

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

PARÂMETROS DO METABOLISMO OXIDATIVO NA
ANÊMOMA-DO-MAR *Bunodosoma cangicum*: VARIAÇÃO SAZONAL E EFEITO
DA EXPOSIÇÃO AO AR

Vinícius Dias Borges

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Adalto Bianchini

RIO GRANDE

Agosto 2013

“Nunca considerem seu estudo como uma obrigação, mas sim como uma oportunidade invejável de aprender sobre a influência libertadora da beleza no domínio do espírito para seu prazer pessoal e para proveito da comunidade a qual pertencerá seu trabalho futuro”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Família

Agradeço primeiramente aos meus pais, Waner e Valdereza, por quem tenho profundo amor e orgulho, por tudo que até hoje me foi dedicado; Por todo o apoio, esforço, dedicação, ensino e principalmente amor, para que agora eu alcance meus objetivos.

Agradeço as minhas queridas irmãs, Viviane e Wâneza, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando, partilhando comigo todas suas qualidades.

Agradeço ao meu amor, Simone, por tudo que vem me proporcionando, por todo amor, carinho, dedicação e acima de tudo pelo incentivo para que eu seguisse sempre caminhando em frente, sem esmorecer. Agradeço a ti, por estar todos os dias ao meu lado, me surpreendendo sempre com coisas boas, me fazendo feliz dia após dia!

Ao meu Mestre

Agradeço ao Professor Adalto Bianchini, a quem tenho grande admiração e gratidão, por todos os ensinamentos, orientação, oportunidades, pelo exemplo profissional e de caráter; pela amizade.

À FURG

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande por toda a estrutura que encontrei, desde a graduação até agora. Ao Instituto de Ciências Biológicas da FURG e ao PPG – Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada;

Agradeço a todos os professores, Funcionários e colegas da fisiologia;

Agradeço também, com grande satisfação, a todos da salinha 2, pela amizade que criamos ao longo destes quase três anos entre um mate e outro, sempre buenos.

Agradeço também a Lais Abujamara, pela amizade e por toda ajuda que sempre me dedicou com maior entusiasmo e que certamente foi de grande valia para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço a todo o pessoal do grupo do Professor Adalto, por toda a dedicação e ajuda em todos os momentos que precisei.

Por fim, agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho, e por tudo...

Pela ajuda neste trabalho, agradeço a todos:

“Qualquer trabalho acadêmico que se faça, por menor que seja jamais é fruto de uma ação individual. Tem que ser partilhado com muitas pessoas; tantas que é impossível nomeá-las todas”.

Marcos Antonio Torriani.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO GERAL.....	7
OBJETIVOS.....	17
MANUSCRITO.....	19
CONCLUSÃO GERAL.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

RESUMO

Bunodosoma cangicum é uma anêmona-do-mar que habita a faixa intermarés nas regiões sul e sudeste do Brasil. Assim como outros animais característicos destes locais, esta espécie de anêmona enfrenta diariamente as mudanças nos parâmetros ambientais decorrentes do ciclo de marés, os quais podem variar conforme a estação do ano. Estas mudanças podem alterar o metabolismo oxidativo dos animais destes habitats, que pode também ser influenciado pelas diferentes estações ao longo do ano. Portanto, a influência de dois períodos distintos durante o ano além da exposição ao ar sobre parâmetros oxidativos (Capacidade antioxidante total contra radicais peróxil - ACAP, atividade da glutamato cisteína ligase - GCL, conteúdo de glutatona reduzida - GSH e nível de peroxidação lipídica - LPO) foi avaliada em anêmonas-do-mar coletadas em situação de submersão ou de emersão em um período do frio e um quente (final de inverno/começo de primavera e início de outono). A resposta destes parâmetros, bem como do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de adenosina trifosfato (ATP), também foi avaliada em animais submetidos diariamente à exposição ao ar (3 h) em laboratório por 30 dias. Com relação aos parâmetros oxidativos considerando apenas os diferentes períodos do ano, uma maior atividade da GCL foi observada durante o período mais frio, assim como um maior nível de LPO neste mesmo período. Com relação à exposição ao ar, no que diz respeito às defesas antioxidantes, em animais coletados em emersão foi observado uma maior atividade da GCL durante o período quente, além de uma maior ACAP e um menor conteúdo de GSH em anêmonas-do-mar coletadas, tanto no período frio como quente. Com relação aos danos oxidativos, um maior nível de LPO foi encontrado em anêmonas-do-mar coletadas durante emersão no período mais quente (outono). De forma geral, não foi observado um padrão de variação dos parâmetros oxidativos em função da hora do dia, evidenciando-se apenas uma diminuição na ACAP e um aumento da GSH, em torno das 13h, em animais coletados durante a estação mais quente. As

anêmonas-do-mar expostas ao ar sob condições controladas de laboratório mostraram variações transitórias da ACAP (aumento) e do conteúdo de GSH (redução) após a re-oxigenação. Estes resultados indicam que alguns parâmetros oxidativos de *B. cangicum* apresentam variação sazonal enquanto outros são afetados pela exposição ao ar. No entanto, o padrão de resposta destes parâmetros é diferente em campo e em laboratório, sugerindo que os parâmetros controlados em laboratório, tais como temperatura, fotoperíodo e iluminação, modificam a resposta do metabolismo oxidativo de *B. cangicum* à exposição ao ar em campo.

Palavras-chave: anêmona-do-mar; maré; estresse oxidativo; exposição ao ar; sazonalidade.

INTRODUÇÃO GERAL

As anêmonas-do-mar são animais pertencentes ao filo Cnidaria, o qual compreende animais com simetria radial e que apresentam o cnidócito, um tipo de célula muito peculiar que designa o filo, sendo esta uma estrutura característica e marcante nas anêmonas-do-mar. Os cnidários estão divididos em quatro classes, sendo elas Hidrozoa, Scyphozoa, Cubozoa e Anthozoa, sendo que nesta última encontram-se as anêmonas-do-mar, os corais, os ceriantos e os antipatários. Os cnidários constituem um grupo muito primitivo, possuindo a mais longa história dentro dos metazoários, a qual alcança mais de 700 milhões de anos. Embora apresentem uma composição estrutural e funcional muito simplificada, os cnidários possuem uma relevância significativa em termos de biomassa em alguns ambientes, sendo que estão presentes em todos os habitats marinhos e em alguns dulcícolas. Porém, não apresentam representantes nos ambientes terrestres. Embora sejam principalmente sésseis ou de locomoção/natação muito lenta, os cnidários são predadores muito eficientes, podendo capturar presas muito mais rápidas e complexas, o que se dá devido à presença dos

nematocistos, que são organelas urticantes localizadas nos cnidócitos e que podem paralisar as presas ao perfurá-las (Ribeiro Costa & Da Rocha, 2006; Hickman *et al.*, 2009).

Além de eficientes predadores, os cnidários também representam um grupo de grande importância, pois muitas vezes vivem em simbiose com outras espécies. No caso de comensalismo, anêmonas ou hidróides frequentemente se fixam em conchas habitadas por crustáceos. Por sua vez, no caso de mutualismo, algas vivem em tecidos de diversos cnidários como hidras de água doce, anêmonas e recifes construtores de corais. Além desta importância ecológica, também é necessário destacar a importância econômica dos cnidários, a qual muitas vezes não é percebida, e que está associada ao fato de que estes animais são construtores de recifes de corais, que abrigam muitos peixes e outros animais que servem de alimento ao homem, e que se constituem como monumentos naturais de grande atração turística (Hickman *et al.*, 2009).

As anêmonas-do-mar (antozoários) também são conhecidas como “animais-flor”, em função da aparência similar a protuberâncias vegetais. Elas pertencem à subclasse Zoantharia ou Hexacorallia e à Ordem Actiniaria ou Corallimorpharia. As anêmonas-do-mar são pólipos solitários e, muitas vezes, apresentam coloração de destaque. São animais bentônicos, sésseis ou de movimentos de locomoção muito lentos, e habitam diferentes ambientes marinhos, desde regiões intermarés, recifes costeiros rasos, costões rochosos e, até mesmo, ilhas oceânicas e atóis (Melo & Amaral, 2005). Normalmente, elas podem ser encontradas associadas a substratos rochosos ou em locais protegidos, como nas fendas ou parte inferior das rochas das zonas intermareais, onde podem enfrentar situações de emersão em situação de maré baixa (Amaral *et al.*, 2000). Além disso, elas estão sujeitas à influência de outros fatores externos, tais como tipo de substrato, assoreamento, ação das ondas, vento e dessecação, os quais podem influenciar sua distribuição (Gomes, *et al.*, 1998).

