



Universidade de Brasília
Instituto de Ciência Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Marina Minari R. de Carvalho

**Metabolismo redox em *Hymeniacidon heliophila*
(Porifera, Demospongiae) sob influência da maré
e radiação solar**

Brasília/DF

2022

Marina Minari R. de Carvalho

**Metabolismo redox em *Hymeniacidon heliophila*
(Porifera, Demospongiae) sob influência da maré
e radiação solar**

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 mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima

Coorientador: Dr. Daniel C. Moreira

Brasília/DF

2022

Marina Minari R. de Carvalho

Metabolismo redox em *Hymeniacidon heliophila* (Porifera, Demospongiae) sob influência da maré e radiação solar

Dissertação 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 para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

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

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Ricardo Henrique Kruger
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Carlos André Ornelas Ricart
Universidade de Brasília - UnB (Suplente)

Resumo

Muitos animais são resistentes a condições sazonais de estresse oxidativo, nas quais o oxigênio fica limitado ou impossibilitado de ser assimilado pelos organismos em função das condições ambientais. Existem alguns mecanismos já comprovados que explicam essa resistência à hipóxia, como a alta produção constitutiva de antioxidantes, a resistência aos danos oxidativos, o aumento de antioxidantes devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o preparo para o estresse oxidativo (POS). O POS já foi demonstrado em 9 filos animais diferentes, e consiste em um aumento da produção de antioxidantes endógenos durante o estresse ambiental, para que na reoxigenação, processo que leva à alta produção de oxi-radicais, o animal esteja em equilíbrio redox. Com as defesas antioxidantes funcionando adequadamente, os danos oxidativos (como dano em DNA, oxidação de proteínas e peroxidação lipídica) podem ser minimizados. Uma das principais dúvidas atuais relacionada ao POS é sua origem evolutiva, sendo que os animais mais basais com POS comprovadamente positivo são duas espécies de cnidários. O filo Porifera, que possui fortes indícios de ter surgido há mais de 800 milhões de anos, é um bom modelo biológico para analisar evolutivamente mecanismos adaptativos, como o POS. Sendo assim o presente trabalho tem como objetivo analisar a resposta antioxidante da esponja *Hymeniacidon heliophila*, que passa por exposição aérea diariamente e sofre de altos índices de radiação solar/UV. A esponja sol (*H. heliophila*) é encontrada no Brasil principalmente no litoral da região sudeste, habitando locais rochosos e sendo vista raramente em total submersão ao longo do dia. Sendo assim, a espécie desenvolveu mecanismos que a permitiu sobreviver à anóxia funcional ocasionada pela maré baixa, sendo uma das possibilidades o POS. Levando em consideração os estressores de exposição aérea e radiação solar/UV, foram feitas expedições científicas no litoral de São Sebastião (SP) para coleta de esponjas (*H. heliophila*). Afim de verificar a ocorrência do POS no campo em condições ambientais naturais, foram feitas coletas diurnas e noturnas, com esponjas dentro e fora d'água (marés alta e baixa), em 3 dias diferentes. As esponjas foram raspadas do substrato, rapidamente limpadas com água e congeladas em N₂ líquido, preservando a bioquímica do animal no momento que foi coletado. Foram conferidos experimentalmente a atividade de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutatona redutase, glutatona peroxidase total e selênio-dependente e glutatona transferase), níveis de glutatona (GSHtotal, GSSG e GSH/GSSG), e danos oxidativos (TBARS e proteínas carboniladas) das esponjas. Foram feitas comparações do efeito redox da exposição aérea, da radiação solar/UV nos períodos diurno e noturno e o efeito da temperatura na primavera e verão. Os resultados demonstraram influência das variações sazonais de condições ambientais no metabolismo redox da esponja. Além disso foi observado a ocorrência de depressão redox durante a exposição aérea, sem ativação do mecanismo POS. Discutimos nessa dissertação o papel do metabolismo redox como parte da adaptação bioquímica das esponjas *H. heliophila* para a sobrevivência aos estresses induzidos pela maré e radiação UV solar.

Palavras chave: exposição aérea; radiação ultravioleta; antioxidantes; Porifera; estresse oxidativo; glutatona.

Abstract

Many animals endure seasonal conditions associated with oxidative stress, when oxygen is limited or unable to be extracted by organisms due to environmental conditions. Some well-known mechanisms that can explain hypoxia tolerance include high constitutive levels of antioxidants, tolerance to oxidative damage, increase of antioxidants due to the increase of ROS, and preparation for oxidative stress (POS). The latter has been demonstrated in 9 different animal phyla and consists in the upregulation of endogenous antioxidants during environmental stress, so the animal can be in a favorable redox balance during reoxygenation, as this process favors high production of oxyradicals. With the antioxidant system working consistently, oxidative damage (including DNA damage, protein oxidation, and lipid peroxidation) can be minimized. Currently, one of the biggest challenges related to POS's research is its evolutionary origin, in which the most basal animals proved to be POS positive are two species of cnidarians. The Porifera phylum, which origin is estimated to be more than 800 million years ago, is a good biological model for the evolutionary analysis of metabolic adaptations, such the POS mechanism. Therefore, this research aimed to analyze the antioxidant system of the sponge *Hymeniacidon heliophila*, which daily goes through tidal aerial exposure, and suffers from high levels of solar/UV radiation. The sponge *H. heliophila* is commonly found in the southern region of Brazil, inhabiting coastal environments, rarely seen totally submerged throughout the whole day. The species developed several adaptations that allow it to survive the functional anoxia caused by the low tide, and one of these adaptations could be POS. Considering these two stressors (aerial exposure and solar/UV radiation), expeditions were made along the coast of São Sebastião (SP) to collect *H. heliophila* sponges. To verify the occurrence of POS in the field under totally natural environmental conditions, day and night samplings were made, with submerged and exposed sponges (high and low tides), on 3 different days. The sponges were scraped from the rocks, cleaned with water, and frozen in liquid N₂, preserving the animal's biochemistry at the time of sampling. Then, whole-body homogenates were used to measure the activity of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase, total and selenium-dependent glutathione peroxidase, and glutathione transferase), levels of glutathione (total GSH, GSSG, and GSH/GSSG), and oxidative damage (TBARS and carbonyl proteins) of sponges. We also compared the redox effect of air exposure, the solar/UV radiation impact during the day and night, and the temperature influence during summer and spring. Results showed an influence of seasonal variations in environmental conditions on redox metabolism. Moreover, we observed the occurrence of a "redox depression" during the aerial exposure, without POS mechanism activation. This dissertation discusses the role of redox metabolism as part of the biochemical adaptations of *H. heliophila* sponges to survive and cope with tidal and solar radiation stresses.

Keywords: aerial exposure; ultraviolet radiation; antioxidants; Porifera; oxidative stress; glutathione.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Marcelo Hermes, por me proporcionar tantas oportunidades e experiências fazendo ciência. Quem sempre me estimulou e me orientou ao longo de todo o caminho. Agradeço ao meu coorientador, Daniel Moreira, que me ensinou todos os protocolos que aprendi dentro daquele laboratório ao longo dos 5 anos que estou lá. Sem ele essa dissertação não teria saído. Agradeço ao meu aluno de PIBIC, Felipe Diego Medeiros, que me acompanhou nas expedições e me ajudou em partes dessa dissertação. Nossa relação se tornou uma verdadeira amizade depois de duas viagens e muitas discussões científicas. E agradeço ao colaborador Juan Carvajalino por todo direcionamento ao longo da minha vida acadêmica.

Agradeço imensamente à minha família. À minha mãe, Teresinha de Jesus Rocha, que nunca foi tão compreensiva com minhas reviravoltas de humor. Me deu todo o suporte que precisei no meu dia-a-dia. Agradeço ao meu irmão João Gabriel Rocha, que me deu o ombro nos meus surtos de ansiedade e me ajudou com verdadeiras obras de arte (figuras) que estão nessa dissertação. Agradeço ao meu pai, que mesmo de longe se faz presente, demonstrando preocupação, carinho e muita paciência.

Agradeço às minhas amigas da velha guarda, Nina Roberto, Marina Bentes, Ana Lígia Barbosa, Caroline Capita, Maria Clara Lima e Alice Crepory. Minhas amigas que me conhecem de muitas fases e com quem posso falar qualquer coisa sem julgamento.

Agradeço meus amigos queridos do laboratório vizinho. Nathalia Soares, Igor Santos, Gabriel Pasquarelli, Gabriel Ribeiro, Sabrina Azevedo e Heloisa Antoniella. Vocês fizeram meus dias mais felizes. Como é bom sempre ter alguém que entende exatamente o que você está passando. Como é bom estar num ambiente em que me sinto querida por tantas pessoas. Apesar de todas as dificuldades que passei naquele laboratório, vocês não deixaram eu me sentir sozinha nem por um dia.

E por último agradeço imensamente à comunidade científica. Ao longo desses anos de mestrado, recebi ajuda de pesquisadores de todo o Brasil. Decidi trabalhar com um animal marinho morando no cerrado, e querendo testar algo novo, então eu precisei de ajuda. Lembro muito bem que agradei à uma pesquisadora do ITA que nos ajudou a conseguir N₂ líquido para a coleta. Ela não tinha nenhuma relação com a minha pesquisa, mas conseguiu um galão de N₂ líquido no domingo de manhã durante pandemia. Ela só falou “Eu te ajudo pela ciência, não precisa agradecer, eu sei como é”. Isso aqueceu meu coração. Também agradeço ao professor Márcio Custódio, que nos proporcionou hospedagem nas duas coletas em São Sebastião, além da sua presença ilustre na segunda coleta. Ele nem sabe disso, mas uma conversa que tivemos sobre evolução me influenciou muito ao longo da escrita dessa dissertação. Fazer ciência no Brasil é difícil, então precisamos nos ajudar.

Sou grata à toda ajuda que recebi de várias formas por tantas pessoas.

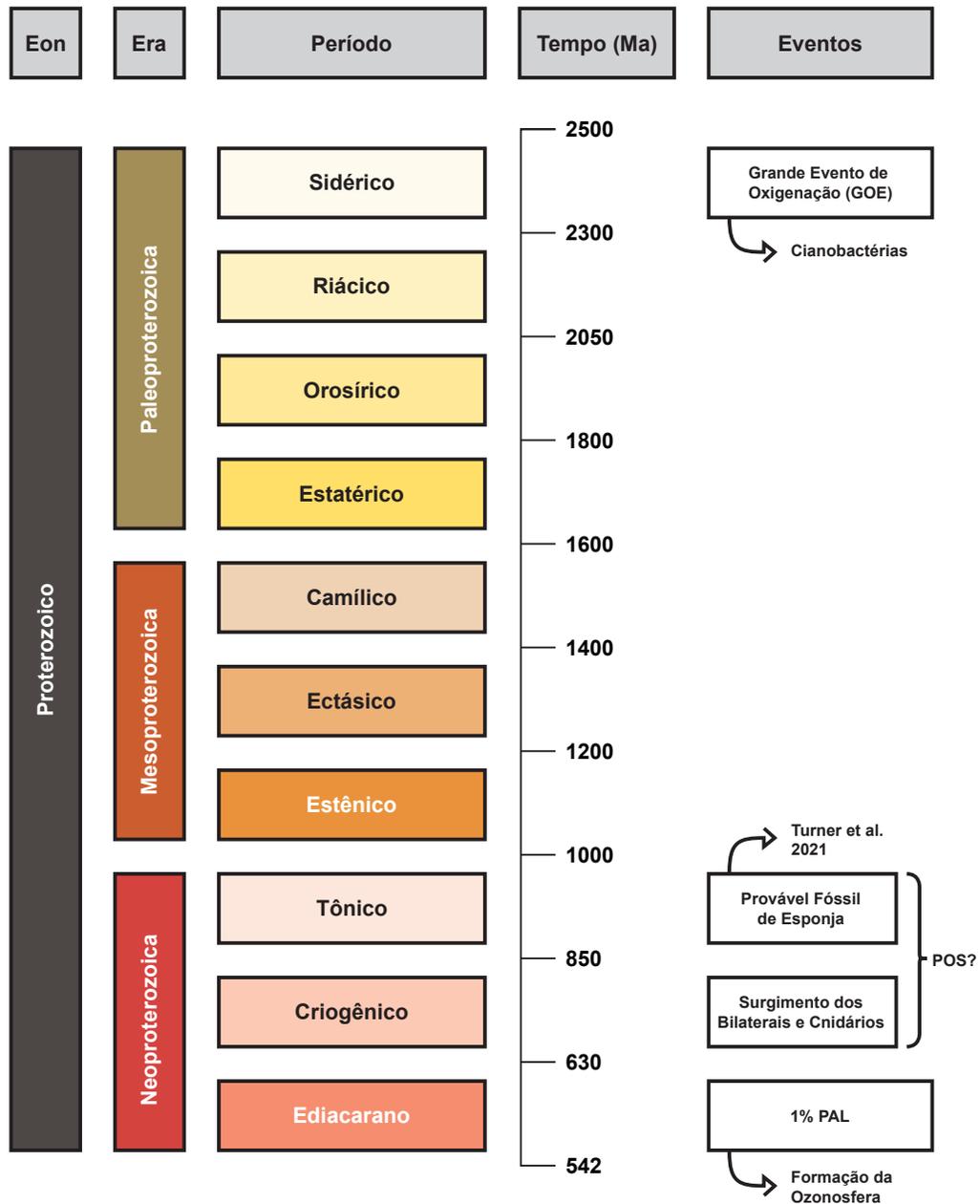
Obrigada!

Capítulo 1 - Introdução Geral	9
Capítulo 2 - Preparo para o estresse oxidativo	27
2.1 História	27
2.2 Mecanismo molecular	32
2.3 Radiação ultravioleta	36
Capítulo 3 - Metodologia	41
3.1 Coleta e local	41
3.2 Homogeneização	46
3.3 Ensaio enzimáticos	47
3.3.1 Glutathione transferase (GST)	47
3.3.2 Glutathione reductase (GR)	48
3.3.3 Glutathione peroxidase (GPX)	48
3.3.4 Catalase (CAT)	49
3.3.5 Superóxido dismutase (SOD)	50
3.4 Marcadores de estresse oxidativo	51
3.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	51
3.4.2 Proteínas carboniladas	52
3.4.2 Níveis de glutathione	53
3.5 Proteínas totais (Bradford)	54
3.6 Análise estatística	55
Capítulo 4 - Resultados	56
4.1 Fatores abióticos	56
4.2 Análise 1 (dia x noite)	59
4.3 Análise 2 (exposição aérea x submersão)	62
4.4 Análise 3 (primavera x verão)	66
4.5 Resultados mais relevantes	69
Capítulo 5 - Discussão	70

5.1 Efeito da radiação solar	70
5.2 Efeito da exposição aérea e anóxia funcional	73
5.3 Sazonalidade e efeito de estações do ano	80
5.4 POS: a possível origem	86
Capítulo 6 - Conclusão e perspectivas futuras	91
Referências Bibliográficas	93
Anexos	105
Artigo em colaboração	105
Fotos das expedições	112

Capítulo 1 - Introdução Geral

Ao longo da dissertação foram feitas várias referências a eventos geológicos envolvidos com o tema do trabalho. Para melhor entendimento do leitor segue a Figura 1 com as eras geológicas associadas aos eventos citados ao longo do texto.



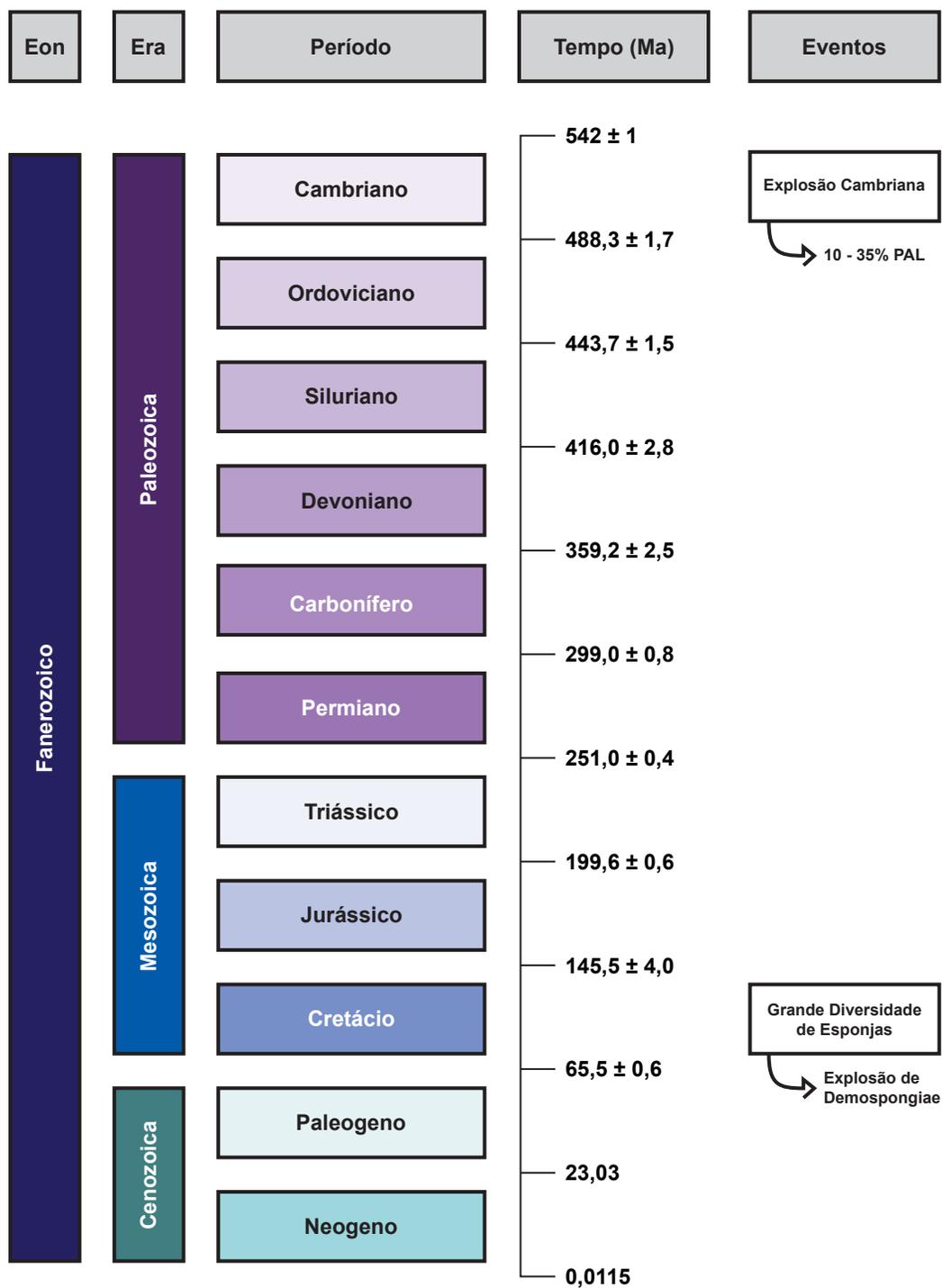


Figura 1. Eras e períodos geológicos de acordo com Gradstein et al. 2004. Os eventos indicados são referentes à eventos citados ao longo de toda a dissertação.

Na era Paleoproterozóica, há aproximadamente 2.4 bilhões de anos (Ga), os níveis de O₂ começaram a aumentar na atmosfera e nos oceanos devido ao surgimento das cianobactérias fotossintetizantes, sendo esse momento histórico conhecido como Grande Evento de Oxigenação (GOE). Apenas no início do período cambriano, há 540 My, a atmosfera e os oceanos ficaram de fato oxigenados, mas ainda com variações entre 10 a 35% dos níveis atuais de O₂ atmosférico (PAL) (Mills & Canfield 2014). Na antiga visão evolutiva a oxigenação da atmosfera foi o fator que determinou a “explosão cambriana” do Reino Animal. Nursall (1959) definiu a “teoria do controle de oxigênio” (OCH), a qual implica a impossibilidade da vida pluricelular aeróbica ao final do Neoproterozóico (~1-0.5 Ga) em função da baixa concentração de O₂. Berkner e Marshall (1965) corroboraram com Nursall e quantificaram que 1% PAL só foi alcançado ao fim da Era Proterozóica (0.6 Ga) e que só então foi possível o início da evolução dos animais, sendo a mesma concentração de O₂ necessário para formação da ozonfera e a consequente proteção a doses letais de radiação ultravioleta.

Ao longo dos anos essa ideia foi sendo refutada por comprovações de animais que conseguem sobreviver a concentrações mais baixas que 1% PAL. Como por exemplo, Mills et al. (2014) demonstrou que a esponja *Halichondria panicea* consegue sobreviver sob 0.54% PAL O₂. Essas esponjas foram coletadas em um local bem oxigenado e foram submetidas a períodos de hipóxia severa em laboratório, e demonstraram ser resistentes a situações ocasionais de baixa concentração de O₂. Com esses resultados Mills hipotetizou que essa capacidade é provavelmente uma adaptação ancestral das primeiras esponjas, e não algo recente a um nicho, de forma que a resistência a hipóxia poderia ser algo comum no filo Porifera, mas que estaria “silenciado”. Reforçando essa ideia, Hoffman et al. (2005) observou que esponjas de água saturada podem ativamente fechar sua abertura externa (óstculo), estimulando anóxia interna, e especulou que os simbioss poderiam fazer esse controle de anaerobiose facultativa.

A partir dessas e outras evidências foi sendo demonstrado que o oxigênio molecular, por si só, não causou a evolução dos animais, refutando a hipótese de Nursall. Em vez disso, acredita-se que o aumento dos níveis de oxigênio criou o ambiente propício para a evolução animal em larga escala, mas que já havia

metazoários presentes que conseguiam resistir a períodos de hipóxia/anóxia (Mills & Canfield, 2014). O metabolismo anaeróbico está presente em todos os grupos eucariontes, de forma não linear no reino animal, o que pode ser interpretado que o ancestral comum eucariótico, que possuía mitocôndria, era um organismo anaeróbico facultativo, e que a aerobiose obrigatória seria uma característica derivada (Embley et al. 2006). Dessa forma, a explicação da origem animal pode estar relacionada não necessariamente apenas com a alta na concentração de oxigênio atmosférico, mas a fatores externos limitantes, como a temperatura global e a salinidade, e genéticos como a seleção celular. O conjunto de todos esses fatores só aconteceu ao final do Neoproterozóico, que coincide com o aumento do O₂ atmosférico, estando possivelmente todos esses fatores envolvidos na explosão cambriana (Mills & Canfield, 2014).

Outro ponto que deve ser enfatizado é que o eucarioto ancestral possuía um arsenal de enzimas envolvidas no metabolismo aeróbico e anaeróbico para sobreviver aos lapsos hipóxicos, de forma que nas linhagens que comumente passavam por hipóxia/anóxia ocorreu uma seleção para que essas enzimas perdurassem (Müller et al. 2000). Jabłońska e Tawfik (2021) a partir de uma análise proteômica identificaram as enzimas envolvidas na produção e/ou consumo de oxigênio, como a catalase, e mapeou filogeneticamente a distribuição dessas famílias de enzimas nas bactérias e arqueas. Foi observado que essas enzimas estão presentes em espécies que divergiram evolutivamente antes da oxigenação da atmosfera, entre 3.25 e 2.9 Ga. Dessa forma, é plausível dizer que o surgimento de enzimas que utilizam oxigênio provavelmente refletem o ciclo de oxigênio dentro da biosfera bem antes do aumento permanente do oxigênio atmosférico, não necessitando estar completa ou permanentemente oxigenada.

Além desses fatores, também deve ser considerado o surgimento do colágeno dentro do contexto de evolução do Reino Animal com o aumento do oxigênio atmosférico. As variedades de colágeno têm papel fundamental na matriz extracelular, sendo a proteína mais abundante entre os metazoários. O colágeno é constituído por três polipeptídeos helicoidais associados em uma tripla-hélice, a qual depende em grande parte do grupo hidroxila presente na hidroxiprolina, que possui seu oxigênio

derivado do oxigênio molecular. Essa via bioquímica demonstra a importância do O_2 na síntese de colágeno, mas não determina qual a quantidade mínima necessária para que ela ocorra. Levando em consideração que os animais bilaterais podem persistir em zonas mínimas de oxigênio (OMZ), onde os níveis de oxigênio podem chegar a 0,3% PAL (Hentschel et al. 2006), é possível que a síntese de colágeno ainda ocorra sob essas concentrações. Assim, atualmente não há evidências de que a síntese de colágeno tenha sido um fator determinante na evolução mais precoce dos animais (Mills & Canfield 2014), mas pode ter sido mais um dos fatores que influenciaram na explosão cambriana.

No caso dos metazoários superiores já foram descritos 20 tipos de colágeno, enquanto para as esponjas, o colágeno está presente apenas na forma fibrilar e colágeno IV. O colágeno fibrilar pode estar na forma de finas fibrilas distribuídas pela matriz intercelular ou na forma fibrosa de espongina, presente apenas na família Demospongiae. A espongina permitiu que os poríferos crescessem em diferentes tamanhos no formato anatômico leuconóide, que possui uma forte rede de canais que possibilita um sistema aquífero mais eficiente, bem como a difusão intracelular (Brusca & Brusca 1990) (Fig. 2). Levando em consideração que a família Demospongiae é, entre os poríferos, a que mais propagou evolutivamente (inclui mais de 90% das esponjas descritas) (World Porifera Database), é possível fazer a associação da presença do colágeno fibroso com a maior eficiência do sistema aquífero e dos diferentes formatos anatômicos que permitiram as esponjas habitarem novos espaços. Assim, também é plausível correlacionar o colágeno com a evolução do Reino Animal, levando em consideração que existem 20 variações na natureza nos táxons mais complexos e recentes, enquanto para as esponjas, o metazoário mais basal, existem apenas dois.

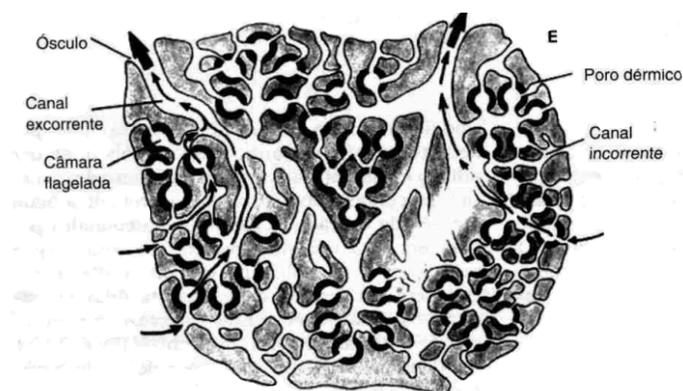


Figura 2. Representação dos canais do sistema aquífero de uma esponja leuconóide com fibras de espongina (Brusca & Brusca 1990)

Antigamente acreditava-se que toda a vida pluricelular tinha surgido a partir do período cambriano, mas estudos recentes mostraram indícios fósseis de poríferos no final do Neoproterozóico, há 890 milhões de anos (My). Turner (2021) identificou estruturas reticuladas em um recife antigo que se assemelham a estruturas de fósseis de esponjas já aceitos pela comunidade científica. A grande dificuldade de determinar se de fato são fósseis de esponjas é: os fósseis já aceitos foram identificados a partir de espículas compostas por carbonato de cálcio ou sílica, o que não foi identificado nesse fóssil em questão. Essa “possível esponjas” não possuía esqueleto rígido, mas sim uma rede proteica esponjosa que se assemelha a espongina presente na classe Demospongiae. Uma possível explicação para a presença desses metazoários basais no oceano ainda hipóxico é que os recifes onde o fóssil foi encontrado possivelmente tinha presença de microorganismos fotossintetizantes que proporcionavam períodos com aumento de oxigênio. Ainda é necessário discutir na academia se esses fósseis de fato são de esponjas, mas ainda assim o fóssil indiscutivelmente mais antigo é de espículas de esponja datadas com 523 My (Antcliffe et al. 2014).

O filo Porifera é o único táxon parazoário, ou seja, metazoário sem tecidos verdadeiros. Com mais de 10.000 espécies descritas (segundo o World Porifera Database), o grupo possui muita variabilidade em sua fisiologia (formato anatômico, forma de sustentação, nutrição e reprodução) e podem habitar desde os recifes mais biodiversos até o mar profundo. O filo é dividido em quatro classes existentes, e duas classes fósseis, que diferem principalmente na composição das espículas, na presença ou ausência de fibras de espongina e no formato anatômico. A classe mais basal, Calcarea, possui espículas de calcário e costumam ser pequenas e de habitats marinhos. A classe Hexactinellida, também conhecida como esponjas de vidro, possuem espículas de sílica com seis pontas, sendo a maioria de mar profundo. A classe Demospongie enquadra a grande maioria das espécies descritas, sendo o grupo mais desenvolvido, possuindo espículas de sílica reforçadas por espongina ou totalmente substituídas, podendo habitar água doce ou salgada. São todas de anatomia leuconóide, que possui uma rede de canais que facilita a filtração da água e consequentemente a difusão de nutrientes (Fig. 2). A quarta classe, Homoscleromorpha, foi recém desmembrada da classe Demospongie (Gazave et al.

2011) mas difere pela presença de uma pinacoderme ciliada e uma membrana basal epitelial, que também facilita a difusão e filtração. (Brusca & Brusca 1990).

Além das classes vivas, existem fósseis de esponjas que caracterizam duas classes já extintas: Stromatoporoidea e Archaeocyatha. A classe Stromatoporoidea inclui esponjas sem espículas e hipercalcificadas. Surgiu pela primeira vez no Ordoviciano Médio, se tornou abundante no Siluriano e Devoniano, e se extinguiu no Cretáceo. A segunda família fóssil vivia em ambientes com substratos de carbonato, estando associada a construção de recifes. Elas surgiram no início do Cambriano e persistiu apenas até o fim do mesmo período. Sendino (2020) catalogou os fósseis de esponjas já documentados no Museu de História Natural (NMH), e observou o padrão geológico das classes. A classe Demospongiae surgiu no Paleozoico e abrange metade da coleção de fósseis do NHM. As esponjas calcareas representam 10% da coleção, surgiram no Cambriano e persistem até hoje, sendo o Cretáceo o período onde teve maior diversidade de espécies. A família Hexactinellida também persistiu ao longo de eras, como Demospongiae, do Cambriano até a atualidade (Fig. 3). A Classe Homoscleromorpha não foi considerada nessa coleção, que ainda não havia sido desmembrada do grupo das Demospongiae. (Sendino 2020)

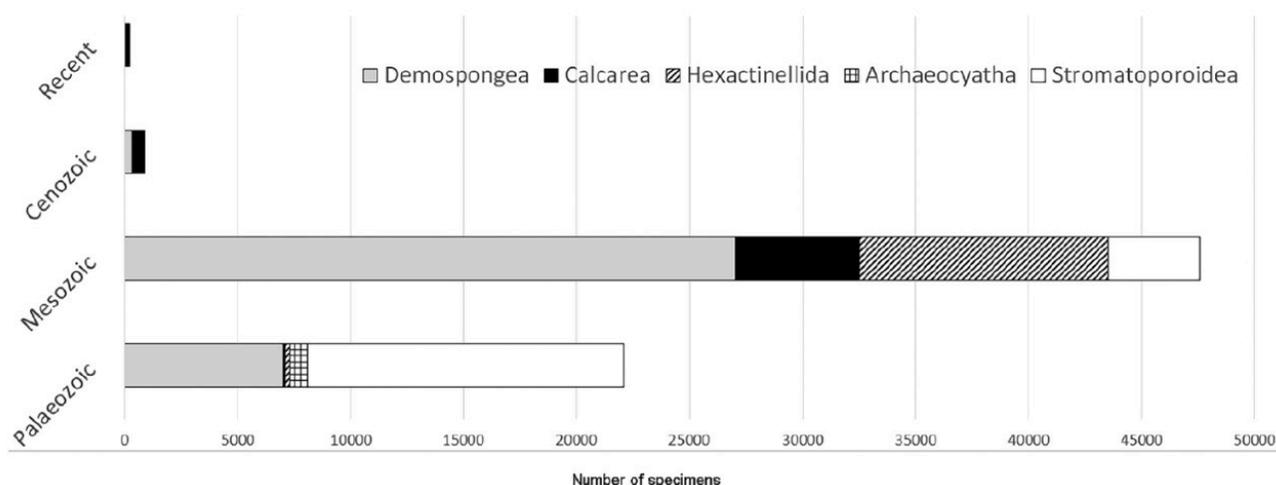


Figura 3. Número de espécies e classes de poríferos por era geológica. Dados retirados do Departamento de Ciências da Terra do Museu de História Natural (Londres) (Sendino 2020)

A literatura sobre esponjas é muito limitada, porém possuem um grande potencial farmacológico. Os poríferos vivem em simbiose com uma grande microbiota composta por 14 filos bacterianos, dois filos de archaea e vários micróbios eucarióticos. Os simbioses produzem compostos antibióticos que matam eficientemente bactérias encontradas na coluna d'água, mas que não afetam o holobionte. Esses compostos podem ter efeito anticancerígeno e antiviral, mas existem limitações biotecnológicas que impossibilitam a produção em larga escala de medicamentos. Um dos principais motivos é a dificuldade no isolamento dessas moléculas, tendo em vista que a ação terapêutica depende da dinâmica conjunta entre os simbioses. Outra limitação é a baixa concentração das substâncias de interesse nos organismos. Por exemplo, a halicondrina B é um composto antitumoral muito encontrado no grupo de esponjas *Lissodendoryx*, mas seria necessário dizimar toda a população mundial do grupo para conseguir produzir medicamento o suficiente para iniciar testes em animais. (Vogel, 2008)

Ainda sobre os microorganismos simbioses das esponjas, os compostos secundários produzidos por eles aparentam desempenhar importantes funções no metabolismo do hospedeiro. Associações intra e intercelulares podem ocorrer concomitantemente no mesmo hospedeiro, com essas relações podendo ser obrigatórias ou facultativas, com transmissão vertical e/ou horizontal (Hill & Sacristán-Soriano 2017). A diversidade de simbioses encontrados na esponja dependem intrinsecamente do tipo de nutrientes que o hospedeiro consome e de seu habitat. Os simbioses podem até exercer pressões seletivas a partir de determinados compostos secundários que favorecem o crescimento de um micróbio em específico, ou o hospedeiro pode favorecer o crescimento a partir do fornecimento de nutrientes específicos (Hill & Sacristán-Soriano 2017). A quantidade e diversidade de microorganismos também é um fator espécie-específico, de forma que as esponjas foram classificadas em duas categorias: alta abundância microbiana (HMA) e baixa abundância microbiana (LMA), podendo variar entre 50 e 3000 simbioses distintos no mesmo hospedeiro (Leys & Kahn 2018). As novas tecnologias de sequenciamento genético têm permitido estudos mais aprofundados sobre a microbiota associada das esponjas, e já foi observado representantes dos três domínios (Bacteria, Archaea e

Eukaria), sendo as bactérias o domínio comumente mais abundante. O filo *Proteobacteria* costuma estar presente, mas também cianobactérias, arqueas do filo *Thaumarchaeota* (Hentschel et al. 2012), algas filamentosas e dinoflagelados (Thacker & Freeman 2012). Os simbioses estão envolvidos em vários processos das esponjas, podendo desenvolver diferentes tipos de relações, como comensalismo, mutualismo, inquilinismo e parasitismo (Hill & Sacristán-Soriano 2017). Eles estão envolvidos nos ciclos de nutrição (Tracker & Freeman 2012), proteção contra herbivorismo e parasitismo (Hill & Sacristán-Soriano 2017), resistência a estressores ambientais (como radiação solar/UV) (Venn et al. 2008) e sistema antioxidante (Regoli et al. 2000). Apesar dessas vantagens, a presença de simbioses pode envolver custos fisiológicos e ecológicos, podendo ocorrer competições entre simbioses e hospedeiro, atração de predadores especialistas e até mesmo gerar doenças (Tracker & Freeman 2012). Estudos futuros são necessários para melhor entendimento do nível de envolvimento dos simbioses nas funções fisiológicas do hospedeiro, porém ainda existem limitações como cultura de simbioses, e sequenciamento genético, levando em consideração que não existe um sistema unificado de classificação e nomenclatura para todas as bactérias e arqueas (Hill & Sacristán-Soriano 2017).

Por possuírem células totipotentes, as esponjas conseguem se regenerar e reproduzir com facilidade, tendo fácil dispersão pelo ambiente. Mas como são filtradores sésseis, podem ser sensíveis a mudanças ambientais, principalmente espécies que habitam regiões entremaré, sendo muitas utilizadas como bioindicadores (Wyllia et al 2018). Variações em condições como salinidade, pH, concentração de matéria orgânica, temperatura e radiação ultravioleta podem interferir no metabolismo do animal. Os ecossistemas costeiros são muito influenciados pela dinâmica do ciclo de maré, que determina a variação nas características físico-químicas da água. A extensão e magnitude da maré depende da fase da lua, estação do ano, declividade da praia e ventos, sendo as condições ambientais que mais passam por variações a temperatura da água, oxigenação e salinidade (Willmer et al. 2005, Nybakken 1988, Freire et al 2011).

A dinâmica da biota dos ambientes costeiros está relacionada com a distribuição ao longo da costa, de forma que os animais que ficam na área superior passam por

mais tempo de exposição aérea devido a maré baixa. A exposição está associada a outros estressores que ficam intensificados fora d'água, como a radiação UV e a temperatura, além da ocorrência de hipóxia funcional (Freire et al 2011). Também pode haver formação de poças na maré alta que permanecem cheias na maré baixa, de forma que os organismos presentes nesse ambiente ficam sujeitos ao aumento da salinidade, redução de oxigênio e aumento da temperatura (Pereira 2021). Conseqüentemente o ambiente entremaré é um dos mais desafiadores ecossistemas (Freire et al 2011). Apesar disso, costumam ser locais biodiversos em função da alta concentração de matéria orgânica, mas também com competição devido ao espaço limitado, a baixa mobilidade da maioria das espécies e ao batimento de ondas e ventos (Petraitis & Fisher, 2008). Dessa forma, a energia e tempo que seriam gastos pelos organismos para funções biológicas como alimentação e reprodução acaba sendo secundária em consequência das pressões seletivas do ambiente. Isso demonstra a relevância de mais estudos de biologia adaptativa de invertebrados marinhos para melhor entendimento da ecologia de ecossistemas costeiros (Pereira, 2021).

Mesmo com sensibilidade para variações ambientais, algumas espécies de esponjas desenvolveram mecanismos adaptativos que as tornaram resistentes a determinados ambientes inóspitos. Como exemplo, as espécies *Corvospongilla lapidas*, *Stratospongilla bombayensis* e *Drulia gray* conseguem resistir a períodos de ressecamento, com a última tendo desenvolvido uma estratégia de dispersão e reprodução a partir de gêmulas capazes de realizar criptobiose (Manconi & Pronzato 2016). As espécies *Spongilla lacustres* e *Ephydatia muelleri* são encontradas na Tundra, sendo resistentes ao frio extremo. *Ephydatia fluviatillis* produz gêmulas capazes de passar por períodos de estivação ou hibernação dependendo do local habitado. E a família Cladorhizidae habita o oceano profundo, tendo evoluído para o carnivorismo em função do ambiente hipóxico/anóxico. (Manconi & Pronzato 2016)

Outro exemplo de esponja adaptada é a espécie marinha *Hymeniacidon heliophila* (popularmente conhecida como esponja sol), que habita ambientes costeiros e por isso sofre exposição aérea diariamente em função da maré. Essa esponja costuma ser muito utilizada como modelo científico, por ser uma das espécies de poríferos que duram mais tempo em aquário controlado. A esponja *H. heliophila* faz

parte da classe Demospongie e da família Halichondriidae. Seu formato é amorfo-lobulado, com papilas eretas e irregulares que ficam acima de uma base em substrato de 1-3mm de espessura. Sua coloração é alaranjada durante a vida, com consistência de corpo mole e frágil (Fig. 4A). A superfície é lisa na parte inferior e com saliências nas papilas que sobressaem. O substrato pode ficar com acúmulo de algas, fragmentos de rocha e conchas, além de compartilhar o espaço com outras esponjas, como por exemplo espécies do gênero *Tedania* sp. (encontrada em associação no litoral de SP). Os ósculos ficam escondidos nos interstícios ou em cima das papilas e as espículas são de tamanho variável, geralmente fusiformes, com o maior diâmetro no meio ou em direção à ponta (Fig. 4B) (Wiedenmayer 1977).

