lima
hermes@unb.br; hermes.unb@gmail.com;
m_hermes_lima@yahoo.com.br

¹ Departamento de Biologia Celular, Laboratório de Radicais Livres, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

² Faculdade da Ceilândia, Universidade de Brasília, Ceilândia, DF 72220-140, Brazil

APÊNDICE D – *Subtropical Hibernation in Juveniles Tegu Lizards (Salvator merianae): Insights from Intestine Redox Dynamics*

Manuscrito submetido à PLOS ONE em 08 de julho de 2017

1

2

3

4 Subtropical hibernation in juvenile tegu lizards (*Salvator*
5 *merianae*): insights from intestine redox dynamics

6

7

8 Daniel C. Moreira^{1¶}, Alexis F. Welker^{2¶}, Élide G. Campos¹, Silvia Cristina R. de Souza³,

9 Marcelo Hermes-Lima^{1*}

10

11

12

13 ¹Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

14

15 ²Faculdade da Ceilândia, Universidade de Brasília, Ceilândia, DF, Brazil

16

17 ³Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo,
18 SP, Brazil

19

20

21 * Corresponding author

22 E-mail: hermes@unb.br and hermes.unb@gmail.com

23

24

25 [¶]These authors contributed equally to this work.

26 **Abstract**

27 Tegu lizards (*Salvator merianae*) experience gradual and mild temperature changes from
28 autumn to winter in their habitat. In the laboratory, they enter into a continuous state of
29 dormancy with an 80% reduction in metabolic rate that remains constant during winter.
30 These conditions contrast with hibernation in small mammals, which withstand large
31 variations in body temperature and metabolic rate during periodic arousal bouts over the
32 winter. The redox metabolism in hibernators under such distinguished conditions is poorly
33 understood. We analyzed the redox metabolism in the small intestine of tegus during
34 different stages of their first annual cycle: late autumn, winter dormancy, arousal and spring
35 activity. The effect of food deprivation during spring was also studied to contrast with fasting
36 during hibernation. Both hibernation and food deprivation caused decreases in reduced
37 glutathione levels and glutathione transferase activity. Total glutathione peroxidase activity
38 also decreased during winter dormancy. Other enzymes of the antioxidant system (catalase,
39 selenium-dependent glutathione peroxidase and glutathione reductase) were unchanged
40 during hibernation, while food deprivation increased mitochondrial superoxide dismutase
41 activity. Notably, levels of disulfide glutathione (GSSG) were 2.1-fold higher in late autumn
42 in comparison to other periods of the seasonal cycle. This more oxidized state in gut tissue
43 may be due to a putative disruption in NADPH-dependent antioxidant systems. The entrance
44 into hibernation seems to be main challenge for the redox homeostasis in the small intestine
45 of tegus.

APÊNDICE E – *Mammalian Hibernation, Oxidative Stress, and Antioxidant Defenses*

Hibernation and Daily Torpor in Vertebrates (ed. Craig L. Frank)

Johns Hopkins University Press

Chapter 6

Mammalian Hibernation, Oxidative Stress, and Antioxidant Defenses

Daniel C. Moreira¹, Alexis F. Welker^{1,2} and Marcelo Hermes-Lima^{1,*}

¹Laboratório de Radicais Livres, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

²Faculdade da Ceilândia, Universidade de Brasília, DF, Brazil.

*Corresponding author: Dr. Marcelo Hermes Lima. E-mail: m_hermes_lima@yahoo.com.br.

Abstract

Mammalian hibernators withstand striking physiological changes, e.g. very large variations in body temperature, oxygen consumption, heart rate and ventilation, when going through multiple torpor-arousal cycles. Such drastic changes are often not tolerable by non-hibernators and are expected to disrupt the balance between production and control of reactive oxygen species (ROS). The biochemical adaptations that support such endurance to oxidative challenging conditions during hibernation have been extensively investigated in various small mammals. Here, we review the management of oxidative stress during the different stages of hibernation, considering the roles of ROS production, endogenous antioxidant defenses, and chaperones especially at the torpid phase. Data from the literature indicate that mitochondrial oxygen consumption and ROS production both decrease at deep torpor. In contrast, there are pieces of evidence indicating the occurrence of redox imbalance and oxidative stress in certain tissues at the torpid phase of hibernation. In line with these observations, there are many reports of tissue-specific enhancement of endogenous antioxidant defenses in torpid hibernators. This response seems to be activated by particular redox-sensitive transcription factors, such as Nrf2 and NF- κ B, which are activated during hibernation. Furthermore, molecular chaperones are up-regulated in several tissues of torpid animals, acting in concert with antioxidants in cytoprotection. Other factors, such as post-translational modifications, uncoupling proteins and oxygen availability are also expected to affect redox balance. As detailed herein, these responses vary among studies, tissues and animal species. Based on these observations, we propose the occurrence of a transient surge in mitochondrial ROS formation at specifically at the entrance into torpor, which would mediate the activation of stress-responsive pathways. This chapter, the first review dedicated to the relationship between hibernation and free radical metabolism, is also a call for the experimental testing of the control of oxidative stress during torpor.