Bunodosoma cangicum Corrêa 1964 é comumente encontrada na zona de intermaré de costões rochosos, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Esta espécie geralmente costuma se fixar nas rochas ou em fendas cobertas de areia, onde permanece enterrada, expondo somente o disco oral (Fig. 1). Além disso, apresenta uma coloração parda que as permite camuflar-se facilmente no substrato onde vivem, principalmente quando se encontram encolhidas (Ribeiro Costa & Da Rocha, 2006). As anêmonas desta espécie geralmente se encontram no mediolitoral entre fendas e frestas, em áreas parcialmente cobertas por sedimento, fixas em substrato rochoso e sujeitas às correntes durante a mudança de marés. Quando expostas ao ar durante a maré baixa, elas adquirem um formato de domo (cúpula) e permanecem completamente fechadas, evitando assim a dessecação (Fig. 2). Além disso, também possuem vesículas secretoras de muco em sua coluna, que contribuem para evitar a perda de água (Ribeiro Costa & Da Rocha, 2006).



Figura 1. Exemplar da anêmona-do-mar *Bunodosoma cangicum* parcialmente recoberto de areia. Fonte: De Capitani (2007).



Figura 2. Exemplos da anêmona-do-mar *Bunodosoma cangicum* expostos ao ar durante a maré baixa. Fonte: foto do autor.

O corpo de *B. cangicum*, assim como o de todas as demais espécies de anêmonas-do-mar, pode ser dividido externamente em três partes principais: o disco pedal ou basal, que provê aderência ao substrato; a coluna ou escapo, que proporciona a sustentação, e o disco oral, onde se encontram a boca e também os tentáculos. Internamente, de uma maneira bem simplificada, pode-se descrever a espécie como sendo em forma de saco, apresentando uma cavidade principal que banha os órgãos internos, a cavidade gastrovascular (Ribeiro Costa & Da Rocha, 2006) (Fig. 3). É interessante chamar atenção para a cavidade gastrovascular e a coluna, no que se refere à adaptação dos indivíduos da espécie ao ambiente. A cavidade gastrovascular, entre outras funções, é responsável por reter água nos eventos de exposição ao ar, durante a maré baixa, mantendo assim uma reserva de água e de oxigênio. Já a coluna, contém inúmeras vesículas secretoras de muco, que além de ser importante na regulação osmótica e na prevenção da dessecação, é responsável pelo agregamento de pequenas partículas do meio que formam uma espécie de cobertura do corpo, a qual também ajuda a manter a homeostase hídrica destes animais. Portanto, estas funções um pouco distintas e que vão além das usuais para coluna e cavidade gastrovascular, parecem constituir importantes

adaptações das anêmonas-do-mar ao local onde vivem, ou seja, a zona intermarés (Ribeiro Costa & Da Rocha, 2006).

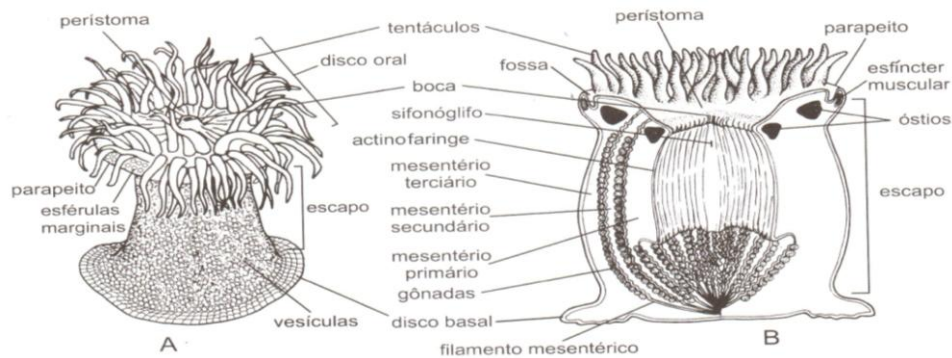


Figura 3. Anatomia externa (A) e interna (B) da anêmona-do-mar *Bunodosoma cangicum*. Fonte: Ribeiro Costa & Da Rocha (2006).

Como descrito acima, as anêmonas-do-mar que habitam a região intermarés possuem a capacidade de reter água em suas cavidades gastrovasculares durante exposição ao ar, o que não ocorre com as espécies que vivem na região infralitoral (Stotz, 1979; Vidolin, 2007). As anêmonas-do-mar das espécies *B. caissarum*, *B. cangicum*, *Actinia bermudensis* e *A. cascaia*, que vivem na faixa intermarés mais alta, possuem capacidade de reter líquido na cavidade gastrovascular e de produção de muco, não apresentando, portanto, perda significativa de água tecidual quando expostas ao sol durante uma hora, em seu habitat natural ou por uma hora e meia, quando expostas ao sol experimentalmente (Vidolin, 2007). Já na espécie *Anemonia sargassensis*, estas adaptações não são observadas (Vidolin, 2007) e, portanto, a incapacidade de lidar com a dessecação, concentração ou dissolução do meio, fatores que são de ocorrência natural na região intermaré, é descrita para esta espécie (Amado *et al.*, 2011).

A faixa intermarés, também chamada de zona de variação da maré, é a faixa do litoral que pode ficar submersa durante a maré alta e emersa durante a maré baixa. A ocupação da faixa intermareal ou submareal implica em diferentes fatores (estressores ou não) bióticos ou

abióticos, em uma mesma espécie ou em diferentes espécies, que são influenciados diretamente pela amplitude da maré (Richardson *et al.*, 1997; Cha *et al.*, 2004). Neste sentido, é importante salientar que as variações das marés podem alterar o metabolismo aeróbico e, conseqüentemente, o estado redox celular de animais que habitam estas zonas, modulando tanto as defesas antioxidantes como os danos oxidativos. Os animais que habitam a faixa intermarés, principalmente na sua linha superior, podem ser frequentemente expostos ao ar ou então ficarem submersos nas chamadas poças de maré, que ocorrem durante a maré baixa. Nestas condições, estes animais podem ser expostos a grandes variações de temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, pH, entre outros fatores, os quais podem influenciar o modo de vida destes animais (Connell, 1972; Nybakken, 1988).

Muitos invertebrados marinhos intermareais desenvolveram adaptações que os permitiram suportar longos períodos de exposição ao ar, tendo em vista que podem ficar naturalmente expostos ao ar duas vezes ao dia durante muitas horas, devido ao recuo da maré (Hermes-Lima *et al.*, 2001). No caso das anêmonas-do-mar, para obter sucesso no habitat em que vivem, elas apresentam uma alta secreção de muco na parede do corpo, o que retém detritos, bem como uma retração do corpo. Estas adaptações auxiliam no controle da perda de água corpórea, uma vez que estes animais apresentam uma superfície altamente permeável à água (Hart e Crowe, 1977). Por sua vez, a tolerância dos animais à hipoxia é dependente da espécie e do estágio de desenvolvimento, podendo ser muito variável, sendo que alguns invertebrados conseguem viver em ausência de oxigênio por dias, semanas ou até mesmo meses. Nessas situações, os organismos enfrentam uma situação de isquemia, onde o oxigênio e o suprimento energético diminuem, forçando as células a suportarem um déficit potencialmente fatal de energia (Hermes-Lima *et al.*, 2001).

Na faixa intermarés, muitos animais de respiração aquática podem enfrentar situação de hipoxia durante a maré baixa, o que pode conseqüentemente conduzir a uma situação de

estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ser causado por espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN). No caso das ERO, estas são formadas por moléculas de oxigênio que apresentam alta reatividade biológica, podendo ser radicais, onde o átomo de oxigênio pode estar sozinho ou associado com outros elementos e possuir elétrons desemparelhados, ou não radiculares, as quais não apresentam elétrons desemparelhados, mas mesmo assim possuem alta reatividade, podendo causar injúrias a muitas moléculas celulares (Bergendi *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2005). Uma produção de ERO muito alta, que excede a capacidade do sistema de defesa antioxidante do organismo, induz ao estresse oxidativo (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002).

As ERO incluem principalmente o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxil ($\cdot OH$) (Storey, 1996). O ânion superóxido, produto da redução de um elétron do oxigênio, é o precursor da maioria das ERO e um mediador das reações oxidativas em cadeia. A dismutação do $O_2^{\cdot-}$, que pode ocorrer espontaneamente ou através da reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD), produz H_2O_2 , que por sua vez, pode ser totalmente reduzido à água ou parcialmente reduzido a $\cdot OH$, um dos mais fortes oxidantes presentes na natureza. A formação do $\cdot OH$ também pode ser catalisada por reações de Fenton (Haber-Weiss), onde os metais de transição assumem papel importante nesta via (Turrens, 2003).