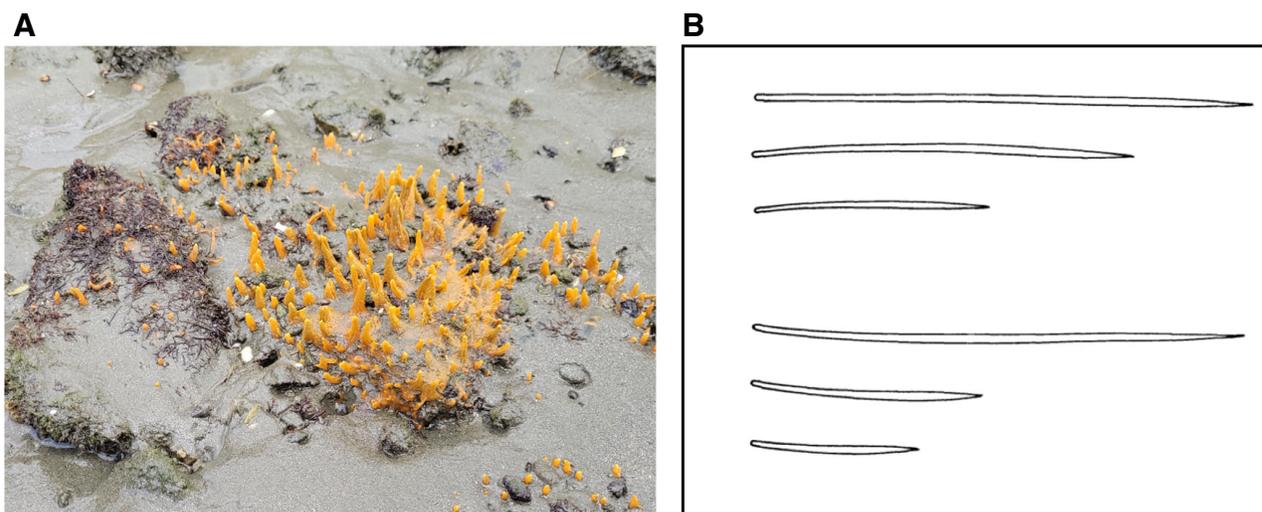


Figura 4. Colônia de *H. heliophila* encontrada na Baía do Araçá (São Sebastião/SP) em 07/09/2021 (A) e possíveis formatos das espículas da espécie (B) (Wiedenmayer 1977)

A esponja sol (*H. heliophila*) é comumente encontrada em ambientes com alta concentração de matéria orgânica e com influência do ciclo de marés, algo não esperado para uma esponja comum. Sendo assim, ao longo do dia a esponja fica exposta de uma a duas vezes durante algumas horas na maré baixa, sofrendo anóxia funcional e alto índice de radiação UV na baixa da manhã. No Brasil, a *H. heliophila* costuma ser encontrada no litoral de São Paulo e Rio de Janeiro (Fig. 5), em locais com poluição crônica, podendo formar tapetes em época propícia.

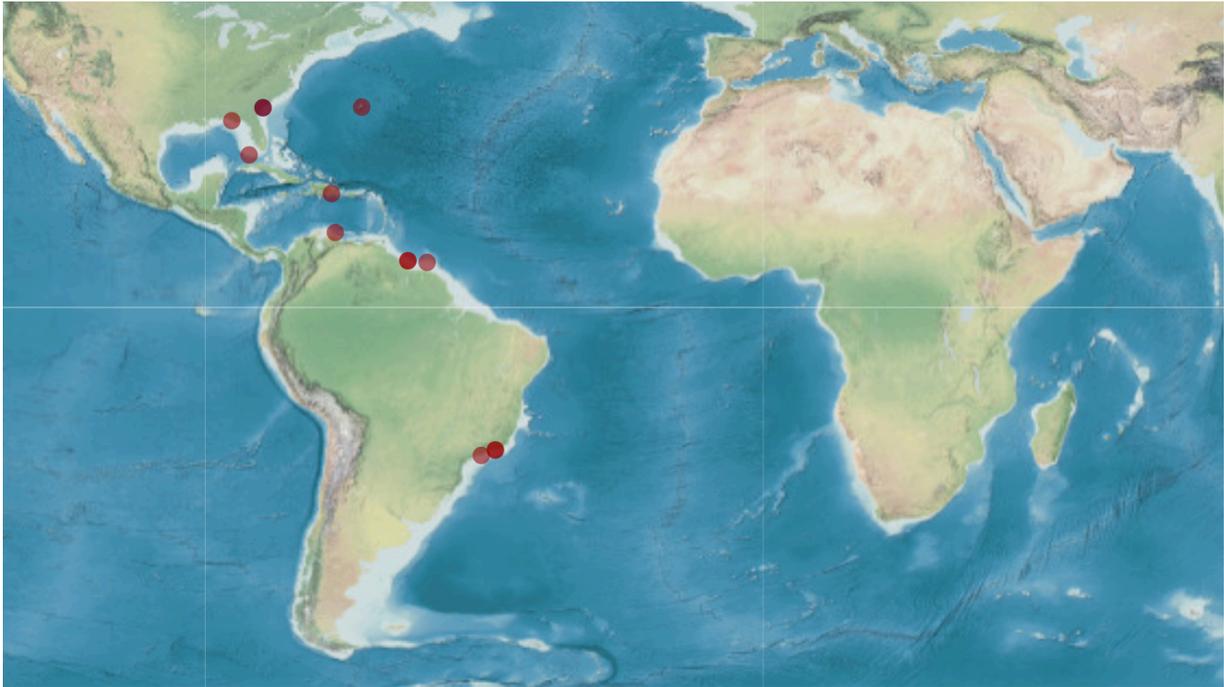


Figura 5. Distribuição geográfica de *Hymeniacidon heliophila*. Pontos em vermelho indicam locais onde a espécie já foi documentada (World Register of Marine Species)

A esponja *H. heliophila* é considerada de baixa abundância microbiana (LMA) (Leys & Kahn 2018), tendo prevalência de proteobactérias e cianobactérias (Weigel & Erwin 2016). Aparentemente os filos *Cyanobacteria* e *Planctomycetes* são comuns em comunidades de esponjas de regiões entre-maré, além do filo *Proteobacteria*, que costuma ser o mais abundante entre os simbiotes de poríferos no geral (Alex & Antunes 2015). Todos esses filos foram encontrados em quantidades consideráveis na esponja sol (*H. heliophila*) (Weigel & Erwin 2016). Uma comparação feita entre espécimes de *H. heliophila* de região intertidal e subtidal demonstrou que os genótipos são idênticos, mas que diferenciaram significativamente na abundância da comunidade simbiote. Os resultados sugerem que estressores ambientais presentes em ambientes entremaré exercem grande influência na microbiota do hospedeiro, como estresse oxidativo, estresse térmico e dissecação (Weigel & Erwin 2016). Dessa forma, esponjas de ambientes costeiros desenvolveram mecanismos para sobreviver à esses estressores ambientais, e possivelmente essas adaptações estão intrinsecamente relacionadas à comunidade simbiote (Manconi & Pronzato 2016).

Já foram descritos na literatura alguns mecanismos adaptativos que podem explicar a resistência à hipóxia, ou no caso da esponja *H. heliophia*, a anóxia funcional derivada da exposição aérea. A adaptação mais conhecida atualmente é o aumento na produção de antioxidantes em resposta ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). No caso de animais que vivem em simbiose com organismos fotossintetizantes, como esponjas associadas à cianobactérias, o O₂ provido da fotossíntese pode gerar um aumento nos níveis de ROS, e conseqüentemente o aumento de antioxidantes endógenos, como foi demonstrado na esponja *Petrosia ficiformis* a partir de testes com presença ou ausência de simbiontes (Regoli et al. 2000). Uma segunda adaptação está associada a taxa metabólica, de forma que quanto mais alta a taxa basal do animal, maior a produção de ROS e conseqüentemente maior a transcrição de genes associados ao sistema antioxidante. Por exemplo, um estudo feito com tubarões demonstrou que as espécies *Isurus oxyrinchus* e *Carcharhinus falciformes*, que fazem nado vigoroso, teve maiores índices constitutivos de enzimas antioxidantes do que *Sphyrna zygaena*, um tubarão menos ativo (López-Cruz et al. 2010). O contrário também é válido, quando ocorre depressão metabólica se espera uma menor produção de ROS e também de antioxidantes, como observado na espécie de pepino do mar *Apostichopus japonicus* sob estivação (Ji et al. 2008). A terceira adaptação é manter os níveis de antioxidantes constantemente elevados. Diversos estudos comparam o sistema antioxidante entre diferentes espécies, mas esse padrão pode ser observado em animais da mesma espécie que habitam locais com diferentes variações de oxigênio. Por exemplo, o mexilhão *Mytilus edulis*, muito encontrado em costões rochosos, teve aumento na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em espécimes que ficam mais próximas da costa, em comparação com espécimes mais distantes que sofrem menos com o ciclo de marés e exposição aérea. (Welker et al. 2013)

A quarta adaptação, que é um dos focos do presente estudo, é o “preparo para o estresse oxidativo” (POS). Esse mecanismo ocorre em animais que passam por um estresse oxidativo sazonal, devido ao clima, ação antrópica, ou outros fatores que modificam temporariamente a disponibilidade de oxigênio do ambiente. Os possíveis estressores já documentados que provocam a ativação do mecanismo são hipóxia,

anóxia, congelamento, exposição aérea em animais aquáticos, estivação, dessecação e radiação UV (Welker et al. 2013, Geihs et al. 2020). Durante a hipóxia, que pode ser gerada a partir dos estressores citados acima, espera-se um breve aumento na produção de ROS em função da baixa concentração de oxigênio, que por sua vez restringe a cadeia transportadora de elétrons e ativa fatores de transcrição de genes de enzimas antioxidantes. Na reoxigenação ocorre repentinamente um aumento abrupto na disponibilidade de oxigênio e espera-se uma alta produção de ROS. Nessas situações, animais POS-positivos aumentam seus antioxidantes durante a hipóxia para minimizar os danos oxidativos que podem ocorrer durante a reoxigenação, sendo esse momento geralmente associado ao estresse oxidativo de fato (Hermes-Lima et al. 2015). O mecanismo POS está detalhadamente descrito na próxima seção do presente trabalho (Capítulo 2).

A importância dos animais desenvolverem adaptações para resistir à hipóxia está relacionada com o metabolismo de ROS. Os seres vivos possuem uma produção constitutiva de ROS, que são originados do O_2 no seu estado fundamental, o qual possui dois elétrons desemparelhados que o caracteriza como radical livre. Sua redução a partir de diferentes doadores, como enzimas oxidases, podem gerar radicais superóxido (O_2^-) e hidroxila ($\bullet OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outras. Apesar de serem naturalmente produzidos, principalmente na cadeia transportadora de elétrons, ROS em altas concentrações pode gerar diferentes tipos de danos oxidativos. (Hermes-Lima 2004)

A peroxidação lipídica (LPO) é um dos principais danos causados por espécies reativas, e está associado a diferentes patologias. O processo é na maioria das vezes catalisado por metais de transição em diferentes estados de oxidação, que a partir de oxidantes fortes causam a quebra de fosfolipídeos presentes nas membranas celulares. O efeito na membrana pode variar dependendo da natureza e concentração do oxidante. Por exemplo, o radical superóxido (O_2^-) é moderadamente reativo quando comparado ao radical hidroxila ($\bullet OH$), que é altamente reativo e capaz de atravessar as membranas celulares. Alguns dos possíveis danos causados pela LPO é a redução na fluidez da membrana ou até mesmo ruptura da bicamada; fluxo descontrolado de íons como Cl^- e Na^+ , envolvidos no potencial de membrana; alteração do funcionamento da

cadeia respiratória de elétrons em função do dano na membrana mitocondrial; mal funcionamento de receptores de membrana envolvidos na transdução de sinal; e efluxo de fluidos intracelulares. Devido a esses efeitos na célula, a LPO está intrinsecamente envolvida em doenças como Alzheimer e Parkinson, que estão relacionadas ao mal funcionamento do fluxo de íons pela membrana. (Hermes-Lima 2004, Halliwell & Gutteridge 2015)

Outro importante indicador de estresse oxidativo são as proteínas carboniladas. Os grupos carbonila (C=O) são formados a partir da reação de radicais livre ou aldeídos com proteínas. Um aumento de duas ou três vezes dos níveis considerados normais de proteínas carboniladas (~10% das proteínas celulares) pode ser um dos principais contribuintes para danos e morte celular. Em função disso, esse dano oxidativo também está associado ao envelhecimento e a patologias como tabagismo, doença hepática alcoólica e diabetes, sendo doenças relacionadas à grande produção de radicais (a partir de diferentes fontes) e conseqüentemente ao estresse oxidativo. (Hermes-Lima 2004, Halliwell & Gutteridge 2015)

Além do efeito danoso nas proteínas e membranas celulares, os radicais também podem afetar diretamente o DNA. A oxidação das bases nitrogenadas é considerado um grande fator para a morte celular ou crescimento de células cancerígenas. Alguns dos radicais que podem gerar a apoptose a partir de modificações no DNA são o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). As conseqüências podem ser inúmeras, desde alterar o crescimento celular até modificar o perfil transcriptômico, que pode gerar mutações gênicas que ativam oncogenes e conseqüentemente geram carcinogênese. A origem desse estresse oxidativo está envolvida com o estilo de vida (por exemplo dieta, exposição a poluentes e radiações, uso de drogas como tabaco, etc.) e com inflamação crônica. (Hermes-Lima 2004; Pizzino et al. 2017).

Todos esses danos oxidativos citados são medidos experimentalmente a partir de diferentes protocolos para analisar o grau de estresse oxidativo, bem como enzimas antioxidantes, para investigar os mecanismos adaptativos citados acima. Por exemplo, no mecanismo POS espera-se que ocorra aumento de enzimas antioxidantes durante o

estresse de hipóxia, funcionando como preparo para um aumento de danos oxidativos durante a reoxigenação.

De fato as espécies reativas de oxigênio (ROS) em altas concentrações nas células e tecidos podem levar a diferentes patologias, mas a visão que “radicais livres são sempre vilões” está cada dia mais defasada. A nossa sociedade ainda procura os antioxidantes exógenos em alimentos como frutas e vegetais no intuito de evitar patologias crônicas associadas ao estresse oxidativo, como diabetes tipo 2, câncer e doenças cardiovasculares. Indiscutivelmente esses alimentos estão associados à maior longevidade, mas a correlação com a suplementação de antioxidantes não é comprovada. Estudos recentes de meta análise com suplementação de antioxidantes como vitamina A, C e E e β -carotenos para prevenção de diferentes doenças indicam que tais compostos induzem maior incidência de câncer e mortalidade (Fortmann et al. 2013, Lin et al 2013). O que de fato pode estar relacionado à redução da incidência dessas doenças são os antioxidantes endógenos produzidos naturalmente pelos organismos, que necessitam de pequenas quantidades de ROS para sensibilizar fatores de transcrição associados a genes de antioxidantes. Por exemplo, já é de conhecimento geral que exercício físico previne inúmeras patologias, mas e nesse processo é produzidas quantidades consideráveis de ROS no músculo esquelético. Para explicar esse fenômeno os pesquisadores propuseram o mecanismo de resposta não-linear conhecido como “hormese”, que se opõe a visão clássica que ROS são totalmente indesejados e prejudiciais para a mitocôndria (Yun & Finkel 2014). Assim, pequenas quantidades de ROS são utilizadas na sinalização celular para geração de antioxidantes endógenos, como as enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), para o organismo se proteger de maneira eficiente contra estressores endógenos e exógenos. Isso demonstra a importante função de ROS no surgimento de adaptações fisiológicas ao longo da evolução para proteção contra o estresse oxidativo. (Ristow 2014)

Essas adaptações possivelmente foram originadas devido pressões seletivas do aumento do oxigênio atmosférico (540 My), de forma que os organismos precisaram desenvolver um sistema de proteção contra os danos oxidativos gerados pelos radicais oriundos da respiração celular (Halliwell & Gutteridge 2015). As defesas antioxidantes

são divididas em quatro subclasses: as defesas primárias que lidam diretamente com ROS, podendo ser enzimáticos ou não (GSH, SOD, CAT, etc.); as defesas auxiliares que reciclam ou sintetizam os substratos das defesas primárias (GR, GST, etc.); complexos de metais com enzimas/proteínas e antioxidantes de baixo peso molecular que minimizam o efeito dos metais pesados na produção de radicais (vitaminas C e E, carotenoides, etc); e enzimas de reparo do DNA para eventuais danos gerados. Ao longo da evolução algumas enzimas antioxidantes foram conservadas desde as bactérias até os humanos enquanto outras foram se especificando para diferentes táxons, podendo variar nas sequências de aminoácidos, nos cofatores e substratos. (Hermes-Lima 2004, Halliwell & Gutteridge 2015)

A glutathione (GSH) faz parte do sistema antioxidante mais conhecido, sendo um importante tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina. Está presente desde as leveduras até o ser humano, e também no reino vegetal, com particularidades em cada grupo (Bachhawat & Yadav 2018). No caso de mamíferos a glutathione é transportada através da membrana plasmática nas células por degradação externa na superfície, transporte dos aminoácidos ou dipeptídeos para o citoplasma, seguido pela ressíntese dentro do citosol onde exerce sua atividade antioxidante (Bachhawat & Yadav 2018). Esse sistema é formado por diferentes enzimas primárias e auxiliares e tem o papel fundamental de biotransformação de compostos eletrofílicos, como O_2^- , o principal radical oriundo da respiração celular. A partir de uma reação de redução os compostos perdem a carga e GSH se oxida, gerando a glutathione dissulfeto (GSSG), que posteriormente será reduzida novamente pela enzima glutathione redutase (GR) ou tioredoxina redutase (TrxR) com consumo de NADPH. No caso do radical superóxido (O_2^-) ocorre inicialmente sua dismutação pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) (podem ter cofatores como manganês, cobre e zinco), gerando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é posteriormente hidrolisado pelas enzimas catalase (CAT), glutathione peroxidases (GPX's) e peroxiredoxinas (Prx). No caso da GPX e Prx é necessário a oxidação de um substrato (GSH e Trx, respectivamente) para que ocorra a redução do peróxido de hidrogênio para água. Quando o sistema antioxidante não está em equilíbrio, e os compostos H_2O_2 e O_2^- permanecem em altas concentrações, pode ocorrer a Reação de Fenton. Nessa reação ocorre uma perturbação nos centros

ferro-enxofre (Fe-S) de proteínas, isso gera a liberação de íons ferrosos (Fe^{2+}) que reduzem o H_2O_2 à radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), altamente reativo e causador de danos oxidativos. Dessa forma, o sistema antioxidante está todo interligado entre as enzimas, a glutatona e outros antioxidantes de baixo peso molecular para manter a homeostase redox (Fig. 6). (Hermes-Lima 2004, Moreira 2017).

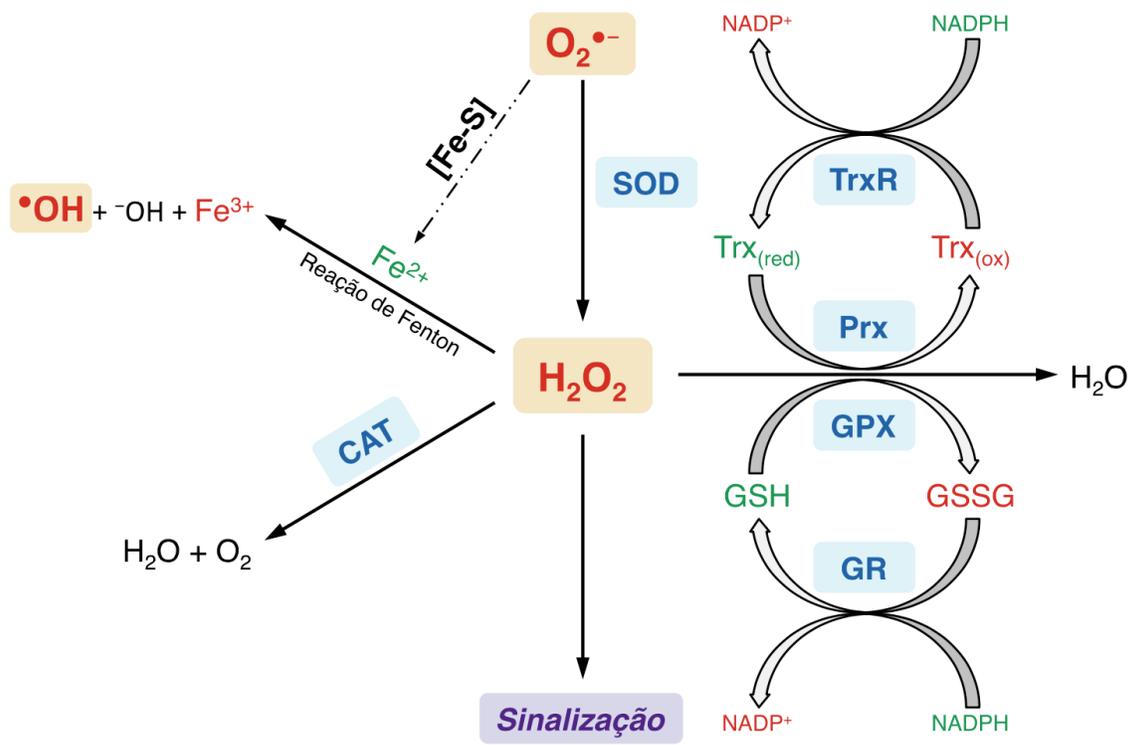


Figura 6. Principais reações envolvidas no sistema antioxidante associado à glutatona (Moreira 2017)

Como dito anteriormente, a explosão cambriana está correlacionada aos níveis de O_2 na atmosfera, e também com outros fatores como o surgimento do colágeno e a estabilização de condições ambientais. Com evidências de esponjas marinhas presentes no período Neoproterozoico, quando o ambiente ainda era hipóxico, é importante o entendimento de mecanismos adaptativos que permitiram a evolução da vida pluricelular desde então. A esponja *H. heliophila* pode ser um bom modelo para analisar a evolução desses mecanismos, levando em consideração sua sobrevivência sob exposição aérea diária, e também por fazer parte da classe Demospongiae, uma das mais primitivas e adaptadas a diferentes condições e ambientes. Assim, o objetivo

geral dessa dissertação é analisar e compreender o funcionamento do metabolismo redox e sistema antioxidante na esponja *H. heliophila* submetida a diferentes estressores (temperatura, radiação solar/UV e exposição aérea) sob condições naturais da espécie. Os objetivos específicos são:

- Verificar a ocorrência ou não do mecanismo POS na esponja *H. heliophila* sob os estresses de radiação solar/UV (dia x noite), exposição aérea (dentro x fora d'água) e o efeito de variações sazonais de condições ambientais (verão x primavera);
- Verificar a possível presença do POS em esponjas na natureza a partir do objetivo específico citado acima, sem ter controle das condições ambientais em laboratório;
- Discutir sobre a evolução do mecanismo POS e suas possíveis origens a partir dos dados obtidos.

Capítulo 2 - Preparo para o estresse oxidativo

Animais tolerantes à hipóxia desenvolveram mecanismos adaptativos para conseguir sobreviver a situações de estresse oxidativo. Algumas adaptações foram brevemente discutidas na Introdução Geral (Capítulo 1), e nesse capítulo será descrito em detalhes o mecanismo conhecido como “preparo para o estresse oxidativo” (POS). Na primeira seção (2.1) é descrito como a teoria surgiu, como se desenvolveu a partir das evidências e quão difundida está no Reino Animal; na segunda seção (2.2) é explicado detalhadamente o mecanismo molecular; e na terceira seção (2.3) é discutido a radiação UV como gatilho para o POS, sendo um dos focos do presente trabalho.

2.1 História

Em 1993 Hermes-Lima & Storey fizeram análise do metabolismo redox em uma espécie de serpente que teve uma resposta não esperada em função ao congelamento ou anóxia. Os antioxidantes endógenos estavam em maiores concentrações durante o

estresse congelante ou da baixa oxigenação, e o grande questionamento foi como esses antioxidantes aumentaram durante o período de baixa oxigenação. Até então acreditava-se que os antioxidantes respondiam apenas após o animal passar por estresse oxidativo, então essas evidências se tornaram divergentes com a literatura conhecida até então. O mecanismo foi então intitulado “preparo para o estresse oxidativo” (POS), que consiste no aumento dos antioxidantes durante situações de baixa oxigenação para o possível momento de estresse oxidativo, que ocorre durante a reoxigenação com a alta produção de espécies reativas (Hermes-Lima et al. 1998). Lushchak e colaboradores (2001) trouxeram uma evidência importante que corroborou com esses resultados, demonstrando um aumento de peroxidação lipídica no peixe dourado (*Carassius auratus*) resistente à hipóxia quando no estado de reoxigenação. Acreditava-se que animais resistentes à hipóxia conseguiam evitar esses danos, mas foi observado que esses peixes aumentam algumas defesas antioxidantes durante a hipóxia severa e passam por estresse oxidativo na reoxigenação, não na hipóxia (Lushchak et al. 2001; Moreira et al. 2022).

Por muitos anos ficou sem explicação o que causava a ativação dos antioxidantes em situações de hipóxia severa – ou seja, o POS não tinha um mecanismo molecular descrito. Se acreditava que durante a hipóxia haveria uma queda da produção de ROS – era o esperado. Assim, se pensava que a ativação da produção de antioxidantes não poderia ser por meio de ROS. Entretanto, essa premissa estava errada. Apareceram muitas evidências indiretas de aumento de ROS na hipóxia, porém sendo um aumento menor comparado à reoxigenação. Em 2013 Welker e colaboradores propuseram que pode haver uma pequena produção de oxi-radicais durante a hipóxia nos animais que fazem POS. Tal aumento seria dificilmente detectável em ensaios bioquímicos por ser um processo rápido, apenas o suficiente para ativar fatores de transcrição de genes de enzimas antioxidantes.

Desde então, nos últimos 20 anos foram surgindo várias evidências pelo mundo de animais que passam por estresse oxidativo em função de mudanças ambientais sazonais e que respondem utilizando o mecanismo POS. Alguns estressores foram caracterizados como possíveis gatilhos para o POS, sendo eles: estivação, hipóxia, congelamento, desidratação, exposição aérea e radiação ultravioleta. Já foram

descritas mais de 120 espécies de animais POS-positivas (Hermes-Lima et al. dados não publicados), incluindo 9 filós diferentes (Fig. 7). Dentre eles estão a carpa comum (*Cyprinus carpio*) sob hipóxia, o coral *Veretillum cynomorium* sob exposição aérea, o caramujo gigante africano (*Achatina fulica*) sob estivação, o mosquito da Antártida (*Belgica antarctica*) sob desidratação, o gastrópode *Littorina littorea* sob anóxia e congelamento e a minhoca *Amyntas gracilis* sob diferentes doses de radiação ultravioleta (Lushchak et al. 2005; Teixeira et al. 2013; Salway et al. 2010; Lopez-Martinez et al. 2009; English & Storey 2003; Chuang & Chen 2013).

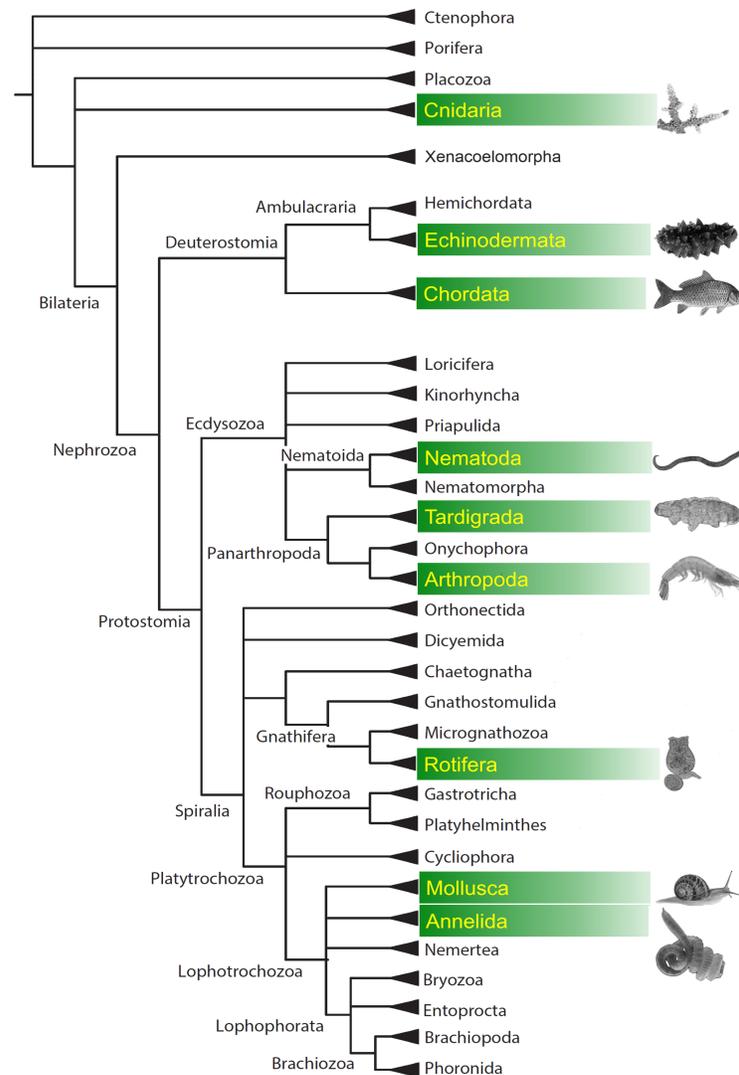


Figura 7. Filos do Reino Animal com espécies comprovadamente POS-positivas (Moreira et al. 2022)

Um dos atuais desafios da pesquisa sobre o POS é mostrar sólidas evidências que o mecanismo acontece na natureza. A grande maioria dos estudos são testes controlados em laboratório, que imitam as condições do habitat natural do animal. Porém, na natureza as condições não são pré-determinadas como em laboratório, e há limitações. As condições ambientais podem ter uma variabilidade muito grande ao longo do período que os animais são coletados, como por exemplo a radiação solar e UV, temperatura do ar e da água (para animais aquáticos), concentração de matéria orgânica, pH, salinidade, oxigenação, umidade relativa do ar, entre outras variáveis. A grande dificuldade é isolar uma ou mais variáveis para determinar seu efeito na alteração metabólica observada no estudo. Por exemplo, não é possível estabelecer com precisão qual condição ambiental foi determinante para um aumento de antioxidantes se houve grande variação na temperatura e na radiação UV, como seria possível se fosse feito em laboratório um desenho experimental com temperatura constante, mas diferentes doses de radiação UV.

Recentemente foi publicado um estudo com mexilhões (*Brachidontes solisianus*) (Moreira et al. 2021) para avaliar o metabolismo redox da espécie sob dois estressores citados anteriormente: exposição aérea e radiação UV, fazendo coleta em campo sem controle dessas condições. Foram feitos dois dias de coleta, coincidentemente um estava mais ensolarado que o outro, e a resposta antioxidante foi diferente: ocorreu mecanismo POS no dia ensolarado, e não no dia nublado (Moreira et al. 2021, Moreira et al. 2022 - submetido). Com esses dados é possível presumir que mais de uma variável ambiental tenha interferido na resposta antioxidante (exposição aérea, radiação solar e temperatura), e também a dose do estressor. Apesar dessas dificuldades, estudos sob condições naturais são importantes para investigar a ecofisiologia animal em cenários ecologicamente relevantes. Para fazer isso, durante a coleta é registrado a variação nas condições ambientais como uma tentativa de identificar aquelas que podem desempenhar um papel na resposta metabólica (Moreira et al. 2021).

Das mais de 120 espécies POS-positivas já documentadas (Hermes-Lima, dados não publicados) apenas algumas tiveram os animais coletados na natureza sem controle das condições ambientais: a espécie de ouriço do mar *Echinometra lucunter* (estresse da exposição aérea), os anuros *Duttaphrynus melanostictus*, *Nanorana*

parkeri, *Proceratophrys cristiceps* e *Pleurodema diplolister* (estresses de estivação e hibernação), o peixe *Astyanax elachylepis* (estresse de hipóxia) e os mexilhões citados anteriormente *Brachidontes solisianus* (Pereira 2021; Patnaik & Sahoo 2021; Moreira et al. 2021a; Moreira et al, 2021b; Ondei et al. 2020, Niu et al. 2022 e Niu et al. 2018) (Tab. 1). Com a literatura ainda limitada é importante procurar novas espécies, possivelmente de filós ainda não documentados, que se enquadram no padrão POS em seu habitat natural. Em função disso, um dos objetivos do presente trabalho é fazer uma coleta em campo de *H. heliophila* para testar o POS sob as condições ambientais naturais da espécie.

Espécie	Estresse	POS	Refência
Mollusca			
Bivalvia			
<i>Brachidontes solisianus</i>	EA	+	Moreira et al. 2021b
Echinodermata			
Holothuroidea			
<i>Echinometra lucunter</i>	EA	+	Pereira 2021
Chordata			
Actinopterygii			
<i>Astyanax elachylepis</i>	H	+	Ondei et al. 2020
Amphibia			
<i>Duttaphrynus melanostictus</i>	HI	+	Patnaik & Sahoo 2021
<i>Nanorana parkeri</i>	HI	-	Niu et al. 2018
<i>Nanorana parkeri</i>	A	+	Niu et al. 2022
<i>Proceratophrys cristiceps</i>	E	+	Moreira et al. 2021a
<i>Pleurodema diplolister</i>	E	+	Moreira et al. 2021a

Tabela 1. Espécies POS-positivas que foram obtidas e testadas em condições ambientais naturais da espécie. EA = exposição aérea; H = hipóxia; HI = hibernação; E = estivação; A = altitude.

2.2 Mecanismo molecular

Muitos animais habitam locais inóspitos, com condições extremas de temperatura, concentração de oxigênio, umidade relativa, etc. Um dos possíveis recursos utilizados por animais para sobreviver a tais condições é a depressão metabólica. São desativadas as vias de alto consumo de ATP, incluindo enzimas metabólicas, que resulta em redução na taxa de consumo de O₂ pela cadeia transportadora de elétrons. Como o animal fica em estado hipometabólico, necessitando de pouco oxigênio e nutrientes, acreditava-se que não haveria produção significativa de ROS devido à baixa disponibilidade do substrato, mas evidências têm mostrado diferentes perspectivas. Um dos primeiros estudos que refutou essa visão clássica foi Rao et al. (1983), que observou em cachorros com oclusão coronária (meio hipóxico), um aumento de 55% dos níveis de oxi-radicais em comparação com o meio normóxico. Outro trabalho com células bovinas também mostrou o aumento de radical superóxido durante a hipóxia (Hernansanz-Agustín et al. 2014). Desde então muitos estudos tem corroborado com a nova visão, principalmente com mamíferos, mas também com invertebrados (Maupoil & Rochette 1988; Paddenberg et al 2003; Hernansanz-Agustín 2014), e têm demonstrado que pode ocorrer a formação de ROS em animais sob hipóxia.

A explicação do mecanismo molecular do POS tem início nesse possível aumento de ROS durante momento de baixa concentração de oxigênio, descrito acima. Esse aumento de ROS está envolvido com a regulação de genes de enzimas antioxidantes a partir de fatores de transcrição (Nrf2, p53, HIF-1, NF-kB e FoxO), de forma que esses fatores são sensíveis ao ROS e responsáveis pela expressão gênica de grande parte do sistema antioxidante. (Welker et al. 2013; Hermes-Lima et al. 2015)

Uma importante via metabólica, e a mais conhecida envolvendo expressão gênica de antioxidantes é a associação entre o fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) (que faz parte de uma grande família de proteínas Nrf), e sua proteína reguladora, Keap1. Em baixas concentrações de ROS é formado no citoplasma um complexo ubiquitinante de Keap1–Culina3, que marca Nrf2 para sua degradação no proteassoma. Na presença de

ROS o complexo passa por uma mudança conformacional que impede a ubiquitinação de Nrf2, que conseqüentemente se acumula no citosol até migrar para o núcleo, onde se liga aos elementos de resposta antioxidante (ARE) presentes nos genes envolvidos com a transcrição de enzimas antioxidantes (Welker et al. 2013; Hermes-Lima et al. 2015). O Nrf2 é um importante regulador de genes envolvidos na biossíntese de glutatona e enzimas antioxidantes como SODs, GPXs, GSTs e catalase (Chan & Kan 1999, Banning et al. 2005, Suzuki et al. 2005). Todos esses antioxidantes citados foram conferidos espectrofotometricamente nas esponjas *H. heliophila* para o presente trabalho.

A origem evolutiva do Nrf2 é associada ao aumento dos níveis de oxigênio na Era Paleoproterozoica, quando houve o Grande Evento de Oxigenação (GOE) (Gacesa et al. 2016). Já a proteína Keap1 tem sido sugerido na academia que evoluiu a partir de ancestrais dos animais bilaterais. Essa conclusão é baseada em estudos como de Fuse & Kobayashi (2017), que encontrou homólogos de Nrf2 em leveduras, mas não de Keap1. Doonan e colegas (2019), corroborando com Gacesa e colegas (2016), fez uma análise filogenética a partir do banco de dados, que demonstrou a presença de proteínas Nrf em metazoários basais (esponjas, ctenóforos, placozoários e cnidários). Curiosamente uma das espécies analisadas, a esponja *Amphimedon queenslandica*, possui duas proteínas Nrf, indicando possivelmente uma adaptação específica da espécie, quando comparado com outras espécies de metazoários basais, que possuem apenas um. Com esses dados Doonan et al (2019) observou que os homólogos de Nrf apareceram antes dos metazoários basais (esponjas, ctenóforos e placozoários), e que as proteínas da família de Keap1 surgiram já nos cnidários.

A proteína p53 é conhecida por seu efeito anti-tumoral, sendo uma importante proteína de checagem para proteção contra possíveis danos no DNA, podendo gerar apoptose celular. Porém, a p53 também está intrinsecamente envolvida na expressão de genes de enzimas SODs e GPXs (Mai et al. 2010, Tan et al. 1999). Outro importante efeito antioxidante da p53 é a regulação do gene da glutaminase 2 mitocondrial, uma enzima que catalisa a síntese de glutamato, precursor de glutatona. A p53 está presente no Reino Animal desde o filo Placozoa, um dos metazoários mais basais, mas possui alguns buracos na árvore filogenética em que os genes foram suprimidos, estando ausente nos poríferos, cnidários, crustáceos e hexápodos (Aberg et al. 2017).

Outro importante fator de transcrição envolvido no estresse oxidativo é a subfamília das proteínas forkhead box (Fox), FoxO. Essa subfamília está envolvida no ciclo celular, apoptose e processos metabólicos, sendo comumente associada a carcinogênese (Malik & Storey 2011). Já foram identificados diferentes genes da subfamília, tendo surgido evolutivamente a partir dos poríferos. No caso da esponja *Amphimedon queenslandica* foram identificados 17 genes da família Fox, incluindo FoxO (Shimeld et al. 2010). As proteínas FoxO são reguladas a partir de mudanças pós-traducionais (fosforilação, acetilação e ubiquitilação) que podem influenciar na capacidade de ligação ao DNA (Malik & Storey 2011, Welker et al. 2013). O estresse oxidativo interfere em algumas dessas mudanças, podendo favorecer a translocação de FoxO para o núcleo, onde se liga a genes-alvo, como das enzimas antioxidantes SOD2 e catalase (Kops et al. 2002; Greer & Brunet 2005). Assim, os fatores de transcrição FoxO podem regular a célula que está sob estresse oxidativo para aumentar a transcrição de genes antioxidantes, desempenhando um importante papel em episódios de hipóxia.