As ERO são continuamente produzidas nos organismos aeróbicos como subprodutos da respiração celular e podem causar inúmeros efeitos deletérios às células, incluindo a peroxidação lipídica, a inativação de enzimas, a oxidação das bases do DNA e degradação protéica (Halliwell, 1993; Lemaire & Livingstone, 1993). Para se proteger contra as ERO, as células possuem enzimas antioxidantes específicas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx) que decompõem o radical ânion superóxido (SOD) e o peróxido de hidrogênio (CAT e GPx) (Sies *et al.*, 1979; Keeling & Smith, 1982;

Sies, 1993; Storey, 1996). Por sua vez, as glutationa-S-transferases (GST) catalisam a conjugação da glutationa (GSH) com xenobióticos, tornando-os menos tóxicos. Além disso, enzimas complementares, como a glutationa redutase (GR), reciclam a glutationa oxidada (GSSG) à sua forma reduzida (GSH) utilizando NADPH, que por sua vez é reciclado através da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), para manter o estado antioxidante celular (Hermes-Lima *et al.*, 2004; Reed, 1986;) (fig. 4).

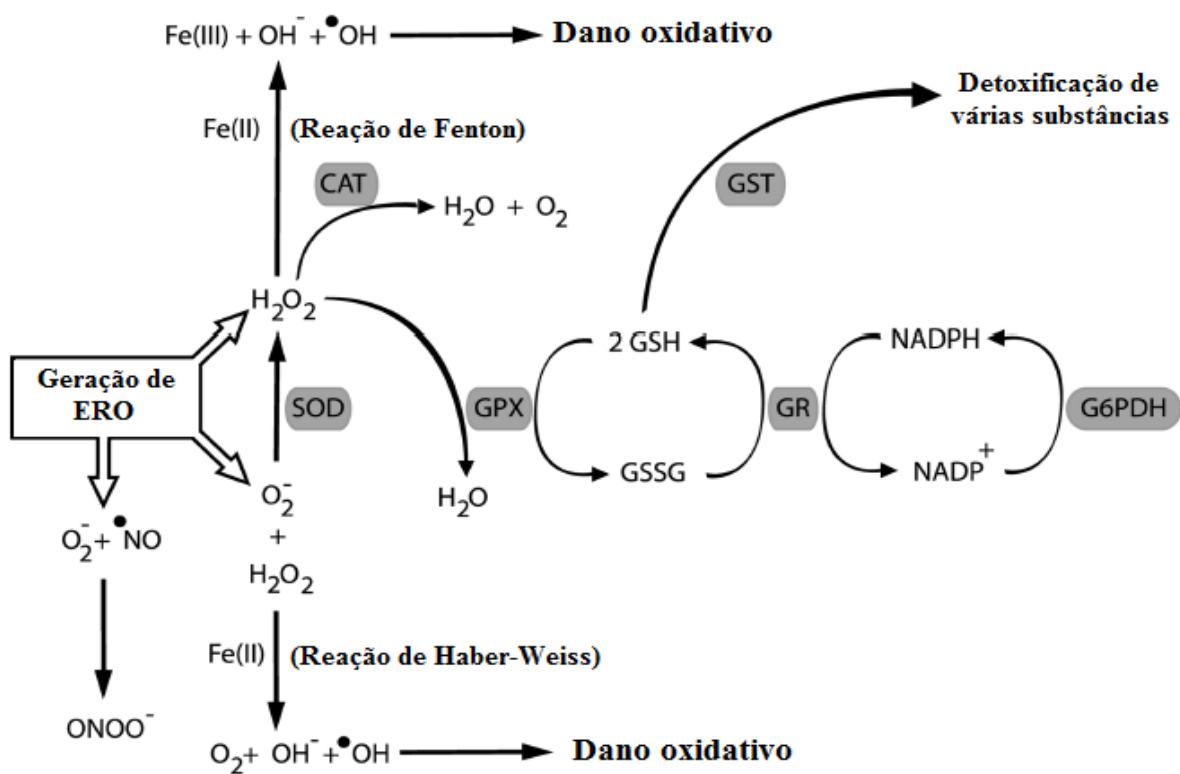


Figura 4. Esquema ilustrando a formação e a detoxificação de ERO. Adaptado de Hermes-Lima (2004).

Estas enzimas podem remover ou transformar as ERO em metabólitos menos tóxicos (Halliwell & Gutteridge, 2007). Além disso, os antioxidantes de baixo peso molecular ou antioxidantes não enzimáticos, tais como GSH e as vitaminas C e E, agem em conjunto com essas defesas enzimáticas (Hermes-Lima, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007). A GSH é

particularmente eficaz contra os radicais hidroxil altamente tóxicos, perfazendo assim uma importante linha de defesa contra uma das espécies radicalares mais reativa e danosa às células e tecidos (Bains & Shaw, 1997). Depois de utilizada, o nível de GSH é restaurado pela GR ou através da produção de novas moléculas de GSH. Por sua vez, a glutamato cisteína ligase (GCL) catalisa a reação entre o glutamato e a cisteína, para formar o dipeptídeo γ Glu-Cys, que é então combinado com a glicina para gerar GSH em uma reação catalisada pela glutathiona sintase (GS) (fig. 5). A síntese da GSH nas células é normalmente regulada pela concentração de GSH disponível no organismo, ou seja, quando o nível de GSH está alto, ocorre uma inibição da atividade da GCL (feedback negativo), e quando o nível está baixo, esse mecanismo de feedback é interrompido, sinalizando para produção de GSH (Hermes-Lima, 2004).

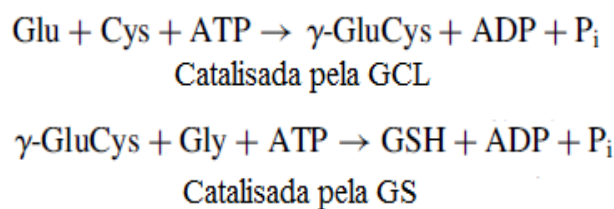


Figura 5. Esquema ilustrando a formação do dipeptídeo γ Glu-Cys e do tripeptídeo γ Glu-Cys-Gly (GSH). Adaptado de Hermes-Lima (2004).

Do ponto de vista ambiental, o estresse oxidativo pode ocorrer quando as células são submetidas a fatores ambientais estressantes, tais como exposição à luz intensa, radiação ultravioleta (UV), choque térmico, elevado ou baixo teor de oxigênio, entre outros. Além disso, os radicais livres tem sido envolvidos nos efeitos deletérios de muitos contaminantes ambientais (Bocchetti & Regoli, 2006; Joyner-Matos *et al.*, 2006; Malanga *et al.*, 2007; Winston & Di Giulio, 1991). No que se refere à disponibilidade de oxigênio, a

transição súbita de um ambiente para outro pode induzir estresse oxidativo severo, como por exemplo, durante a exposição dos organismos à hipoxia ou anoxia seguida por reoxigenação (Ferreira *et al.*, 1999; Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002). Esta situação parece ser de ocorrência natural nos organismos que vivem na área de transição das marés, como é o caso da anêmona *B. cangicum*. De fato, variações nos parâmetros abióticos, notadamente oxigenação e temperatura, influenciam a produção de ERO e as respostas antioxidantes em inúmeros organismos submetidos a estas variações, como mamíferos e invertebrados intermareais (Newell & Walkey, 1966; Arduini *et al.*, 1988; Manduzio *et al.*, 2005; Santovito *et al.*, 2005; Lushchak & Bagnyukova, 2006).

Além dos efeitos imediatos da anaerobiose, os animais tolerantes a anoxia/hipoxia tem que lidar com os danos que ocorrem na reoxigenação (Issartel *et al.*, 2009). Neste sentido, sabe-se que há um grande incremento na produção de ERO quando a cadeia respiratória mitocondrial retorna à sua atividade. Sabe-se também que, em muitos casos, os animais conseguem lidar bem com estas situações, pois aumentam suas defesas antioxidantes, sejam elas enzimáticas ou não, em resposta ao estresse oxidativo (Storey, 1996). Outro fator muito importante que pode influenciar as defesas antioxidantes e conseqüentemente o estado redox celular é a sazonalidade. Este fator pode modular os estados pró e antioxidantes nos animais. Assim, os parâmetros enzimáticos e não enzimáticos de defesa podem variar em diferentes estações do ano, como no inverno e verão. Além disso, até mesmo a taxa respiratória pode ser influenciada pela estação do ano. Esta variação nos parâmetros antioxidantes em função da época do ano já vem sendo bastante explorada, principalmente porque muitos destes fatores também são utilizados como biomarcadores da condição de saúde animal em relação aos parâmetros ambientais. Portanto, conhecer tais variações é de suma importância para um diagnóstico mais preciso em estudos deste tipo. Neste sentido, alguns estudos mostram variações sazonais nas defesas antioxidantes, sendo que na maioria dos casos estas defesas

umentam naturalmente em estações mais quentes. Esta resposta pode ser esperada, tendo em vista o aumento do metabolismo nestas estações do ano. Além disso, em muitos casos, os animais se encontram em fase reprodutiva nestas épocas do ano, quando ficam também mais susceptíveis ao estresse oxidativo (Power & Sheehan, 1996; Sheehan & Power, 1999; Regoli *et al.*, 2002; Bocchetti & Regoli, 2006; Joyner-Matos *et al.*, 2006; Malanga *et al.*, 2007).

Os efeitos das variações dos parâmetros abióticos associados aos ciclos de maré na fisiologia de invertebrados já tem sido abordados, incluindo a avaliação da influência destes ciclos nos parâmetros antioxidantes, tolerância à temperatura e salinidade, bem como na distribuição no ambiente de animais habitantes da zona de intermaré (Vidolin, 2007; Letendre *et al.*, 2008, 2009; Amado *et al.*, 2011). No entanto, este tipo de estudo ainda é bastante escasso quando se considera a diversidade dos cnidários. Cabe ainda ressaltar que os poucos estudos com anêmonas-do-mar são focados principalmente na distribuição destes animais no ambiente (Melo & Amaral, 2005; Borges *et al.*, 2007; Vidolin, 2007) e na análise de suas toxinas e os efeitos destas (Gondran *et al.*, 2002; Zaharenko *et al.*, 2008a,b).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Com base no exposto acima, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar o estado oxidativo da anêmona-do-mar *Bunodosoma cangicum* em diferentes estações do ano e em função da exposição ao ar.

Objetivos específicos

Para atender ao objetivo geral deste estudo, foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- Determinar e comparar a resposta corporal do sistema de defesa antioxidante [capacidade antioxidante total contra radicais peróxil (ACAP)], da atividade da glutamato cisteína ligase (GCL) e do conteúdo de glutatona (GSH) durante emersão e imersão em diferentes estações do ano (outono e primavera).
- Avaliar e comparar o dano oxidativo corporal (peroxidação lipídica) durante emersão e imersão em diferentes estações do ano (outono e primavera).
- Analisar e comparar o conteúdo corporal de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante emersão e imersão em laboratório.
- Quantificar e comparar o conteúdo corporal de ATP durante emersão e imersão em laboratório.

MANUSCRITO

PARAMETERS OF OXIDATIVE METABOLISM IN THE SEA ANEMONE

***Bunodosoma cangicum*: SEASONAL CHANGES AND EFFECTS OF AIR EXPOSURE**

Vinícius Dias Borges¹, Laís Abujamara² and Adalto Bianchini^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, 96.203-900 – Rio
Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, 96.203-900 – Rio
Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

*** Este manuscrito deverá ser submetido para publicação no**
Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

PARAMETERS OF OXIDATIVE METABOLISM IN THE SEA ANEMONE

***Bunodosoma cangicum*: SEASONAL CHANGES AND EFFECTS OF AIR EXPOSURE**

Vinícius Dias Borges¹, Laís Abujamara², Adalto Bianchini^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada,
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália km 8,
Campus Carreiros, 96.203-900, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália km 8,
96.203-900, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author: Adalto Bianchini
Universidade Federal do Rio Grande
Instituto de Ciências Biológicas
Avenida Itália km 8, Campus Carreiros
96.203-900 – Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil
Phone: +55 53 32935255
FAX: +55 53 32336633
e-mail: adaltobianchini@furg.br

ABSTRACT

The sea anemone *Bunodosoma cangicum* faces daily changes in environmental parameters associated with the tidal cycle, which can show seasonal variations. These changes can alter the oxidative metabolism, which can show seasonal variations. Therefore, the influence of the season and exposure to air on oxidative parameters (ACAP, GCL activity, GSH content and LPO level) was evaluated in submerged and emerged sea anemones collected in two distinct periods in the field. The response of these parameters, as well as of ROS and ATP content was also evaluated in sea anemones subjected (3 h) daily to air exposure in laboratory for 30 days. Higher GCL activity and LPO level was observed in sea anemones collected in spring. Higher ACAP and lower GSH content were observed in sea anemones found emerged in spring and autumn, while a higher activity of GCL was found only in autumn. Also in autumn, a higher level of LPO was found in anemones collected during emersion. Virtually no significant pattern of variation in oxidative parameters was observed as a function of daytime in field and laboratory sea anemones. Air exposure under controlled conditions in laboratory induced a transitory change in ACAP (increase) and GSH content (decrease) after re-oxygenation. Taken altogether, these results indicate that some oxidative parameters of *B. cangicum* show seasonal variations while other are affected by air exposure. However, a differential pattern of response of these parameters were observed in field and laboratory sea anemones. These findings suggest that environmental parameters controlled in laboratory, such as temperature, photoperiod and light intensity, modify the response of the oxidative metabolism in *B. cangicum* during the natural exposure to air under field conditions.

Keywords: sea anemone; tidal cycle; seasonal changes; air exposure; oxidative stress;

INTRODUCTION

The intertidal zone is the coastal area that can be submersed during the high tide and emerged during the low tide. Therefore, organisms living in substrates at the intertidal zone are continuously exposed to several environmental stressors that influence or determine their distribution (Gomes *et al.*, 1998; Cha *et al.*, 2004; Amado *et al.*, 2011). Physiological stress associated with air exposure, including desiccation, increasing temperature, ultraviolet radiation and low oxygen content (hypoxia), as well as changes in water salinity and pH can limit the ability of species to explore the upper end of the intertidal zone (Nybakken, 1988).

During low tide, many invertebrates like bivalves are able to support long periods of oxygen depression during air exposure by firmly closing their valves, retaining water internally. Also, they show several biochemical and physiological adaptations allowing them to tolerate the anaerobic condition for varying periods (Letendre *et al.*, 2008). These adaptations have been extensively studied and include the maintenance of high levels of fuel reserves for anaerobic respiration (e.g., glycogen and aspartate) in all tissues, metabolic depression generally lower than 10% of the aerobic rate, and production of succinate, alanine and volatile compounds (acetate and ethylene propionate) as alternative end products of glycolysis which maximize the ATP generation through anaerobic metabolism instead of lactate that can increase the metabolic acidosis (Zwaan and Wijsman, 1976; Storey and Storey, 1990). Sea anemones like several other animals from the intertidal zone experience natural cyclic changes between water submersion and air exposure. Furthermore, species living in the upper level of the intertidal zone also retain water in the gastrovascular cavity, shrink their body in a cupule shape and produce abundant mucus to avoid desiccation (Stotz, 1979; Vidolin, 2007).

In addition to the metabolic changes described above, the abrupt variation in oxygen availability characteristic of intertidal zones can induce oxidative stress to organisms through the exposure to hypoxia or anoxia followed by reoxygenation (Ferreira *et al.*, 1999; Hermes-Lima and Zenteno Savin, 2002). Reactive oxygen species (ROS) are continuously produced as end products of the cellular respiration and when excessive can cause several deleterious effects to biomolecules, including lipid peroxidation (LPO), enzyme inactivation, protein degradation, and oxidation of DNA bases (Halliwell, 1993; Lemaire and Livingstone, 1993). Therefore, antioxidant enzymes like superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), glutathione-*S*-transferases (GST), glutathione reductase (GR) are involved in the maintenance of the cellular antioxidant status and protect cells against ROS (Sies *et al.*, 1979; Keeling and Smith, 1982; Sies, 1993; Story, 1996).

Additionally to the enzymatic antioxidant agents, low molecular weight antioxidants (non-enzymatic antioxidants) such as GSH and vitamins C and E also play an important role in the maintenance of the cellular antioxidant status (Hermes-Lima, 2004; Halliwell and Gutteridge, 2007). GSH is particularly efficient against the highly toxic hydroxyl radicals, thus being an important defence line against one of the most reactive and deleterious radical species of oxygen (Bains and Shaw, 1997). After being employed, GSH level is restored by the GR activity or through the production of novel GSH molecules. Glutamate cysteine ligase (GCL) catalyzes the reaction between glutamate and cysteine to form the dipeptide γ -glutamylcysteine (γ -Glu-Cys), which is combined with glycine to generate GSH in a reaction catalyzed by glutathione synthase (GS). The cellular GSH synthesis is normally regulated by the amount of GSH available in the organism. When the GSH level is high, GCL activity is inhibited (negative feedback). In turn, the negative feedback is interrupted when the GSH level is low, thus signaling the GSH production (Hermes-Lima, 2004).