Os fatores de transcrição NF- κ B também desempenham um importante papel na resposta ao estresse oxidativo, apesar de serem mais conhecidos por sua função imunológica. Conseguem se ligar a uma sequência de 10 pares de base de sítio κ B nos genes alvo para favorecer a transcrição. O NF- κ B é formado por duas subunidades, podendo ser homo ou heterodímero dependendo da espécie e tipo celular, sendo as já conhecidas em mamíferos p65, p50, p52, RelB e cRel. Quando desativado, o fator NF- κ B encontra-se ligado a proteínas I κ B no citoplasma, que impedem sua translocação para o núcleo. O desmembramento do complexo I κ B/NF- κ B a partir da fosforilação do I κ B possibilita o transporte do NF- κ B até núcleo, onde pode se ligar aos genes alvo (Welker et al. 2013). Já foi demonstrado o efeito dos fatores NF- κ B na expressão de enzimas antioxidantes como MnSOD, CuSOD, GST e GPX (Morgan & Liu 2011). Esses fatores de transcrição foram altamente conservados ao longo da evolução, mas variam na sua composição proteica, já tendo sido identificados homólogos em poríferos, cnidários e vertebrados em geral, estando ausente apenas nos nematóides (Williams & Gilmore 2020).

Outro fator de transcrição que modula a homeostase redox é o fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1). É um heterodímero composto por uma subunidade HIF-1 α que é regulada pela concentração de oxigênio, e uma subunidade constitutiva HIF-1 β . Em normóxia HIF-1 α é hidrolisada por enzimas prolin-hidrolases (PHD) e ocorre a sinalização para sua degradação pela proteína VHL, o que inibe a dimerização com a subunidade HIF-1 β , e conseqüentemente a ativação da transcrição dos genes-alvo. A subunidade HIF-1 α é produzida constantemente, mas só se estabiliza com a outra subunidade sob condições hipóxicas. Dessa forma, quando o dímero está no núcleo, ele se liga aos elementos de resposta à hipóxia (HRE) presentes nas sequências regulatórias dos genes-alvo (Welker et al. 2013). Muitos genes são regulados pelo HIF-1, envolvidos com vias metabólicas como glicólise e angiogênese, e também com enzimas antioxidantes, como GPX (Bierl et al. 2004). Ao longo da evolução houve diferenciação e surgimento de genes homólogos, presentes nas esponjas por exemplo. Porém nesse caso também houve perda ou ausência no transcriptoma de genes de enzimas envolvidas na via, como PHD e VHL, podendo haver variação entre as classes dos poríferos. A classe Demospongiae especificamente possui gene homólogo a HIF-1 α e VHL, estando totalmente ausente apenas os genes envolvidos com as proteínas PHD. A partir dos cnidários todos os genes envolvidos nessa via de transcrição estão presentes e conservados ao longo do Reino Animal (Mills et al. 2018).

O mecanismo molecular do POS depende significativamente desses fatores de transcrição para produção das enzimas antioxidantes. Como foi descrito anteriormente, o estresse ambiental (congelamento, hipóxia, estivação, desidratação, exposição aérea e radiação UV) pode levar a produção, ainda que limitada, de ROS. Esse aumento relativo ativa os fatores transcrição, que se translocam para o núcleo, onde se ligam aos genes-alvo de enzimas como CAT, SOD e GPX. Com o aumento da tradução e modificações pós traducionais de enzimas antioxidantes o sistema fica “preparado” para o momento de reperfusão/reoxigenação, quando majoritariamente ocorre o estresse e o aumento de danos oxidativos como peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, (Fig. 8).

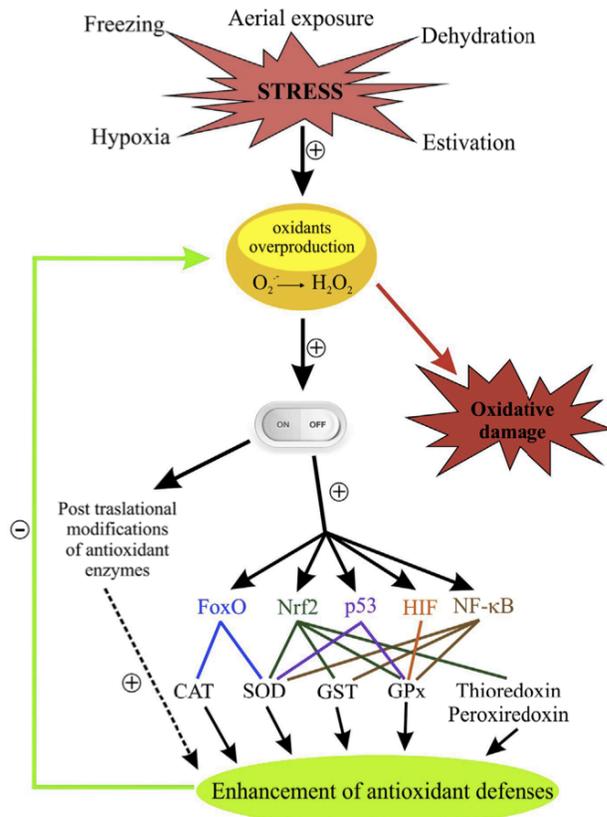


Figura 8. Mecanismo molecular do “preparo para o estresse oxidativo”. Estresses ambientais com privação de oxigênio geram um aumento de ROS que por sua vez ativa os fatores de transcrição FoxO, Nrf2, p53, HIF e NF-κB para transcrição e tradução de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GST e GPX). Também ocorrem mudanças pós traducionais nas enzimas já sintetizadas. Com as enzimas antioxidantes em maior atividade o sistema antioxidante fica ativo para proteção do organismo aos danos oxidativos provenientes da reoxigenação/reperfusão

2.3 Radiação ultravioleta

A radiação UV até recentemente não era considerada um dos possíveis gatilhos para o POS, até que foi proposto em 2020, a partir de uma revisão feita com busca ativa de artigos em diferentes plataformas de pesquisa, que o UV pode gerar respostas moleculares semelhantes às outras condições (hipóxia, estivação, etc.) (Geihs et al. 2020). A radiação UV é uma condição ambiental que tem efeito nocivo em animais terrestres e aquáticos, do filo mais basal até os cordados. No caso de ecossistemas aquáticos, em invertebrados sésseis ou com pouca mobilidade, a interferência pode ser ainda maior. A exposição pode gerar diferentes efeitos metabólicos de forma direta, danificando biomoléculas e estruturas celulares, ou indireta, a partir da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Schuch et al. 2017). No caso da ação indireta, muitos estudos indicam uma resposta à exposição UV dose-dependente, de forma que

em baixas doses ocorre uma pressão seletiva para adaptações fisiológicas. Esse mecanismo dose-dependente é conhecido como hormese e é caracterizado por uma resposta bifásica: um determinado estressor, quando em baixas doses, gera uma resposta adaptativa ao evento, e quando em altas doses tem um efeito tóxico (Fig. 9) (Yun & Finkel 2014). A hormese se enquadra no padrão observado em estudos analisados por Geihs e colegas (2020) na resposta à diferentes doses de radiação UV (Chuang & Chen 2013; Won et al., 2014; Singh et al., 2015).

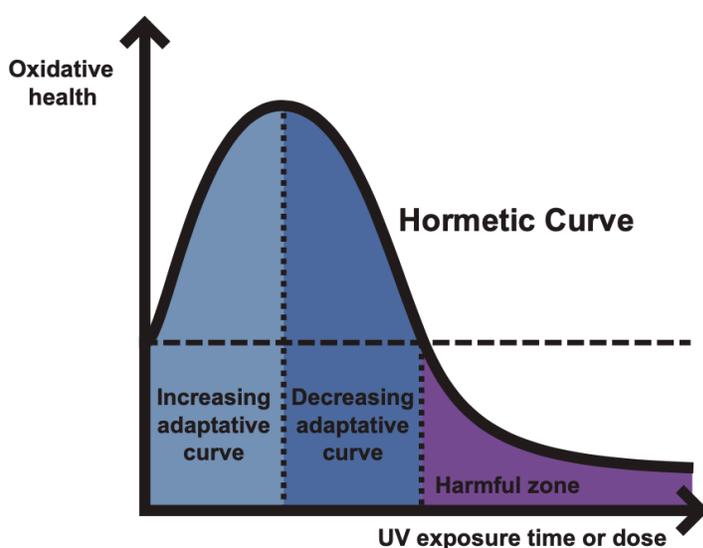


Figura 9. Padrão hormético contextualizado para o metabolismo redox com o estressor radiação UV dividido em três fases: em baixas doses de UV ocorre uma resposta adaptativa a partir de um aumento relativo de ROS para produção de antioxidantes; em doses medianas se inicia o processo de estresse oxidativo; em altas doses o efeito do ROS é tóxico, podendo gerar dano no DNA e peroxidação lipídica

Um exemplo claro da resposta dose-dependente ao UV é o estudo citado anteriormente com mexilhões da espécie *Brachidontes solisianus* (Moreira et al. 2022 - submetido). A coleta ocorreu em dois dias diferentes, com radiações UV diferentes conferidas pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), em consequência das condições ambientais naturais. A radiação solar cumulativa do dia ensolarado (dia 01) foi de 15.381 kJ/m², enquanto no dia nublado (dia 02) foi de 5.489 kJ/m² (Moreira et al. 2022 - submetido). Como esperado (Geihs et al. 2020), houve uma resposta dose-dependente, em que no dia 01 houve aumento significativo de GSht, GSH, TBARS e proteínas carboniladas, enquanto no dia 02 não houve diferença significativa em nenhum antioxidante ou marcador de estresse oxidativo (Moreira et al. 2022-submetido) (Fig. 10).

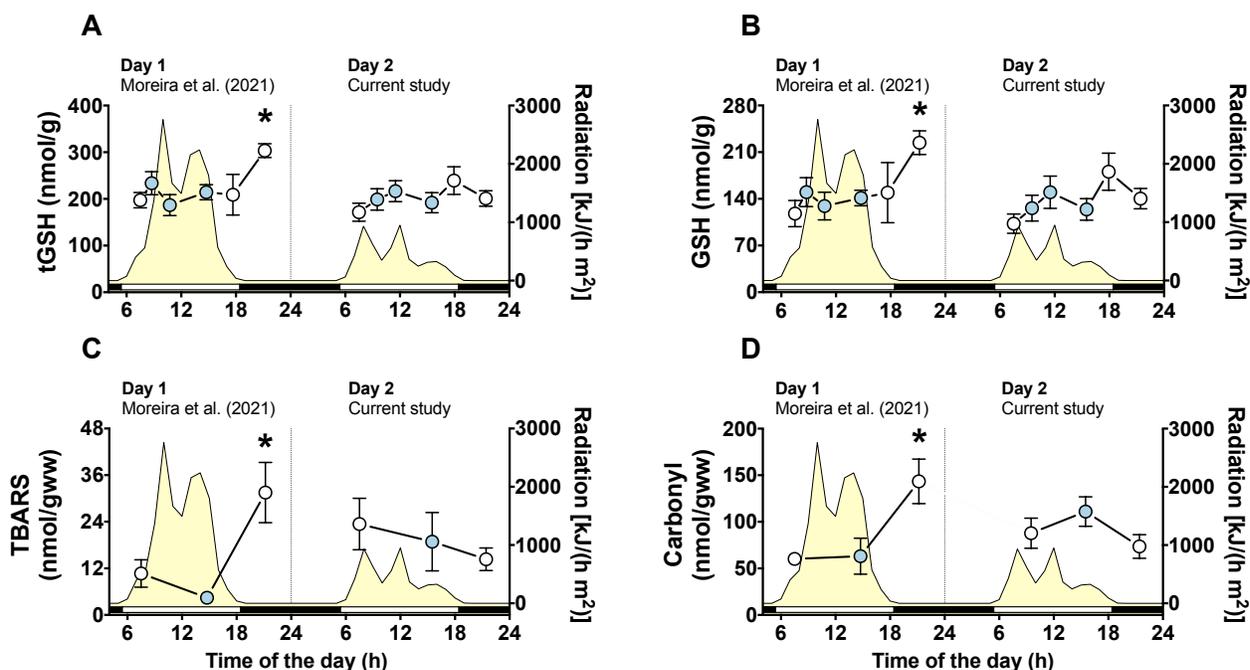


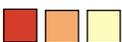
Figura 10. Níveis de glutatona total (A), glutatona reduzida (B), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (C) e proteínas carboniladas (D) em mexilhões *Brachidontes solisianus*. Os animais ficaram expostos ao ar no início da manhã e no final da tarde em dois dias diferentes de coleta. O sombreado amarelo representa a radiação solar global no eixo Y direito e as barras pretas e brancas, o fotoperíodo. Os círculos brancos representam o grupo de animais expostos ao ar, e os azuis os submersos. O asterisco denota a diferença significativa entre os animais em diferentes tempos de exposição ou submersão, indicado no eixo X. GSht e GSH: N=7-11; TBARS e proteínas carboniladas: N=8-9. Os dados dos animais coletados no dia 01 foram obtidos de Moreira et al 2021 e colegas e do dia 02 Moreira et al. 2022 - submetido

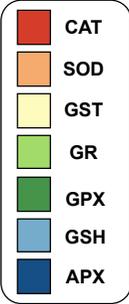
Outros fatores também podem interferir na resposta metabólica à radiação UV: tamanho corporal, estilo de vida (diurno ou noturno) e composição de pele e/ou esqueleto. Animais sésseis de ecossistemas intertidais, como as esponjas *H. heliophila*, podem estar mais sujeitos aos efeitos nocivos, e ter uma resposta mais acentuada de aumento de antioxidantes endógenos (Geihs et al. 2020). Além dos fatores físicos dos animais que podem interferir no grau de resposta e dano oxidativo, outros estressores podem estar envolvidos, principalmente em pesquisas feitas com animais na natureza sem controle de condições como salinidade, pH, temperatura do ar e da água, etc. No estudo de Moreira et al. 2022 houve muita variação de temperatura entre os dois dias,

então não foi possível presumir que a radiação teve efeito significativo sobre o metabolismo redox do mexilhão.

A partir dos dados (Fig. 10), Moreira e colegas (2022) corroboraram com Geihs e colegas (2020), demonstrando que o tempo e a dose de radiação UV são determinantes para a resposta antioxidante do animal sob estresse oxidativo, além dos fatores físicos citados anteriormente. Com tantas variáveis, animais de diferentes filos invertebrados que habitam locais ecologicamente semelhantes, como *H. heliophila* e *B. solisianus*, pode haver diferenças no mecanismo-resposta, na proporção de antioxidantes endógenos sintetizados e até mesmo no momento significativo de estresse oxidativo (durante a exposição ou submersão, por exemplo). Apesar de todas essas variáveis, observou-se o padrão POS em *Brachidontes solisianus*, sendo então caracterizada como mais uma espécie POS-positiva, com possivelmente dois estressores associados (radiação solar e exposição aérea/hipóxia funcional).

Com análises feitas a partir de busca ativa de artigos publicados até 2019, Geihs e colegas (2020) propuseram a inserção da radiação UV como possível gatilho do POS, mas com algumas ressalvas e diferenças. O mecanismo molecular descrito na seção anterior (2.2), para animais tolerantes à hipóxia que obedecem aos critérios do POS, possui muitas semelhanças com o mecanismo gerado pela radiação UV. Porém, no caso do último, ocorre indução de formação de ROS a partir da ativação de cromóforos excitados por UV-A (Yagura et al. 2017) ou por enzimas geradoras de ROS induzidas por UV-B, como NADPH-oxidases e ciclooxigenases (Schuch et al., 2017). Outra diferença relevante é que no caso do POS-UV não há necessariamente uma depressão metabólica associada como ocorre com o POS gerado por estivação, desidratação e congelamento (Geihs et al. 2020). Com essas ressalvas, foi descrito o padrão POS-UV, sendo incluídas 17 espécies de 6 filos diferentes que obedecem ao padrão (Fig.11)

Phylum	Species		↑ Antioxidants	↑ ROS	↑ Stress markers
Cnidaria	<i>Acropora microphthalmal</i>				
Rotifera	<i>Brachionus sp.</i>			✓	
Annelida	<i>Amyntas gracilis</i>				✓
Arthropoda	<i>Mythimma separata</i>				✓
	<i>Tigriopus japonicus</i>			✓	
	<i>Eudiaptomus gracilis</i>				
Echinodermata	<i>Tripneustes gratilla</i>				✓
	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>				✓
Chordata	<i>Catla catla</i>				✓
	<i>Gadus morhua</i>				✓
	<i>Gambusia holbrooki</i>				✓



- CAT
- SOD
- GST
- GR
- GPX
- GSH
- APX

Figura 11. Alterações esquemáticas no metabolismo redox em diferentes espécies animais em resposta à UVR. Na figura observam-se 12 espécies de 6 filos respondendo à UVR de acordo com as variáveis: níveis/atividade de antioxidantes endógenos (GSH e antioxidantes enzimáticos), formação de ROS e marcadores de estresse oxidativo (peroxidação lipídica, proteínas carboniladas e danos no DNA). A figura mostra apenas variáveis que tiveram aumento durante a exposição à UVR. (Geihs et al. 2020)

Capítulo 3 - Metodologia

3.1 Coleta e local

Foram feitas duas expedições para São Sebastião (SP) para coletar as amostras de *H. heliophila* na Baía do Araçá, uma praia que foi sedimentada para fins de pesca, formando um grande costão rochoso rico em matéria orgânica (Fig. 12). O clima da cidade é tropical, com a temperatura média mensal variando entre 19.6 a 25.2°C ao longo do ano, sendo fevereiro o mês mais quente, com média de 25.2 °C e com mais horas de sol por dia, 8.18h. A cidade possui um índice pluviométrico anual alto, em média 1973mm, sendo o mês de janeiro o mais chuvoso (284mm) e com menos horas de sol por dia (5.93h). Em relação à temperatura da água do mar a média anual é de 23.65°C, sendo fevereiro o mês com temperatura da água mais alta, cerca de 27°C. Em contrapartida, em setembro a temperatura média é de 20.2°C e da água 21°C, tendo em média 6.2h de sol por dia (Climate-Data, 2022).



Figura 12. Baía do Araçá (Vielá Dona Petronília - Topolândia, São Sebastião SP, 11600-000)

A Baía do Araçá abrange três praias, duas ilhas, manguezais, costões rochosos e uma área entre-marés, que compreende uma planície intertidal de até 300m de largura, onde foram feitas as coletas de *H. heliophila*, e uma zona subtidal, que fica permanentemente submersa (Fig. 13). A diversidade ambiental propicia uma grande biodiversidade associada, sendo um local comumente utilizado para estudos relacionados à biologia e ecologia. Além disso, é um local próximo à cidade, sendo há muito tempo exposto a ações antrópicas e, por isso, possui muita matéria orgânica disponível (Amaral et al. 2016).

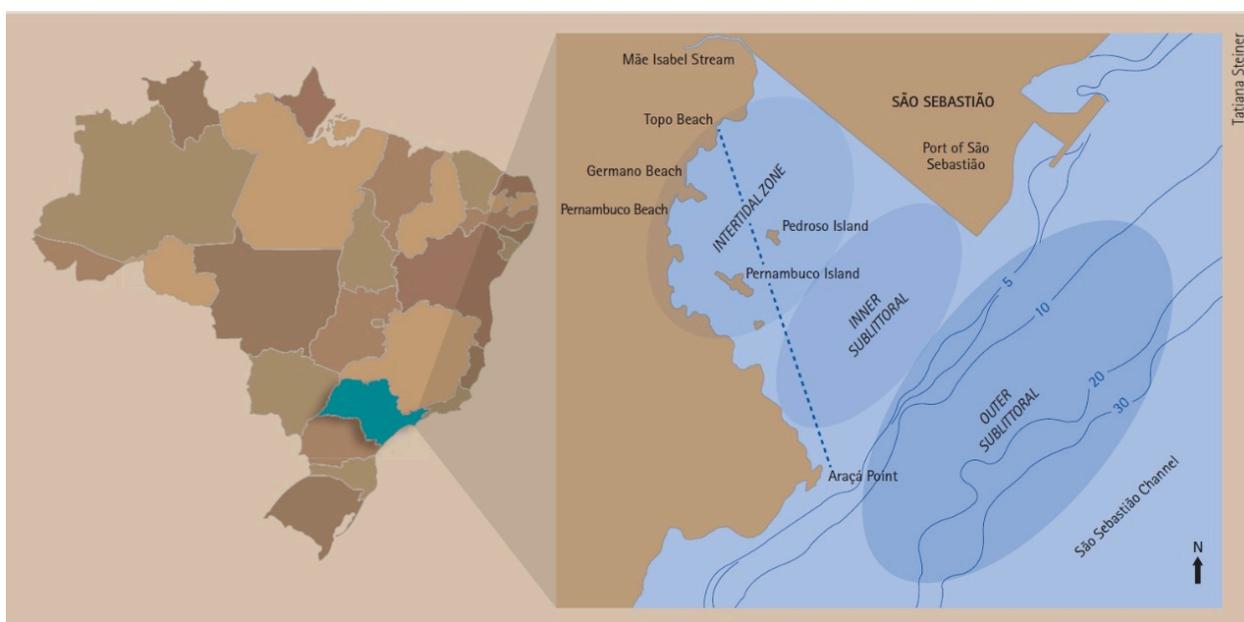


Figura 13. Baía do Araçá e suas diferentes áreas topográficas: zona intertidal, sublitoral interno e sublitoral externo (Amaral et al. 2016)

Nesse contexto, surgiu o “Project Biota/Fapesp-Araçá”, que tem o objetivo de entender como a zona costeira de Araçá se comporta como um sistema complexo, considerando a integração entre processos físicos, biológicos e sociais dentro da baía. O projeto fez uma coletânea de espécies já documentadas na região (1950-2010), além de atualizar para novas espécies. Os resultados mostraram mais de 1.300 táxons presentes na região, com aproximadamente 50 que ainda não haviam sido identificados (Amaral et al. 2016). As algas estão entre os organismos mais abundantes, além de ostras, caranguejos, cracas, e a esponja de interesse, *H. heliophila* (Fig. 14).

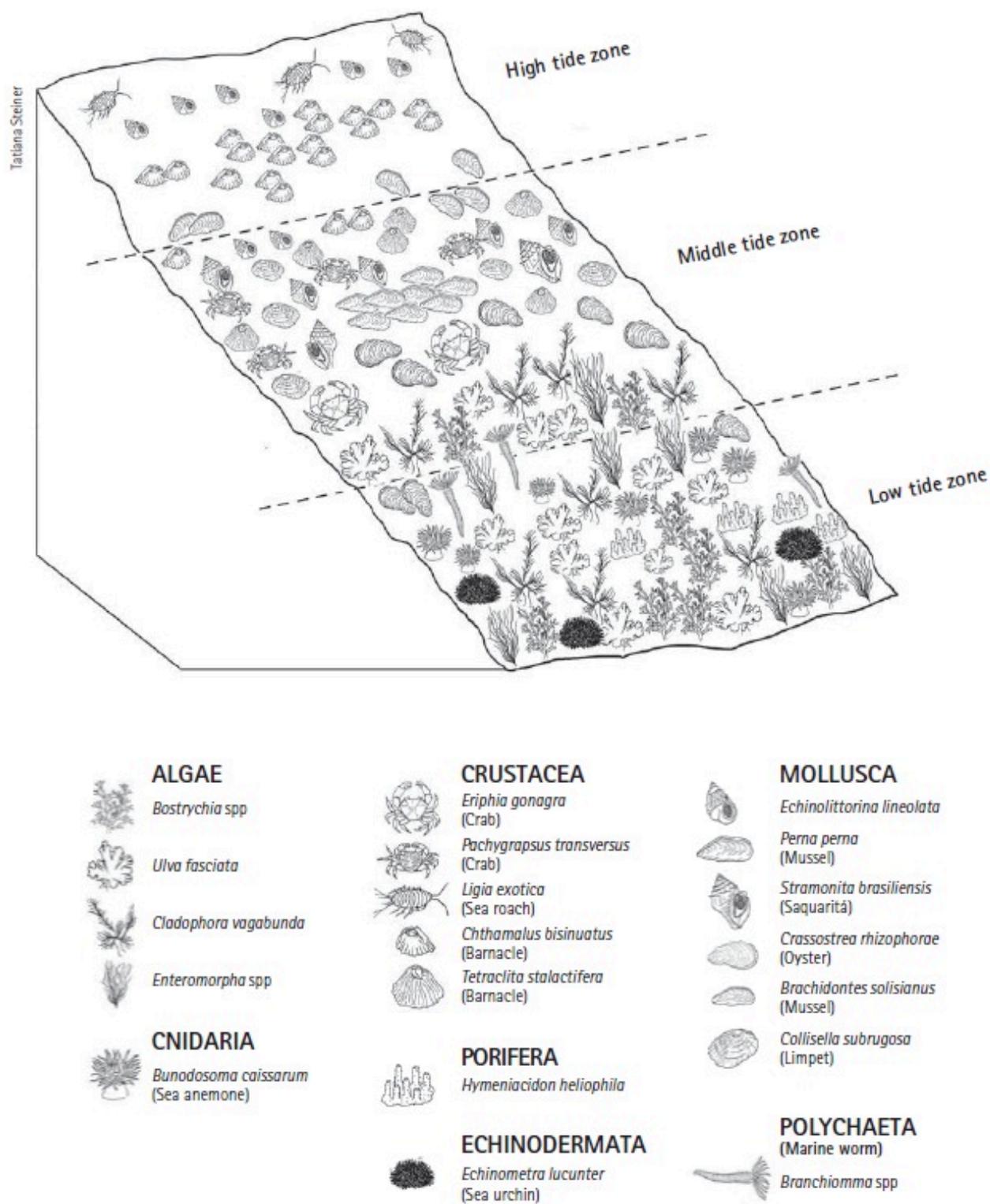


Figura 14. Distribuição espacial das espécies mais comuns de macroinvertebrados na Baía do Araçá. O número de ilustrações de cada espécie na figura representa sua abundância relativa na natureza (Amaral et al. 2016)

A escolha da data das expedições dependeu da ocorrência de maré baixa (i.e., igual ou abaixo de 0,3), de acordo com a tábua de marés (Tábua de marés, 2021). Com a maré acima de 0,3 a coleta fica impossibilitada tanto pela dificuldade de raspagem das amostras no substrato como pela inviabilidade de acesso a pé à praia. Sendo assim, realizamos três dias de coleta: (i) 28/02/2021 (verão); (ii) 06/09/2021 (primavera) e (iii) 07/09/2021 (primavera) (Licença de coleta SISBio 28917-1). Como esperado, em fevereiro o clima estava com temperaturas do ar e da água, além do índice de radiação solar e UV, consideravelmente acima das taxas de setembro. No verão, foram coletadas 7 amostras de *H. heliophila* expostas ao ar (Fig. 15A) e 7 submersas (Fig. 15B) entre 9 e 10h30. Já na primavera, realizamos dois dias diferentes de coleta, foram 6 amostras de esponjas expostas ao ar pela manhã, 6 expostas pela noite, 6 submersas pela manhã e 6 submersas pela noite. No dia 2, a coleta da manhã foi entre 9 e 10h e a da noite entre 20h20 e 21h30, enquanto no dia 3 a coleta da manhã foi entre 8h20 e 9h30 e a da noite entre 20h40 e 22h. Os horários foram determinados de acordo com a maré baixa (Tábua de marés, 2021).

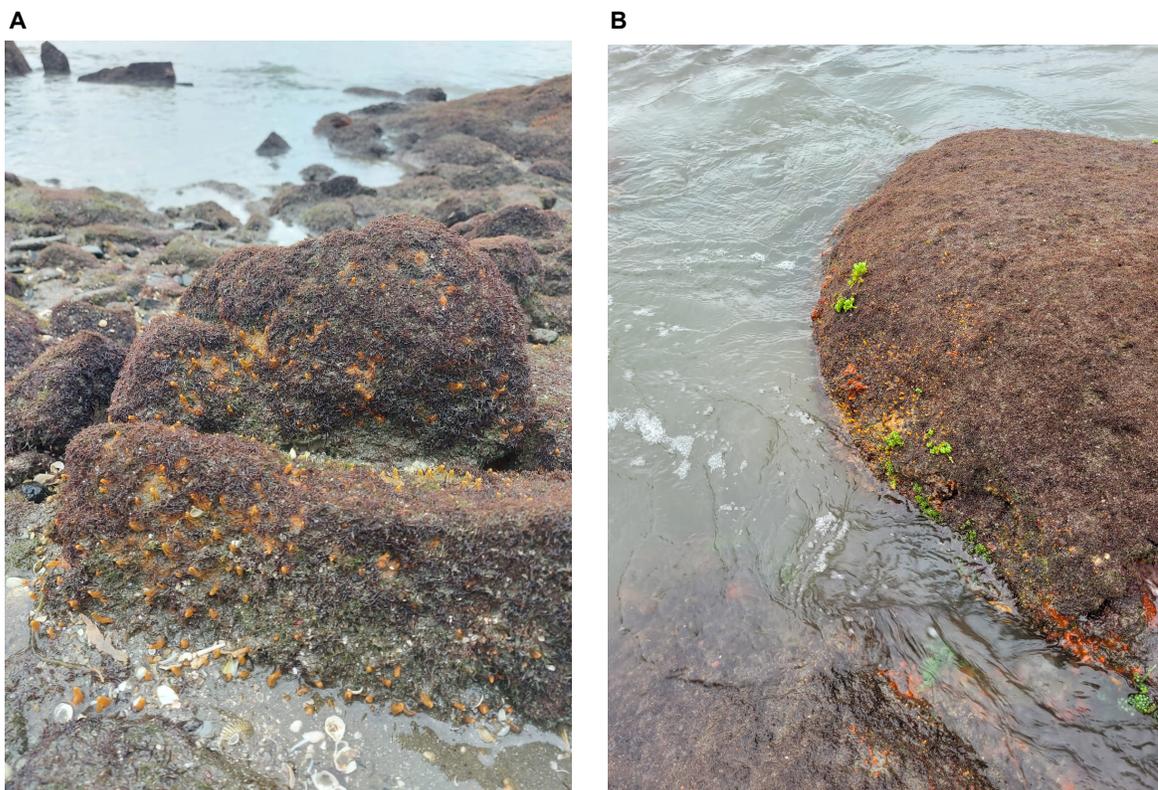


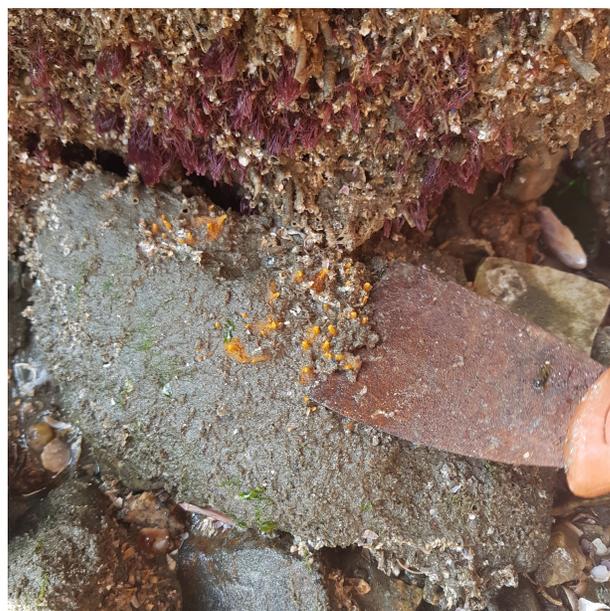
Figura 15. Colônias de *H. heliophila* sob exposição aérea (A) e em submersão (B) em São Sebastião (SP) em setembro de 2021.

As localizações foram demarcadas com material flutuante amarrado em fio de nylon e presos em pedras próximas à diferentes colônias de *H. heliophila*, que foram retirados ao final da expedição (Fig. 16A). Para diferenciar os indivíduos, cada amostra retirada do substrato tinha no mínimo 5 m de distância entre outras. As esponjas foram raspadas do substrato com espátula (Fig. 16B), deixando tecido o suficiente para ser regenerado. Em seguida as amostras foram transferidas para um recipiente com água do mar para fazer uma rápida lavagem (Fig. 16C), seguido de uma limpeza mais detalhada, retirando excesso de substrato com pinça em placa de petri e isolando ao máximo as papilas da esponja (Fig. 16D). Em ambas coletas foi levado para a praia um botijão de nitrogênio líquido para congelar a esponja instantaneamente em tubos de 50 mL logo após a limpeza, preservando a bioquímica do animal no momento de interesse. Após o congelamento, as amostras foram armazenadas em isopor com gelo seco, na temperatura aproximada de -80°C , até chegar na Universidade de Brasília, onde foram transferidas para um ultra-freezer em -80°C . Foram documentados os horários de coleta de todas as amostras, as coordenadas geográficas e a temperatura da água foi aferida com termômetro.

A.



B.



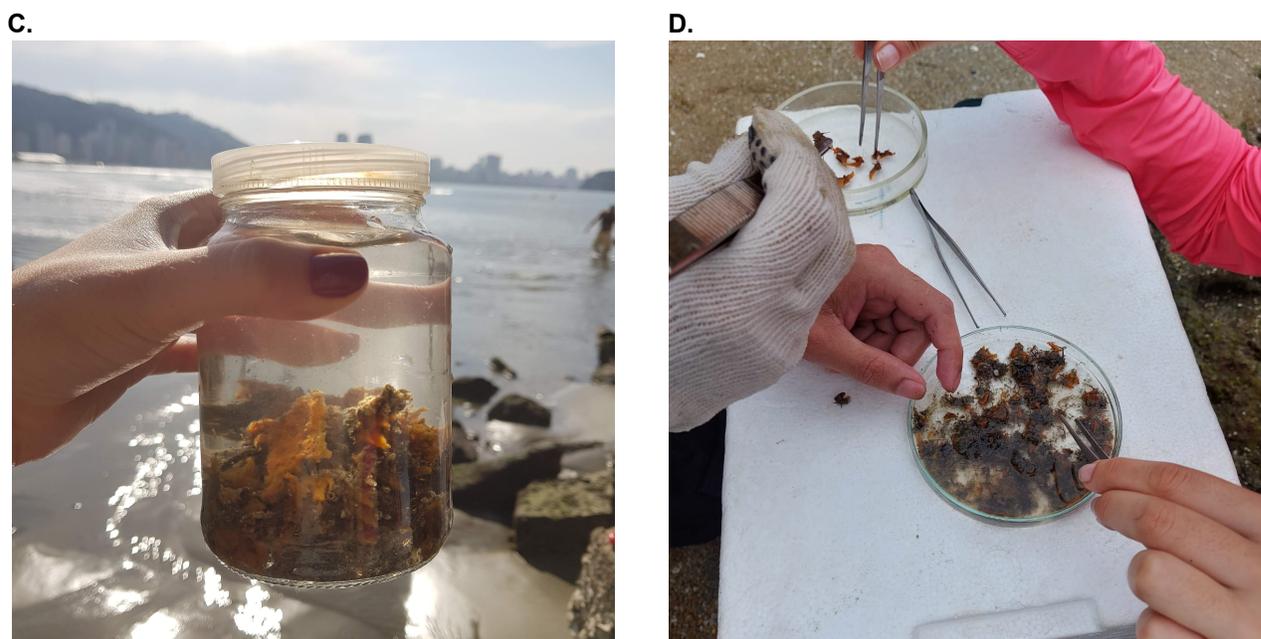


Figura 16. Etapas do processo de coleta: demarcação das localizações (A), raspagem das colônias com espátula (B), lavagem rápida com água do mar em recipiente (C) e limpeza detalhada com pinça em placa de petri (D), com posterior congelamento em N₂ líquido em tubos falcon.

3.2 Homogeneização

O falcon original da expedição foi manuseado em cadinho resfriado por N₂ líquido. Cada uma das amostras foi separada em tubos de 1,5 mL com pesos conhecidos destinados a diferentes experimentos, sem deixar que o tecido descongelasse, evitando alterações artificiais nas amostras (i.e., oxidação de moléculas de interesse). A homogeneização dos tecidos para os ensaios enzimáticos seguiu o protocolo descrito por Regoli e colegas (2004) com algumas adaptações. Foi preparada uma solução homogeneizadora composta por 1,5% (p/v) NaCl, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 0,1 mM, Tris-HCl 100 mM pH 7,5, e coquetel inibidor de protease 1:1.000 (P8340, Sigma-Aldrich). Cada amostra foi imediatamente imersa na solução homogeneizadora após ser retirada do ultra-freezer. A homogeneização mecânica foi feita usando o equipamento turrax (D-160-2) em tubos falcon de 50 mL por 1 min na proporção de uma parte de tecido para quatro partes de solução (1:5). Em seguida, os

homogeneizados foram transferidos para tubos de 1,5 mL e centrifugados por 20 min a 2.000 g e 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado novamente por 60 min, a 10.000 g e 4°C. O último sobrenadante foi mantido em gelo para ser utilizado nos ensaios enzimáticos no mesmo dia em que foram preparados, e ~50 µL foram separados para conferência de proteínas totais (Bradford 1976).

Já na homogeneização para os ensaios de TBARS, GSH/GSSG e proteínas carboniladas, o tecido foi retirado do ultra-freezer e rapidamente imerso em uma solução de TCA 10% (p/v) na concentração de tecido de 1:5. Para o experimento TBARS, a homogeneização foi feita em homogeneizador vidro-vidro do tipo Tenbroeck, com duração de aproximadamente 5 min de maceração por amostra. Já para proteínas carboniladas e GSH/GSSG a homogeneização foi feita em turrax (D-160-2) em tubos falcon de 50 mL por 1 min. Aproximadamente 2 mL de homogeneizado foi transferido para tubo eppendorf e centrifugado a 10.000 g por 10 min. O sobrenadante foi armazenado em novo tubo e mantido no gelo para ser utilizado no mesmo dia, no caso dos ensaios de TBARS e GSH/GSSG. Já o pellet foi secado e congelado no ultra-freezer para serem utilizados posteriormente para o ensaio de proteínas carboniladas.

3.3 Ensaios enzimáticos

3.3.1 Glutationa transferase (GST)

No ensaio de GST é monitorada a velocidade de formação de 2,4-dinitrofenil-5-glutationa (DNP-SG), um conjugado entre 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e GSH. Dessa forma, 1 U de GST equivale a quantidade de GR que produz 1 µmol/min do conjugado, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹ (Habig, Pabst & Jakoby 1974). As concentrações finais dos reagentes foram GSH 5 mM, CDNB 1 mM, tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM pH 6,8, EDTA 1 mM e o homogeneizado na concentração 1:5. Para a padronização foram testados diferentes volumes de homogeneizado, chegando no volume ideal para leitura em espectrofotômetro de 15 µL por amostra do homogeneizado 1:5, em um volume final de 200 µL por poço na placa

de 96 poços. O monitoramento de produção de CDNB-SG foi feito a partir de um ensaio cinético em spectramax M3 em 340 nm por 100 s. As taxas dos ensaios controle sem homogeneizado foram subtraídas dos testes, suprimindo o valor relativo à reação espontânea entre CDNB e GSH.

3.3.2 Glutaciona redutase (GR)

A enzima GR catalisa a redução de GSSG em GSH, com consumo de NADPH. Dessa forma, o ensaio mede a atividade de GR a partir do consumo de NADPH (Carlberg & Mannervik 1975). As concentrações finais dos reagentes foram de NADPH 0,25 mM, GSSG 5 mM, tampão KPi 50 mM pH 7,2 e 1 mM EDTA. Para o homogeneizado na concentração de 1:5 foi conferido diferentes volumes durante a padronização, chegando em 10 μ L por amostra por poço, em um volume final de 200 μ L na placa de 96 poços, com todas as condições e amostras em triplicata. O consumo de NADPH foi aferido em leitura cinética em espectrofotômetro em 340 nm por 100 s. Diferente dos outros ensaios, o branco experimental é feito com a presença de homogeneizado, mas ausência de GSSG, isso para determinar consumo espontâneo de NADPH e subtrair dos valores teste. O cálculo foi feito a partir do coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹ sendo o consumo de NADPH proporcional à atividade de GR na amostra.