As discussed above, environmental factors can modulate the energy and oxidative metabolism in animals subjected to hypoxia/anoxia conditions. Therefore, it is also important to consider the influence of the seasonal changes in environmental factors, which can vary according to the climate of the region considered. For example, increasing temperature can stimulate all metabolic processes in accordance with the thermodynamic principle. In fact, it is shown to induce oxidative stress in toads (Bagnyukova *et al.*, 2003.), fish (Parihar and Dubey, 1995; Heise *et al.*, 2006 a,b; Lushchak and Bagnyukova, 2006) and other aquatic animals (Verlecar *et al.*, 2007; Bocchetti *et al.*, 2008). Therefore, it would be expected that a decrease in temperature could lead to a reduced oxidative metabolism. However, environmental temperature decrease together with a metabolic depression was shown to induce oxidative stress in fish (Malek *et al.*, 2004) and barnacles (Niyogi *et al.*, 2001).

While most studies in mollusks are focused on the biochemical changes associated with the metabolic anaerobiosis, as well as on the adaptations to the oxidative stress during the transitory aerobic/anaerobic events (Almeida *et al.*, 2005; Altieri, 2006; Letrende *et al.*, 2008; Letrende *et al.*, 2009), few information is available on the adaptive responses of the antioxidant parameters and oxidative damage in the events of air exposure followed by resubmersion in sea anemones.

In light of the above, the main goal of the present study was to evaluate the antioxidant status and oxidative damage in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* found submerged or emerged in two different seasons. In the present study, we have analyzed the response of the antioxidant defence system [total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP), GCL activity and GSH content], as well as the level of oxidative damage (LPO) in field *B. cangicum* found submerged or emerged in late winter/early spring and early autumn. The effect of daily air exposure followed by resubmersion on the antioxidant defence system, ROS production, oxidative damage and ATP content was also evaluated under controlled

laboratory conditions. It is expected that the oxidative status of sea anemones would be dependent on both season and air exposure.

MATERIALS AND METHODS

Field sea anemones

Sea anemones (*B. cangicum*) were collected in the intertidal zone at the “Molhe Oeste” (32°09'40.25''S; 52°05'51.96''O) at Cassino Beach (Rio Grande, RS, southern Brazil). Two collections were performed in early autumn (10/04/2012 and 13/04/2012) and two other collections were made in later winter/early spring (09/09/2012 and 14/10/2012). These periods were chosen because the early autumn characterizes all the metabolic adjustments from the summer and the early spring from winter. In each collection, sea anemones were caught at different daytimes (09:00, 11:00, 13:00, 16:00 and 18:00 h). Ten sea anemones (five submerged and five emerged) were manually collected every time, kept on dry ice, transferred to the laboratory and stored in ultrafreezer (-80°C) until analysis.

Laboratory sea anemones

Additional sea anemones were collected, transferred to the laboratory and acclimated to laboratory conditions in natural sea water (salinity 30 ppt) for 30 days. Room temperature (20°C) and photoperiod (12h L: 12 h D) were fixed. Acclimated sea anemones were always kept submerged or daily exposed (3 h) to air for 30 days. Five glass aquaria containing five sea anemones each were kept filled with natural sea water (salinity 30 ppt). Five other glass aquaria also containing five sea anemones each were filled with natural sea water (salinity 30 ppt), but had the sea water completely removed for 3 h, through siphon (from 12:00 h to 15:00 h) followed by resubmersion (from 15:00 h to 12:00 h next day). During the whole

period (30-days acclimation and 30-days experimentation periods), sea anemones were daily fed with fish slices and water was completely renewed. After 30 days of the beginning of the experiment, all sea anemones (submerged and submerged/emerged) were collected. The sea anemones kept always submerged were collected at 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6h. The anemones subjected to emersion were collected at 0, 1.5, 3.0h of exposure to air and followed by collection at 1,5 and 3.0h of re-submersion. These times correspond respectively to 12:00h, 13:30h, 15:00h, 16:30h e 18:00h during the daytime. Each sea anemone was sampled for analyses and all samples were stored as described above for the field sea anemones.

Sample homogenization

For each analysis, a sample (~0.05-0.1 g) was collected from the lateral/apical side of each sea anemone. Samples were homogenized using one of the buffer solutions described below, depending the type of the analysis to be performed. Sample homogenized was adjusted to 2 mg proteins/ml, except for the LPO and ATP content analysis. Protein in sample homogenized was measured using a commercial reagent kit (Microprote, Doles, Goiânia, GO, Brazil) based on the biuret assay.

For the analysis of antioxidants (ACAP, GCL activity, and GSH content), samples were homogenized using a buffer solution containing tris(hidroximetil)aminometano (Tris-base; 0.6055 g), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; 0.0730 g), dithiothreitol (0.0385 g), sacarose (42.789 g), and KCl (2.7956 g) dissolved in MilliQ water (250 ml). Samples for LPO measurement were homogenized in a buffer solution containing 1.25 ml of butylated hydroxytoluene (35 μ M) diluted in 50 ml of KCl solution (1.15%).

ACAP determination

ACAP was determined as described by Amado *et al.* (2009). Briefly, ROS was detected by fluorometry (excitation/emission: 485/520 nm) employing 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (H₂DCF-DA) as substrate. Each sample was homogenized (1:5; w:v) in the buffer solution and exposed to peroxy radicals generated by the thermal decomposition (37°C) of 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP, 1 mM). Fluorescence generated was measured for 30 min (Victor 2, Perkin-Elmer, USA). ACAP was determined based on the difference between the fluorescence area generated in the presence and in the absence of ABAP, normalized by the fluorescence value obtained in the absence of ABAP.

GCL activity and GSH content measurement

GCL activity was measured based on the fluorescence generated by the formation of γ -Glu-Cys, as described by White *et al.* (2003). Samples were homogenized in buffer solution and incubated in the presence and in the absence of cysteine in a reaction buffer containing ATP (40 mM), L-glutamate (20 mM), sodium borate (20 mM), serine (2 mM) and MgCl₂·6H₂O (40 mM). After incubation, the fluorescent probe 2,3-naftalene-dicarboxyaldehyde (NDA) was added. Basal concentration of GSH and γ -Glu-Cys formation were measured (excitation/emission: 472/528 nm) using a spectrofluorometer (Victor 2, Perkin-Elmer, USA). Data were calculated based on curve built with GSH standard solutions.

ROS determination

ROS content was determined following the method described by Viarengo *et al.* (1999). Immediately after collection, samples were homogenized (1:5; w:v) in a cold solution containing sucrose (0.32 M), hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES; 20 mM), MgCl₂ (1 mM), and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; 0,1 mM). Homogenized samples

were centrifuged (20,000x g) at 4°C for 20 min. Aliquots of the supernatant were employed for ROS measurement, which was performed using a reaction medium containing HEPES (30 mM), KCl (200 mM) and MgCl₂ (1 mM) and H₂DCF-DA (16 μM). In the presence of ROS, fluorescence generated is measured (excitation/emission: 485/530 nm) for 60 min (Victor 2, Perkin-Elmer, USA). Data were normalized by the protein content in the homogenate, which was measured using a commercial reagent kit (Microprote, Doles, Goiânia, GO, Brazil) based on the biuret assay.

LPO measurement

LPO was determined using the method based on the thiobarbituric acid reagent substances (TBARS), as described by Oakes and Van der Kraak (2003). According to this method the thiobarbituric acid (TBA) reacts with malondialdehyde (MDA) under acid condition and high temperature (95°C) forming a fluorescent chromogen (excitation/emission: 515/553 nm). For analysis, samples were homogenized (1:9; w/v) in the respective buffer solution. Data were calculated based on a curve built with standard solutions of tetramethoxypropane (TMP), which after hydrolysis generates MDA.

ATP content measurement

ATP content was analyzed using a commercial reagent kit [ATP Determination Kit (A22066), Molecular Probes, USA) based on luciferin oxidation in the presence of ATP to produce light, which was measured at 580 nm (Victor, Perkin-Elmer, USA). For this analysis, samples were homogenized by mechanical maceration in liquid nitrogen, deproteinized (1:5; w:v) with perchloric acid (HClO₄) and centrifuged (500xg) for 5 min. Samples were neutralized (pH 7-8) with potassium carbonate (K₂CO₃) and again centrifuged (500xg) for 2

min. The supernatant was collected and employed for ATP content determination. Data were calculated based on a curve built with ATP standard solutions provided with the reagent kit.