3.3.3 Glutaciona peroxidase (GPX)

A família de glutaciona peroxidases está envolvida na redução de hidroperóxidos orgânicos a partir da oxidação de GSH para GSSG. Concomitantemente, a enzima GR reduz novamente a GSSG para GSH com consumo de NADPH. O ensaio mede indiretamente a atividade de GPX monitorando o consumo de NADPH para redução de hidroperóxidos a partir da oxidação de GSH, com bloqueio da catalase utilizando azida de sódio (NaN₃) 4 mM, afim de evitar interferências reacionais (Paglia & Valentine 1967). Foi conferida a GPX-total com cumeno hidroperóxido (CHP) 1 mM e a GPX-

selênio-dependente com H_2O_2 0,5 mM. A diferença nas espécies reativas está relacionada com o substrato de cada enzima. As concentrações finais do restante dos reagentes foram tampão KPi 50 mM pH 7,2, EDTA 0,5 mM, GSH 5 mM, GR 0,5 U/mL e NADPH 0,25 mM em um volume final de 200 μL por poço na placa de 96 poços, com todas as condições e amostras em triplicata. A partir da padronização foi definido o volume ideal de tecido, sendo para GPXt 40 μL e para GPXse 50 μL de homogeneizado 1:5. Inicialmente foi conferida por 90 s a variação da absorbância em 340 nm do meio reacional na ausência de hidroperóxidos após 1 min de incubação do homogeneizado com o restante dos reagentes, isso para estabilização do consumo de NADPH. Após a primeira leitura em espectrofotômetro, foi acrescentado os substratos enzimáticos (CHP e H_2O_2) para uma segunda leitura em 340 nm por 90 s. Para os cálculos, 1 U GPX equivale a quantidade de enzima que consome 1 μmol de NADPH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) 6,22 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. As taxas dos ensaios na ausência de homogeneizado e ausência de substrato foram subtraídas das taxas do ensaio final.

3.3.4 Catalase (CAT)

A catalase catalisa a degradação de um dos principais indutores de estresse oxidativo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dessa forma, o ensaio mede a atividade de catalase a partir do monitoramento de decomposição de H_2O_2 em 240 nm (Aebi 1984). Diferente dos outros ensaios, a catalase é conferida em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, uma vez que o comprimento de onda de 240 nm é inferior a radiação ultravioleta, que não consegue atravessar corretamente materiais como poliestireno, presente nas tradicionais placas de 96 poços. A partir da padronização concluiu-se que o volume ideal de tecido é de 4 μL do homogeneizado diluído em Tris-HCl 100 mM 1:40. As concentrações finais dos reagentes em um volume final de 800 μL foram de tampão KPi 50 mM pH 7,2, EDTA 1 mM e H_2O_2 10 mM. A cubeta foi vedada com Parafilm®, agitada manualmente e rapidamente inserida no espectrofotômetro. O monitoramento ocorreu de modo cinético por 1 min no comprimento de onda de 240

nm. Para os cálculos foi utilizado o coeficiente de absorvidade molar para H₂O₂ em 240 nm de 0,0394 mM⁻¹ cm⁻¹ (Aebi 1984), subtraindo as taxas controle de ausência de homogeneizado e ausência de substrato (H₂O₂) dos testes amostrais.

3.3.5 Superóxido dismutase (SOD)

A enzima SOD catalisa a dismutação de radicais superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, uma espécie menos reativa que é degradada posteriormente pela catalase. A atividade de SOD foi aferida usando o método de Paoletti (Paoletti et al. 1986), pelo monitoramento da inibição da oxidação de NADH por radicais superóxido gerados experimentalmente. Na presença de O₂, EDTA, cloreto de manganês e 2-mercaptoetanol, dissolvidos em tampão, no meio reacional é produzido radicais superóxido que oxidam o NADH. Essa oxidação pode ser inibida pela atividade de SOD presente nas amostras, em função da redução de disponibilidade de radicais superóxido. Dessa forma, no ensaio é necessário que seja feita uma curva de inibição com diferentes volumes de amostra, para verificar quanto de enzima inibe em 50% a velocidade de oxidação do NADH por radicais superóxido gerados pelo sistema. Com a padronização específica para *H. heliophila* foi constatado que existe uma taxa espontânea de consumo de NADH nas amostras, e por isso foi necessário fazer ensaios teste (com presença de MnCl₂, EDTA e 2-mercaptoetanol e amostra) e branco (ausência de MnCl₂, EDTA e B-mercaptoetanol e presença de amostra). As concentrações finais dos reagentes foram de tampão KPi (pH 7,4) 50 mM, EDTA 5 mM, MnCl₂ 2,5 mM, NADH 0,25 mM, e 2-mercaptoetanol 4 mM em um volume de 200 µL por poço, em placa de 96 poços, com todas as condições em triplicata. Os volumes de amostra foram de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 µL de homogeneizado 1:5. O monitoramento foi feito em espectrofotômetro em 340 nm por 15 min. Para a construção da curva foi considerada a subtração da média da taxa de absorbância inicial (teste e branco) com a média taxa de absorbância final de cada volume, com a posterior subtração das taxas dos testes e brancos. Foram considerados 3 volumes por amostra, na faixa linear, para determinar a quantidade de SOD nos homogeneizados. Dessa forma, foi considerado 1

U SOD a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do NADH a NAD⁺.

3.4 Marcadores de estresse oxidativo

3.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um índice de peroxidação lipídica das membranas celulares, um dos principais danos decorrentes de estresse oxidativo. Quando a peroxidação lipídica acontece, ocorre a formação de produtos citotóxicos, como por exemplo, o malonaldeído (MDA). No ensaio é medido o MDA presente nas amostras utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA) como reagente, sendo um método indireto de determinar a peroxidação lipídica (Buege & Aust 1978). Os homogeneizados 1:5 preparados em TCA 10% (seção 3.2) foram separados em dois volumes de 500 μ L, um destinado para o tubo teste e outro para o branco. Cada tubo teste foram acrescentados 500 μ L de TCA 10% e 500 μ L da solução de TBA (50 mM) e BHT (50 mM) dissolvidos em HCl 0,5 M, e cada tubo branco foram acrescentados 500 μ L de TCA 10% e 500 μ L de HCl 0,5 M. Após agitação em vórtex por 15 s, todos os tubos ficaram em banho-maria à 95°C por 15 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 6 min a 10.000 g e o sobrenadante foi transferido para novos tubos e armazenados. O MDA quando reage com TBA gera uma coloração rosada, que absorve luz nos comprimentos de onda de 532 e 600 nm. Dessa forma, para cada ensaio teste e branco foi acrescentado de 200 μ L/poço em triplicata em placa de 96 poços, fazendo leitura pontual em espectrofotômetro nos comprimentos de onda citados. Para o cálculo foi considerada a média da subtração das absorbâncias do teste (532-600 nm) subtraída da média do branco (532-600 nm).

3.4.2 Proteínas carboniladas

O ensaio de proteínas carboniladas descrito por Fields & Dixon (1971) estima o grau de dano oxidativo a proteínas. Para tanto, foi utilizado o pellet guardado da homogeneização para GSH/GSSG, oriundo de 2 mL de tecido 1:5 centrifugado (seção 3.2). Para ressuspensão do pellet foi adicionado 1 mL de TCA 10% , o tubo ficou aproximadamente 1 min agitando em vórtex, seguido de 10 min em banho ultrassônico e 2 min de maceração com pistilo manual. O volume foi dividido em duas alíquotas de 400 μ L em dois tubos eppendorf, um destinado para o teste e outro para o branco. Os tubos foram centrifugados a 10.000g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Nos tubos teste foram acrescentados 500 μ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10 mM em HCl 2 M, e nos brancos, 500 μ L de HCl 2 M. As amostras ficaram em incubação no escuro por 1 h, com agitação em vórtex de 30 s a cada 15 min, para que o corante do DNPH reaja com as proteínas carboniladas. Após a incubação foram acrescentados 500 μ L de TCA 20%, e os tubos foram agitados e mantidos em gelo por 10 min para a precipitação das proteínas que foram solubilizadas. Os tubos foram centrifugados novamente a 10.000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi iniciado o processo de lavagem. A lavagem foi feita com 1 mL de etanol:acetato de etila (1:1, v/v), seguido de agitação em vórtex por 15 s e centrifugação de 10.000 g por 10 min a 4° C, afim de descartar substâncias não desejadas, como as espículas das esponjas. O processo foi repetido três vezes, sendo o último sobrenadante descartado, seguindo para a secagem completa do pellet em capela por aproximadamente 10 minutos. Os pellets secos foram ressuspensos em 600 μ L cloreto de guanidina 6 M em ácido fosfórico (H₃PO₄) seguido de aquecimento em banho maria em 50°C por 10 min e a última centrifugação a 10.000 g por 10 min a 4°C. Para leitura pontual em espectrofotômetro em 370 nm, foi acrescentado 150 μ L de cada teste e branco em triplicata em placa de 96 poços.

3.4.2 Níveis de glutathiona

O ensaio segue o método reciclador de Griffith (1980) com adaptações para microplacas. O método se baseia na reação da glutathiona em seu estado reduzido (GSH) com 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) a partir da quebra da ligação dissulfeto, o que gera o composto secundário 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e o conjugado entre o grupo tiol (SH) da GSH com outra molécula de TNB (SH-TNB). Para a determinação dos níveis de GSH-total, é acrescentado no ensaio NADPH e GR para que a glutathiona dissulfeto (GSSG) volte ao seu estado reduzido (GSH), e toda a glutathiona presente no meio reaja com DTNB, gerando GS-TNB. As concentrações finais dos reagentes foram de tampão KPi (pH 7,0) 125 mM, EDTA 1,25 mM, TCA 0,5% (p/v), NADPH 0,2 mM, DTNB 0,27 mM, e GR 0,27 U/mL. A partir da padronização do método com amostras de *H. heliophila*, concluiu-se que o volume ideal de tecido é de 10 μ L do sobrenadante do homogeneizado em TCA 10% 1:5. Os níveis de glutathiona total foram conferidos em triplicata em espectrofotômetro por 90 s em placas de 96 poços no comprimento de onda de 412 nm, que é absorvido pelo composto TNB. Durante a leitura das amostras foi feita concomitantemente uma curva padrão, substituindo o volume de amostra (10 mL) por GSH diluída em TCA 10% em diferentes concentrações (80, 40, 20, 10 e 5 μ M). Nestas condições a quantidade de GSH-total nas amostras é determinada pela velocidade de aumento da absorbância em 412 nm comparando com a curva-padrão de GSH.

Para determinação apenas dos níveis de GSSG as amostras são pré-tratadas e ficam incubadas em temperatura ambiente por 1 h em tubos eppendorf contendo 50 μ L de sobrenadante ácido 1:5, 150 μ L de 500 mM KPi (pH 7,0) e 10 μ L de 500 mM 2-vinilpiridina (2-VP), solubilizada em etanol. A incubação é feita uma vez que a GSH presente na amostra tem o seu grupo SH ligado covalentemente à 2-VP, ficando bloqueado para outras reações, incluindo com o DTNB. Sendo assim, a GR presente no ensaio reage apenas com a GSSG, que não possui o grupo SH, levando à sua redução para GSH, que reage com o DTNB. Assim, a taxa de aumento da absorbância se deve unicamente à concentração de GSSG presente na amostra. Para o ensaio foi feita uma

solução niveladora para reproduzir as condições das amostras, composta por 1 mL TCA 10%, 3 mL KPi 500 mM pH 7,0 e 200 μ L Etanol P.A. As concentrações finais dos reagentes foram de tampão KPi (pH 7,0) 125 mM, EDTA 1,25 mM, NADPH 0,2 mM, DTNB 0,4 mM, GR 0,4 U/mL e 10 μ L de solução niveladora em um volume reacional de 200 μ L. O volume de amostra foi de 7 μ L do homogeneizado em TCA 10% 1:5, ajustando com a solução niveladora para 30 μ L. Assim como no ensaio de GSH-total, para conferir os níveis de GSSG também é necessário fazer uma curva padrão aplicando 20 μ L de cada solução padrão diluída em solução niveladora nas concentrações de 3,2, 1,6, 0,8, 0,4 e 0,2 μ M. Os níveis de GSSG foram aferidos em espectrofotômetro em placas de 96 poços em triplicata no comprimento de onda de 412 nm por 90 s. A taxa de aumento da absorbância foi comparada com a curva padrão para calcular as concentrações de GSSG nas amostras. Sendo assim, a partir desse ensaio é possível determinar os níveis de GSH, GSSG e GSH/GSSG a partir da divisão dos valores.

3.5 Proteínas totais (Bradford)

Para todos os ensaios realizados, com exceção de TBARS, foi necessário determinar a concentração de proteínas totais solúveis (Bradford, 1976). Para a curva padrão foram feitas soluções com albumina do soro bovino (BSA) diluído em Tris-HCl 100 mM nas concentrações de 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05 e 0,025 e 0.0 mg/mL, acrescentando 10 μ L por poço em triplicata, com exceção da última concentração, que o padrão foi substituído por 10 μ L de Tris-HCl 100 mM. No caso dos ensaios enzimáticos foi utilizado 2 μ L de homogeneizado 1:5 com 8 μ L de Tris-HCl 100 mM. Já para os ensaios de GSH/GSSG e proteínas carboniladas foi acrescentado 5 μ L do pellet ressuspenso em cloreto de guanidina 6 M com 5 μ L de Tris-HCl 100 mM, em triplicata. Após a pipetagem dos padrões, tampão e amostras foi acrescentado 250 μ L do reagente de Bradford, feito a partir de Coomassie Brilliant Blue G-250. A placa foi agitada por 20 s e ficou mantida por 5 min protegida da luz. Em seguida foi feita leitura pontual em espectrofotômetro em 595nm. A concentração de proteínas do

homogeneizado foi determinada pela comparação dos dados amostrais obtidos com a curva-padrão feita a partir de BSA.

3.6 Análise estatística

Com os dados gerados a partir das quantificações bioquímicas foram feitas 3 diferentes análises para comparar as variáveis: efeito da presença/ausência de radiação UV (Análise 1), efeito da exposição aérea (Análise 2) e efeito da estação do ano (Análise 3). O teste usado foi Welch Two Sample T-test, com o software RStudio Team (2021) (Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA). A partir da Tabela 2 é possível verificar como as amostras foram distribuídas em grupos em cada uma das análises.

Amostra	Estação	Dia	Turno	Estado	Análise 1 (Dia x Noite)	Análise 2 (Exposição x Submersão)	Análise 3 (Primavera x Verão)
38	Primavera	2	Dia	Exposição	Dia exposição	Dia 2 exposição	Primavera exposição
36	Primavera	2	Dia	Exposição	Dia exposição	Dia 2 exposição	Primavera exposição
50	Primavera	2	Dia	Exposição	Dia exposição	Dia 2 exposição	Primavera exposição
44	Primavera	2	Dia	Submersão	Dia submersão	Dia 2 submersão	Primavera submersão
58	Primavera	2	Dia	Submersão	Dia submersão	Dia 2 submersão	Primavera submersão
52	Primavera	2	Dia	Submersão	Dia submersão	Dia 2 submersão	Primavera submersão
49	Primavera	2	Noite	Exposição	Noite exposição	Dia 2 exposição	Primavera exposição
54	Primavera	2	Noite	Exposição	Noite exposição	Dia 2 exposição	Primavera exposição
59	Primavera	2	Noite	Exposição	Noite exposição	Dia 2 exposição	Primavera exposição
45	Primavera	2	Noite	Submersão	Noite submersão	Dia 2 submersão	Primavera submersão
60	Primavera	2	Noite	Submersão	Noite submersão	Dia 2 submersão	Primavera submersão
40	Primavera	2	Noite	Submersão	Noite submersão	Dia 2 submersão	Primavera submersão
55	Primavera	3	Dia	Exposição	Dia exposição	Dia 3 exposição	Primavera exposição
43	Primavera	3	Dia	Exposição	Dia exposição	Dia 3 exposição	Primavera exposição
37	Primavera	3	Dia	Exposição	Dia exposição	Dia 3 exposição	Primavera exposição
57	Primavera	3	Dia	Submersão	Dia submersão	Dia 3 submersão	Primavera submersão
42	Primavera	3	Dia	Submersão	Dia submersão	Dia 3 submersão	Primavera submersão
48	Primavera	3	Dia	Submersão	Dia submersão	Dia 3 submersão	Primavera submersão
31	Primavera	3	Noite	Exposição	Noite exposição	Dia 3 exposição	Primavera exposição
41	Primavera	3	Noite	Exposição	Noite exposição	Dia 3 exposição	Primavera exposição
34	Primavera	3	Noite	Exposição	Noite exposição	Dia 3 exposição	Primavera exposição
35	Primavera	3	Noite	Submersão	Noite submersão	Dia 3 submersão	Primavera submersão
32	Primavera	3	Noite	Submersão	Noite submersão	Dia 3 submersão	Primavera submersão
47	Primavera	3	Noite	Submersão	Noite submersão	Dia 3 submersão	Primavera submersão

Amostra	Estação	Dia	Turno	Estado	Análise 1 (Dia x Noite)	Análise 2 (Exposição x Submersão)	Análise 3 (Primavera x Verão)
4	Verão	1	Dia	Submersão		Dia 1 submersão	Verão submersão
15	Verão	1	Dia	Submersão		Dia 1 submersão	Verão submersão
14	Verão	1	Dia	Submersão		Dia 1 submersão	Verão submersão
13	Verão	1	Dia	Submersão		Dia 1 submersão	Verão submersão
11	Verão	1	Dia	Submersão		Dia 1 submersão	Verão submersão
26	Verão	1	Dia	Submersão		Dia 1 submersão	Verão submersão
21	Verão	1	Dia	Submersão		Dia 1 submersão	Verão submersão
29	Verão	1	Dia	Exposição		Dia 1 exposição	Verão exposição
9	Verão	1	Dia	Exposição		Dia 1 exposição	Verão exposição
6	Verão	1	Dia	Exposição		Dia 1 exposição	Verão exposição
28	Verão	1	Dia	Exposição		Dia 1 exposição	Verão exposição
19	Verão	1	Dia	Exposição		Dia 1 exposição	Verão exposição
23	Verão	1	Dia	Exposição		Dia 1 exposição	Verão exposição
22	Verão	1	Dia	Exposição		Dia 1 exposição	Verão exposição

Tabela 2. Relação entre as amostras e as análises estatísticas realizadas. É indicado a estação (primavera ou verão), o dia de coleta (01, 02 ou 03) e o estado que a esponja se encontrava durante a coleta (exposição ou submersão) de cada amostra

Capítulo 4 - Resultados

4.1 Fatores abióticos

No dia 01 de coleta (verão) o clima estava visivelmente mais ensolarado comparado com a primavera, como é de se esperar de acordo com o clima anual da cidade de São Sebastião (Climate-Data) (Fig. 17). O sol nasceu às 5:56, e se pôs às 18h31, totalizando mais de 12h de sol (Tábua de Marés), com a média de radiação solar e UV ao longo do dia de 472.92 e 4.51 w/m², respectivamente (Estação Meteorológica do CEBIMar/USP). Para a análise do estresse gerado pela radiação foi considerado a radiação solar e UV cumulativa até o horário de coleta, considerando o estresse gerado ao longo de todo o dia, não apenas no período que as amostras estavam sendo retiradas do substrato. A temperatura média ao longo de todo o dia foi de 26.8 °C, e a média no período de coleta foi de 27.6 °C. A maré estava ao nível de 0.3 m, às 9h44, com a coleta sendo realizada no intervalo de 9 às 10h30. As amostras

expostas estavam aproximadamente com 2h de exposição aérea quando foram coletadas e as submersas estavam com 10min de submersão.

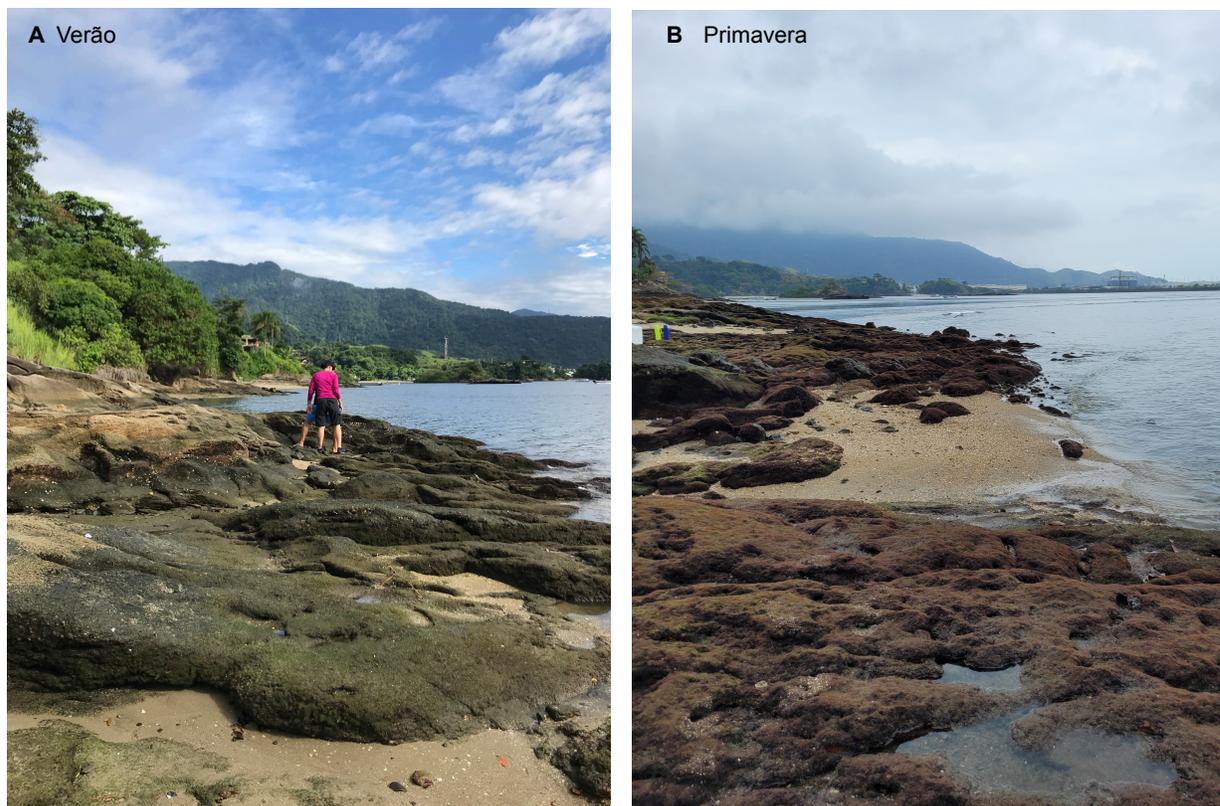


Figura 17. Diferença climática visível entre o verão (A) e a primavera (B)

No dia 02 (primavera) o sol nasceu às 6h07 e se pôs às 17h52, totalizando quase 12h de sol, com média do dia de radiação solar e UV de 156.62 e 1.58 w/m^2 , respectivamente. A temperatura média do ar ao longo de todo o dia foi de 22.25 °C e do período de coleta foi de 22.6°C (dia) e 23°C (noite) (Estação Meteorológica do CEBIMar/USP). Às 8h30 a maré estava em -0.1m e às 20h51 em 0.2m, com as coletas sendo realizadas entre 9-10h e 20h20-21h30. O dia 03 (primavera) estava muito semelhante com o dia 02: a radiação solar e UV média do dia foi de 142.61 e 1.37 w/m^2 , com o sol nascendo às 6h06 e se pondo às 17h52 (quase 12h de sol). A temperatura média do dia foi de 22.17°C e do período de coleta 22.2°C (dia) e 21.2°C (noite) (Estação Meteorológica do CEBIMar/USP, Tábua de Marés). A maré estava a -0.1m às 9h05 e 0.2 às 21h25, com as coletas feitas nos períodos de 8h20-9h30 e 20h40-22h

(Tábua de Marés). As amostras expostas estavam aproximadamente com 2h de exposição aérea e as submersas com 10min de submersão.

Na tabela 3 é possível verificar a radiação solar e UV cumulativa até os horários de coleta citados, temperatura do ar média do período de coleta e da água, sendo os três primeiros dados obtidos a partir da Estação Meteorológica do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar) em São Sebastião, há aproximadamente 5km de distância da Baía do Araçá. A temperatura da água foi aferida em termômetro no horário e local da coleta. Na figura 18 é possível ver a grande diferença entre primavera/verão ao longo de todo o dia das principais variáveis ambientais (radiação solar (Fig 18A) e UV (Fig. 18B) e temperatura (Fig. 18C), bem como a semelhança entre os dois dias da primavera

Dia	Verão		Primavera		
	1	2	3	3	
Turno	manhã	manhã	noite	manhã	noite
Temperatura do ar (°C)	27.6	22.6	21.6	22.2	22.1
Temperatura da água (°C)	27.5	23.0	23.0	22	22
Radiação solar (w/m ²)	10656	1911	10807	1309	9983
Radiação UV (w/m ²)	51.6	3.7	53.9	2.4	55

Tabela 3. Diferenças das condições ambientais entre os dias de coleta 01 (28/02/201), 02 (06/09/2021) e 03 (07/09/2021). Os dados de temperatura da água foram aferidos na hora e local de coleta com termômetro. Os dados de temperatura do ar, radiação solar e UV foram retirados da Estação Meteorológica do CEBIMar, e foram aferidos a cada 10min. A radiação solar e UV é referente aos valores cumulativos do início do dia até os horários de coleta. A temperatura do ar é a média dos valores do período de coleta.

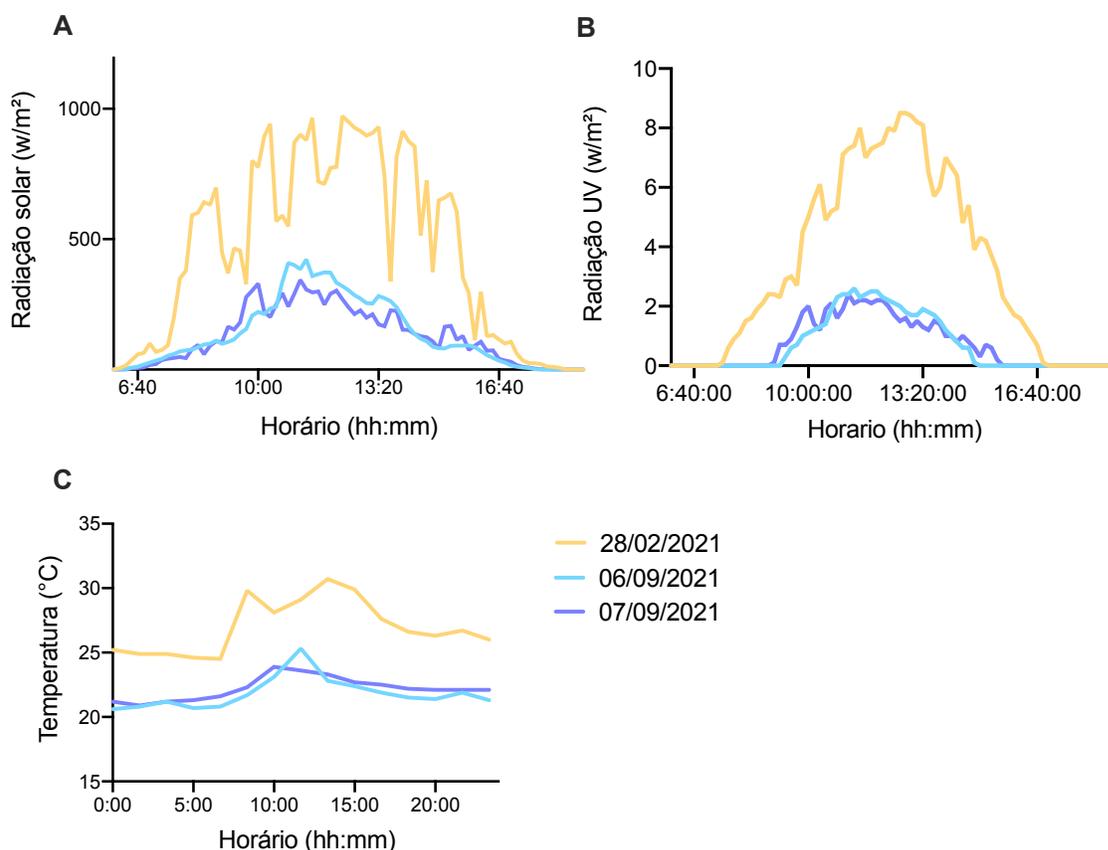


Figura 18. Variação das condições ambientais de radiação solar (A), radiação UV (B) e temperatura (C) ao longo de todo o dia. A linha laranja é referente ao dia 01 (28/02/2021); azul claro ao dia 02 (06/09/2021); violeta ao dia 03 (07/09/2021). Dados retirados da Estação Meteorológica do CEBIMar, aferidos a cada 10min.

4.2 Análise 1 (dia x noite)

Para verificar o efeito da presença ou ausência de radiação solar/UV as amostras do verão foram desconsideradas pela grande diferença em mais de uma variável ambiental (temperatura e radiação solar/UV), enquanto os dias 02 e 03 (primavera) foram semelhantes (Tab. 3, Fig. 18). Não houve diferença significativa ($p > 0.05$) em nenhuma das comparações entre dia e noite nas amostras submersas (Fig. 19) ou expostas ao ar (Fig. 20).

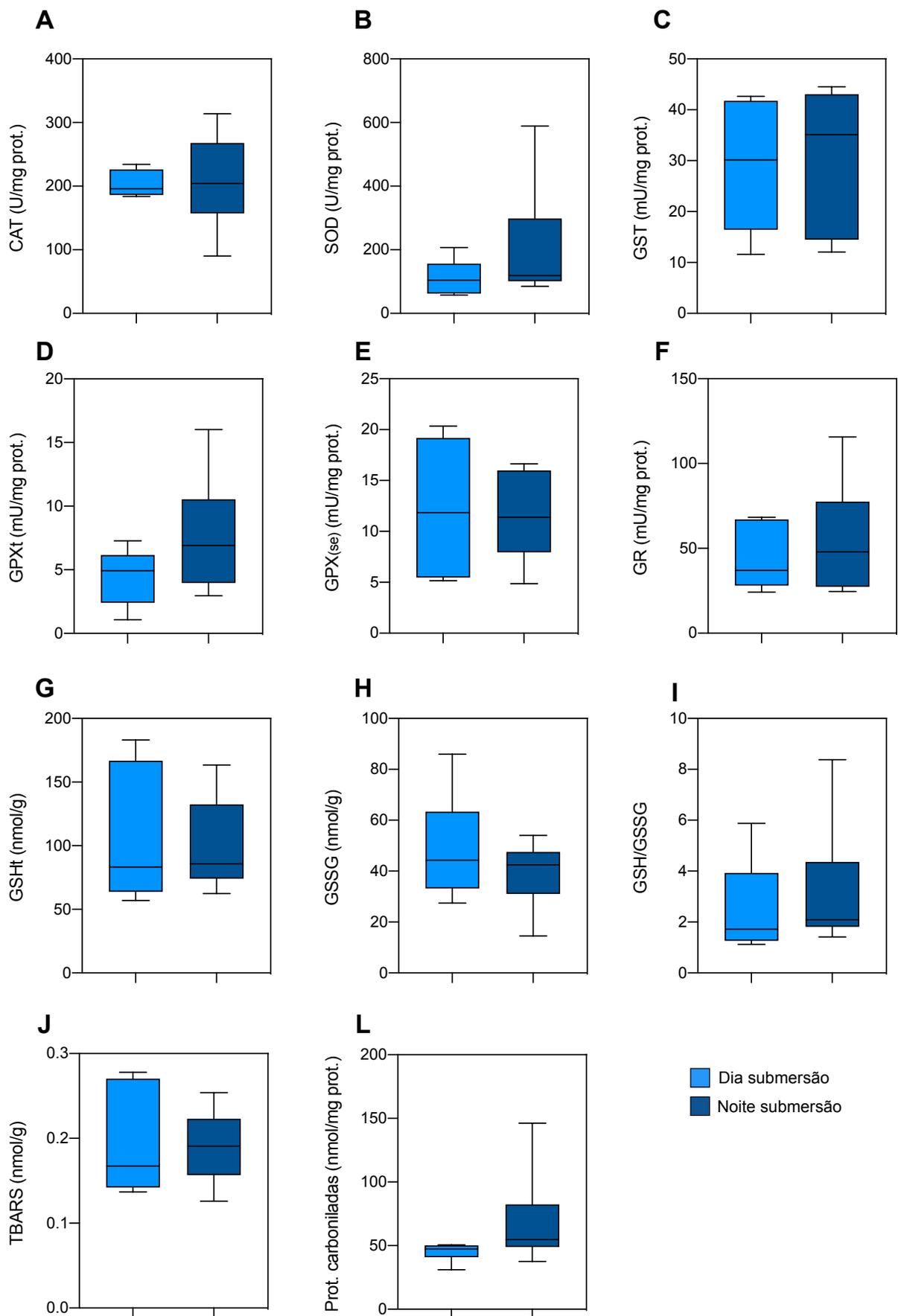


Figura 19. Dados bioquímicos das esponjas *H. heliophila* em submersão do dia 02 e 03, comparando dia (barras em azul claro) e noite (barras em azul escuro): atividade de CAT (A), SOD (B), GST (C), GPX (D), GPX_(se) (E) e GR (F). Níveis de glutatona reduzida (GSH) (G), oxidada (GSSG) (H) e GSH/GSSG (I). Danos oxidativos de TBARS (J) e proteínas carboniladas (L).

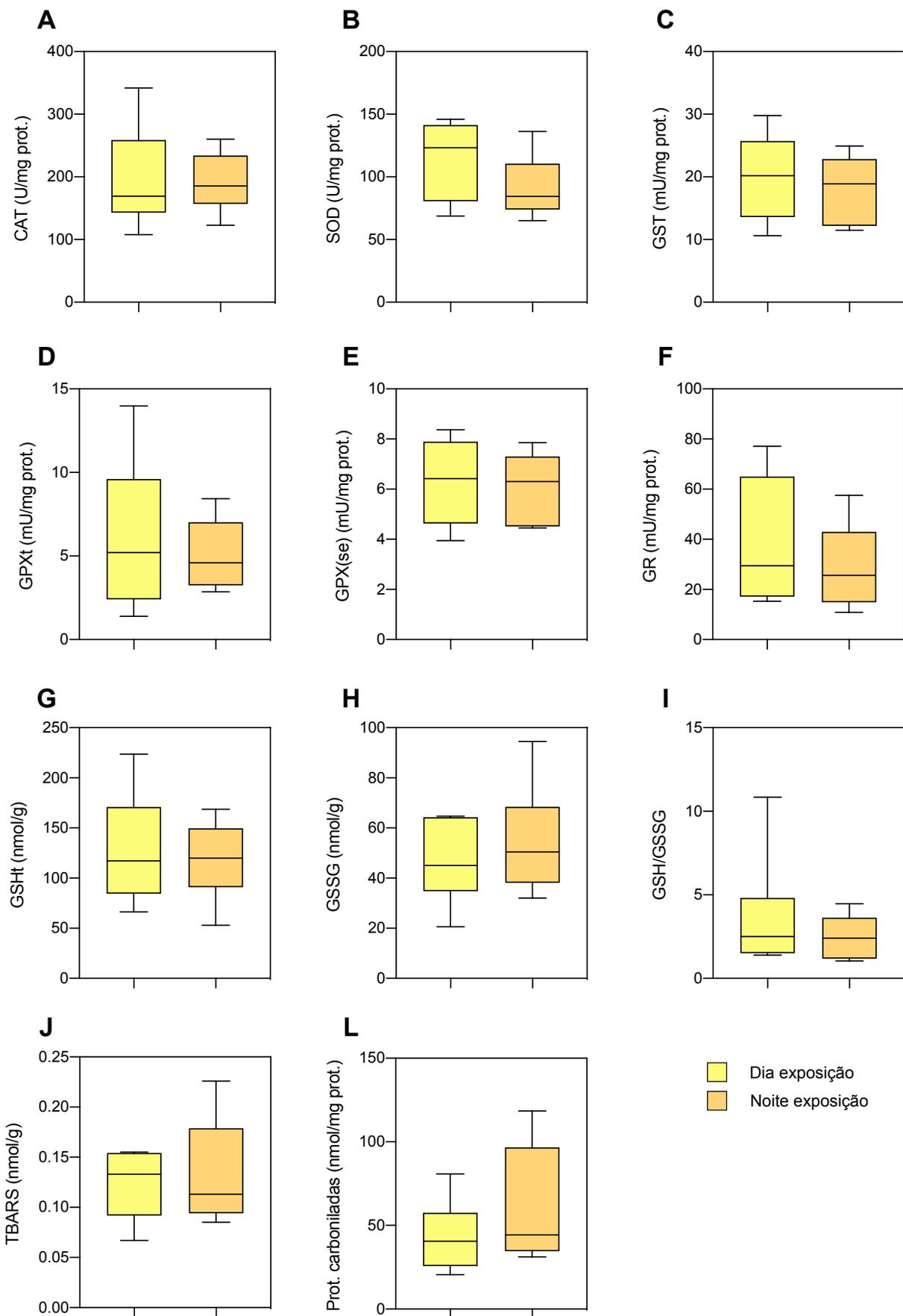


Figura 20. Dados bioquímicos das esponjas *H. heliophila* em exposição aérea nos dias 02 e 03, comparando dia (barras em amarelo) e noite (barras em azul laranja): atividade de CAT (A), SOD (B), GST (C), GPX (D), GPX_(Se) (E) e GR (F). Níveis de glutathiona reduzida (GSH) (G), oxidada (GSSG) (H) e GSH/GSSG (I). Danos oxidativos de TBARS (J) e proteínas carboniladas (L).

4.3 Análise 2 (exposição aérea x submersão)

Para verificar o efeito da exposição aérea, a análise foi feita para os três dias de coleta comparando as amostras que estavam em exposição e em submersão (Fig. 21, 22 e 23). No dia 01 (verão) houve diferença significativa na catalase ($p = 0.021$) e em TBARS ($p = 0.022$), de forma que ambos estavam aumentados nas amostras em submersão (Fig. 21). Catalase aumentou 45.7% e TBARS 21.9% na maré alta (em submersão). O restante das análises bioquímicas do dia 01 (verão) não houve diferença significativa ($p > 0.05$). No dia 02 (primavera) houve diferença significativa em $GPX_{(Se)}$ ($p = 0.0023$) e TBARS ($p = 0.0034$), com ambos aumentados nas esponjas em submersão (Fig. 22). $GPX_{(Se)}$ aumentou 58.3% e TBARS 44.4% nas amostras submersas. Não houve diferença significativa no restante das análises bioquímicas do dia 02 ($p > 0.05$). No dia 03 não houve nenhuma diferença significativa nas análises bioquímicas, apenas uma tendência de aumento de GST de 43.1% ($p = 0.078$) nas esponjas em submersão (Fig. 23).