Data presentation and analysis

Data were expressed as mean \pm standard error and subjected to analysis of variance (ANOVA). When data normality and variance homogeneity were observed, mean values were compared using ANOVA followed by the Fisher test. When the ANOVA assumptions were not met, data were subjected to the Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. In all cases, the significance level adopted was 95% ($\alpha = 0.05$).

RESULTS

Field sea anemones

Seasonal variations in oxidative parameters

When data were grouped disregarding the sea anemone position in the substrate (submerged or emerged) and the time of collection, no significant difference was observed in ACAP and GSH content between sea anemones collected in spring and autumn. However, sea anemones collected in spring showed significantly higher GCL activity and LPO content than those collected in autumn (Table 1).

Effect of air exposure on oxidative parameters

When data were grouped disregarding the time of collection, sea anemones found submerged showed significantly lower ACAP and higher GSH content than those found emerged at the moment of collection in spring. However, no significant differences were

observed in GCL activity and LPO content between the two groups of sea anemones (Table 2). In autumn, sea anemones found submerged showed significantly lower ACAP, GCL activity and LPO content than those found emerged at the moment of collection. However, a significantly higher GSH content was observed in sea anemones found submerged at the moment of collection (Table 3).

When data were grouped disregarding the position of the sea anemone in the substrate at the time of collection, sea anemones collected in spring showed no significant change in ACAP (Fig. 1A), GSH content (Fig. 1B), GCL activity (Fig. 1C) and LPO content (Fig. 1D) over the daytime. However, sea anemones collected in autumn showed significant change in ACAP and GSH content. ACAP was lower in sea anemones collected at 13:00 h than in those collected at 11:00 and 16:00 h (Fig. 1A). In turn, these sea anemones showed higher GSH content than those collected at 9:00 h (Fig. 1B). No significant change was observed in GCL activity (Fig. 1C) and LPO content (Fig. 1D).

Laboratory sea anemones

Sea anemones always kept submerged showed no significant change in ACAP (Fig. 2A), GCL activity (Fig. 2C), ROS content (Fig. 2D), LPO content (Fig. 2E) and ATP content (Fig. 2F). However, they showed a higher GSH content at 16:30 and 18:00 h (Fig. 2B).

Sea anemones daily subjected to air exposure from 12:00 to 15:00 h showed higher ACAP at 16:30 h than at 13:30 and 15:00 h (Fig. 2A). They also showed lower GSH content at 16:30 and 18:00 h than at 15:00 h (Fig. 2B). However, no significant change in GCL content (Fig. 2C), ROS content (Fig. 2D), LPO content (Fig. 2E) and ATP content (2F).

DISCUSSION

As predicted, data showed that the oxidative status of *B. cangicum* is dependent on the season (early spring or early autumn). This statement is based on the fact that LPO is higher in sea anemones collected in spring than in those collected in autumn, indicating that the former were not able to counteract the deleterious effects of ROS generated in that season. The higher GCL activity observed in sea anemones collected in spring indicates that a higher rate of GSH consumption would be occurring in these animals when compared to those collected in autumn. In fact, this increased GCL activity was responsible for the maintenance of the GSH level during late winter/spring, since the two groups of sea anemones showed similar mean values of GSH content.

It is important to note that a higher LPO level was observed in spring sea anemones, despite an increased generation and consumption of GSH. Taking these findings altogether, it seems that GSH only is not able to scavenge enough ROS in sea anemones collected in spring, resulting in oxidative damage to lipids. A higher ROS production would be expected to occur associated with the significantly increased ultraviolet (UV) radiation observed in spring in the studied area (Gouveia, 2009). In fact, cell damage induced by UV radiation through LPO is already known (Dahms & Lee, 2010). Furthermore, antioxidant responses were already described for cnidarians like corals and sea anemones exposed to UV radiation (Shick *et al.*, 1991; Shick *et al.*, 1995). Unfortunately, the level of ROS generation could not be measured in field sea anemones in the present study because this analysis must be performed in fresh collected tissues.

Several studies have demonstrated seasonal changes in both enzymatic and non-enzymatic antioxidants (Sheehan and Power, 1999; Power and Sheehan, 1996; Regoli *et al.*, 2002; Bocchetti and Regoli, 2006; Joyner-Matos *et al.*, 2006; Malanga *et al.*, 2007). In the present study, there was a lack of seasonal change in ACAP, indicating that the two groups of

sea anemones are keeping a similar antioxidant status. However, it must be considered that ACAP is a good indicator of the antioxidant defenses against peroxy radicals. Therefore, the higher LPO observed in sea anemones collected in late winter/spring suggests that part of the oxidative damage to lipids is being caused by other ROS than the peroxy radicals, such as the hydroxyl radicals. Finally, this higher LPO damage could be also explaining by considering a possible slower response of spring sea anemones to ROS production. This hypothesis is based on the fact that collections were performed in early spring and late winter, i.e. after the winter time, where sea anemones were longer exposed to significantly lower temperatures than those collected in early autumn, which were subjected to hotter temperatures during the whole summer. In ectothermic animals like sea anemones, a lower metabolic rate would be expected in early spring than in early autumn (Lushchak, 2011).

As previously mentioned, *Bunodosoma* is usually found in the intertidal zone of southern and southeastern coast of Brazil, thus being daily subjected to changes in environmental parameters associated with the tidal cycle (Gomes *et al.*, 1998; Cha *et al.*, 2004; Amado *et al.*, 2011). In response to air exposure during the low tide, *B. cangicum* shows abundant production of mucus, body shrinkage, and water retention in the gastrovascular cavity. They also are able to deal with the salinity changes associated with the tidal cycle (Vidolim, 2007; Amado *et al.*, 2011). However, no previous study was available on how *B. cangicum* deals with the oxidative metabolism during the air exposure associated with the tidal cycle.

In the present study, a marked difference in the oxidative status of submerged and emerged sea anemones was observed. As seasonal changes in oxidative parameters were observed, submerged and emerged sea anemones were compared by season. In spring, higher ACAP was observed in sea anemones exposed to air. Letrende *et al.* (2008, 2009) described a higher superoxide dismutase (SOD) activity in mussels (*Mytilus edulis*) commonly exposed to

air than in those living submerged most of time. Freire *et al.* (2011), described an increased GPx and CAT activity in muscle of the crab *Callinectes ornatus* after exposure to air for 3 h. Almeida *et al.* (2005) reported an increased GST activity in the mussel *Perna perna* during air exposure. Taking altogether, these findings indicate that the activity of antioxidant enzymes is stimulated after or during air exposure. This would explain, at least in part, the higher ACAP found in emerged sea anemones *B. cangicum* analyzed in the present study.

The increased level of ACAP described above for emerged sea anemones seems to have been enough to detoxify ROS, even though this analysis has not been performed, and to avoid a possible increase in LPO during air exposure. However, this response cannot be explained by the GSH content data. In fact, GSH content was lower in emerged sea anemones than in those found submerged. Therefore, the higher ACAP described above would be due to an increase in the concentration of other non-enzymatic antioxidants than GSH and/or a higher activity of antioxidant enzymes. In this case, GCL activity was similar in emerged and submerged sea anemones. These findings suggest that GSH is being used by sea anemones to detoxify ROS, as observed in other animals (Reed, 1986; Bains and Shaw, 1997; Hermes-Lima, 2004), but its level is not being adequately restored during air exposure. Despite the observed lack of increase in GCL activity during air exposure, no significant difference in LPO content was observed between submerged and emerged sea anemones, indicating that they are facing quite well the stressing conditions associated with air exposure in spring (Winston and Di Giulio, 1991). This is especially true if we consider that a higher oxidative damage would be expected due to the increased UV radiation incidence observed during this season in the studied area (Gouveia, 2009). As observed in the present study for sea anemones collected in spring, a lack of change in oxidative damage between submerged and emerged animals was also reported in crabs *C. ornatus* and *C. danae* (Freire *et al.*, 2011). However, Almeida *et al.* (2005) described a higher LPO level in the mussel *P. perna* exposed to air. In

this case, it is important to note that crabs were exposed to air for only 3 h, while mussels were exposed for a much longer period (24 h).

As observed in the mussel *P. perna* (Almeida *et al.*, 2005), sea anemones found emerged during the hot season (autumn) showed a higher oxidative damage (LPO) than those found submerged in this season. This response is opposed to that observed in sea anemones collected in cold season (late winter/early spring). Also, emerged sea anemones collected in autumn showed higher ACAP and GCL activity. Despite the increased GCL activity, GSH content was lower in emerged sea anemones than in those found submerged. Taken altogether, these findings suggest that sea anemones are using GSH to detoxify ROS during air exposure also in the hot season (autumn), as reported for other species from the intertidal zone (Letrende *et al.*, 2008; Letrende *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2011). It is also clear that the higher GCL activity observed in emerged sea anemones is an attempt to restore the GSH level during air exposure. However, this response was shown to be not enough to avoid an increased oxidative damage (LPO) during air exposure in autumn.