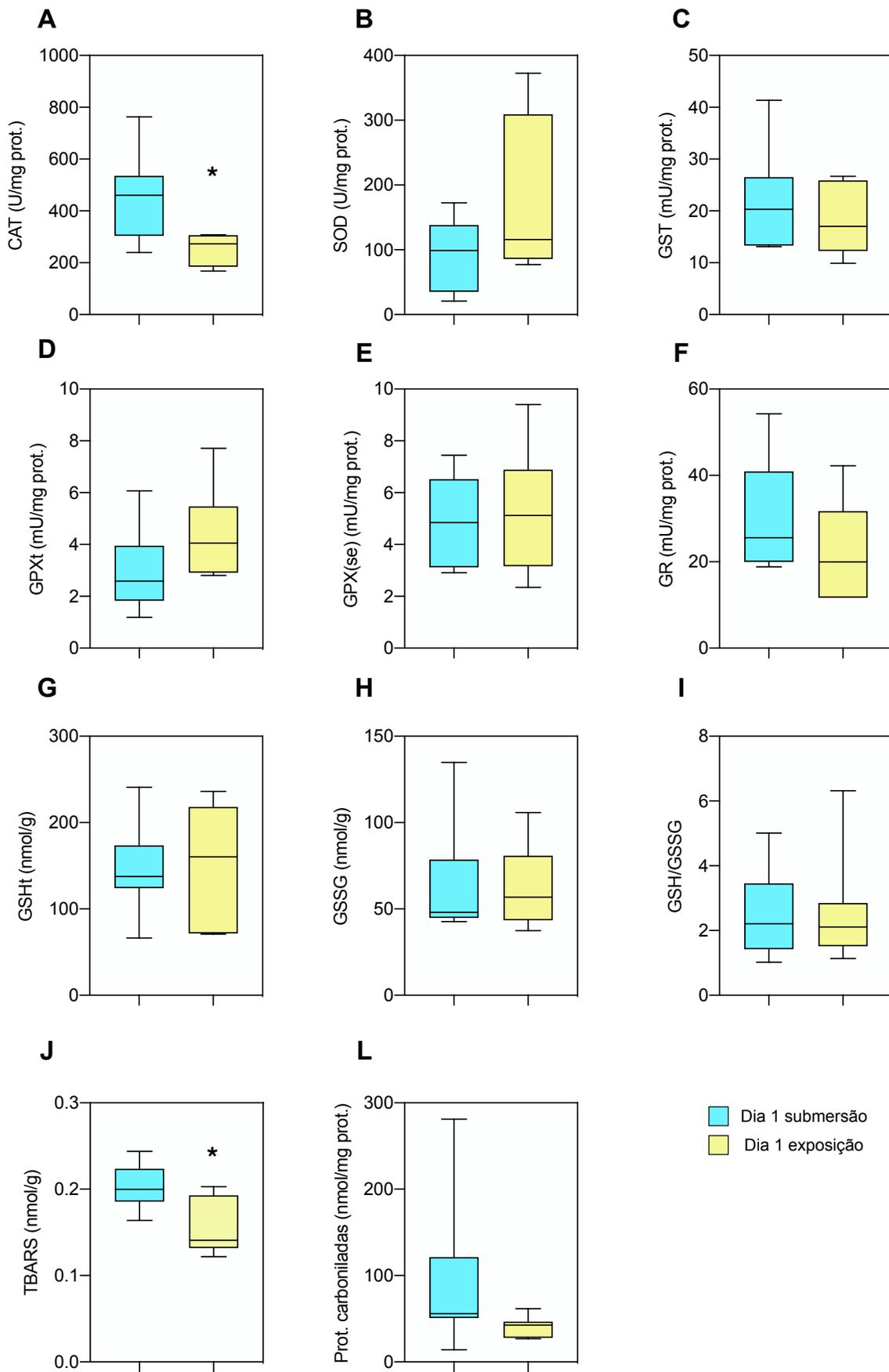


Figura 21. Dados bioquímicos das esponjas *H. heliophila* do dia 01, comparando submersão (barras em azul) e exposição aérea (barras em amarelo): atividade de CAT (A), SOD (B), GST (C), GPX (D), GPX_(se) (E) e GR (F). Níveis de glutatona reduzida (GSH) (G), oxidada (GSSG) (H) e GSH/GSSG (I). Danos oxidativos de TBARS (J) e proteínas carboniladas (L).

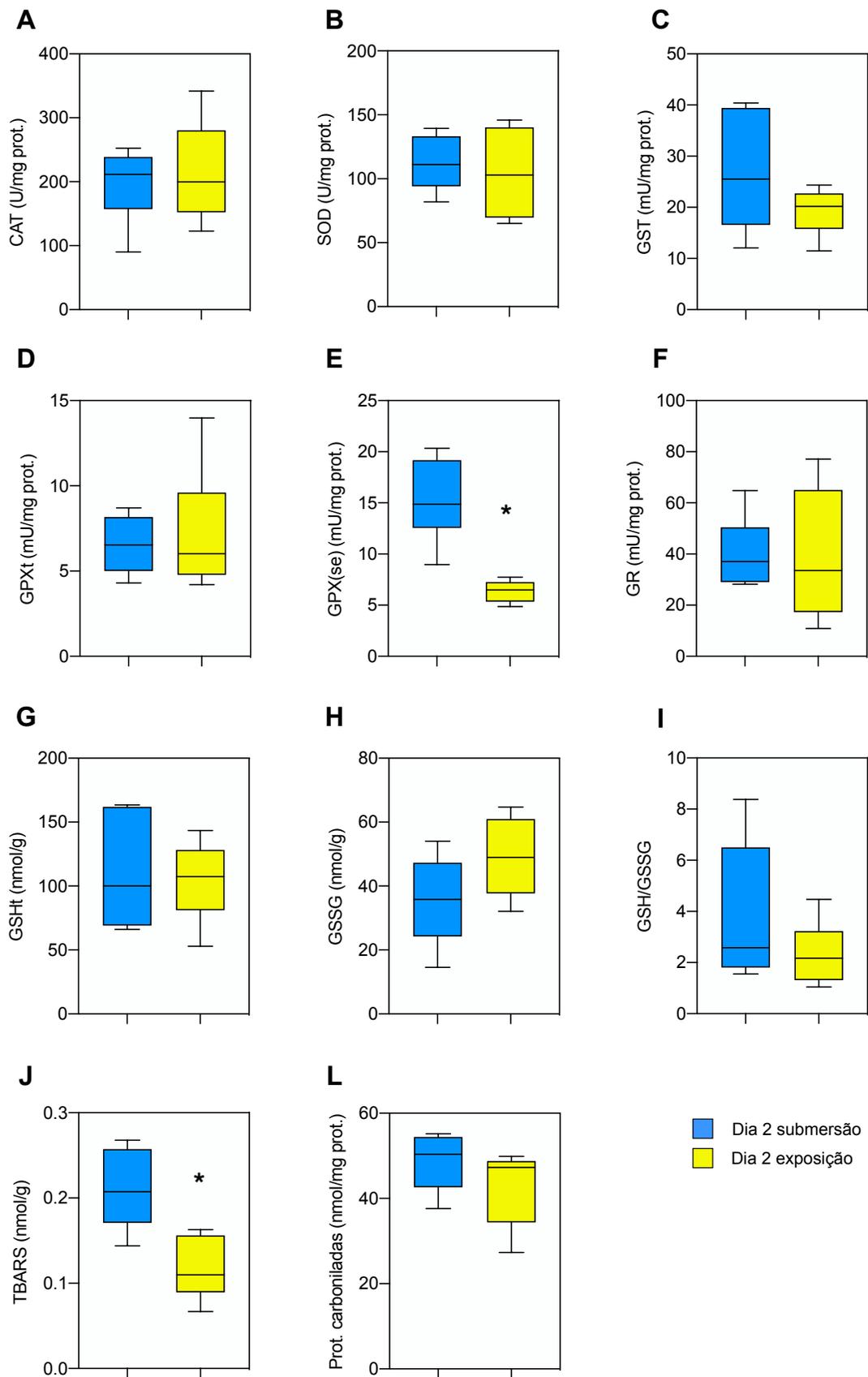


Figura 22. Dados bioquímicos das esponjas *H. heliophila* do dia 02, comparando submersão (barras em azul) e exposição aérea (barras em amarelo): atividade de CAT (A), SOD (B), GST (C), GPX (D), GPX_(Se) (E) e GR (F). Níveis de glutatona reduzida (GSH) (G), oxidada (GSSG) (H) e GSH/GSSG (I). Danos oxidativos de TBARS (J) e proteínas carboniladas (L).

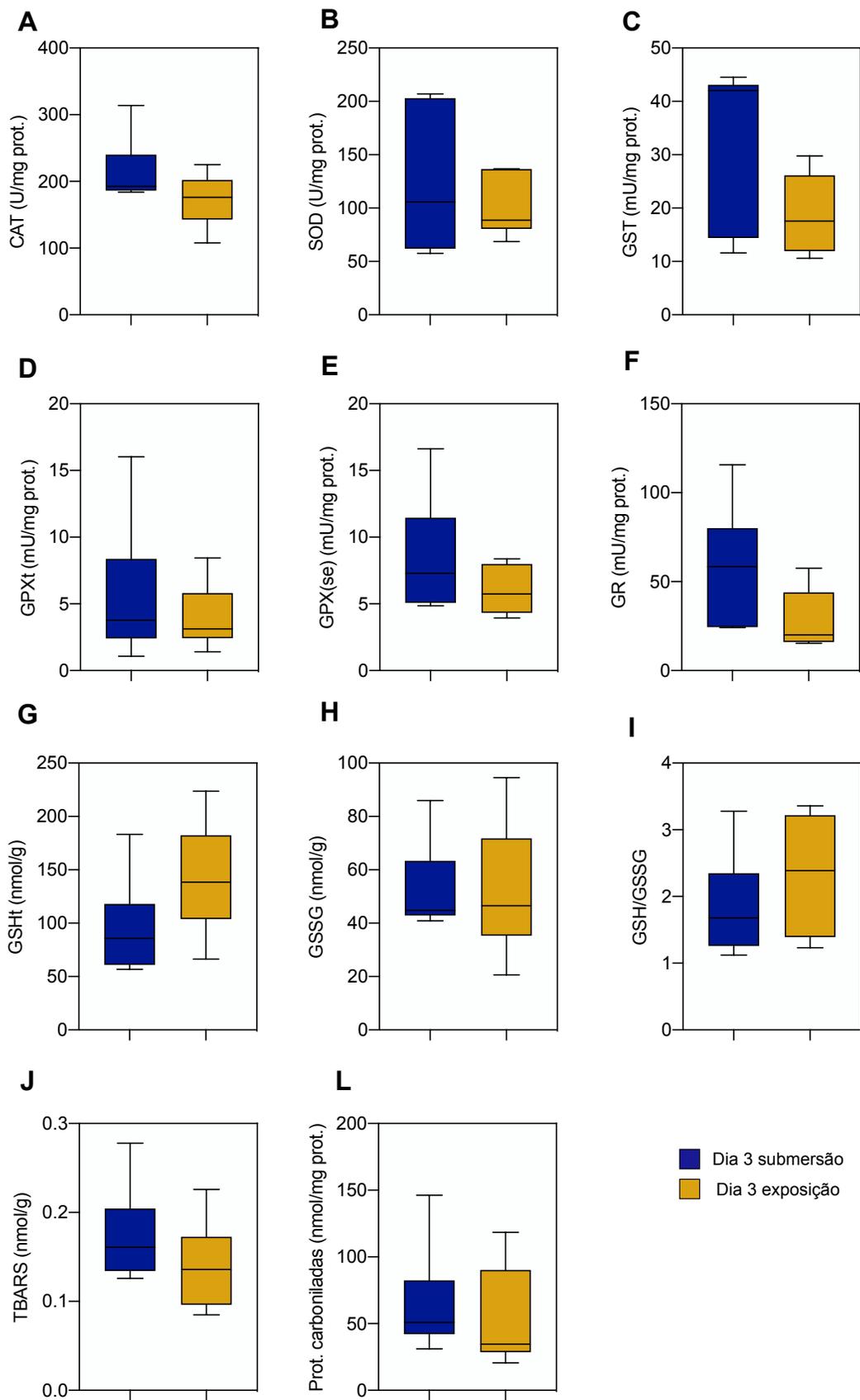


Figura 23. Dados bioquímicos das esponjas *H. heliophila* do dia 03, comparando submersão (barras em azul) e exposição aérea (barras em amarelo): atividade de CAT (A), SOD (B), GST (C), GPX (D), GPX_(se) (E) e GR (F). Níveis de glutatona reduzida (GSH) (G), oxidada (GSSG) (H) e GSH/GSSG (I). Danos oxidativos de TBARS (J) e proteínas carboniladas (L).

4.4 Análise 3 (primavera x verão)

Para comparar primavera e verão os grupos “dia” e “noite” do dia 02 e dia 03 foram agrupados em primavera submersão e primavera exposição, uma vez que não houve diferença significativa entre dia e noite na primavera (Fig. 19 e 20). O dia 01 também foi separado em exposição e submersão para comprar com os respectivos da primavera. Não foi feito o agrupamento entre exposição aérea e submersão uma vez que houve diferença significativa na análise dessa variável (Fig. 21 e 22).

Comparando primavera e verão na condição de exposição aérea não houve diferença significativa em nenhuma das análises bioquímicas ($p > 0.05$) (Fig. 24). Por outro lado durante a submersão houve diferença significativa em GPXt ($p = 0.026$), GPX_(Se) ($p = 0.00088$), GR ($p = 0.044$) e CAT ($p = 0.0099$) na primavera (Fig. 25). No restante das análises não houve diferença significativa ($p > 0.05$). As atividades de GPXt, GPX_(Se) e GR aumentaram em 51,3%, 59,5% e 40,6%, respectivamente, na primavera em comparação ao verão. A atividade de catalase, por sua vez, diminuiu em 38% na primavera.

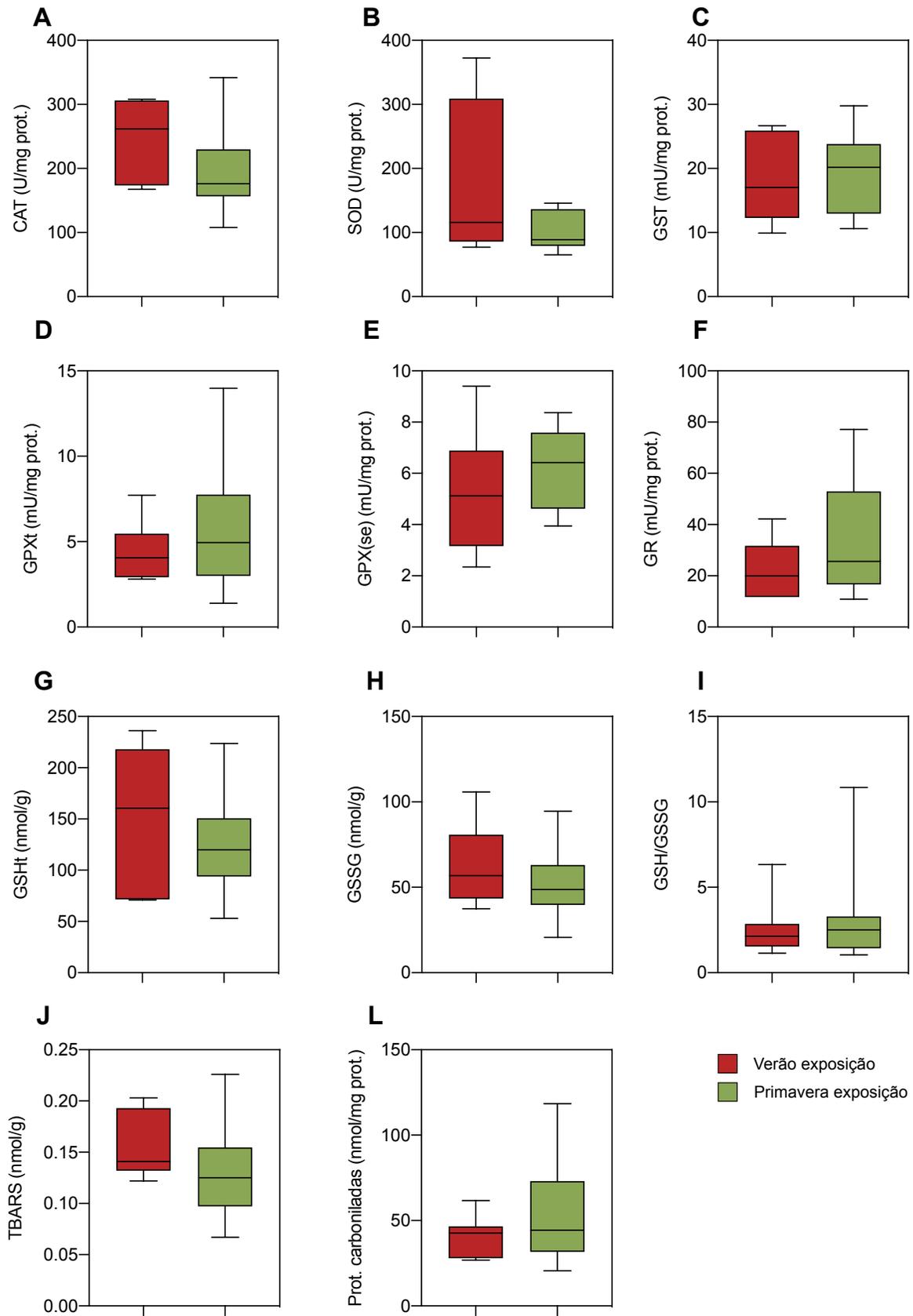


Figura 24. Dados bioquímicos das esponjas *H. heliophila* em exposição, comparando verão (barras em vermelho) e primavera (barras em verde): atividade de CAT (A), SOD (B), GST (C), GPX (D), GPX_(Se) (E) e GR (F). Níveis de glutatona reduzida (GSH) (G), oxidada (GSSG) (H) e GSH/GSSG (I). Danos oxidativos de TBARS (J) e proteínas carboniladas (L).

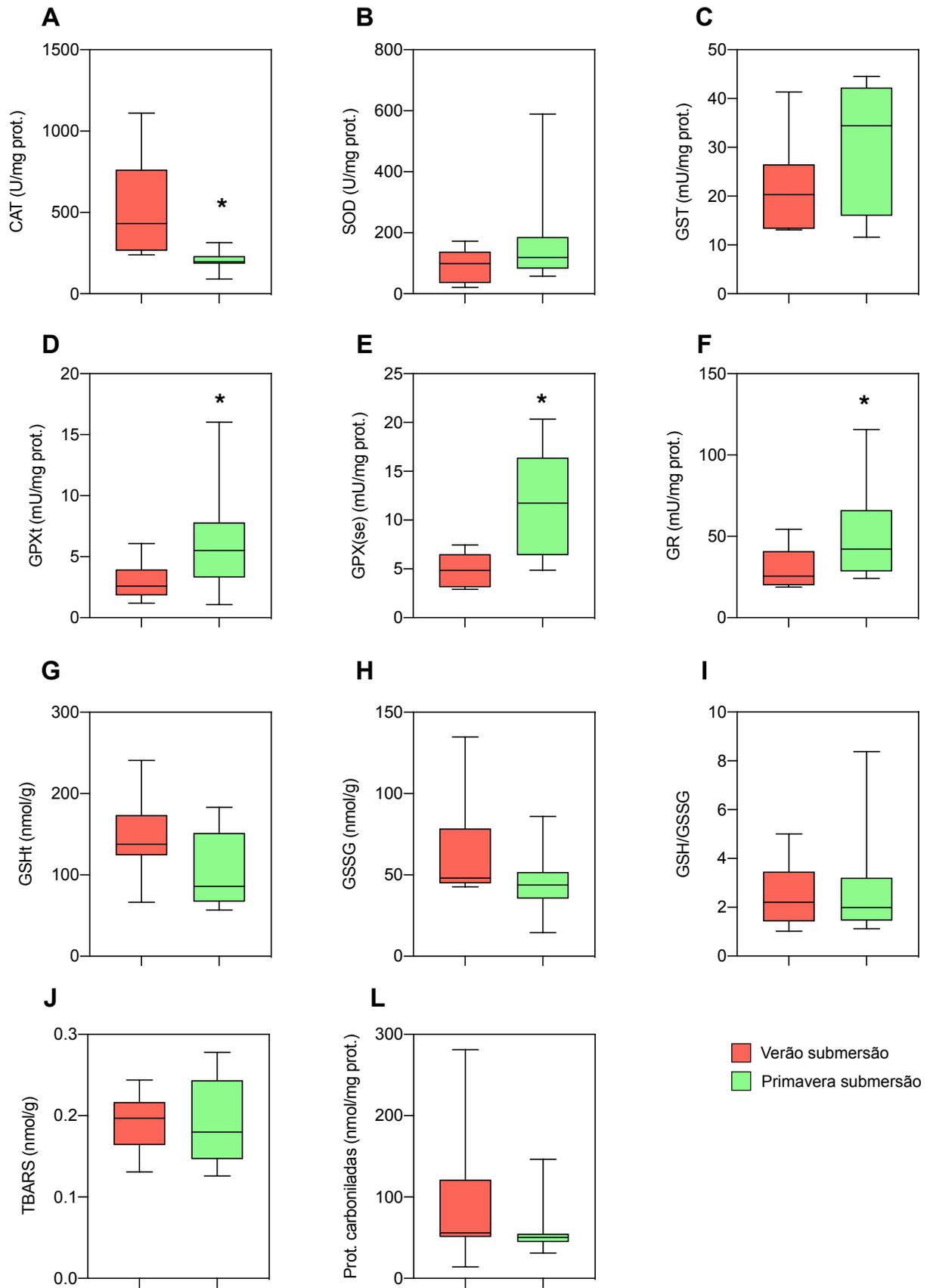


Figura 25. Dados bioquímicos das esponjas *H. heliophila* em submersão, comparando verão (barras em vermelho) e primavera (barras em verde): atividade de CAT (A), SOD (B), GST (C), GPX (D), GPX_(se) (E) e GR (F). Níveis de glutationa reduzida (GSH) G), oxidada (GSSG) (H) e GSH/GSSG (I). Danos oxidativos de TBARS (J) e proteínas carboniladas (L).

4.5 Resultados mais relevantes

Para auxiliar o leitor no entendimento dos resultados, na Figura 26 foi esquematizado as análises que tiveram diferença significativa. As enzimas CAT ($p=0.021$) e GPX(Se) ($p=0.0023$) estavam aumentadas na submersão dos dias 01 e 02, respectivamente. TBARS também estava mais elevado na submersão de ambos os dias ($p=0.022$ e 0.0034 , respectivamente). E na comparação entre primavera verão as enzimas GPXt ($p=0.026$), GPX(Se) ($p=0.0008$) e GR ($p=0.044$) estavam aumentadas nas esponjas submersas na primavera. No verão, CAT foi a única variável bioquímica analisada que estava com maior atividade no verão quando comparado à primavera ($p=0.0009$).

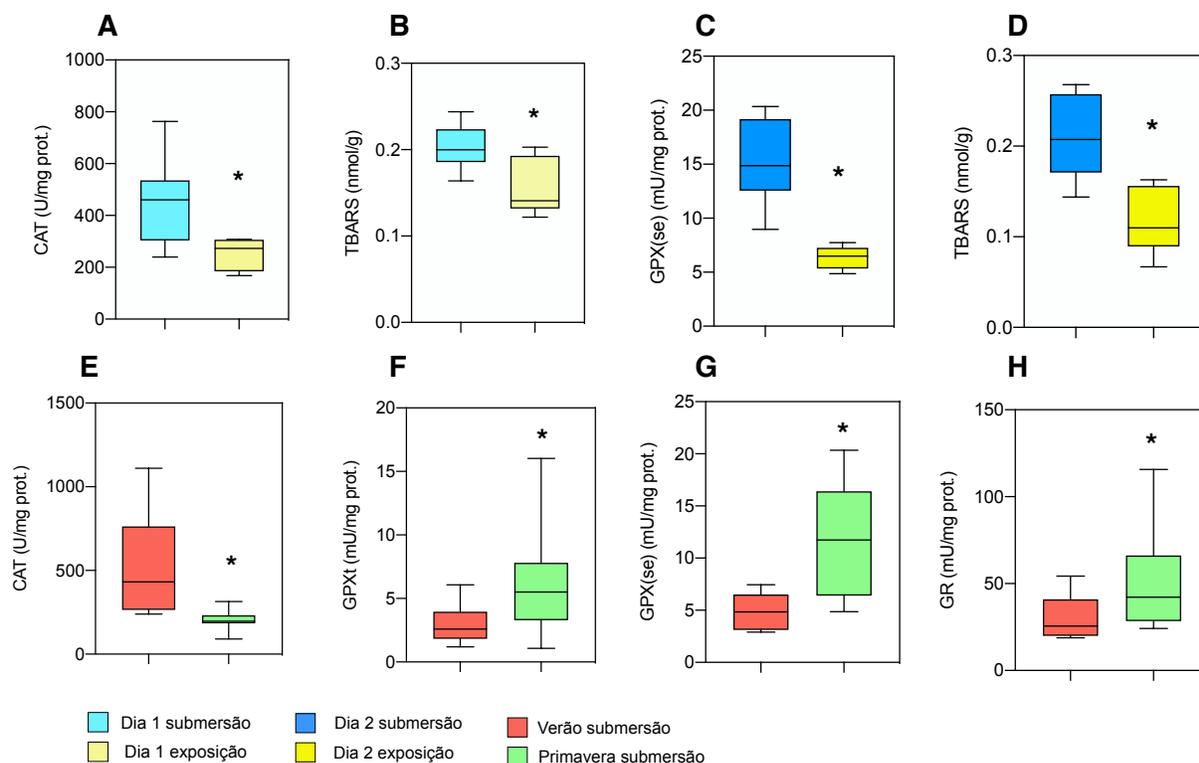


Figura 26. Dados bioquímicos das esponjas *H. heliophila* em que foi observado diferença significativa nas análises 2 e 3. Atividade de CAT (A) e TBARS (B) nas amostras do dia 1 em submersão (barras em azul claro) e exposição aérea (barras em amarelo claro). Atividade de GPX(Se) (C) e TBARS (D) nas amostras do dia 2 em submersão (barras em azul escuro) e em exposição aérea (barras em amarelo escuro). Atividade de CAT (E), GPXt (F), GPX(Se) (G) e GR (H) nas amostras submersas do verão (barras em vermelho) e primavera (barras em verde)

Capítulo 5 - Discussão

5.1 Efeito da radiação solar

A radiação UV é um dos fatores abióticos que mais têm preocupado a sociedade atualmente. Nas duas últimas décadas houve redução na densidade da ozonosfera, o que aumentou a atenção com os possíveis efeitos negativos do UV, principalmente com o UV-B (280-315nm) (Rastogi et al. 2010). A radiação UV pode promover alterações nas vias metabólicas dos animais (danos moleculares e genéticos), em especial os de pequeno porte. Pode afetar a produtividade dos ecossistemas marinhos, a diversidade de espécies, a estabilidade do ecossistema e as interações tróficas, além de modificar ciclos biogeoquímicos (Häder et al. 2011). Existem algumas formas de proteção ao UV, sendo elas: evitar locais com maior incidência solar (comum em animais com boa locomoção), barreiras físicas (como conchas), compostos que absorvem radiação (MAA's, pigmentos, etc.), produção de antioxidantes (CAT, SOD, GSH, etc.) e reparo no DNA para danos que já foram gerados (Núñez-Pons et al. 2018).

Para animais sésseis, como as esponjas, e que vivem em habitat inóspitos e com alta incidência de UV-R, como regiões entre-maré, foi fundamental o surgimento - ao longo da evolução - de adaptações a partir de compostos que absorvem radiação. Atualmente a indústria biotecnológica tem se interessado por organismos marinhos costeiros que produzem determinados compostos fotoprotetores, principalmente pequenos organismos como cianobactérias, algas e fitoplâncton (Derikvand et al. 2017, Chrapusta et al. 2017), mas também animais que possuem grandes populações de simbiontes, como corais e esponjas (Dunlap et al. 1998, Lysek et al. 2003). A verdadeira intenção da indústria é a produção de protetores solares ou produtos antienvhecimento para o ser humano a partir desses compostos naturais. A importância desse movimento é a liberação de compostos menos tóxicos no meio ambiente, uma vez que tem sido cada vez mais demonstrado o efeito maléfico de

cosméticos sintéticos associados aos microplásticos em ecossistemas marinhos (Sharma & Chatterjee 2017, Tovar-Sánchez et al 2013).

O composto fotoprotetor natural mais comum e de interesse farmacológico são os aminoácidos do tipo micosporina (MAA's), uma família de metabólitos secundários que absorvem a energia solar e são formados a partir de conjugação entre cromóforos. Absorvem UV nos comprimentos de onda entre 310-362nm, com capacidade de dissipar a radiação em calor sem produção de ROS. Eles são sintetizados exclusivamente por bactérias, cianobactérias, macroalgas e fitoplâncton, mas podem ser adquiridos por consumidores primários e secundários (Rastogi et al. 2010, Häder et al. 2015). No caso de esponjas e corais, pode ocorrer a produção a partir de algas simbiontes. A síntese depende da espécie e da localização onde o organismo se encontra. Assim, fatores como turbidez e altura da coluna d'água são determinantes. Em águas temperadas as concentrações de MAA costumam ser menores no inverno em comparação com o verão, de forma que a expressão de MAA's está proporcionalmente relacionada com a irradiância (Häder et al. 2015). Os MAA's podem ser constituídos por diferentes aminoácidos que os classificam dentro da grande família, como micosporina-glicina (MG) e micosporina-glicina-valina (MGV). Já foi identificado a ocorrência de MAA's em diferentes animais marinhos, como moluscos, peixes, estrelas do mar e corais (Rastogi et al. 2010), mas especificamente em esponjas McClintock & Karentz (1997) identificaram 6 diferentes MAA's em 14 espécies, sendo o mais abundante a palitina (PI).

Nos resultados obtidos no presente trabalho não houve diferença significativa das 11 variáveis bioquímicas nas comparações entre dia e noite, o que sugere alguma tolerância à radiação solar/UV pela esponja *Hymeniacidon heliophila*, também conhecida como esponja-sol ou "sun-loving sponge" (esponja que ama o sol) (Fig. 19 e 20). Não é possível determinar com nossos dados qual é o grau de tolerância, mas é demonstrado que uma variação de radiação solar cumulativa de 1911 para 10807 w/m² (dia 02) ou de 1309 para 9983 w/m² (dia 03) ao longo do dia não ativa enzimas antioxidantes e nem gera danos oxidativos significativos (Tab. 3). É possível que no verão a resposta metabólica ocorra de maneira diferente, levando em consideração que a radiação apenas da manhã (10656 w/m²) se assemelha com a radiação da primavera

ao longo de todo o dia (Tab. 3). Porém, por diferentes fatores não foi possível fazer coleta pela noite no verão, o que limitou a comparação entre dia e noite apenas na primavera.

Existem outros compostos que podem estar relacionados com a tolerância à radiação solar da esponja *H. heliophila*, como os pigmentos. Foi identificado na espécie *H. heliophila* carotenóides em sua composição, o que gera sua coloração alaranjada (Maia et al. 2021), e também o efeito amplamente conhecido de proteção contra radiação UV. Os carotenóides recebem a energia de oxi-radicais como oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e peroxil ($\text{ROO}\cdot$), sendo essas as principais espécies reativas formadas em reações fotooxidantes. Essa energia é então dissipada por rotação e vibração entre o carotenoide excitado e o solvente circundante, gerando energia térmica (Stahl & Sies 2002). Outros pigmentos que podem estar associados à tolerância ao UV são dos simbiontes fotossintetizantes. Alguns desses microorganismos utilizam comprimentos de onda específicos de luz para alimentar os seus fotossistemas, podendo até gerar hiperóxia local (Quévrain et al. 2014). Por exemplo, a citonemina está presente em todas as linhagens de cianobactérias, incluindo as que fazem simbiose em esponjas (Proteau et al. 1993). Esse pigmento absorve principalmente na faixa do UV-A (315-400nm), mas também na faixa UV-B (280-320nm) e UV-C (190-280nm). Foi demonstrado que níveis normais de citonemina em cianobactérias evitam em até 90% da radiação UV-A incidente nas células, além de ter observado que a alta radiação UV-A inibe a fotossíntese e retarda o crescimento até que quantidades substanciais de citonemina sejam reabastecidas (Proteau et al. 1993).

Para o presente trabalho foi hipotetizado que a radiação solar/UV poderia ser um gatilho para algum mecanismo de adaptação redox na esponja *H. heliophila*, porém os resultados não foram conclusivos. O motivo foi a tolerância relativa à radiação solar/UV da espécie, demonstrada pela análise 1 (dia x noite) das variáveis redox do presente trabalho. Não houve diferença significativa nos antioxidantes enzimáticos (CAT, SOD, GST, GR, GPXt e GPX_(se)), glutationa (GSH, GSSG, GSH/GSSG) e danos oxidativos (proteínas carboniladas e TBARS) ao comparar dia e noite na primavera (Fig. 19 e 20). Infelizmente quando foi realizada a coleta da primavera o clima estava nublado e o nível de radiação solar estava baixo (~68% menor que no dia 01, de verão). Isso pode não

ter estressado suficientemente as esponjas para gerar uma resposta antioxidante. Seria necessário coletar em dias mais ensolarados durante o dia e a noite para se obter resultados mais conclusivos.

Assim, a partir dos dados gerados não é possível aferir o grau de tolerância à radiação solar/UV levando em consideração a limitação de doses de radiação testadas. É possível que essa tolerância esteja relacionada com a presença de diferentes compostos fotoprotetores, como MAA's e pigmentos (da esponja em si ou de simbiontes fotossintetizantes), que em situações de pouca variação de radiação solar ao longo do dia conseguem absorver o suficiente para não gerar danos oxidativos e ativação do sistema antioxidante. São necessários trabalhos futuros que testem doses mais altas de radiação solar/UV na natureza, possivelmente em mais estações do ano, concomitante com a quantificação desses compostos fotoprotetores. Assim será possível determinar qual limite de tolerância à radiação solar a *H. heliophila* possui e se está associado de fato aos metabólitos secundários. Assim será possível o aprimoramento do conhecimento sobre quais mecanismos fisiológicos são ativados para defesa contra danos oxidativos gerados em consequência do estresse de radiação solar/UV. Apesar de não termos encontrado diferenças entre dia e noite nas esponjas coletadas na primavera, importantes diferenças ocorreram quando as esponjas são expostas ao ar na maré baixa - vide item 5.2.

5.2 Efeito da exposição aérea e anóxia funcional

Com os dados obtidos nas comparações entre esponjas expostas ao ar e submersas na água observa-se que as esponjas submersas estão com maiores níveis de danos oxidativos (TBARS) e enzimas antioxidantes (GPX_(Se), CAT, e GST) quando comparado às esponjas coletadas na maré baixa (Fig. 21, 22 e 23). Esses resultados evidenciam que o momento de significativo estresse oxidativo da *H. heliophila* é durante a submersão, mais especificamente na condição de reoxigenação. O dano oxidativo observado é originado de uma produção rápida de ROS, que também causam a ativação dos fatores de transcrição redox, como Nrf2, NF-κB e HIF1 (genes ou

homólogos já identificados em esponjas), induzindo o aumento das enzimas antioxidantes (Hermes-Lima et al. 2015). É importante levar em consideração que as amostras submersas foram coletadas com cerca de 10min do início da submersão. Isso demonstra a velocidade da resposta antioxidante das esponjas, uma vez que em 10min de submersão as taxas de danos oxidativos e antioxidantes já estavam aumentadas em comparação com as expostas ao ar por 2h.

Uma das hipóteses desse trabalho era que a esponja *H. heliophila* faria o mecanismo POS engatilhado pelos estressores de exposição aérea e radiação solar/UV. Já foi discutido que a *H. heliophila* possui alguma resistência à radiação solar/UV e que não foi possível aferir o grau de tolerância para avaliar a resposta antioxidante. Porém, se a esponja fizesse o mecanismo POS devido a exposição aérea, haveria um aumento de antioxidantes durante a exposição aérea, engatilhado por uma pequena produção de ROS, que protegeria o animal aos danos oxidativos na reoxigenação. Esse padrão foi observado em diferentes invertebrados marinhos que vivem em condições semelhantes a *H. heliophila* de exposição aérea diária devido ao ciclo de maré, como os bivalves, caranguejos, corais e ouriços do mar (Hermes-Lima et al. 2015; Teixeira et al. 2013, Moreira et al. 2022; Pereira 2021). Mas isso não foi observado nas esponjas do presente trabalho, o que verificamos foi o mecanismo contrário, em que houve um aumento de danos oxidativos e antioxidantes durante a reoxigenação, demonstrando que o momento de real estresse oxidativo da *H. heliophila* é em baixo d'água (mais especificamente durante a reoxigenação no início da submersão), e não fora. Assim, fica evidente que a esponja *H. heliophila* não é uma espécie POS-positiva sob o estresse de exposição aérea, e faz o mecanismo de defesa antioxidante “clássico”.

Mas porque a esponja seria diferente de outros invertebrados marinhos em termos de resposta ao ciclo de exposição aérea e submersão? Uma possível explicação para esse fenômeno é a depressão metabólica durante a exposição aérea. A depressão metabólica é uma redução na taxa metabólica abaixo da taxa de repouso, sendo uma resposta a diferentes estresses ambientais, como variação de temperatura, dessecação, hipóxia, anóxia, variação de salinidade, privação de nutrientes, etc. A extensão da depressão pode variar desde 80% da taxa de repouso até 1% ou menos (Guppy & Withers 1999). Existem diferentes classificações que dependem do grupo de

animais em questão, a extensão e duração da depressão metabólica, a temperatura corporal do animal e do ambiente, o estado que a água corporal se encontra (congelado ou hiperosmótico) e a disponibilidade de oxigênio (Withers & Cooper 2010). Assim surgiu as grandes classificações de criptobiose (ametabolismo), que inclui anidrobiose, criobiose, osmobiose e anoxibiose, e dormência (hipometabolismo), que inclui os tipos mais conhecidos: diapausa, torpor, hibernação e estivação (Withers & Cooper 2010).

A depressão metabólica é uma adaptação presente na maioria dos filos animais, sendo a mais estudada a hibernação em mamíferos, em que ocorre uma grande redução na temperatura corpórea, perda de água e redução das vias metabólicas, principalmente as que tem alto consumo de ATP (Geiser 2013). Porém o mecanismo é muito mais amplo no Reino Animal do que apenas os mamíferos. Por exemplo, pequenos invertebrados como rotíferos, que são pouco conhecidos, são capazes de fazer anidrobiose, que permite a sobrevivência em severa desidratação e ametabolismo (Marotta et al. 2010). Os tardígrados, conhecidos como ursos d'água, são adaptados a diferentes ambientes estressantes, sendo capazes de fazer os quatro tipos de criobiose: anidrobiose (com perda d'água), criobiose (em baixas temperaturas), osmobiose (em alta salinidade) e anoxibiose (baixa oxigenação) (Nelson et al. 2015, Møbjerg et al. 2011). Muitos outros táxons fazem diferentes mecanismos para diferentes ambientes e situações de estresse, como anuros em estivação (Moreira et al. 2021), répteis em hibernação (Moreira et al. 2018), insetos em diapausa (Tougeron 2019), hibernação e torpor em mamíferos e pássaros (Lyman 2013), entre tantos outros. Em relação aos animais mais basais, já foi documentado depressão metabólica em corais submetidos a 20 dias com privação de nutrientes e luz (Jacobson et al. 2016). Foi observado uma redução em 37% da taxa de respiração e 64% da massa corpórea, mas a produção de esqueleto permaneceu normalizada (Jacobson et al. 2016). Também é bem conhecido o mecanismo de diapausa e criptobiose em gêmulas de esponjas controlado por fatores endógenos (Nikalje & Muley 2015, Manconi & Pronzato 2016). As esponjas podem se reproduzir de forma sexuada e assexuada, com a produção de gêmulas estimulada por situações como temperatura extrema e dessecação, com a germinação ocorrendo com o retorno de condições favoráveis para crescimento de uma nova esponja (Nikalje

& Muley 2015). Porém, não foi documentado até então qualquer mecanismo de depressão metabólica em poríferos maduros.

Para concluir que uma esponja faz depressão metabólica é necessário avaliar diferentes aspectos, como a taxa de respiração, mudança no tamanho, peso e morfologia, padrão de contração, taxa de bombeamento e quantificação de enzimas relacionadas com o metabolismo basal. Na literatura é observado padrões muito diferentes de esponjas em resposta à hipóxia, o que dificulta definir se de fato fazem depressão metabólica. Por exemplo a esponja *Halichondria panicea* consegue sobreviver em taxas de até 0.5% PAL, reduzindo a taxa de filtração para um terço da taxa basal, mas mantendo sua taxa de respiração sem mudanças significativas (Mills et al. 2014). Em contrapartida a esponja *Suberites carnosus* aumentou a taxa de respiração sob dois dias de hipóxia (6% PAL), assim como a taxa de bombeamento em 5% PAL. Porém, com 5 dias de hipóxia severa (1.5% PAL) a taxa de bombeamento praticamente cessou (Micaroni et al. 2022). A abundância e diversidade de simbioses também influencia no grau de tolerância à hipóxia. As esponjas de alta abundância microbiana (HMA) costumam ter maiores custos energéticos, e consequentemente maiores taxas de respiração quando comparado à espécies de baixa abundância microbiana (LMA). Isso sugere uma maior tolerância à hipóxia em espécies LMA (Leys & Kahn 2018) – sendo a classificação em que a espécie *H. heliophila* se enquadra (Turque et al. 2008). Espécies da zona entremarés param a filtração quando expostas ao ar, mas costumam manter o epitélio oxigenado enquanto o tecido está úmido, porém após 15 min o tecido fica seco e a esponja entra em anóxia funcional (Hoffmann et al. 2008).

Assim, com os dados obtidos no presente trabalho não é possível afirmar que a esponja *H. heliophila* faz depressão metabólica em exposição aérea. Por outro lado, é evidente que ocorre uma “depressão redox” do sistema primário de defesas antioxidantes com a privação de oxigênio na maré baixa. Isso corrobora com Hoffmann e colegas (2008) em relação à anoxia interna que ocorre sob exposição aérea, de forma que após 2h de exposição o epitélio da esponja *H. heliophila* não estaria mais úmido e o animal se encontraria em anóxia. Isso limitaria a formação mitocondrial de ROS e consequentemente de danos oxidativos. A menor taxa de TBARS na maré baixa está de

acordo com essa hipótese (Fig. 27). Isso demonstra que a esponja *H. heliophila* utiliza o mecanismo clássico de proteção antioxidante contra danos oxidativos. Com a privação de oxigênio (anóxia) o metabolismo redox ficaria inerte, com pouca ou nenhuma produção mitocondrial de ROS, que conseqüentemente não geraria danos oxidativos, como observado nas amostras expostas ao ar. Uma vez que as concentrações de oxigênio se reestabeleceram na reoxigenação possivelmente ocorreu grande produção mitocondrial de ROS que gerou o aumento de danos oxidativos, observado pela maior quantidade de TBARS nas amostras em submersão (Fig. 27). É importante enfatizar a significância desse dado que se repetiu na primavera e no verão (dia 01 e 02). No dia 03 (primavera), apesar da baixa significância do TBARS na submersão ($p=0.28$), o resultado segue na mesma tendência dos outros dias, que é o aumento na maré alta (Fig. 27).

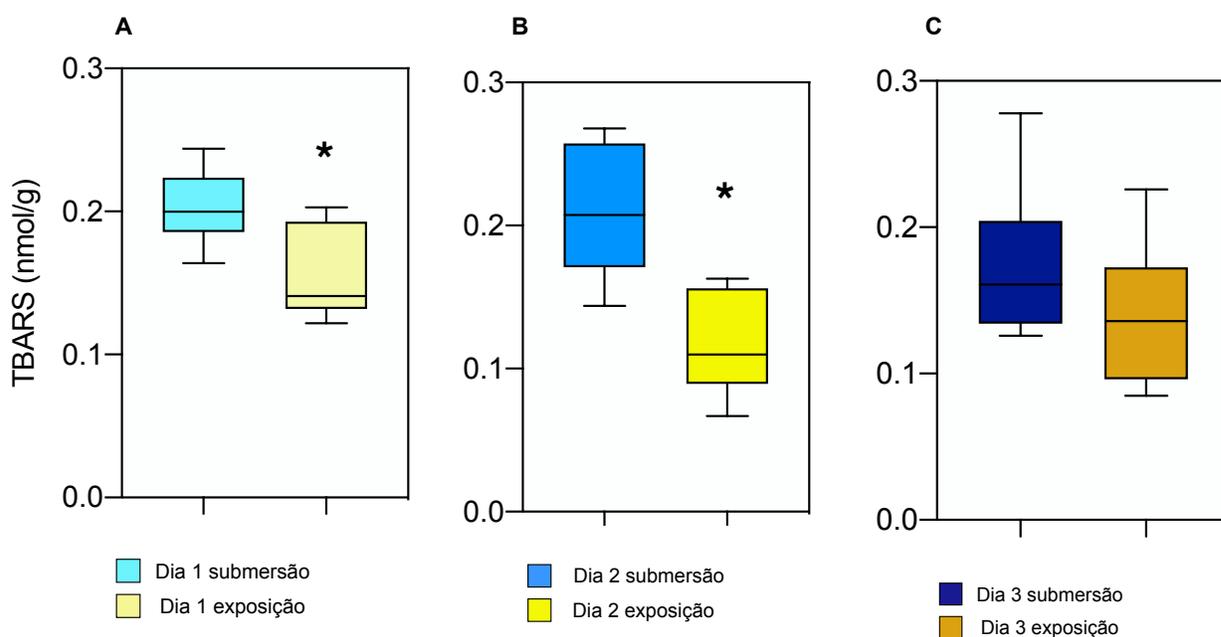


Figura 27. Dados bioquímicos de TBARS nas comparações entre esponjas *H. heliophila* em exposição aérea e submersão nos dias de coleta 01 (A), 02 (B) e 03 (C). No dia 01 houve aumento significativo de 21.9% durante a submersão ($p=0.022$)(A). No dia 02 também houve aumento significativo em TBARS de 44.4% durante a submersão ($p=0.0034$). No dia 03 não houve aumento significativo de TBARS.

De acordo com a nossa proposta, o sistema antioxidante só foi sensibilizado a partir de grandes quantidades de ROS, mas respondeu de maneira rápida (10min) e por isso observou-se o aumento de enzimas antioxidantes nas amostras em submersão (Fig. 28).

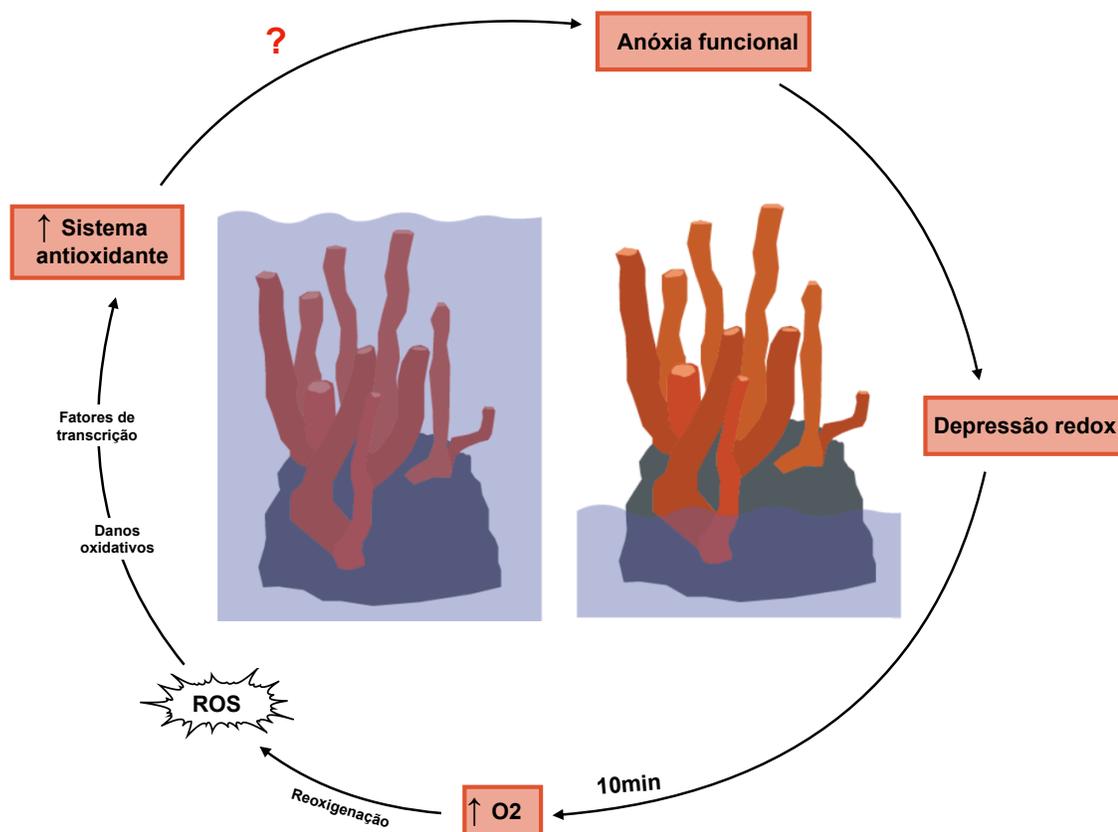


Figura 28. Esquema da resposta antioxidante de *H. heliopila* em ciclo de exposição aérea e submersão. Quando a esponja fica exposta ao ar ocorre anóxia funcional, que conseqüentemente gera depressão redox. Nessa etapa não há aumento de antioxidantes e danos oxidativos, possivelmente pela não-produção de ROS. Após 10min de submersão, durante a reoxigenação, ocorre a resposta clássica ao estresse oxidativo: o grande aumento de ROS gera danos oxidativos e ativa fatores de transcrição. Conseqüentemente o sistema antioxidante é ativado. Não se sabe como o metabolismo redox fica após horas de submersão.

Estudos futuros são necessários para conferir se a espécie possui outros antioxidantes, possivelmente de baixo peso molecular, para avaliar se o sistema antioxidante está mais acentuado em termos de defesas secundárias. O protocolo de capacidade antioxidante total (TAC) pode proporcionar uma visão geral do sistema antioxidante, mas sem especificar quais antioxidantes tiveram maior atividade (Brand-Williams e al. 1995), incluindo dessa forma os antioxidantes de baixo peso molecular, como ácido ascórbico e ácido úrico. Além desses, os MAA's e carotenoides citados anteriormente também possuem atividade antioxidante (Lesser 2006), o que reforça a necessidade de serem futuramente quantificados nas amostras de *H. heliophila*.

Também é importante enfatizar que as defesas antioxidantes primárias e secundárias são muito influenciadas pela presença dos simbiossomas nas esponjas. Por exemplo, Regoli e colegas (2000) observaram um aumento de quatro vezes de glutathione reduzida (GSH) de esponjas da espécie *Petrosia ficiformis* com presença de simbiossomas quando comparado com partes sem simbiossomas. Por outro lado, ácido ascórbico e úrico não se alteraram. Além disso, as atividades de CAT, SOD, GPX, GR e GST estavam todas aumentadas nas amostras com simbiossomas (Regoli et al. 2000). O mesmo padrão foi observado na comparação entre a anêmona simbiótica *Anemonia viridis* e a não-simbiótica *Actinia schmidtii*, em que foi observado aumento significativo de diferentes variedades de SOD na anêmona simbiótica quando submetida à hiperóxia (Richier et al. 2005). Tais observações demonstram a importância de fazer análises em campo com as condições ambientais naturais da espécie, e conseqüentemente sem afetar a biota associada com as esponjas.

Com esses resultados fica o grande questionamento de qual é o momento em que a esponja *H. heliophila* fica com suas taxas normalizadas, uma vez que exposta ao ar ela se encontra em anóxia e com depressão redox, e em submersão ela fica “estressada”, ou seja, com danos oxidativos acentuados e com o sistema antioxidante primário ativo (Fig. 28). Assim, para estudos futuros é importante fazer análises em diferentes momentos da submersão, uma vez que as amostras submersas foram coletadas pouco depois da subida da maré (~10min). Infelizmente não foi possível fazer coleta em outros momentos devido à logística de coleta das esponjas na maré alta, não tínhamos material de mergulho e nem meio de transporte para locomoção na maré alta.

Pelos mesmos motivos também não foi possível coletar amostras que seriam consideradas “controle”, ou seja, que ficam submersas durante todo o tempo, o que limitou as análises para comparações apenas entre esponjas expostas ao ar e recém submersas (em reoxigenação). É possível que após algumas horas de submersão as taxas de dano oxidativo estejam mais atenuadas devido a atividade de reparo de danos. Também são necessárias outras análises em laboratório, possivelmente com um sistema de aquário que simule o ciclo de marés, para verificar se de fato ocorre uma depressão metabólica na exposição aérea. Para tanto é necessário que seja observado as taxas de respiração, contração e filtração, além de testes bioquímicos de enzimas metabólicas basais, como citrato sintase (CS) e piruvato quinase (PK). Para fazer essa análise completa possivelmente seja mais eficiente fazer testes em laboratório concomitantemente com testes na natureza, de acordo com a filosofia de trabalho em ecofisiologia de J.I. Spicer (2014). Para observar detalhadamente os efeitos morfológicos e comportamentais é ideal utilizar esponjas em aquário controlado, porém também é importante a coleta em campo para fazer as análises bioquímicas sob influência das variáveis do habitat natural da espécie, incluindo simbiontes.

5.3 Sazonalidade e efeito de estações do ano

As análises entre primavera e verão só apresentaram diferenças significativas nas comparações entre as amostras submersas, o que faz sentido ao considerar o conceito de “depressão redox” durante a exposição aérea proposto anteriormente. Curiosamente as esponjas *H. heliophila* demonstraram ter o sistema antioxidante mais ativo na primavera quando comparado ao verão. A temperatura e radiação solar média da coleta do dia de verão estava 26.8°C e 472.92 w/m² respectivamente, enquanto a média da primavera (considerando os dias 02 e 03), estava 22.21°C 149,62 w/m². Se esperava que com essa diferença tão evidente de temperatura e radiação solar (Tab. 3, Fig. 18), as esponjas do verão estariam com mais antioxidantes e danos oxidativos em comparação com a primavera. Entretanto, não foi observado elevação de TBARS e proteínas carboniladas, e ocorreu um aumento significativo das enzimas GPXt (51.3%),

GPX_(se) (59.5%) e GR (40.6%) na primavera, sendo todas envolvidas no sistema antioxidante glutathiona dependente. No verão apenas a enzima catalase (CAT) estava mais ativa em comparação com a primavera (62%), sendo uma enzima não necessariamente associada à glutathiona (Fig. 26 E,F,G e H).

A temperatura é um fator abiótico que influencia significativamente o metabolismo redox, podendo gerar diferentes respostas em variadas espécies. Já foi observado em animais de água doce e salgada um padrão de inibição de enzimas antioxidantes com o aumento de temperatura. Por exemplo, em duas espécies de camarão (*Palaemon serratus* e *Palaemon elegans*) houve aumento significativo da atividade de SOD até 28°C seguido de uma redução abrupta a partir de 30°C (Vinagre et al. 2014). O mesmo padrão foi observado no peixe estuarino *Liza ramada*, que teve a atividade de GST aumentada até 32°C seguido de uma redução abrupta (Madeira et al. 2013). A ostra *Crassostrea virginica* também demonstrou uma redução de SOD a partir de 30°C (Rahman & Rahman 2021). O peixe dourado *Carassius auratus* teve redução significativa de GST após 7h em temperatura de 23°C em comparação com o controle à 3°C (Bagnyukova et al. 2007). A partir desses estudos é observado que não existe um padrão definido de resposta antioxidante à altas temperaturas, mas que até determinada temperatura o sistema antioxidante aumenta sua atividade, até ter uma queda abrupta, e isso parece ocorrer em paralelo com variações da taxa metabólica e produção de ROS. O limite de temperatura que as enzimas antioxidantes começam a reduzir parece ser espécie específico.

É possível que a esponja *H. heliophila* tenha um padrão de resposta a temperatura que depende da estação do ano, de forma que no verão, quando a temperatura está consideravelmente mais elevada (com mais de 5°C de diferença), as enzimas antioxidantes envolvidas no sistema da glutathiona estejam inibidas temporariamente. Não é possível aferir qual é o limite de temperatura que a esponja sol começa a reduzir a atividade das enzimas glutathiona-dependente, mas a partir dos dados é possível concluir que está na faixa entre 23 e 27°C, podendo ser uma espécie sensível a variação de temperatura, mas com alguma tolerância à radiação solar.

A catalase por outro lado apresentou um aumento no verão de 62% quando comparado com a primavera, se opondo as enzimas glutathiona-dependente (Fig. 26E).

A enzima CAT de organismos aquáticos costuma ser mais resistente a altas temperaturas. Por exemplo, o mexilhão *Mytilus coruscus* teve a atividade de CAT aumentada nas brânquias e glândula digestiva em 30°C em comparação a 25°C em condições de pH básico (Hu et al. 2015). Esse experimento durou 14 dias, e com testes em 3 diferentes pH's (7.3, 7.7 e 8.1) associado às temperaturas de 25 e 30°C. Em nenhum dos casos houve redução da catalase com o aumento da temperatura (Hu et al. 2015). Em outro estudo, o atum (*Dicentrarchus labrax*) foi submetido à três temperaturas diferentes (18, 24 e 28°C) por até 30 dias e só houve redução de CAT - após 30 dias - sob a maior temperatura, mas permaneceu com níveis elevados com 15 dias sob 30°C (Vinagre et al. 2012). No caso do peixe *Sparus aurata* foi observado a enzima CAT aumentada de forma gradual nas brânquias, fígado, cérebro e músculo em diferentes temperaturas, de 18°C até 34°C (Madeira et al. 2016). O caranguejo *Scylla paramamosain* permaneceu com níveis elevados de CAT nas brânquias até 24h sob estresse de 35°C e no hepatopancreas por 12h à 35°C, em comparação com o controle aclimatado à 25°C (Liu et al. 2018).

Com esses estudos é observado que a catalase costuma ser resistente a maiores temperaturas por períodos mais prolongados em comparação com as outras enzimas antioxidantes. Isso corrobora com nossas observações de que a atividade de que CAT na esponja *H. heliophila* esteja com níveis mais elevados no verão em comparação com a primavera. Possivelmente no verão as enzimas glutathione-dependente ficam menos pronunciadas, devido a sensibilidade à temperaturas mais altas. Porém, como uma forma de compensação o sistema antioxidante da esponja sol teria intensificado a atividade de CAT, sendo supostamente uma enzima mais resistente, protegendo o organismo de danos oxidativos no verão – estação com maior intensidade de radiação solar/UV e maiores temperaturas. Os MAA's e antioxidantes de baixo peso molecular (como flavonoides e carotenoides) também podem influenciar na proteção do verão, agindo em conjunto a catalase, mas como não foram aferidos experimentalmente não é possível afirmar a influência.

O único antioxidante de baixo peso molecular que foi quantificado no presente estudo foi a glutathione, incluindo sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), além da razão GSH/GSSG. Não houve diferença significativa de glutathione em nenhuma das

análises estatísticas, mas o aumento das enzimas glutaciona-dependente durante a primavera demonstra que o sistema está ativo. A glutaciona é um importante antioxidante, possivelmente o mais abrangente, e tem papel fundamental de neutralizar ROS (Bachhawat & Yadav 2018). Assim, a glutaciona tem um efeito direto de minimizar os danos oxidativos oriundos da radiação solar/UV. Aparentemente é comum em invertebrados marinhos a glutaciona total estar na faixa entre 200 e 300nmol/g de tecido (Moreira et al. 2021, Arun et al. 1999, Cansei & Viarengo 1997, Almeida et al. 2005). Isso corrobora com os resultados de *H. heliophila* do presente trabalho, em que todas as comparações mantiveram o nível de GSht nessa faixa (Fig. 21G, 22G, 23G, 24G, 25G). Já foi demonstrado o efeito significativo de glutaciona em invertebrados marinhos sob estresse de radiação UV e exposição aérea (Moreira et al. 2023). Assim, apesar de não haver diferença significativa na comparação entre primavera e verão, a glutaciona possivelmente também tem uma importante função nas esponjas *H. heliophila*, em especial na primavera, quando aparentemente o sistema antioxidante está mais ativo.

A temperatura também parece influenciar significativamente a taxa de fotossíntese de cianobactérias. Diferentes estudos associaram o aumento da taxa de fotossíntese de cianobactérias de regiões entre-maré com o aumento da temperatura (Wieland & Kuhl 2005; Aguilera et al. 2020; Giordanino et al. 2011). Esses estudos não utilizaram cianobactérias em associação com esponjas, mas sim de vida livre, mas podem dar pistas do que acontece nas cianobactérias presentes nas esponjas de regiões entre-maré, como *H. heliophila* (Weigel & Erwin 2016). Já foi demonstrado a estabilidade sazonal da microbiota associada às esponjas marinhas (White et al. 2012; Erwin et al. 2012; Erwin et al. 2015), mas definitivamente ocorre variabilidade da taxa de fotossíntese por cianobactérias ao longo do ano (Aguilera et al. 2020). É de amplo conhecimento que o aumento da taxa de fotossíntese está associado ao aumento da concentração de oxigênio local (Quévrain et al. 2014). Dessa forma, enquanto os compostos fotoprotetores absorvem a radiação UV para minimizar o foto-estresse oxidativo, as cianobactérias absorvem a radiação solar e conseqüentemente aumentam a taxa de fotossíntese, colaborando para o aumento da concentração de O₂ do micro-ambiente. Com a taxa de fotossíntese aumentada no verão é possível que o micro-ambiente da esponja fique hiperóxico (seguindo essa linha de raciocínio em que os

simbiontes das esponjas *H. heliophila* teriam maiores taxas de fotossíntese no verão). Assim, as cianobactérias podem colaborar, ao absorver a radiação solar, na proteção à danos no DNA. Por outro lado, também podem gerar hiperóxia local devido à maior taxa de fotossíntese. Apesar do ambiente possivelmente hiperóxico, que favorece a formação de ROS e dano oxidativo, não houve diferença significativa nos indicadores de estresse oxidativo (proteínas carboniladas, TBARS, GSSG e GSH/GSSG), demonstrando que o sistema aparenta estar em equilíbrio redox.

Nesse contexto, o que pode estar minimizando o estresse oxidativo do verão na esponja sol seriam os MAA's e outros compostos fotoprotetores. Nos resultados não foi observado efeito da radiação solar/UV na comparação entre dia e noite na mesma estação do ano (primavera), mas é possível que tenha efeito sazonal. Os MAA's citados anteriormente tem um papel fundamental de proteção contra radiação solar/UV no verão. Diferentes estudos correlacionam a temperatura e radiação solar do ano com a produção de MAA's pelos organismos que os sintetizam, de forma que nas estações mais quentes e com maior radiação a produção fica intensificada. Um estudo com duas espécies de coral (*Lobophytum compactum* e *Sinularia flexibilis*) teve essa correlação evidente, à medida que a temperatura e radiação solar aumentava ou reduzia ao longo do ano, o mesmo acontecia com a concentração de MAA's nas duas espécies de coral (Fig. 29) (Michalek-Wagner 2001). Outros estudos corroboram com a sazonalidade da produção de MAA's em macroalgas, fitoplâncton e cianobactérias (Lalegerie et al 2020, Tartarotti & Sommaruga 2006, Karsten et al. 1998). No estudo com fitoplânctons especificamente também houve correlação da profundidade do organismo em relação ao nível do mar em conjunto com a produção sazonal de MAA's. Observou-se que nas estações mais quentes e profundidades mais rasas (regiões entremaré) houve maior produção de MAA's.

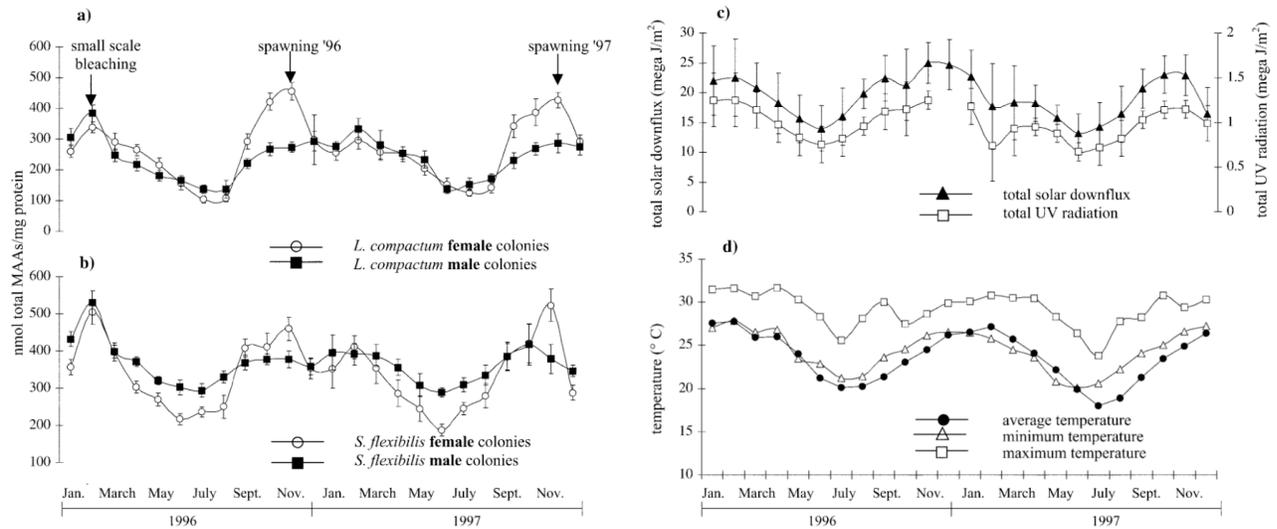


Figura 29. Quantificação de MAA's nas espécies de coral *Lobophytum compactum* (A) e *Sinularia flexibilis* (B) de acordo com os meses de janeiro, março, maio, julho, setembro e novembro de 1996 e 1997 em colônias macho e fêmea. Variação de radiação solar (C) e temperatura (D) ao longo dos mesmos meses. (Michalek-Wagner 2001)

Assim, é possível que as esponjas *H. heliophila* apresentem variação da produção dos MAA's (principalmente palitina) a partir dos simbiontes de acordo com a estação do ano (McClintock e Karentz 1997). Seguindo essa linha de raciocínio, no verão as enzimas antioxidantes glutaciona-dependente ficam inibidas devido à maior temperatura. Porém como forma de compensação o metabolismo ativaria a enzima catalase, possivelmente de forma concomitante com uma maior concentração de MAA's (que absorvem radiação solar/UV) e maior taxa de fotossíntese pelas cianobactérias. Por outro lado, na primavera a radiação solar está consideravelmente menor, o que consequentemente reduz a taxa de fotossíntese das cianobactérias, assim como a concentração de MAA's. Com a redução desses fatores que colaboram na absorção da radiação solar/UV, o sistema antioxidante ativa as defesas primárias envolvidas no ciclo da glutaciona (enzimas GPX, GPX_(Se) e GR), que na primavera ficam mais ativas. Aparentemente ocorrem diferentes estratégias adaptativas em diferentes estações no ano, levando em consideração a variabilidade de diversos fatores influenciados pelas condições ambientais. Porém, em ambas as estações (primavera e verão) essas estratégias parecem ser suficientes para proteção ao desequilíbrio redox e de danos

oxidativos, levando em consideração que não houve diferença significativa de proteínas carboniladas, TBARS e GSSG ao comparar as duas estações. (Fig. 30)

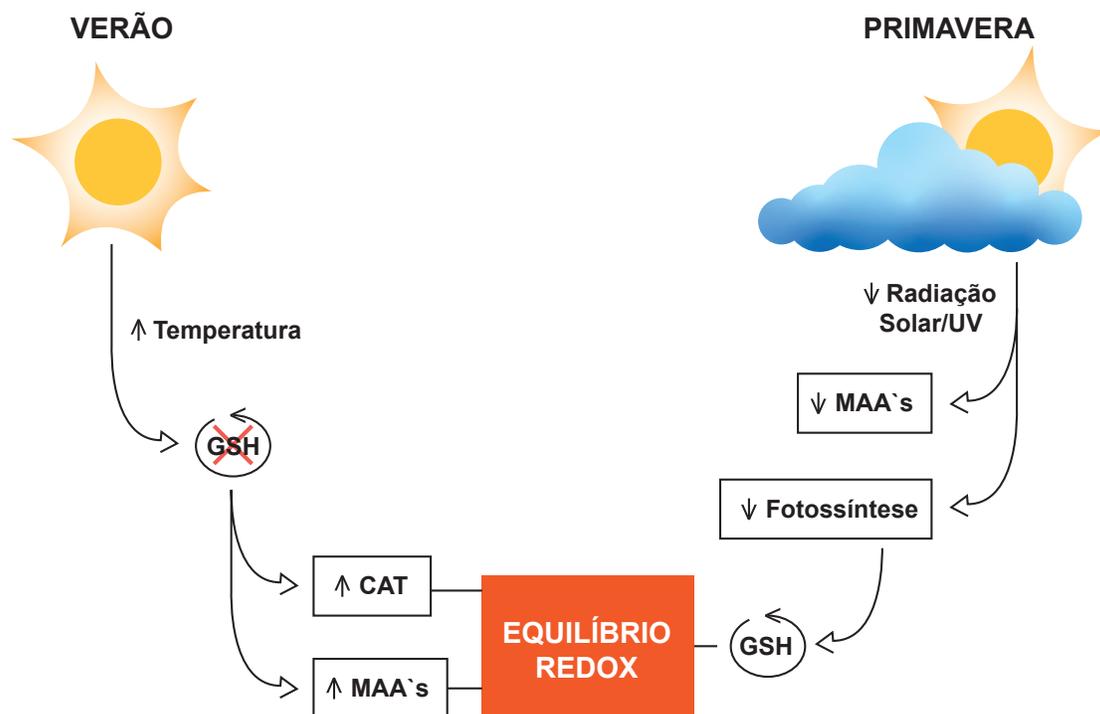


Figura 30. Estratégias redox da esponja *H. heliophila* no verão e na primavera para lidar com diferenças sazonais de variáveis ambientais (radiação solar/UV, temperatura, etc.). A variação de MAA's e taxa de fotossíntese foi hipotetizada a partir de estudos anteriores.

5.4 POS: a possível origem

Um dos objetivos do presente trabalho era estimar quando o mecanismo POS poderia ter surgido ao longo da evolução. A esponja *H. heliophila* foi escolhida por fazer parte de um dos filos mais basais e antigos, que possui fortes indícios de ter surgido antes da oxigenação da atmosfera e dos oceanos (Fig. 1) (Turner 2021). Isso sugere resistência do filo (em geral) a situações extremas, como momentos de privação de oxigênio (Manconi & Pronzato 2016, Mills et al. 2014). Assim, foi relevante testar uma

esponja que passa por situações que poderiam engatilhar o mecanismo POS, como exposição aérea e radiação UV, para analisar e estimar uma possível origem evolutiva para o mecanismo. Com os resultados ficou evidente que a esponja sol não faz o mecanismo POS, porém, os resultados não foram conclusivos para afirmar que o mecanismo não surgiu ou não nos poríferos.

O filo mais basal que já foi documentado ter espécies POS-positivas é o Cnidaria, com três espécies: *Veretillum cynomorium* (induzido por radiação UV) *Acropora microphthalma* (induzido por exposição aérea) e *Bunodosoma cangicum* (induzido por hipóxia) (Shick et al. 1995; Teixeira et al. 2013; Abujamara et al. 2014). O octocoral *A. microphthalma* teve uma resposta clássica de POS ao estresse oxidativo sob exposição aérea. Os animais foram submetidos a 2,5 h de exposição aérea e tiveram os níveis elevados de GST e CAT com 2h de exposição e SOD com 2,5h. Uma vez que os animais submergiram houve aumento de proteínas carboniladas, que provavelmente estariam mais acentuados se os antioxidantes não estivessem já ativados durante a exposição. O que ocorre é de fato um “preparo” para o estresse que ocorre na reoxigenação, e essa resposta é o que se espera de uma espécie POS-positiva, o que não foi observado na esponja sol.

O POS já foi demonstrado em mais de 120 espécies de animais (Hermes-Lima et al. dados não publicados), e os filós com maior número de espécies são Arthropoda (com crustáceos e insetos em abundância), Mollusca (principalmente bivalves e gastrópodes) e Chordata (principalmente peixes e anfíbios). Praticamente todos os peixes POS-positivos foram submetidos à hipóxia, e os crustáceos na grande maioria também. Por outro lado, os insetos e anfíbios parecem fazer POS sob uma maior variedade de estressores, como anóxia, desidratação, estivação e congelamento. Os bivalves e gastrópodes além da hipóxia também fazem POS sob exposição aérea (Moreira et al. 2016). A literatura ainda é muito limitada em relação ao estressor radiação UV, um dos motivos para testar na esponja *H. heliophila*, porém já foram incluídas 17 espécies POS-positivas de 6 filós diferentes (Cnidaria, Rotifera, Annelida, Arthropoda, Echinodermata e Chordata), sendo em sua maioria animais aquáticos (Geihs et al. 2020).

Já foi discutido no capítulo 2 o mecanismo molecular do POS que está intrinsecamente relacionado aos fatores de transcrição NF-kB, HIF1, Nrf2, FoxO e p53 para ativar a transcrição de antioxidantes. A partir de análises genômicas e filogenéticas é possível observar que esses fatores de transcrição foram muito conservados ao longo da evolução do Reino Animal, mas também houve surgimento de genes homólogos em táxons específicos (Doonan et al. 2019, Aberg et al. 2017, Shimeld et al. 2010, Williams & Gilmore 2020, Mills et al. 2018). Assim, a partir de uma análise teórica e pesquisa ativa é possível fazer uma estimativa do período geológico que o POS pode ter surgido a partir da presença de genes (ou homólogos) de um ou mais fatores de transcrição associados ao POS.

Os filos Chordata e Arthropoda, que possuem uma grande diversidade de espécies POS-positivas (Moreira et al. 2016), estão associados à presença de grande parte dos fatores de transcrição envolvidos no mecanismo POS (Fig. 31). Com exceção dos tardígrados e rotíferos, que ainda não possuem evidências, todos os filos em que já foi observado POS têm pelo menos dois dos fatores de transcrição citados. Isso corrobora com o mecanismo descrito por Moreira e colaboradores (2016) que relaciona esses fatores à ativação de genes de enzimas antioxidantes. Porém é importante enfatizar que esses fatores não estão relacionados apenas com as vias de metabolismo redox, então sua presença não indica necessariamente que a espécie vai obedecer ao critério de aumento de antioxidantes durante a privação de oxigênio.

Por exemplo, conforme a figura 31, observa-se a presença de três fatores de transcrição redox funcionais (NF-kB, Nrf e FoxO) no filo Porifera. Isso fortalece a hipótese que o POS pode estar presente nas esponjas. Porém, como em outros filos, não necessariamente o mesmo mecanismo estará presente em todas as espécies. Essas diferentes respostas podem estar associadas aos diversos ambientes e condições a que os indivíduos são submetidos. A esponja sol (*H. heliophila*), demonstrou não atender aos critérios do POS apesar de ter no seu filo evidências da presença desses fatores de transcrição. Assim, é possível que a esponja estudada não foi exposta às condições que favorecessem a ocorrência do POS. Faz sentido a ausência do mecanismo POS ao considerar a anóxia funcional que ocorre sob exposição aérea, de acordo com Hoffmann e colaboradores (2008). Em anóxia não

haveria formação mitocondrial de ROS, uma vez que a concentração de oxigênio fica praticamente nula (Halliwell & Gutteridge 2015). Sem concentrações mínimas de ROS não é possível a ativação dos fatores de transcrição redox e geração de danos oxidativos no momento da exposição. Assim, a ativação de enzimas antioxidantes e GSH durante a anóxia fica inviabilizada

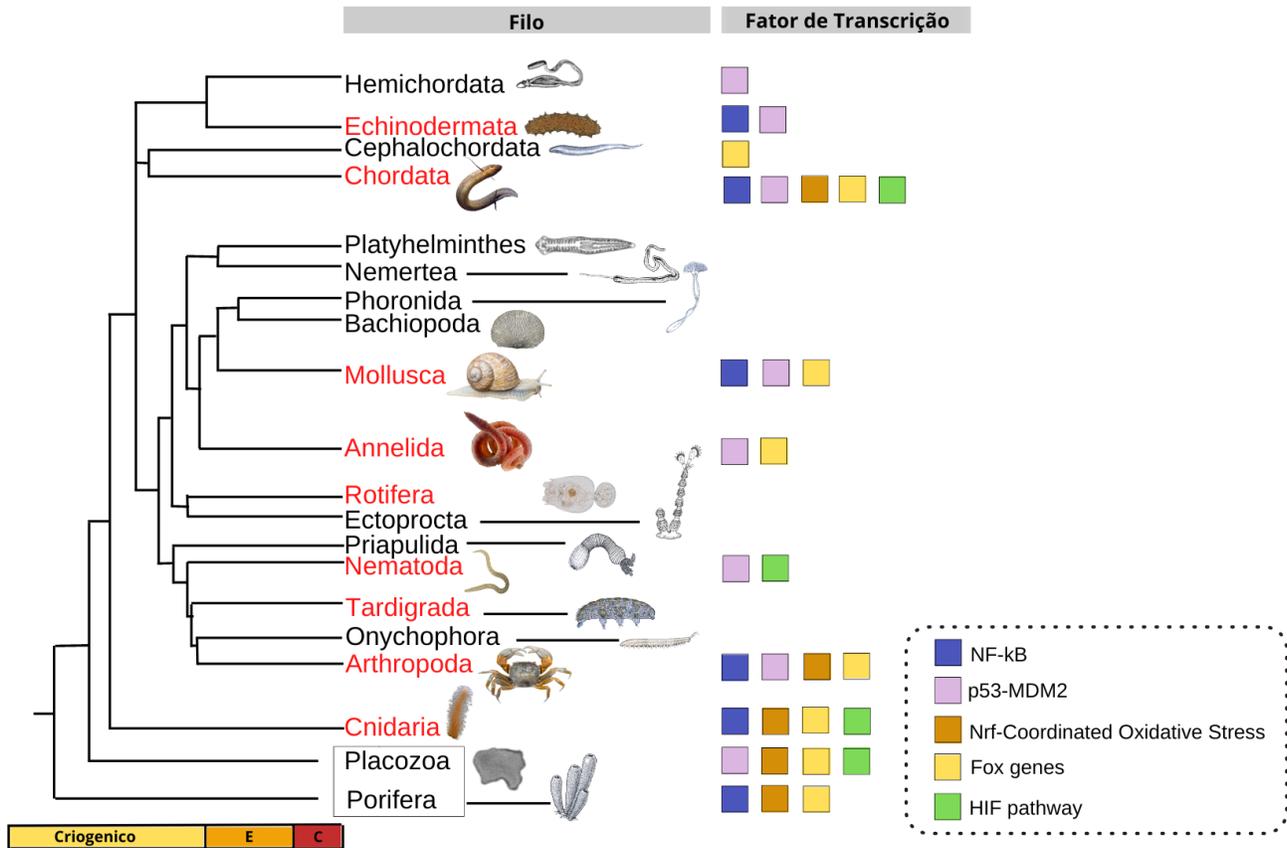


Figura 31. Árvore filogenética de acordo com os períodos geológicos de divergência evolutiva entre diferentes táxons. Em vermelho, filis que possuem espécies POS-positivas já descritas. No canto inferior esquerdo estão os períodos geológicos Criogênico (em amarelo), Ediacarano (em laranja) e Cambriano (em vermelho). Os quadrados são referentes à presença dos fatores de transcrição ou homólogos de NF-kB, P53, Nrf, Fox e HIF, em determinados filis (Mills et al. 2018, Shimeld et al. 2010, Donnan et al. 2019, Berg et al. 2017, Williams & Gilmore 2020). O retângulo cinza (englobando Placozoa e Porifera) representa os filis em que ainda devem ser testados para o mecanismo POS, sendo possíveis candidatos à origem evolutiva.

Como colocado acima, os nossos resultados evidenciaram que a esponja sol não utiliza o mecanismo POS sob condições naturais de exposição aérea. Porém, as evidências não descartam a possibilidade da espécie fazer POS sob hipóxia, uma vez nessa condição ainda pode ocorrer uma pequena produção de ROS (Maupoil & Rochette 1988; Paddenberg et al 2003; Hernansanz-Agustín 2014), que poderia ativar o POS por um mecanismo hormético (Oliveira et al. 2018). Por exemplo, Mills e colaboradores (2014) fizeram testes em laboratório com a esponja *Halichondria panicea* sob hipóxia, e a espécie demonstrou resistência na concentração de oxigênio entre 0.5-4% PAL. Não foi analisado o metabolismo redox nesse estudo. Assim, é possível que a esponja *H. panicea* utilize o mecanismo POS. Dessa forma, como foi citado na seção 5.2, é interessante fazer testes controlados em laboratório com *H. heliophila*, para simular condições variadas, como a hipóxia, que também podem ocorrer de forma natural em zonas intermarés.

Com relação a origem evolutiva do POS no Reino Animal, é possível que possa ter surgido na Era Neoproterozóica, com maior probabilidade no período Criogênico. O início dessa faixa geológica se dá no período Tônico, quando possivelmente já existia a família Demospongiae (Turner 2021). Assim, como ainda há possibilidade de poríferos utilizarem o POS, hipótese reforçada pela presença de fatores de transcrição redox associados (Fig. 31), o período Tônico é uma das possibilidades de surgimento do mecanismo. Atualmente há fortes evidências indicando que o POS já estaria presente no período Criogênio, quando houve surgimento dos cnidários e bilaterais (Fig. 1, Fig. 31), e isso foi proposto por Moreira e colaboradores (2017). Porém isso pode ter ocorrido em diferentes épocas do período Criogênico. Por exemplo, existe a possibilidade do POS ocorrer em outros táxons basais, como o Placozoa, que se encontra evolutivamente entre os poríferos e cnidários e possui quatro dos fatores de transcrição associados (ou homólogos) (Fig. 31). Por exemplo, a espécie *Trichoplax adhaerens* – considerado o animal multicelular mais simples conhecido – apresenta os principais componentes do sistema HIF: fator de transcrição HIF, enzimas proil-hidroxilase (PHDs) e proteína VHL (Loenarz et al. 2011, Rytönen & Storz 2011). Assim, para delimitar mais detalhadamente o momento de divergência em que surgiu o

mecanismo POS, é importante testar outras espécies de esponja e também outros filos basais. Animais que passam por condições semelhantes às da esponja sol, ou seja com algum tipo de privação de oxigênio em frequência sazonal, são bons candidatos ao mecanismo POS, por mais basais que sejam.

Capítulo 6 - Conclusão e perspectivas futuras

A partir dessa dissertação é possível observar pela primeira vez na academia científica a resposta antioxidante de esponjas marinhas sob exposição aérea em condições naturais. Como já hipotetizado por muitos autores, é confirmado que a esponja sol (*H. heliophila*) tem alguma resistência à radiação solar/UV. Porém, com os resultados não foi possível estimar qual a dose de radiação solar/UV é alta o suficiente para gerar uma resposta antioxidante no animal, uma vez que a esponja não estava “estressada” o suficiente.

Autores sugerem que esponjas expostas ao ar ficam em anóxia funcional. Com as variáveis bioquímicas conferidas no presente trabalho é observado que de fato o sistema antioxidante fica inerte durante a exposição aérea. Aqui sugerimos que ocorre uma “depressão redox” que corrobora com a anóxia funcional sugerida por autores. Além disso, também foi observado que a esponja sol não faz o mecanismo POS, porém sua resposta antioxidante acontece de maneira extremamente rápida (10min). Assim, a esponja se protege contra danos oxidativos com o mecanismo “clássico” de aumento de antioxidantes em decorrência do aumento repentino e exponencial de ROS durante a reoxigenação.

Além disso, os resultados evidenciaram que a sazonalidade tem influência no metabolismo redox da esponja sol. Ou seja, ao longo do ano a esponja utiliza diferentes estratégias de acordo com variações entre as estações verão e primavera. Aqui hipotetizamos que diferentes fatores podem explicar essas variações fisiológicas, como compostos fotoprotetores (MAA's, pigmentos etc.), antioxidantes de baixo peso molecular (incluindo polifenóis e flavonoides), taxa de fotossíntese por cianobactérias simbioses, além do efeito da própria temperatura e radiação UV no metabolismo redox.

Apesar das diferentes estratégias utilizadas nas estações de primavera verão, ambas parecem ser suficiente para manter o equilíbrio redox.

Nosso grupo de trabalho (GPRO) tem intenção de ainda quantificar os MAA's nas amostras de *H. heliophila* para aferir se de fato existe influência desses compostos na resistência ao verão. Além disso, também pretendemos aferir a capacidade antioxidante total para melhor entendimento do sistema antioxidante da *H. heliophila*, incluindo os antioxidantes de baixo peso molecular não aferidos. Para perspectivas de longo prazo também é relevante novas coletas com esponjas que estejam submersas à um período maior que 10min, para responder a lacuna que ficou do ciclo de metabolismo redox da *H. heliophila* sob exposição aérea e submersão (Fig. 28). A associação com testes em aquário controlado também é relevante para observar variações de fatores morfológicos e taxas metabólicas (respiração, filtração, mudanças anatômicas, etc.), para confirmar se em conjunto com a depressão redox também ocorre depressão metabólica em algum nível. Além disso, em aquário também é possível simular situações de hipóxia que podem acontecer naturalmente em zonas entre-maré.

Em relação a evolução do mecanismo POS, a literatura ainda é muito limitada, porém é possível fazer uma estimativa que tenha surgido na era Neoproterozóica, provavelmente no período Criogênico. Essa conclusão foi tirada a partir de evidências que mostram o POS em cnidários (que surgiram no Criogênico), e ainda a possibilidade das esponjas fazerem o mecanismo, com indícios fósseis do filo Porifera ter surgido no período Tônico.

Essa pesquisa é de extrema relevância, uma vez que a literatura ainda é limitada em relação à sistema antioxidante de esponjas em geral. Entretanto, ainda não existem estudos que descrevam o metabolismo redox de esponjas sob estressores ambientais naturais associados à privação de oxigênio, sendo esse o primeiro.

Referências Bibliográficas

1. Aberg, E., Saccoccia, F., Grabherr, M., Ore, W.Y. J., Jemth, P., and Hultqvist, G. (2017). Evolution of the p53-MDM2 pathway. *BMC evolutionary biology*, 17(1), 1-12.
2. Abujamara, 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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 162, 34-42.
3. Aebi, H. (1984). "Catalase in Vitro". *Methods in Enzymology* 105:121–26.
4. Aguilera, Á., Suominen, S., Pétursdóttir, S., Olgudóttir, E., Guðmundsdóttir, E.E., Altamirano, M., and Hreggviðsson, G.Ó. (2020). Physiological plasticity of high-temperature intertidal cyanobacterial microbial mats to temperature and salinity: Daily and seasonal in situ photosynthetic performance. *European journal of phycology*, 55(2), 223-233.
5. Alex, A., and Antunes, A. (2015). Pyrosequencing characterization of the microbiota from Atlantic intertidal marine sponges reveals high microbial diversity and the lack of co-occurrence patterns. *PloS one*, 10(5), e0127455.
6. Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H., and Di Mascio, P. (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.
7. Amaral, A.C.Z., A.Turra, A.M. Ciotti, C.L.B.R. Wongtschowski e Y. Schaeffer-Novelli. (2016). Life in Araçá Bay: diversity and importance. *Editora Lume*
8. Antcliffe, J. B., Callow, R. H., & Brasier, M. D. (2014). Giving the early fossil record of sponges a squeeze. *Biological Reviews*, 89(4), 972-1004.
9. Arun, S., Krishnamoorthy, P., and Subramanian, P. (1999). Properties of glutathione peroxidase from the hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(6), 725-732.
10. Bachhawat, A.K., and Yadav, S. (2018). The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ -glutamyl cycle. *Iubmb Life*, 70(7), 585-592.
11. Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, K.B., and Lushchak, V.I. (2007). Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 C. *Journal of Thermal Biology*, 32(4), 227-234.
12. Banning, A., Deubel, S., Kluth, D., Zhou, Z., and Brigelius-Flohé, R. (2005). The GI-GPx gene is a target for Nrf2, *Mol. Cell. Biol.* 25 4914–4923.
13. Berkner LV, Marshall LC. (1965). On the origin and rise of oxygen concentration in the Earth's atmosphere. *J Atmos Sci* 22: 22561.

14. Bierl C., Voetsch B., Jin R.C., Handy D.E., and Loscalzo J. (2004). Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression, *J. Biol. Chem.* 279 26839–26845.
15. 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), 248-254.
16. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
17. Brusca, R. C., Brusca, G. J., and Haver, N. J. (1990). Invertebrates. Vol. 2. *Sunderland, MA: Sinauer Associates*
18. Buege, J.A., Aust, S.D., (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.
19. Canesi, L., and Viarengo, A. (1997). Age-related differences in glutathione metabolism in mussel tissues (*Mytilus edulis* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 116(2), 217-221.
20. Carlberg, I., and B. Mannervik. (1975). "Purification and Characterization of the Flavoenzyme Glutathione Reductase from Rat Liver". *The Journal of Biological Chemistry* 250 (14):5475–80.
21. Chan, K., and Kan, Y. W. (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12731. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.22.12731>
22. Chrapusta, E., Kaminski, A., Duchnik, K., Bober, B., Adamski, M., and Bialczyk, J. (2017). Mycosporine-like amino acids: Potential health and beauty ingredients. *Marine drugs*, 15(10), 326.
23. Chuang, S.C., and Chen, J.H. (2013). Photooxidation and antioxidant responses in the earthworm *Amyntas gracilis* exposed to environmental levels of ultraviolet B radiation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164(3), 429-437.
24. Clima São Sebastião (Brasil). *Climate-Data, 2022*. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/sao-paulo/sao-sebastiao-34837/#climate-graph>>. Acesso em 23 de outubro de 2022.
25. Derikvand, P., Llewellyn, C. A., and Purton, S. (2017). Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers: A comparison with current synthetic compounds. *European Journal of Phycology*, 52(1), 43-56.
26. Doonan, L.B., Hartigan, A., Okamura, B., and Long, P.F. (2019). Stress-free evolution: the Nrf-coordinated oxidative stress response in early diverging metazoans. *Integrative and Comparative Biology*, 59(4), 799-810.
27. Dunlap, W.C., Chalker, B.E., Bandaranayake, W.M., and Wu Won, J.J. (1998). Nature's sunscreen from the Great Barrier Reef, Australia. *International journal of cosmetic science*, 20(1), 41-51.

28. Embley TM, Martin W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440: 62330.
29. English, T.E., and Storey, K.B. (2003). Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*. *Journal of Experimental Biology*, 206(14), 2517-2524.
30. Erwin, P.M., Coma, R., Lopez-Sendino, P., Serrano, E., and Ribes, M. (2015). Stable symbionts across the HMA-LMA dichotomy: low seasonal and interannual variation in sponge-associated bacteria from taxonomically diverse hosts. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(10).
31. Erwin, P.M., Pita, L., López-Legentil, S., and Turon, X. (2012). Stability of sponge-associated bacteria over large seasonal shifts in temperature and irradiance. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7358-7368.
32. Fields, R., and 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.
33. Fortmann, S. P., Burda, B. U., Senger, C. A., Lin, J. S., and Whitlock, E. P. (2013). Vitamin and mineral supplements in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: an updated systematic evidence review for the US Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine*, 159(12), 824-834.
34. Freire, C. A., Welker, A. F., Storey, J. M., Storey, K. B., and Hermes-Lima, M. (2011). Oxidative stress in estuarine and intertidal environments (temperate and tropical). *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, 41-57.
35. Freire, C.A., Togni, V.G., Hermes-Lima, M., 2011a. 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 Mol. Integr. Physiol.* 160, 291–300.
36. Fuse Y, Kobayashi M. (2017). Conservation of the Keap1-Nrf2 System: an evolutionary journey through stressful space and time. *Molecules* 22:436
37. Gacesa R., Dunlap W.C., Barlow D.J., Laskowski R.A., Long P.F. (2016). Rising levels of atmospheric oxygen and evolution of Nrf2. *Sci Rep* 6:27740.
38. Gazave, E., Lapébie, P., Ereskovsky, A. V., Vacelet, J., Renard, E., Cárdenas, P., & Borchiellini, C. (2011). No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera. In *Ancient Animals, New Challenges* (pp. 3-10). Springer, Dordrecht.
39. Geihs, M. A., Moreira, D. C., López-Martínez, G., Minari, M., Ferreira-Cravo, M., Carvajalino-Fernández, J. M., and Hermes-Lima, M. (2020). Commentary: Ultraviolet radiation triggers "preparation for oxidative stress" antioxidant response in animals: Similarities and interplay with other stressors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 239, 110585.
40. Geiser, F. (2013). Hibernation. *Current Biology*, 23(5), R188-R193.

41. Giordanino, M.V.F., Strauch, S.M., Villafañe, V.E., & Helbling, E.W. (2011). Influence of temperature and UVR on photosynthesis and morphology of four species of cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 103(1), 68-77.
42. Greer, E.L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410–7425
43. Griffith, O.W. (1980). “Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine”. *Analytical Biochemistry* 106 (1):207–12.
44. Guppy, M., and Withers, P. (1999). Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biological Reviews*, 74(1), 1-40.
45. 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.
46. Häder, D.P., Williamson, C.E., Wängberg, S Å., Rautio, M., Rose, K.C., Gao, K., and Worrest, R. (2015). Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with other environmental factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(1), 108-126.
47. Häder, D.P.; Helbling, E.W.; Williamson, C.E.; Worrest, R.C. (2011) Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 10, 242–260.
48. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2015). Free radicals in biology and medicine”. Quinta edição. *Editora Oxford university press*.
49. Hentschel U., Usher K.M., Taylor M.W. (2006). Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol* 55: 16777.
50. Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. M., and Taylor, M. W. (2012). Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), 641-654.
51. Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *Functional metabolism: regulation and adaptation*, 1, 319-66.
52. Hermes-Lima, M., Moreira, D. C., Rivera-Ingraham, G. A., 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 Radical Biology and Medicine*, 89, 1122-1143.
53. 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. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10053-6](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10053-6)
54. Hermes-Lima, M., Storey, K.B. (1993). Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am J Physiol* 265, R646-652. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.3.R646>
55. Hernansanz-Agustin, P.; Izquierdo-Alvarez, A.; Sanchez-Gomez, F.J.; Ramos, E.; Villa-Pina, T.; Lamas, S.; Bogdanova, A.; and Martinez-Ruiz. (2014) A. Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 71, 146–156.

56. Hill, M. S., & Sacristán-Soriano, O. (2017). Molecular and functional ecology of sponges and their microbial symbionts. *Climate change, ocean acidification and sponges*, 105-142.
57. Hoffmann F, Larsen O, Thiel V, Rapp HT, et al. (2005). An anaerobic world in sponges. *Geomicrobiol J* 22: 110.
58. Hoffmann, F., Røy, H., Bayer, K., Hentschel, U., Pfannkuchen, M., Brümmer, F., de Beer, D. (2008). Oxygen dynamics and transport in the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *Mar Biol* 153:1257–1264.
59. Horn, M.H., Martin, K.L.M., Chotkowski, M.A. (1999). Intertidal Fishes: Life in two worlds. San Diego, *Academic Press*
60. Hu, M., Li, L., Sui, Y., Li, J., Wang, Y., Lu, W., and Dupont, S. (2015). Effect of pH and temperature on antioxidant responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(2), 573-583.
61. *Hymeniacion heliophila*. *World Register of Marine Species*. Disponível em <<https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=131633>> Acesso em 26 de outubro de 2022
62. Jabłońska, J., and Dan S. Tawfik. (2021): "The evolution of oxygen-utilizing enzymes suggests early biosphere oxygenation." *Nature ecology & evolution* 5.4 :442-448.
63. Jacobson, L.M., Edmunds, P.J., Muller, E.B., and Nisbet, R.M. (2016). The implications of reduced metabolic rate in resource-limited corals. *Journal of Experimental Biology*, 219(6), 870-877.
64. Ji, T.T., Dong, Y.W., Dong, S.L. (2008). Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: aestivation and temperature. *Aquaculture* 283, 180–187.
65. Karsten, U., Maier, J., and Garcia-Pichel, F. (1998). Seasonality in UV-absorbing compounds of cyanobacterial mat communities from an intertidal mangrove flat. *Aquatic Microbial Ecology*, 16(1), 37-44.
66. Kops, G.J., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W., Coffey, P.J., Huang, T.T., Bos, J.L., Medema, R.H., and Burgering, B.M. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419, 316–321.
67. Korteerakul, C.; Honda, M.; Ngoennet, S.; Hibino, T.; Waditee-Sirisattha, R.; Kageyama, H. (2020) Antioxidative and Antiglycative Properties of Mycosporine-Like Amino Acids-Containing Aqueous Extracts Derived from Edible Terrestrial Cyanobacteria. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 66, 339–346.
68. Lalegerie, F., Stiger-Pouvreau, V., and Connan, S. (2020). Temporal variation in pigment and mycosporine-like amino acid composition of the red macroalga *Palmaria palmata* from Brittany (France): Hypothesis on the MAA biosynthesis pathway under high irradiance. *Journal of Applied Phycology*, 32(4), 2641-2656.
69. Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 253-278.

70. Leys, S. P., and Kahn, A. S. (2018). Oxygen and the energetic requirements of the first multicellular animals. *Integrative and Comparative Biology*, 58(4), 666-676.
71. Lin, J. S., O'Connor, E., Rossom, R. C., Perdue, L. A., and Eckstrom, E. (2013). Screening for cognitive impairment in older adults: a systematic review for the US Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine*, 159(9), 601-612.
72. Liu, Z.M., Zhu, X.L., Lu, J., Cai, W.J., Ye, Y.P., and Lv, Y.P. (2018). Effect of high temperature stress on heat shock protein expression and antioxidant enzyme activity of two morphs of the mud crab *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 223, 10-17.
73. Loenarz C., Coleman M.L., and Boleininger A. (2011) The hypoxia-inducible transcription factor pathway regulates oxygen sensing in the simplest animal, *Trichoplax adhaerens*. *EMBO Rep* 12:63–70. doi: 10.1038/embor.2010.170
74. López-Cruz, R.I., Zenteno-Savín, T., Galván-Magaña, F. (2010). Superoxide production, oxidative damage and enzymatic antioxidant defenses in shark skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol. A* 156, 50–56.
75. Lopez-Martinez, G., Benoit, J. B., Rinehart, J. P., Elnitsky, M. A., Lee, R. E., & Denlinger, D. L. (2009). Dehydration, rehydration, and overhydration alter patterns of gene expression in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. *Journal of Comparative Physiology B*, 179(4), 481-491.
76. Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, J.M., Storey, K.B., (2005b). Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1319– 1330. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.006>
77. 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 Physiol* 280, R100–R107.
78. Lyman, C.P. (2013). Hibernation and torpor in mammals and birds. *Academic Press*.
79. Lysek, N., Kinscherf, R., Claus, R., and Lindel, T. (2003). L-5-Hydroxytryptophan: Antioxidant and Anti-Apoptotic Principle of the Intertidal Sponge *Hymeniacidon heliophila*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(7-8), 568-572.
80. Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Vinagre, C., and Diniz, M. S. (2013). Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 166(2), 237-243.
81. Madeira, D., Vinagre, C., and Diniz, M. S. (2016). Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. *Ecological Indicators*, 63, 324-331.
82. Mai W.J., Yan J.L., Wang L., Zheng Y., Xin Y., and Wang W.N. (2010). Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells, *Aquat. Toxicol.* 100 271–281.

83. Mai W.-J., Yan J.-L., Wang L., Zheng Y., Xin Y., Wang W.-N.. (2010). Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells, *Aquat. Toxicol.* 100 271–281.
84. Maia, L. F., Gonzaga, T. A., Campos, M. T., Lobo-Hajdu, G., Edwards, H. G., and de Oliveira, L. F. (2021). Coloration patterns of marine sponges assessed by vibrational spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 52(12), 2581-2596.
85. Malik, A. I., and Storey, K. B. (2011). Transcriptional regulation of antioxidant enzymes by FoxO1 under dehydration stress. *Gene*, 485(2), 114-119.
86. Manconi, R., and Pronzato, R. (2016). How to survive and persist in temporary freshwater? Adaptive traits of sponges (Porifera: Spongillida): A review. *Hydrobiologia*, 782(1), 11-22.
87. Marotta, R., Leasi, F., Uggetti, A., Ricci, C., and Melone, G. (2010). Dry and survive: morphological changes during anhydrobiosis in a bdelloid rotifer. *Journal of structural biology*, 171(1), 11-17.
88. Maupoil V., and Rochette L., (1988) Evaluation of free radical and lipid peroxide formation during global ischemia and reperfusion in isolated perfused rat heart, *Cardiovasc. Drug. Ther.* 2 615–621.
89. McClintock, J. B., and Karentz, D. (1997). Mycosporine-like amino acids in 38 species of subtidal marine organisms from McMurdo Sound, Antarctica. *Antarctic Science*, 9(4), 392-398.
90. Micaroni, V., Strano, F., McAllen, R., Woods, L., Turner, J., Harman, L., and Bell, J. J. (2022). Adaptive strategies of sponges to deoxygenated oceans. *Global Change Biology*, 28(6), 1972-1989.
91. Michalek-Wagner, K. (2001). Seasonal and sex-specific variations in levels of photo-protecting mycosporine-like amino acids (MAAs) in soft corals. *Marine Biology*, 139(4), 61-660.
92. Mills D.B., Ward L.M., Jones C., and Sweeten B., (2014). Oxygen requirements of the earliest animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 416872.
93. Mills, D. B., and Canfield, D. E. (2014). Oxygen and animal evolution: Did a rise of atmospheric oxygen “trigger” the origin of animals? *BioEssays*, 36(12), 1145-1155.
94. Mills, D.B., Francis, W.R., Vargas, S., Larsen, M., Elemans, C.P., Canfield, D.E., and Wörheide, G. (2018). The last common ancestor of animals lacked the HIF pathway and respired in low-oxygen environments. *Elife*, 7, e31176.
95. Møbjerg, N., Halberg, K. A., Jørgensen, A., Persson, D., Bjørn, M., Ramløv, H., and Kristensen, R. M. (2011). Survival in extreme environments on the current knowledge of adaptations in tardigrades. *Acta physiologica*, 202(3), 409-420.
96. Moreira, D.C. (2017). Adaptações do metabolismo redox aos extremos ambientais: mecanismo, distribuição e ocorrência do fenômeno de “Preparo para o Estresse Oxidativo”. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília. Brasília/DF

97. Moreira, D. C., Campos, É. G., Giraud-Billoud, M., Storey, K. B., & Hermes-Lima, M. (2022). Commentary: On the merit of an early contributor of the “Preparation for Oxidative Stress”(POS) theory. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 111341.
98. Moreira, D.C., Carvajalino-Fernández, J.M., Navas, C.A., de Carvalho, J.E., and Hermes-Lima, M. (2021). Metabolic and Redox Biomarkers in Skeletal Muscle Underlie Physiological Adaptations of Two Estivating Anuran Species in a South American Semi-arid Environment. *Frontiers in Physiology*, 2176.
99. Moreira, D. C., Carvajalino-Fernández, J. M., Silva, W. P., Kuzniewski, F., Navas, C. A., de Carvalho, J. E., & Hermes-Lima, M. (2020). Preparation for oxidative stress in *Proceratophrys cristiceps* (Anura, Odontophrynidae) naturally estivating in the Brazilian Caatinga. *Science of The Total Environment*, 723, 137957.
100. Moreira, D.C., Sabino, M.A., Kuzniewski, F.T., Furtado-Filho, O.V., Carvajalino-Fernández, J.M., Angelini, R. and Hermes-Lima, M. (2021). Redox metabolism in mussels (*Brachidontes solisianus*) under the influence of tides in a rocky beach in Southern Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 258, 107424.
101. Moreira, D.C., Welker, A.F., Campos, É.G., de Souza, S.C.R., and Hermes-Lima, M. (2018). Subtropical hibernation in juvenile tegu lizards (*Salvator merianae*): insights from intestine redox dynamics. *Scientific Reports*, 8(1), 1-11.
102. Morgan, M.J., and Liu, Z.G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res.* 21, 103–115.
103. Müller, W. E., Koziol, C., Wiens, M., & Schröder, H. C. (2000). Stress response in marine sponges: genes and molecules involved and their use as biomarkers. In *Cell and Molecular Response to Stress* (Vol. 1, pp. 193-208). Elsevier.
104. Nelson, D. R., Guidetti, R., and Rebecchi, L. (2015). Phylum tardigrada. In *Thorp and Covich's freshwater invertebrates* (pp. 347-380). Academic Press.
105. Nikalje, S.B., and Muley, D.V. (2015) Observations on germination of gemmules in fresh water sponge *trochospongilla* (porifera: spongillidae) from western maharashtra. *I J R B A T*, Vol. II, Issue (7), Nov 2015: 239-242
106. Niu, Y., Cao, W., Zhao, Y., Zhai, H., Zhao, Y., Tang, X., and Chen, Q. (2018). The levels of oxidative stress and antioxidant capacity in hibernating *Nanorana parkeri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 219, 19-27.
107. Niu, Y., Zhang, X., Xu, T., Li, X., Zhang, H., Wu, A., and Chen, Q. (2022). Physiological and Biochemical Adaptations to High Altitude in Tibetan Frogs, *Nanorana parkeri*. *Frontiers in physiology*, 1392.
108. Núñez-Pons, L., Avila, C., Romano, G., Verde, C., and Giordano, D. (2018). UV-protective compounds in marine organisms from the Southern Ocean. *Marine drugs*, 16(9), 336.
109. Nursall JR. (1959). Oxygen as a prerequisite to the origin of the Metazoa. *Nature* 183: 11702.

110. Nybakken, J.W. (1988) *Marine Biology: An Ecological Approach*. Harper-Collins, New York.
111. Oliveira, M. F., Geihs, M. A., França, T. F., Moreira, D. C., and Hermes-Lima, M. (2018). Is “preparation for oxidative stress” a case of physiological conditioning hormesis?. *Frontiers in physiology*, *9*, 945.
112. Ondei, L.S., Teresa, F.B., Garcia, D.P., Felício, A.A., da Silva, D.G.H., and de Almeida, E.A. (2020). Fish biomarker responses to perturbation by drought in streams. *Neotrop. Ichthyol.* 18:e190130. Paddenberg R., Ishaq B., Goldenberg A., Faulhammer P., Rose F., Weissmann N., Braun-Dullaeus R.C., and Kummer W. (2003). Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature, *Am. J. Physiol.* 284 L710–L719.
113. Paglia, D.E., and Valentine, W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, *70*(1), 158-169.
114. Paoletti, F., D. Aldinucci, A. Mocali, and A. Caparrini. (1986). “A Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Superoxide Dismutase Activity in Tissue Extracts”. *Analytical Biochemistry* 154 (2):536–41.
115. Patnaik, P., & Sahoo, D. D. (2021). Variations in oxidative stress and antioxidant defense level during different phases of hibernation in common Asian toad, *Duttaphrynus melanostictus*. *Biology open*, *10*(7), bio058567.
116. Pereira, T. M. (2021). Tese (Doutorado em Ecologia de Ecossistemas). *Universidade de Vila Velha, Espírito Santo (ES)*. p 91.
117. Petraitis, P.S., and Fisher, J.A.D. (2008). Rocky Intertidal Zone. *Ecosystems*, 3107-3112.
118. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., and Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
119. Proteau, P. J., Gerwick, W. H., Garcia-Pichel, F., and Castenholz, R. (1993). The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia*, *49*(9), 825-829.
120. Quévrain, E., Domart-Coulon, I., and Bourguet-Kondracki, M.L. (2014). Marine Natural Products—Chemical Defense/Chemical Communication in Sponges and Corals. *Natural Products: Natural Products: Discourse, Diversity, and Design*, 39-66.
121. Rahman, M.S., and Rahman, M.S. (2021). Effects of elevated temperature on prooxidant-antioxidant homeostasis and redox status in the American oyster: Signaling pathways of cellular apoptosis during heat stress. *Environmental Research*, *196*, 110428.
122. Rao P.S., Cohen M.V., and Mueller H.S., (1983) Production of free radicals and lipid peroxides in early experimental myocardial ischemia, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15 713–716.
123. Rastogi, R.P., Sinha, R.P., Singh, S.P., and Häder, D. P. (2010). Photoprotective compounds from marine organisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *37*(6), 537-558.

124. Regoli, F., Cerrano, C., Chierici, E., Bompadre, S., Bavestrello, G. (2000). Susceptibility to oxidative stress of the Mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis*: role of endosymbionts and solar irradiance. *Mar. Biol.* 137, 453–461.
125. Richier, S., Furla, P., Plantivaux, A., Merle, P. L., and Allemand, D. (2005). Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, 208(2), 277-285.
126. Ristow, M. (2014). Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nature medicine*, 20(7), 709-711.
127. Rivera-Ingraham G.A., Bickmeyer U., Abele D. (2013). The physiological response of the marine platyhelminth *Macrostomum lignano* to different environmental oxygen concentrations, *J. Exp. Biol.* 216 2741–2751
128. Rytönen K.T., Storz J.F. (2010) Evolutionary origins of oxygen sensing in animals. *EMBO Rep* 12:3–4. doi: 10.1038/embor.2010.192
129. 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*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 157(3), 229-236.
130. Schuch, A.P., Moreno, N.C., Schuch, N.J., Menck, C.F.M., and Garcia, C.C.M. (2017). Sunlight damage to cellular DNA: focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic. Biol. Med.* 107, 110–124.
131. Sendino, C. (2020). The Natural History Museum Fossil Porifera Collection. *Collections*, 16(4), 363-380.
132. Sharma, S., and Chatterjee, S. (2017). Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(27), 21530-21547.
133. Shick, J.M., Lesser, M.P., Dunlap, W.C., Stochaj, W.R., Chalker, B.E., and Won, J.W. (1995). Depth-dependent responses to solar ultraviolet radiation and oxidative stress in the zooxanthellate coral *Acropora microphthalmum*. *Marine Biology*, 122(1), 41-51.
134. Shimeld, S.M., Degnan, B., and Luke, G.N. (2010). Evolutionary genomics of the Fox genes: origin of gene families and the ancestry of gene clusters. *Genomics*, 95(5), 256-260.
135. Singh, M.K., Sharma, J.G., Chakrabarti, R. (2015). Simulation study of natural UV-B radiation on *Catla catla* and its impact on physiology, oxidative stress, Hsp 70 and DNA fragmentation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 149, 156–163.
136. Spicer, J. I. (2014). What can an ecophysiological approach tell us about the physiological responses of marine invertebrates to hypoxia?. *Journal of Experimental Biology*, 217(1), 46-56.
137. Stahl, W., and Sies, H. (2002). Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15(5), 291-296.
138. Suzuki, T., Takagi, Y., Osanai, H., Li, L., Takeuchi, M., Katoh, Y., and Yamamoto, M. (2005). Pi class glutathione S-transferase genes are regulated by Nrf 2 through an

- evolutionarily conserved regulatory element in zebrafish. *Biochemical Journal*, 388(1), 65-73.
139. Tábua de marés e solunares São Sebastião. *Tábua de Marés*. Disponível em <<https://tabuademares.com/br/so-paulo/sao-sebastiao>>. Acesso em 23 de outubro de 2022.
 140. Tan M., Li S., Swaroop M., Guan K., Oberley L.W., and Sun Y. (1999). Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53, *J. Biol. Chem.* 274 12061–12066.
 141. Tartarotti, B., and Sommaruga, R. (2006). Seasonal and ontogenetic changes of mycosporine-like amino acids in planktonic organisms from an alpine lake. *Limnology and Oceanography*, 51(3), 1530-1541.
 142. Teixeira, T., Diniz, M., Calado, R., and Rosa, R. (2013). Coral physiological adaptations to air exposure: heat shock and oxidative stress responses in *Veretillum cynomorium*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 439, 35-41.
 143. Thacker, R.W., and Freeman, C.J. (2012). Sponge–microbe symbioses: recent advances and new directions. *Advances in marine biology*, 62, 57-111.
 144. Torres, P.; Santos, J.P.; Chow, F.; Ferreira, M.J.P.; Dos Santos, D.Y. (2018) Comparative analysis of in vitro antioxidant capacities of mycosporine-like amino acids (MAAs). *Algal Res.* 34, 57–67.
 145. Tougeron, K. (2019). Diapause research in insects: historical review and recent work perspectives. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 167(1), 27-36.
 146. Tovar-Sánchez, A., Sánchez-Quiles, D., Basterretxea, G., Benedé, J. L., Chisvert, A., Salvador, A., and Blasco, J. (2013). Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters. *PLoS One*, 8(6), e65451.
 147. Turner, E. C. (2021). Possible poriferan body fossils in early Neoproterozoic microbial reefs. *Nature*, 596(7870), 87-91.
 148. Turque A.S., Cardoso A.M., Silveira C.B., Vieira R.P., Freitas F.A.D., Albano R.M., Gonzalez A.M., Paranhos R., Muricy G., and Martins O.B. (2008). Bacterial communities of the marine sponges *Hymeniacidon heliophila* and *Polymastia janeirensis* and their environment in Rio de Janeiro, Brazil. *Mar Biol* 155:135–146.
 149. Venn, A. A., Loram, J. E., and Douglas, A. E. (2008). Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of experimental botany*, 59(5), 1069-1080.
 150. Vinagre, C., Madeira, D., Mendonça, V., Dias, M., Roma, J., and Diniz, M. S. (2014). Effect of temperature in multiple biomarkers of oxidative stress in coastal shrimp. *Journal of thermal biology*, 41, 38-42.
 151. Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., and Diniz, M. (2012). Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological indicators*, 23, 274-279.
 152. Vogel, G. (2008) The inner lives of sponges. *Science* 320:1028–1030
 153. Weigel, B.L., and Erwin, P.M. (2016). Intraspecific variation in microbial symbiont communities of the sun sponge, *Hymeniacidon heliophila*, from intertidal and subtidal habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 650-658.

154. Welker, A. F., Moreira, D. C., Campos, É. G., & Hermes-Lima, M. (2013). Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 165(4), 384-404.
155. White, J.R., Patel, J., Ottesen, A., Arce, G., Blackwelder, P., and Lopez, J.V. (2012). Pyrosequencing of bacterial symbionts within *Axinella corrugata* sponges: diversity and seasonal variability. *PLoS one*, 7(6), e38204.
156. Wiedenmayer, F. (1977). Shallow-water sponges of the western Bahamas (Vol. 28).p.150. *Editora Springer Basel AG*
157. Wieland, A., and Kühl, M. (2005). Regulation of photosynthesis and oxygen consumption in a hypersaline cyanobacterial mat (Camargue, France) by irradiance, temperature and salinity. *FEMS microbiology ecology*, 55(2), 195-210.
158. Williams, L.M., and Gilmore, T.D. (2020). Looking down on NF- κ B. *Molecular and Cellular Biology*, 40(15), e00104-20.
159. Willmer, P., Stone, G., and Johnston, I. (2005) *Environmental Physiology of Animals*. Blackwell, Oxford.
160. Withers, P.C., and Cooper, C.E. (2010). Metabolic depression: a historical perspective. In *Aestivation* (pp. 1-23). Springer, Berlin, Heidelberg.
161. Won, E.J., Lee, Y., Han, J., Hwang, U.K., Shin, K.H., Park, H.G., and Lee, J.S. (2014). Effects of UV radiation on hatching, lipid peroxidation, and fatty acid composition in the copepod *Paracyclopina nana*. *Comparat. Biochem. Physiol. Part C* 165, 60–66.
162. World Porifera Database. (n.d.). Retrieved November 17, 2022, from <https://www.marinespecies.org/porifera/>
163. Wyllia, K., Nabila, B., Kheiredine, O., and Farid, D. (2018). Sponges (Porifera) as bioindicator species of environmental stress from de Gulf of Annaba (Algeria). *Biodiversity Journal*, 9(4), 319-324.
164. Yagura, T., Schuch, A.P., Garcia, C.C.M., Rocha, C.R.R., Moreno, N.C., Angeli, J.P.F., Mendes, D., Severino, D., Bianchini Sanchez, A., Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G., and Menck, C.F.M. (2017). Direct participation of DNA in the formation of singlet oxygen and base damage under UVA irradiation. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 86–93.
165. Yun, J., and Finkel, T. (2014). Mitohormesis. *Cell metabolism*, 19(5), 757-766.

Anexos

Artigo em colaboração

Seguem o artigo em que fui coautora durante o mestrado. Esse estudo é referente à inclusão da radiação UV aos possíveis estressores associados ao POS (Fig. 11) (Geihs et al. 2020).



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A

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

Commentary

Commentary: Ultraviolet radiation triggers “preparation for oxidative stress” antioxidant response in animals: Similarities and interplay with other stressors



Márcio A. Geihs^{a,1}, Daniel C. Moreira^{b,c,1}, Giancarlo López-Martínez^d, Marina Minari^b, Marlize Ferreira-Cravo^e, Juan Manuel Carvajalino-Fernández^b, Marcelo Hermes-Lima^{b,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

^c Área de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

^d Department of Biological Sciences, North Dakota State University, Fargo, ND 58102, USA

^e Instituto Federal do Paraná, Campus Paranaguá, Paranaguá, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Aquatic animals
Free radical
Glutathione
Hormesis
Electromagnetic
Wavelength

ABSTRACT

Preparation for oxidative stress (POS), i.e., the upregulation of endogenous antioxidants, is a widespread response of animals exposed to extreme conditions. This response has been described for more than 80 animal species belonging to eight phyla during hypometabolism or situations that limit oxygen availability. The pattern of the typical POS-response, in which a mild redox imbalance triggers antioxidant adjustments that results in increased tolerance to subsequent oxidative insults, roughly follows the curve of hormetic phenomena. A similar pattern has been reported for various animal species exposed to ultraviolet radiation (UVR) – these studies, on animals from six phyla, are discussed herein. In the light of the similarities in the redox-response of animals exposed to either oxygen restriction or UVR, we argue in this essay that UVR elicits a type of response that fits the POS theory. Exposure to UVR induces both reactive species formation and antioxidant adaptation, which is the essence of typical POS-responses. Thus, antioxidant response to UVR in animals can be categorized as a POS-type mechanism. Moreover, considering that animals are exposed to multiple stressors simultaneously in nature, this would represent an ecologically relevant process, by which one stressor (e.g., UV or ionizing radiation) may enhance the tolerance to other. We also discuss a possible role of low doses of ionizing radiation as inductor of POS-like responses in animals.

1. Introduction

Sunlight brings an enormous amount of energy to Earth. Although this is the ultimate fuel for life, it can also be its foe. Within the range of electromagnetic wavelengths, ultraviolet radiation (UVR) is the one that causes most harm to animals in nature (Cockell and Blaustein, 2001). Exposure to both UVR-A and UVR-B is an important factor not only for terrestrial environments but also for aquatic ecosystems, where organisms are exposed to solar UVR in the upper photic zone or when exposed to air during low tides. In the context of aquatic environments, UVR-B has received great attention in the past years, especially in regions with a thinner ozone layer (Misra et al., 2002; Häder et al., 2007), although UVR-A is also likely to be important as it can penetrate deeply into the water.

Exposure to UVR can damage major biomolecules and cellular structures, either through direct action of UVR or, indirectly, through the formation of reactive oxygen species (ROS) (Cadet et al., 2005; Agnez-Lima et al., 2012; Schuch et al., 2017). In that regard, DNA is a main target of UVR, generating pyrimidine dimers, strand breaks, modified bases, photo-adducts, and DNA–protein cross-links (Karentz et al., 2004; Yagura et al., 2017). Several reports indicate that UVR effects on organisms are dose- and time-dependent (Chuang and Chen, 2013; Won et al., 2014; Singh et al., 2015), eliciting adaptive responses at low doses (Dahms and Lee, 2010; Häder et al., 2015; Cadet and Davies, 2017). Therefore, our essay concentrates on the biological actions of UVR exposure, with a focus on the indirect effects mediated by ROS. Furthermore, the emphasis herein will be on the “classical” antioxidant response in animals, leaving out sunscreen molecules and DNA

* Corresponding author.

E-mail address: hermes@unb.br (M. Hermes-Lima).

¹ These authors contributed equally.

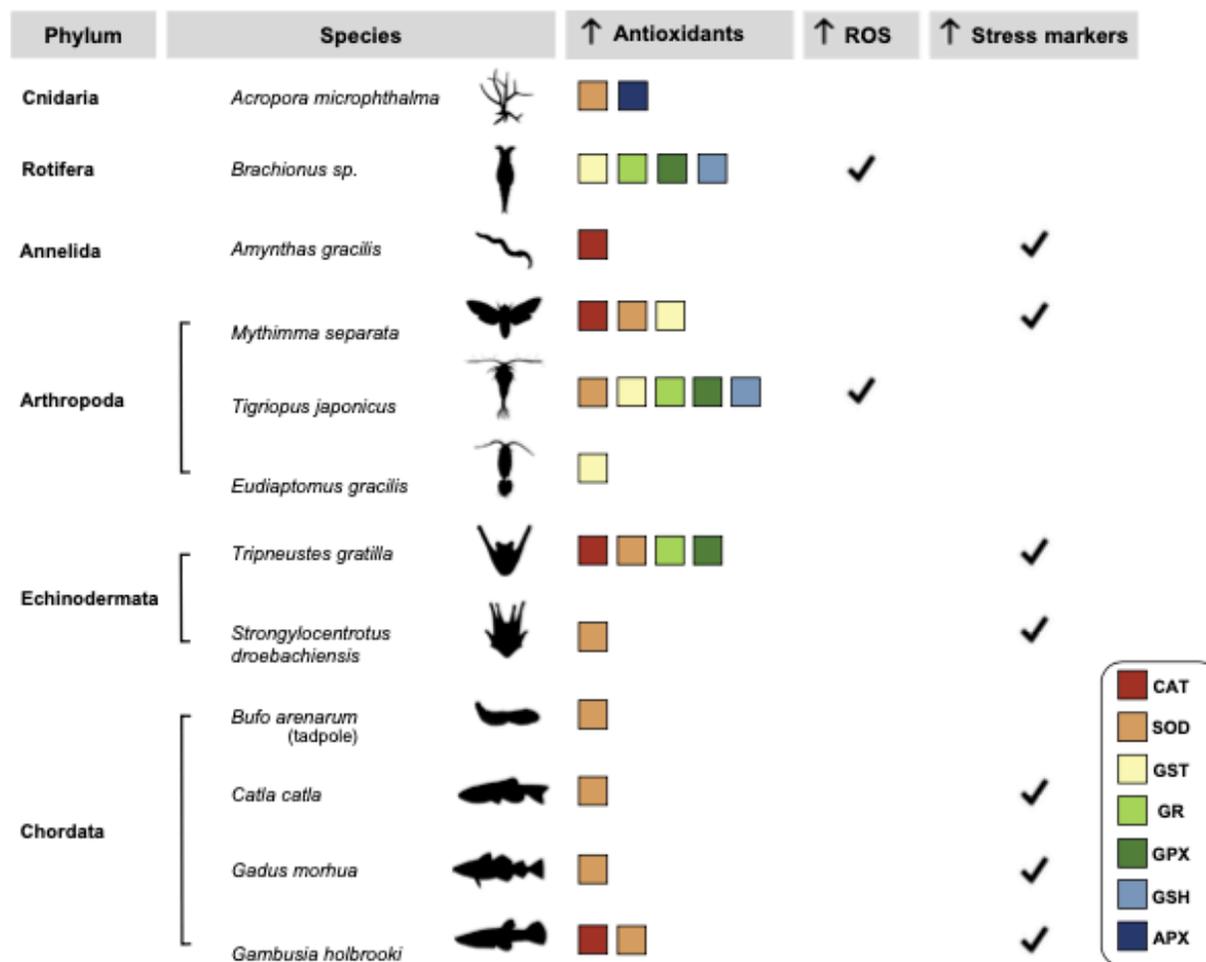


Fig. 1. Schematic alterations in the redox metabolism in various animal species in response to UVR. It depicts 12 animal species, from 6 different phyla, responding to UVR according the following variables: (i) levels/activity of endogenous antioxidants (GSH and antioxidant enzymes), (ii) ROS formation and (iii) and markers of oxidative stress (lipid peroxidation, protein carbonyl or DNA damage) (see Section 2 in the main text). The figure shows only variables that increased under UVR.

repair systems.

2. Redox-adaptive animal response to UVR

Although animals can improve their endogenous antioxidant systems upon exposure to low doses of UVR, high doses frequently elicit a rampant oxidative stress. In addition to dosage, other factors influence the outcome of UVR exposure, such as the body size, mode of life (diurnal, nocturnal, etc.), and skin/exoskeleton characteristics. Therefore, the effects of UVR may differ greatly between different species and how the animal's body is exposed. For example, Kim et al. (2011) reported a dose-dependent effect of UVR in which low doses (0.1–0.4 J/cm²) increased ROS formation and the levels of glutathione (GSH) and antioxidant enzymes in rotifers *Brachionus sp.* Increased activities of antioxidant enzymes, as well as ROS levels, were also observed for the benthic copepod *Tigriopus japonicus* after exposure to UVR-B (1.2 and 2.4 J/cm²) (Kim et al., 2015). Increased ROS production was accompanied by a rise in SOD activity in the copepod *Paracyclopsina nana* after exposure to low UVR-B dose (0.1 J/cm²) (Won et al., 2014) (Fig. 1). Considering the effect of the water column on the intensity of UVR that actually reaches animals, some studies have analyzed UVR effects from that perspective. For instance, an overall activation of antioxidant enzymes, as well as increased protein carbonyl levels, happened in sea urchin larvae *Tripneustes gratilla* upon exposure to natural UVR in shallow (1 m), but not in deeper water (4 m) (Lister et al., 2010). For the colonies of the coral *Acropora microphthalma* (host

and zooxantella), individuals collected at shallow water had a high antioxidant status, whereas antioxidant levels decreased as depth increased (Shick et al., 1995). Furthermore, the effect of depth on the redox metabolism is evident in *Strongylocentrotus droebachiensis* larvae. Sea urchin larvae exposed to UVR at 1 m depth have higher levels of SOD and DNA damage than those exposed to UVR at deeper depths (Lesser, 2010).

The modulation of endogenous antioxidants in response to UVR might be especially important for animals restricted to environments under direct solar exposition with no microhabitats with solar protection. This is the case of many water bodies where a number of aquatic vertebrates cannot shelter from sunlight. Indeed, tadpoles and fish (larval and adults) inhabiting shallow waters activate their endogenous antioxidants when exposed to UVR. For example, *Bufo arenarum* tadpoles increase their SOD activity when exposed to UVR-B sublethal doses (0.02–0.2 J/cm²), followed by a return to basal levels after 5 h (Herkovits et al., 2006) (Fig. 1). A similar response – regarding SOD and catalase activities – occurs in adult zebrafish (*Brachydanio rerio*) exposed to two UV-B doses (0.32 and 4.2 J/cm²) (Charron et al., 2000). Likewise, embryos of the salamander *Ambystoma maculatum* enhanced their SOD levels when exposed to low UVR doses (0.02–3.96 J/cm²) (Lesser et al., 2001b). Moreover, Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae exposed to UVR (2.3 J/cm²) exhibited higher levels of SOD and DNA damage than control animals (Lesser et al., 2001a). Intertidal juvenile fish *Girella laevis* exposed to UVR-B (1.04 J/cm²) increased their hepatic SOD and catalase activities after 2 h (Carrasco-Malio et al.,

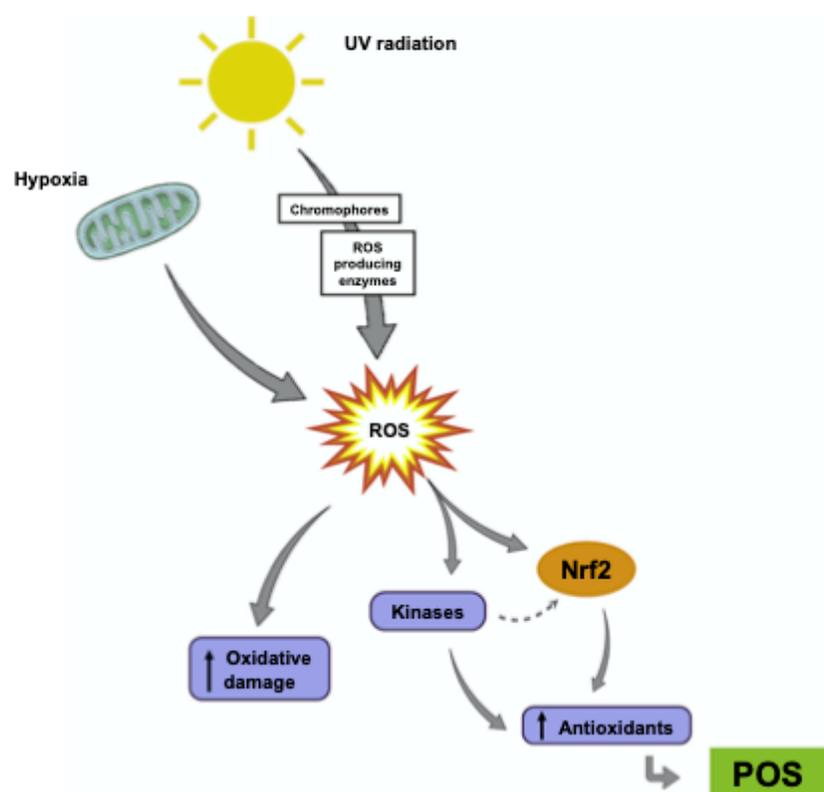


Fig. 2. Animals' redox-response to UVR shares many similarities with responses to other POS-inducing conditions. The scheme shows an illustration of the convergence of redox-responses to low doses of UVR and hypoxia exposure, a classical POS-inducing condition. There is accumulating evidence that hypoxia changes the redox state of mitochondria, increasing mitochondrial ROS production. This may trigger, in hypoxic-tolerant animals, a series of biochemical responses that increase the activity of the endogenous antioxidant system, either by acting upon existing enzymes through post-translational modifications (such as phosphorylation; or by inducing the synthesis of new antioxidant enzymes via activation of redox-sensitive transcription factors, such as Nrf2 (Hermes-Lima et al., 2015; Giraud-Billoud et al., 2019). This increase in antioxidant defenses helps the animal to cope with the subsequent, more severe redox stress of reoxygenation, thus creating the POS pattern (Moreira et al., 2017). UVR irradiation induces ROS formation by completely different mechanisms than the ones in hypoxia, such as generation of singlet oxygen by DNA and other chromophores excited by UV-A (Yagura et al., 2017) or by UV-B-induced activation of ROS-generating enzymes, such as NADPH oxidase and cyclooxygenases (Beak et al., 2004; Masaki et al., 2009; Schuch et al., 2017). Thus, low doses of UVR can boost antioxidant defenses and help animals to cope with subsequent exposures to higher doses of UV.

2014). However, a longer exposure (5 h) elicited a decrease in catalase activity as well as increased lipoperoxidation and DNA damage. For *Catla catla* fish larvae, Singh et al. (2015) reported increased SOD activity and oxidative stress after UVR-B exposure ($0.5\text{--}2.0\text{ J/cm}^2$) for 21 days. The interplay between temperature and UVR has also been explored. Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) specimens that had been acclimatized at low temperatures are more susceptible to oxidative damage than those acclimatized at high temperatures when exposed to UVR (Kazerouni et al., 2016). The effect of UVR is expected to be more intense in small-bodied slim animals with thin teguments, such as the examples presented above. In these cases, both invertebrates and vertebrates discussed herein presents an adaptive strategy to manage redox imbalances through activation of antioxidants. There are cases, however, where UVR induces only oxidative stress, without an adaptive antioxidant response, such as in catfish *Clarias gariepinus* (Ibrahim, 2015). Further research is needed to fully understand the UVR action on the redox metabolism of aquatic vertebrates.

Several of the aforementioned examples highlight the occurrence of a hormetic biphasic response (i.e., low doses stimulate antioxidants and potentially increase fitness, whereas high doses inhibit antioxidants and have deleterious effects). This biphasic-pattern also works for land animals. For example, mRNA expression of many antioxidant enzymes is stimulated by UVR-A exposure (1.1 J/cm^2) in the moth *Helicoverpa armigera*. Longer irradiation times decrease GSH:GSSG ratio, indicating that UVR-A induces redox imbalance (Wang et al., 2012). In a study with the ear-cutting caterpillar *Mythimna separata*, low UVR-A dose (1.2 J/cm^2) increased the activity of several antioxidant enzymes after 60 min. On the other hand, longer exposures (90–120 min) reduced the activity of antioxidant enzymes, leading to high levels of oxidative stress markers (Ali et al., 2017). Similarly, *Spodoptera litura* moths exposed to UVR-B (1.08 J/cm^2) for 1 h increased the activities of antioxidant enzymes. When UVR exposure was extended to 2 h (2.16 J/cm^2), the antioxidant enzymes returned to basal levels or decreased (Kharty et al., 2014). In the case of earthworms *Amyntas gracilis*, a low UVR-B dose (0.05 J/cm^2) prompted an increase in catalase activity. At a

higher dose (0.3 J/cm^2), however, there was a decrease in glutathione peroxidase and catalase activities and an increase in lipoperoxidation (Singh et al., 2015). (Fig. 1). Thus, these studies with terrestrial and aquatic animals indicate that the response of endogenous antioxidants, as well as the degree of oxidative stress, presents an overall dose-dependent response within a limited range, leading to UVR adaptive responses under low doses and to deleterious outcomes at higher doses.

3. The POS adaptive theory

The pattern observed in the response of endogenous antioxidants to UVR is reminiscent of the biochemical adaptations reported for many animal species challenged by extreme environments. These challenges include freezing-cold, oxygen depletion, and recovery from these conditions. Such conditions may change cyclically or abruptly in natural habitats (Welker et al., 2013). The activation of endogenous antioxidants under these situations was first reported in garter snakes (Hermes-Lima and Storey, 1993) and named "Preparation for Oxidative Stress" (POS) (Hermes-Lima et al., 1998), whereby a small-scale redox imbalance induces a physiological antioxidant response, setting the animal to deal with subsequent, more severe, oxidative stress (Hermes-Lima et al., 2015). A great number of studies confirmed that POS occurs in many animal species in the following situations: hypoxia/anoxia, severe dehydration, freezing, estivation, hyposaline stress (in aquatic animals), and air exposure of water-breathing animals (Giraud-Billoud et al., 2019). In total, such a POS-response was identified in 83 species from 8 different animal phyla, including vertebrates and invertebrates (Moreira et al., 2016, 2017). In animals under hypoxia, where POS has been most studied, it is one component of a set of physiological/biochemical adaptive responses that allows organisms to cope with low oxygen levels. These include: (i) the arrest of most transcriptional and translational activity, (ii) depression of metabolic rate, (iii) re-wiring of energy metabolism pathways toward fermentative routes, (iv) activation of macromolecular repair and detoxification of cellular-derived oxidants (Krivoruchko and Storey, 2015; Storey, 2015; Biggar and

Storey, 2018). Importantly, the transient upregulation of the antioxidant defense system is a hallmark of many organisms that tolerate hypoxic stresses, as it is crucial to deal with reoxygenation. Elucidating the exact molecular mechanisms that trigger POS is an active topic of research, but, only recently, it was proposed that the biochemical patterns associated with POS are brought about by an increase in ROS levels (Hermes-Lima et al., 2015). Such increase in ROS levels (which may happen during hypoxia, for example) activates redox-sensitive transcription factors, such as FoxOs, NF- κ B, and Nrf2, promoting the expression of antioxidants (Fig. 2). In addition, posttranslational modifications on antioxidant enzymes may also contribute to the expression of the POS phenotype (Oliveira et al., 2018). Moreover, many organisms exposed to mild sublethal stress conditions trigger a response that is protective against stronger subsequent challenges, typical of hormetic outputs (Costantini, 2014a; Costantini, 2014b). In fact, POS has strong similarities with hormetic responses (Oliveira et al., 2018).

4. Redox-adaptive response to UVR as POS

We argue herein that the antioxidant adaptation in response to UVR should be considered a new type of POS-response. It is possible to draw some parallels between the response of animals' endogenous antioxidant systems to low oxygen and to UVR. These come from the observations that exposure to low doses of UVR can increase ROS production and stimulate the antioxidant system, which is the essence of the typical POS response (Fig. 2). Such upregulation of antioxidants should increase the animals' capacity to deal with subsequent exposures to higher dosages of UVR. Although the patterns of antioxidant response to hypoxia and UVR exposure are alike, whether they share the same molecular mechanisms is still an open question.

The currently proposed biochemical mechanism for POS in animals exposed to hypoxic stress relies on the increase in ROS production during oxygen deprivation (Hermes-Lima et al., 2015). It is well known that ROS activate redox-sensitive transcription factors, as well as protein kinase pathways (Oliveira et al., 2018). Some of these transcription factors, notably Nrf2, can stimulate the expression of endogenous antioxidants (Espinosa-Diez et al., 2015; Klotz et al., 2015). Like hypoxia, UVR also increases both ROS production (Liu et al., 2016; Jeayeng et al., 2017; Schuch et al., 2017), and the levels of endogenous antioxidants (Liu et al., 2011). Hence, the evidence strongly suggests the involvement of redox-sensitive transcription factors, such as Nrf2, in the UVR adaptive response (Fig. 2). Indeed, the role of Nrf2 and its related genes has been demonstrated in vitro by studies using dermal cells and fibroblasts (Schäfer et al., 2010; Schäfer and Werner, 2015), but not in animal cases reported herein (Section 2). Thus, the pathways underlying the redox-response to UVR and hypoxia seem to converge to the same set of cellular responses, both showing the POS pattern.

There are, however, some differences between the antioxidant response to UVR exposure and, for example, hypoxia. One of the most relevant difference is the fact that the POS response to UVR is not necessarily accompanied by metabolic depression – a highly relevant adaptive factor for hypoxia tolerance, which also happens under estivation, severe dehydration and freezing exposure (Hermes-Lima et al., 2015). Despite their differences, there are striking parallels in the pattern of redox-response the animals show under those conditions. One of these is the involvement of transcription factor Nrf2 as a key molecular component of the antioxidant adaptive response (Fig. 2). In the currently accepted cases of POS, we can identify typical hormetic patterns (Oliveira et al., 2018), in which an earlier and mild oxidative stress increases the animals' capacity to deal with a subsequent and more severe stress. This same POS/hormetic pattern is described herein in 17 animal species from six phyla (Section 2).

Although an adaptive redox-response to UVR can be induced in the laboratory, it is a challenge to identify ecological scenarios in which this POS-response may be important. For example, in tropical marine environments, the diversity of invertebrates exposed to direct UVR is

immense and totally depend on the ecophysiological mechanisms to respond to the UVR excess. In this sense, the work by Lister et al. (2010) with *T. gratilla* larvae in the Cook Islands could be viewed as ecologically relevant for POS response in nature. These larvae are routinely exposed to varying levels of UVR in marine environments. There was an upregulation of antioxidant systems in shallow depth; such process in larval states constitutes an important investment for the animal fitness because minimize long-term effects such as oxidative DNA damage (Lister et al., 2010). Moreover, the range of tolerance to direct solar UVR is one of the limiting factors defining which habitats a species can inhabit, especially for sessile animals or those that do not present behavioral adaptations associated with differential use of microenvironments (Zagarese and Williamson, 1994). Within communities, both the UVR dose and the exposure time are important factors whose differential effects on each species shape the structure of the communities (Williamson et al., 2001; Yang et al., 2017). In that regard, the role of UVR on animal homeostasis and adaptation can be more complex than its isolated direct effect on organisms; UVR might have transgenerational effects and synergistic interactions with other environmental stressors. For example, UVR not only cause a POS-type adaptive response in individuals directly exposed to it (Kazerouni et al., 2016) but also in their offspring (Kazerouni et al., 2017). Moreover, under natural conditions, the exposure to both solar UVR and air induced the activation of antioxidant systems in intertidal mussels *Brachidontes solisianus* (Moreira et al., 2017).

5. Ionizing radiation and POS

Gamma and X rays are forms of ionizing radiation characterized by their smaller wavelengths, and higher frequency and energy than UVR. We expect them to also elicit a protective response that may fit into the POS theory. Such response was first shown over a century ago, when low dose X-ray radiation increased lifespan in flour beetles (Davey, 1917). Additionally, this protection allowed the beetles to tolerate lethal amounts of radiation when given as smaller doses daily (Davey, 1919). The bulk of the work on the protective effects of X-ray radiation has been carried out in insects because of their importance as agricultural pests and medical research models. Lifespan extensions related to low dose gamma or X-ray exposure have been recorded in several insects (Calabrese, 2013). Beyond reporting longer-lived animals, longevity increases in flies only occur when associated with starvation conditions (Lamb, 1964), suggesting that the mechanism behind this benefit is connected to mitochondrial function and energetics.

Mechanistically, little is known about how gamma and X-rays increase lifespan. However, performance improvements following low dose and high dose exposures seem to work differently. Higher doses of ionizing radiation lead to increased longevity in insects, especially in females, mostly due to a decreased reproductive output or sterility (López-Martínez and Hahn, 2014; López-Martínez et al., 2014). Sterility triggers a life history trade-off where energy normally allocated for reproduction now goes toward immunity and defense (Stearns, 1989). Conversely, low dose radiation and its protective phenomena are in line with our POS expectations: an adaptive antioxidant response. Mechanistic work with *Drosophila melanogaster* shows that activity and lifespan were shortened in flies with mutations to apoptosis, DNA repair, antioxidant defense, and heat shock protein genes (Moskalev et al., 2006, 2009). Mutants for apoptosis and antioxidant genes were the most affected, indicating that the benefit conferred by low-dose gamma rays is connected to a decreased oxidative stress with the strongest benefit seen in early life exposure (Moskalev, 2007). Antioxidant enzymes and genes involved in oxidative stress management were expressed in response to low-dose gamma irradiation connected with lifespan extension and the authors propose that the mechanism for low-dose ionizing radiation protection is the activation of oxidative stress defense mechanisms (Seong et al., 2011), which goes to the heart of the POS theory (Giraud-Billoud et al., 2019). In vitro and in vivo

evidence in mammalian cells show lower levels of DNA damage following low dose radiation treatment (Vijayalaxmi and Scarfi, 2014). All this work suggests that hormetic effects associated with low-dose gamma and X rays are likely rooted in the POS theory, as some of the mechanism known indicates a key role for endogenous antioxidants and heat shock proteins - two sets of genes that are crucial in the POS framework.

6. Conclusions

Finally, the molecular similarity between the responses to UVR (and ionizing radiation) and other POS conditions may also expand the ecological relevance of POS phenotypes. It implies a possible interaction between, for example, UVR and hypoxia – where UVR pre-exposure could set up preparation for hypoxic stress (or vice-versa). This would be similar to what has been reported for other hormetic phenomena, where “stress X” sets up animals for tolerance to “stress Y” (Costantini, 2014b; López-Martínez and Hahn, 2014; Espinosa-Diez et al., 2015). This has been verified in the case of pre-exposure of several insect species to hypoxia causing beneficial outcomes for ionizing radiation exposure (Robinson, 1975; Nestel et al., 2007; López-Martínez and Hahn, 2012, 2014; López-Martínez et al., 2014). Considering that animals may be subjected to multiple stressors simultaneously, the interplay between UV/ionizing radiation and hypoxia, for instance, should affect and modulate the POS-response in nature.

Author contributions

MG, DCM and MHL worked on the concept of UVR redox-adaptation response as being part of the overall POS strategy. MG, MM, MFC, JMCF and MHL contributed with key examples of UV-related studies. GLM contributed with discussions on ionizing radiation. MM and DCM produced the artwork. MG, DCM, GLM, MFC, JMCF, and MHL 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 193.00000219/2019-71 to MHL and 193.00002154/2018-17 to DCM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, grant 421384/2018-2 to MHL and 428048/2018-8 to DCM) and National Science Foundation (Office of Integrative Activities RII Track-2 #1826834 to GLM). JMCF is a recipient of a PNPd/CAPES Scholarship (#23106.055368/2017-89). This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil, finance code 001).

Declaration of Competing Interest

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.

Acknowledgments

We thank Dr. Georgina A. Rivera-Ingraham (Kourou, French Guiana) for help with the manuscript preparation. This work is in honor of Enid Hermes Lima (Brazil), mother of MHL, who is approaching 80 years old, and Janet Storey (Carleton University) for a key role in shaping the original POS idea.

References

Agnez-Lima, L.F., Melo, J.T.A., Silva, A.E., Oliveira, A.H.S., Timoteo, A.R.S., Lima-Bessa, K.M., Martinez, G.R., Medeiros, M.H., Di Mascio, P., Galhardo, R.S., Menck, C.F.M.,

2012. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mut. Res. Rev. Mut. Res.* 751 (1), 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.mrr.2011.12.005>.
- Ali, A., Rashid, M.A., Huang, Q.Y., Lei, C.L., 2017. Influence of UV-A radiation on oxidative stress and antioxidant enzymes in *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (9), 8392–8398. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8514-7>.
- Beak, S.M., Lee, Y.S., Kim, J.A., 2004. NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor- κ B in HaCaT human keratinocytes. *Biochimie* 86, 425–429. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.06.010>.
- Biggar, K.K., Storey, K.B., 2018. Functional impact of microRNA regulation in models of extreme stress adaptation. *J. Mol. Cell Biol.* 10 (2), 93–101. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjx053>.
- Cadet, J., Davies, K.J.A., 2017. Oxidative DNA damage & repair: An introduction. *Free Radic. Biol. Med.* 107, 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.030>.
- Cadet, J., Sage, E., Douki, T., 2005. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mut. Res. Fundament. Mol. Mech. Mutagenesis* 571 (1), 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.09.012>.
- Calabrese, E.J., 2013. Low doses of radiation can enhance insect lifespans. *Biogerontology* 14 (4), 365–381. <https://doi.org/10.1007/s10522-013-9436-5>.
- Carrasco-Malio, A., Diaz, M., Mella, M., Montoya, M.J., Miranda, A., Landaeta, M.F., Sánchez, G., Hidalgo, M.E., 2014. Are the intertidal fish highly resistant to UV-B radiation? A study based on oxidative stress in *Girella laevis* (Kyphosidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.030>.
- Charron, R.A., Fenwick, J.C., Lean, D.R., Moon, T.W., 2000. Ultraviolet-B radiation effects on antioxidant status and survival in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Photochem. Photobiol.* 72 (3), 327–333. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)0720327UBREOA2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0720327UBREOA2.0.CO2).
- Chuang, S.C., Chen, J.H., 2013. Photooxidation and antioxidant responses in the earthworm *Amyndus gracilis* exposed to environmental levels of ultraviolet B radiation. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 164 (3), 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.11.006>.
- Cockell, C., Blaustein, A.R., 2001. *Ecosystems, Evolution, and Ultraviolet Radiation*. Springer-Verlag, New York.
- Costantini, D., 2014a. Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Costantini, D., 2014b. Does hormesis foster organism resistance to extreme events? *Front. Ecol. Environ.* 12 (4), 209–210. <https://doi.org/10.1890/14.WB.005>.
- Dahms, H.U., Lee, J.S., 2010. UV radiation in marine ectotherms: molecular effects and responses. *Aquat. Toxicol.* 97 (1), 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.002>.
- Davey, W.P., 1917. The effect of X-rays on the length of life of *Tribolium confusum*. *J. Exp. Zool.* 22 (3), 573–592.
- Davey, W.P., 1919. Prolongation of life of *Tribolium confusum* apparently due to small doses of X-rays. *J. Exp. Zool.* 28 (3), 447–458.
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., Lamas, S., 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 6, 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.008>.
- Giraud-Billoud, M., Rivera-Ingraham, G.A., Moreira, D.C., Burmester, T., Castro-Vazquez, A., Carvajalino-Fernández, J.M., Dafre, A., Niu, C., Tremblay, N., Paital, B., Rosa, R., Storey, J.M., Vega, I.A., Zhang, W., Yepiz-Plascencia, G., Zenteno-Savín, T., Storey, K.B., Hermes-Lima, M., 2019. Twenty years of the ‘Preparation for Oxidative Stress’ (POS) theory: Ecophysiological advantages and molecular strategies. *Comparat. Biochem. Physiol. A* 234, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.004>.
- Häder, D.P., Kumar, H.D., Smith, R.C., Worrest, R.C., 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 (3), 267–285. <https://doi.org/10.1039/B700020K>.
- Häder, D.P., Williamson, C.E., Wängberg, S., Rautio, M., Rose, K.C., Gao, K., Helbing, E.W., Sinha, R.P., Worrest, T., 2015. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with other environmental factors. *Photochem. Photobiol. Sci.* 14 (1), 108–126. <https://doi.org/10.1039/C4PP90035A>.
- Herkovits, J., D’Eramo, J.L., Fridman, O., 2006. The effect of UV-B radiation on *Bufo arenarum* embryos survival and superoxide dismutase activity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 3 (1), 43–47. <https://doi.org/10.3390/ijerph2006030006>.
- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1993. Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Physiol.* 265, R646–R652. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.265.3.R646>.
- 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: Biochem. Mol. Biol.* 120 (3), 437–448. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10053-6](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10053-6).
- Hermes-Lima, M., Moreira, D.C., Rivera-Ingraham, G.A., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos, T.C., Campos, E., 2015. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 1122–1143. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156>.
- Ibrahim, A.T.A., 2015. Negative impacts of ultraviolet-a radiation on antioxidant and oxidative stress biomarkers of African catfish *Clarias gariepinus*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 14, 1337–1345. <https://doi.org/10.1039/c5pp00112a>.
- Jeayeng, S., Wongkajornsilp, A., Slominski, A.T., Jirawatnotai, S., Sampattavanich, S., Panich, U., 2017. Nrf2 in keratinocytes modulates UVB-induced DNA damage and apoptosis in melanocytes through MAPK signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 918–928. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.009>.
- Karentz, D., Bosch, I., Mitchell, D.M., 2004. Limited effects of Antarctic ozone depletion on sea urchin development. *Mar. Biol.* 145 (2), 277–292. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1310-1>.

- Kazerouni, E.G., Franklin, C.E., Seebacher, F., 2016. UV-B radiation interacts with temperature to determine animal performance. *Funct. Ecol.* 30 (4), 584–595. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12520>.
- Kazerouni, E.G., Franklin, C.E., Seebacher, F., 2017. Parental exposure modulates the effects of UV-B on offspring in guppies. *Funct. Ecol.* 31 (5), 1082–1090. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12817>.
- Kharty, S., Sankari, R., Shivakumar, M.S., 2014. Ultraviolet-B light induced oxidative stress: effects on antioxidant response of *Spodoptera litura*. *J. Photochem. Photobiol. B* 135, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.04.008>.
- Kim, R.O., Rhee, J.S., Won, E.J., Lee, K.W., Kang, C.M., Lee, Y.M., Lee, J.S., 2011. Ultraviolet B retards growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the monogonont rotifer, *Brachionus sp.* *Aquatic Toxicol.* (Amsterdam, Netherlands) 101 (3–4), 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.12.005>.
- Kim, B.M., Rhee, J.S., Lee, K.W., Kim, M.J., Shin, K.H., Lee, S.J., Lee, Y.M., Lee, J.S., 2015. UV-B radiation-induced oxidative stress and p38 signaling pathway involvement in the benthic copepod *Tigriopus japonicus*. *Comparat. Biochem. Physiol. Part C* 167, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.08.003>.
- Klotz, L.O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., Monsalve, M., 2015. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol.* 6, 51–72. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.019>.
- Krivoruchko, A., Storey, K.B., 2015. Turtle anoxia tolerance: biochemistry and gene regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1850 (6), 1188–1196. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.02.001>.
- Lamb, M.J., 1964. The effects of radiation on the longevity of female *Drosophila subobscura*. *J. Insect Physiol.* 10, 487–497. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(64\)90072-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(64)90072-1).
- Lesser, M.P., 2010. Depth-dependent effects of ultraviolet radiation on survivorship, oxidative stress and DNA damage in sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) embryos from the Gulf of Maine. *Photochem. Photobiol.* 86 (2), 382–388. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00671.x>.
- Lesser, M.P., Farrell, J.H., Walker, C.W., 2001a. Oxidative stress, DNA damage and p53 expression in the larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to ultraviolet (290–400 nm) radiation. *J. Exp. Biol.* 204 (1), 157–164.
- Lesser, M.P., Turtle, S.L., Farrell, J.H., Walker, C.W., 2001b. Exposure to ultraviolet radiation (290–400 nm) causes oxidative stress, DNA damage, and expression of p53/p73 in laboratory experiments on embryos of the spotted salamander, *Ambystoma maculatum*. *Physiol. Biochem. Zool.* 74 (5), 733–741. <https://doi.org/10.1086/322931>.
- Lister, K.N., Lamare, M.D., Burritt, D.J., 2010. Oxidative damage in response to natural levels of UV-B radiation in larvae of the Tropical Sea urchin *Tripleneustes gratilla*. *Photochem. Photobiol.* 86 (5), 1091–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00779.x>.
- Liu, Y., Chan, F., Sun, H., Yan, J., Fan, D., Zhao, D., An, J., Zhou, D., 2011. Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *Eur. J. Pharmacol.* 650, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.009>.
- Liu, C., Vojnovic, D., Kochevar, I.E., Jurkunas, U.V., 2016. UV-A irradiation activates Nrf2-regulated antioxidant defense and induces p53/Caspase3-dependent apoptosis in corneal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 2319–2327. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19097>.
- López-Martínez, 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. <https://doi.org/10.1242/jeb.065631>.
- López-Martínez, G., Hahn, D.A., 2014. Early life hormetic treatments decrease irradiation-induced oxidative damage, increase longevity, and enhance sexual performance during old age in the Caribbean fruit fly. *PLoS One* 9 (1), e88128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088128>.
- López-Martínez, G., Carpenter, J.E., Hight, S.D., Hahn, D.A., 2014. Low-oxygen atmospheric treatment improves the performance of irradiation-sterilized male cactus moths used in SIT. *J. Econ. Entomol.* 107 (1), 185–197. <https://doi.org/10.1603/EC13370>.
- Masaki, H., Izutsu, Y., Yahagi, S., Okano, Y., 2009. Reactive oxygen species in HaCaT keratinocytes after UVB irradiation are triggered by intracellular Ca²⁺ levels. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 14 (1), 50–52. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.2009.12>.
- Misra, R.B., Babu, G.S., Ray, R.S., Hans, R.K., 2002. Tubifex: a sensitive model for UV-B induced Phototoxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52 (3), 288–295. <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2184>.
- Moreira, D.C., Venancio, L.P.R., Sabino, M.A.C.T., Hermes-Lima, M., 2016. How widespread is preparation for oxidative stress in the animal kingdom? *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 200, 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.023>.
- Moreira, D.C., Oliveira, M.F., Liz-Guimarães, L., Diniz-Rojas, N., Campos, É., Hermes-Lima, M., 2017. Current trends and research challenges regarding “preparation for oxidative stress”. *Front. Physiol.* 8, 702. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00702>.
- Moskalev, A., 2007. Radiation-induced life span alteration of *Drosophila* lines with genotype differences. *Biogerontology* 8, 499–504. <https://doi.org/10.1007/s10522-007-9090-x>.
- Moskalev, A.A., Yazkiv, A.S., Zainullin, V.G., 2006. Effect of low-dose irradiation on the lifespan in various strains of *Drosophila melanogaster*. *Russ. J. Genet.* 42 (6), 628–635. <https://doi.org/10.1134/S102279540606007X>.
- Moskalev, A., Shaposhnikov, M., Turysheva, E., 2009. Life span alteration after irradiation in *Drosophila melanogaster* strains with mutation of Hsf and Hsps. *Biogerontology* 10, 3–11. <https://doi.org/10.1007/s10522-008-9147-5>.
- Nestel, D., Nemny-Lavy, E., Islam, S.M., Wormoayporn, V., Caceres, C., 2007. Effects of pre-irradiation conditioning of medfly pupae (Diptera: Tephritidae): hypoxia and quality of sterile males. *Fla. Entomol.* 90, 80–87.
- Oliveira, M.F., Geijs, M.A., França, T.F.A., Moreira, D.C., Hermes-Lima, M., 2018. Is “preparation for oxidative stress” a case of physiological conditioning Hormesis? *Front. Physiol.* 9, 945. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00945>.
- Robinson, A.S., 1975. Influence of anoxia during gamma irradiation on the fertility and competitiveness of the adult male codling moth, *Laspesyesia pomonella* (L.). *Radiat. Res.* 61, 526–534.
- Schäfer, M., Werner, S., 2015. Nrf2 - A regulator of keratinocyte redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.018>.
- Schäfer, M., Dütsch, S., Keller, U., Navid, F., Schwarz, A., Johnson, D.A., Johnson, J.A., Werner, S., 2010. Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis. *Genes Dev.* 24 (10), 1045–1058. <https://doi.org/10.1101/gad.568810>.
- Schuch, A.P., Moreno, N.C., Schuch, N.J., Menck, C.F.M., Garcia, C.C.M., 2017. Sunlight damage to cellular DNA: focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic. Biol. Med.* 107, 110–124. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.029>.
- Seong, K.M., Kim, C.S., Seo, S.-W., Jeon, H.Y., Lee, B.-S., Nam, S.Y., Yang, K.H., Kim, J.-Y., Kim, C.S., Min, K.-J., Jin, Y.-W., 2011. Genome-wide analysis of low-dose irradiated male *Drosophila melanogaster* with extended longevity. *Biogerontology* 12, 93–107. <https://doi.org/10.1007/s10522-010-9295-2>.
- Shick, J.M., Lesser, M.P., Dunlap, W.C., Stochaj, W.R., Chalker, B.E., Won, J.W., 1995. Depth-dependent responses to solar ultraviolet radiation and oxidative stress in the zooxanthellate coral *Acropora microphthalma*. *Mar. Biol.* 122 (1), 41–51. <https://doi.org/10.1007/BF00349276>.
- Singh, M.K., Sharma, J.G., Chakrabarti, R., 2015. Simulation study of natural UV-B radiation on *Caenorhabditis elegans* and its impact on physiology, oxidative stress, Hsp 70 and DNA fragmentation. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 149, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.05.019>.
- Stearns, S.C., 1989. Trade-offs in life-history evolution. *Funct. Ecol.* 3, 259–268.
- Storey, K.B., 2015. Regulation of hypometabolism: insights into epigenetic controls. *J. Exp. Biol.* 218 (1), 150–159. <https://doi.org/10.1242/jeb.106369>.
- Vijayalaxmi, C.Y., Scarfi, M.R., 2014. Adaptive response in mammalian cells exposed to non-ionizing radiofrequency fields: a review and gaps in knowledge. *Mutat. Res.* 760, 36045. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.02.002>.
- Wang, Y., Wang, L., Zhu, Z., Ma, W., Lei, C., 2012. The molecular characterization of antioxidant enzyme genes in *Helicoverpa armigera* adults and their involvement in response to ultraviolet-A stress. *J. Insect Physiol.* 58 (9), 1250–1258. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.06.012>.
- Welker, A.F., Moreira, D.C., Campos, É., Hermes-Lima, M., 2013. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 165 (4), 384–404. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.003>.
- Williamson, C.E., Olson, O.G., Lott, S.E., Walker, N.D., Engstrom, D.R., Hargreaves, B.R., 2001. Ultraviolet radiation and zooplankton community structure following deglaciation in glacier bay, Alaska. *Ecology* 82 (6), 1748–1760. <https://doi.org/10.2307/2679815>.
- Won, E.J., Lee, Y., Han, J., Hwang, U.K., Shin, K.H., Park, H.G., Lee, J.S., 2014. Effects of UV radiation on hatching, lipid peroxidation, and fatty acid composition in the copepod *Paracyclopsina nana*. *Comparat. Biochem. Physiol. Part C* 165, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.06.001>.
- Yagura, T., Schuch, A.P., Garcia, C.C.M., Rocha, C.R.R., Moreno, N.C., Angeli, J.P.F., Mendes, D., Severino, D., Bianchini Sanchez, A., Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G., Menck, C.F.M., 2017. Direct participation of DNA in the formation of singlet oxygen and base damage under UVA irradiation. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.018>.
- Yang, Y., Niu, K., Hu, Z., Niklas, K.J., Sun, S., 2017. Linking species performance to community structure as affected by UV-B radiation: an attenuation experiment. *J. Plant Ecol.* 11 (2), 286–296. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtw001>.
- Zagarese, H.E., Williamson, C.E., 1994. Modeling the impacts of UV-B radiation on ecological interactions in freshwater and marine ecosystems. In: Biggs, R.H., Joyner, M.B.E. (Eds.), *Stratospheric Ozone Depletion/UV-B Radiation in the Biosphere*. Springer-Verlag, New York, NY, pp. 315–328.

Fotos das expedições