As previously discussed, the intertidal zone shows frequent changes in the environmental parameters. These changes can be observed several times every day and at certain times of the day (Nybakken, 1988). Also, there are evidences that organisms living in areas where wide variations in the tidal cycle are observed exhibit a more marked response of stress indicators than those living in more stable zones (Freire *et al.*, 2011). Therefore, as observed for season and air exposure, possible changes in the oxidative parameters along the daytime would be also expected (Hermes-Lima, 2004; Bickler and Buck, 2007; Freire *et al.*, 2011). However, data from the present study show that these parameters did not show a clearly pattern of variation according to the daytime. This result could be explained considering the fact that tide amplitude is quite narrow in the studied area. Furthermore, wind intensity and direction has a marked influence on the tidal variations in the studied area,

which could help to explain the lack of a clear pattern of the antioxidant responses associated with the daytime (tidal cycle). Actually, changes in oxidative parameters observed in the sea anemone *B. cangicum* living in the studied seems to be associated with air exposure, as reported for mussels (Letrende *et al.*, 2008; Letrende *et al.*, 2009) and crabs (Freire *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2011).

Based on the findings reported above, sea anemones acclimated to laboratory conditions were kept always submerged or daily subjected to a 3-h period of air exposure (from 12:00 to 15:00 h) followed by a 21-h period (from 15:00 to 12:00 h of the next day) of resubmersion for 30 days. Results showed that sea anemones always kept submerged only showed a significant variation in the GSH content as a function of the daytime. An increased GSH content was observed at the end of afternoon (16:30 to 18:00 h). This response could be associated to an intrinsic daily rhythm likely associated with a decrease in the UV radiation. However, further studies are needed to confirm this hypothesis.

Sea anemones exposed to air under controlled conditions in laboratory showed transitory changes in ACAP (increase) and GSH content (decrease) at 16:30h (after 1.5 h of resubmersion) respect to their condition at the end of the air exposure period. Considering that environmental parameters (e.g., temperature, salinity, light intensity, pH, and dissolved oxygen) influencing ROS production and the antioxidant response in different groups of animals (Newell and Walkey, 1966; Arduini *et al.*, 1988; Manduzio *et al.*, 2005; Santovito *et al.*, 2005; Lushchak and Bagnyukova, 2006) were controlled in laboratory, changes observed in oxidative parameters (ACAP and GSH content) can be thus ascribed to alterations in environmental parameters associated with air exposure. It is also important to note that changes in these parameters can also influence the energy metabolism (Hermes-Lima and Zenteno-Savin, 2002; Hermes-Lima *et al.*, 2004). However, sea anemones daily exposed to air followed by resubmersion did not show a significant change in ATP content. This lack of

response could be associated to the short period of exposure to air (3 h) tested in the present study. Finally, it is worth to mention that changes in oxidative parameters (especially ACAP and GSH content) in response to air exposure were quite different in field and laboratory sea anemones. This finding suggest that the response shown by field sea anemones is a result of the combined effects of a multitude of environmental parameters when compared to the partial controlled conditions employed to perform the experimental exposure to air in laboratory.

In conclusion, findings reported in the present study show that oxidative parameters in the sea anemone *B. cangicum* did not vary significantly according to the daytime both under field and laboratory conditions. However, some parameters are markedly influenced by season (GCL activity and LPO) or exposure to air (ACAP and GSH content). Furthermore, data reported in the present study show that sea anemones display a differential response to air exposure under field and laboratory conditions. This finding suggest that environmental factors that are controlled in laboratory, such as temperature, photoperiod and light intensity, have an important influence on the response of oxidative parameters to air exposure in the field.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática – CNPq, Brasília, DF, Brazil) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Programa Ciências do Mar - CAPES, Brasília, DF, Brazil), as well as the International Development Research Center (IDCR, Ottawa, Canada). VDB was a MSc fellow from the Brazilian CAPES. AB is a fellow from the

Brazilian CNPq (Proc. #304430/2009-9) and is supported by the International Canada Research Chair Program from IDRC.

REFERENCES

- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F, Medeiros, H.G, Di Mascio, P., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 318, 21-30.
- Altieri, A.H., 2006. Inducible variation in hypoxia tolerance across the intertidal-subtidal distribution of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 325, 295-300.
- Amado, L.L., Garcia, L.M., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407, 2115-2123.
- Amado, E.M., Vidolin, D., Freire, C.A, Souza, M.M., 2011. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. *Comp. Biochem. Physiol.* 158, 542-551.
- Arduini, A., Mezzetti, A., Porreca, E., Lapenna, D., DeJulia, J., Marzio, L., Polidoro, G., Cuccurullo, F., 1988. Effect of ischemia and reperfusion on antioxidant enzymes and mitochondrial inner membrane proteins in perfused rat heart. *Biochim. Biophys.* 970, 113-121.
- Bains, J.S., Shaw, C.A., 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res. Rev.* 25, 335-58.
- Bagnyukova, T.V., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2003. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. *J. Therm. Biol.* 28, 21-28.

- Bickler, P.E., Buck, L.T., 2007. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 145-170.
- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913-921.
- Bocchetti, R., Lamberti, C.V., Pisanelli, B., Razzetti, E.M., Maggi, C., Catalano, B., Sesta, G., Martuccio, G., Gabellini, M., Regoli, F., 2008. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Mar. Environ. Res.* 66, 24-26.
- Cha, H.-R., Buddemeier, R.W., Fautin, D.G., Sandhei, P., 2004. Distribution of sea anemones (Cnidaria, Actiniaria) in Korea analyzed by environmental clustering. *Hydrobiologia* 530, 497-502.
- Corrêa, D.D., 1964. Corallimorpharia e Actiniaria do Atlântico Oeste Tropical. Tese de Livre Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Dahms, H.U., Lee, J.S., 2010. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquat. Toxicol.* 97, 3-14.
- Ekau, H., Auel, H., Pörtner, H.-O., Gilbert, D., 2010. Impacts of hypoxia on the structure and processes in pelagic communities (zooplankton, macro-invertebrates and fish). *Biogeoscience* 7, 1669-1699.
- Ferreira, R., Milei, J., Grana, D., 1999. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in the heart. *J. Publ. Health* 8, 97-101.
- Freire, C.A., Togni, V.G., Hermes-Lima, M., 2011. Responses of free radical metabolism to air exposure or salinity stress in crabs (*Callinectes danae* e *C. ornatus*) with different estuarine distributions. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 160 (2): 291-300.

- Gomes, P.B., Belém, M.J., Schlenz, E., 1998. Distribution, abundance and adaptations of three species of Actiniidae (Cnidaria, Actiniaria) on an intertidal beach rock in Carneiros beach, Pernambuco, Braz. Misc. Zool. 21, 65-72.
- Gouveia, G.R., 2009. Penetração da radiação UV na coluna d'água do estuário da lagoa dos patos e seus efeitos sobre células e larvas de peixes. Tese de Doutorado. Pós-graduação em Oceanografia Biológica. Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande.
- Halliwell, B., 1993. Oxidative DNA damage: meaning and measurement. In: Halliwell, B., Auroma, O.I. (Eds.), DNA and Free Radicals. Ellis Horwood, New York.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed. Oxford University Press, New York.
- Hart, C.E., Crowe, J.H., 1977. The effect of attached gravel on survival of intertidal anemones. Trans. Am. Microsc. Soc. 96, 28-41.
- Heise, K., Puntarulo, S., Nikinmaa, M., Abele, D., Pörtner, H.O., 2006a. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. J. Exp. Biol. 209, 353-363.
- Heise, K., Puntarulo, S., Nikinmaa, M., Lucassen, M., Pörtner, H.O., Abele, D., 2006b. Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*). Comp. Biochem. Physiol. A 143, 494-503.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K. B., 2001. Protein adaptations and signal to oxygen availability during environmental stress. Elsevier Science.
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savin, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. Comp. Biochem. Physiol. C 133, 537-556.

- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, pp. 319-368.
- Hickman, C.P.J., Roberts, L.S., Larson, A., 2009. *Princípios Integrados de Zoologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Holt, R.D., Keitt, T.H., 2005. Species' borders: a unifying theme in ecology. *Oikos* 108, 3-6.
- Joyner-Matos, J., Downs, C.A., David, J., 2006. Increased expression of stress proteins in the surf clam *Donax variabilis* following hydrogen sulfide exposure. *Comp. Biochem. Physiol. A* 145, 245-257.
- Keeling, P.L., Smith, L.L., 1982. Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3243-3249.
- Lemaire, P., Livingstone, D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 1, 1119-1147.
- Letendre, J., Chouquet, B., Rocher, B., Manduzio, H., Leboulenger, F., Durand, F., 2008. Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 148, 211-216.
- Letendre, J., Chouquet, B., Manduzio, H., Marin, M., Bultelle, F., Leboulenger, F., Durand, F., 2009. Tidal height influences the levels of enzymatic antioxidant defences in *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* 67, 69-74.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 36-41.

- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13-30.
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebr. Surviv. J.* 2, 91-104.
- Malanga, G., Estevez, M.S., Calvo, J., Abele, D., Puntarulo, S., 2007. The effect of seasonality on oxidative metabolism in *Nacella (Patinigera) magellanica*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146, 551-558.
- Malek, R.L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy M.A., Gerhard, G.S., 2004. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 138, 363-373.
- Modig, H., Ólafsson, E., 1998. Responses of Baltic benthic invertebrates to hypoxic events. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 229, 133-148.
- Newell, R.C., Walkey, M., 1966. Oxidative activity of mammalian liver mitochondria as a function of temperature. *Nature* 212, 428-429.
- Nybakken, J.W., 1988. *Marine Biology: An Ecological Approach*. Harper-Collins Publishers, New York.
- Niyogi, S., Biswas, S., Sarker, S., Datta, A.G., 2001. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 52, 13-26.
- Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63, 447-463.
- Parihar, M.S., Dubey, A.K., 1995. Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. *Comp. Biochem. Physiol. C* 112, 309-313.

- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 114, 99-103.
- Reed, D.J., 1986. Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem. Pharmacol.* 35, 7-13.
- Regoli, F., Nigro, M., Chiantore, M., Winston, G.W., 2002. Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Sci. Total Environ.* 289, 205-211.
- Ribeiro, S.M., Queiroz, J.H., Pelúzo, M.C.G., Costa, N.M.B., Matta, S.L.P., Queiroz, M.E.L.R., 2005. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. *Biosci. J.* 12, 133-149.
- Romero, M.C., Tapella, F., Sotelano, M.P., Ansaldo, M., Lovrich, G.A., 2011. Oxidative stress in the subantarctic false king crab *Paralomis granulosa* during air exposure and subsequent re-submersion. *Aquaculture.* 319, 205–210.
- Santovito, G., Piccinni, E., Cassini, A., Irato, P., Albergoni, V., 2005. Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140, 321-329.
- Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. *FEBS Lett.* 103, 287-290.
- Sies, H., 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25, 1058-1071.
- Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defenses. *Eur. J. Biochem.* 215, 213-219.
- Shick, J.M., Lesser, M.P., Stochaj, W.R., 1991. Ultraviolet-radiation and photooxidative stress in zooxanthellate Anthozoa: the sea anemone *Phyllodiscus semoni* and the octocoral *Clavularia* sp. *Symbio* 10, 145–173.

- Shick, J.M., Lesser, M.P., Dunlap, W.C., Stochaj, W.R., Chalker, B.E., Won, J.W., 1995. Depth-dependent response to solar ultraviolet-radiation and oxidative stress in the zooxanthellate coral *Acropora microphthalma*. *Mar. Biol.* 122, 41–51.
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. C* 123, 193-199.
- Stephenson, T.A., Stephenson A., 1949. The universal feature of zonation between tidemarks on rocky shores. *J. Ecol.* 38, 289-305.
- Storey, K.B., Storey, J., 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Q. Rev. Biol.* 65, 145-174.
- Storey, K. B., 1996. Functional metabolism: regulation and adaptation.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715-1733.
- Stotz, W.B., 1979. Functional morphology and zonation of three species of sea anemones from rocky shores in Southern Chile. *Mar. Biol.* 50, 181-188.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.* 46, 1612-1619.
- Vidolin, D., 2007. Tolerância à variação de parâmetros ambientais e sua influência sobre a distribuição espacial de anêmonas-do-mar na zona entremarés de um costão rochoso no sul do Brasil. Pós-graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B., 2007. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chem.-Biol. Interact.* 167, 219-226.

- White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., Kavanagh, T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.* 318, 175-180.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.
- Zange, J., Portner, O., Grieshaber, M.K., 1989. The anaerobic energy metabolism in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis* during contraction and cath. *Comp. Biochem. Physiol. B* 159, 349-359.
- Zwaan, A., Wijsman, T.C.M., 1976. Anaerobic metabolism in Bivalvia (Mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 54, 313-324.

TABLES

Table 1. Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP), glutathione (GSH) content, glutamate cysteine ligase (GCL) activity and lipid peroxidation (LPO) content in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* in different seasons (spring and autumn). Data were grouped independently on the sea anemone position in the substrate (exposed or non-exposed to air) and the time of collection. Data are expressed as mean \pm standard error. * Denotes significant different mean values ($p < 0.05$) between seasons for the same parameter.

Parameter	Season	
	Spring	Autumn
ACAP (1/relative area)	0.092 \pm 0.005 (n = 75)	0.094 \pm 0.004 (n = 83)
GSH (nmol/mg protein)	247.3 \pm 10.8 (n = 75)	239.1 \pm 18.7 (n = 72)
GCL (nmol GSH/mg protein/h)	392.9 \pm 19.3* (n = 70)	222.7 \pm 12.6 (n = 73)
LPO (nmol MDA/mg wet tissue)	2.96 \pm 0.07* (n = 79)	2.55 \pm 0.11 (n = 82)

Table 2. Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP), glutathione (GSH) content, glutamate cysteine ligase (GCL) activity and lipid peroxidation (LPO) content in submerged and emerged sea anemones (*Bunodosoma cangicum*) collected in spring. Data were grouped independently on the time of collection. Data are expressed as mean \pm standard error.

*Denotes significant different mean values ($p < 0.05$) between conditions for the same parameter.

Parameter	Condition	
	Submerged	Emerged
ACAP (1/relative area)	0.080 \pm 0.006 (n = 45)	0.111 \pm 0.008* (n = 30)
GSH (nmol/mg protein)	269.8 \pm 11.8 (n = 50)	215.1 \pm 16.9* (n = 35)
GCL (nmol GSH/mg protein/h)	433.4 \pm 28.4 (n = 45)	352.4 \pm 21.2 (n = 30)
LPO (nmol MDA/mg wet tissue)	2.89 \pm 0.08 (n = 48)	3.07 \pm 0.15 (n = 31)

Table 3. Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP), glutathione (GSH) content, glutamate cysteine ligase (GCL) activity and lipid peroxidation (LPO) content in submerged and emerged sea anemones (*Bunodosoma cangicum*) collected in autumn. Data were grouped independently on the time of collection. Data are expressed as mean \pm standard error.

*Denotes significant different mean values ($p < 0.05$) between conditions for the same parameter.

Parameter	Condition	
	Submerged	Emerged
ACAP (1/relative area)	0.084 \pm 0.005 (n = 46)	0.106 \pm 0.006* (n = 37)
GSH (nmol/mg protein)	273.5 \pm 22.1 (n = 39)	198.4 \pm 30.2* (n = 33)
GCL (nmol GSH/mg protein/h)	170.8 \pm 11.0 (n = 40)	289.3 \pm 19.9* (n = 32)
LPO (nmol MDA/mg wet tissue)	2.17 \pm 0.17 (n = 42)	2.95 \pm 0.10* (n = 40)

LEGEND TO FIGURES

Figure 1. Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) (A), glutathione (GSH) content (B), glutamate cysteine ligase (GCL) activity (C) and lipid peroxidation (LPO) content (D) in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* collected in spring (●) and autumn (○) at different daytimes. Data were grouped independently on the sea anemone position in the substrate (exposed or non-exposed to air). Data are expressed as mean ± standard error (spring: n = 70-79; autumn: n = 72-83). Different capital and small letters denotes significant different mean values ($p < 0.05$) among daytimes for spring and autumn sea anemones, respectively.

Figure 2. Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) (A), glutathione (GSH) content (B), glutamate cysteine ligase (GCL) activity (C), reactive oxygen species (ROS) content (D), lipid peroxidation (LPO) content (E) and ATP content (F) in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* always kept submerged (●) or daily subjected to a 3-h period of emersion (from 12:00 h to 15:00 h) in the laboratory. Data are expressed as mean ± standard error (submerged: n = 3-5; emerged: n = 4-5). Different capital and small letters denotes significant different mean values ($p < 0.05$) among daytimes for sea anemones always kept submerged (●) and those subjected to the emersion/submersion (○) cycle, respectively.

FIGURES

Figure 1A

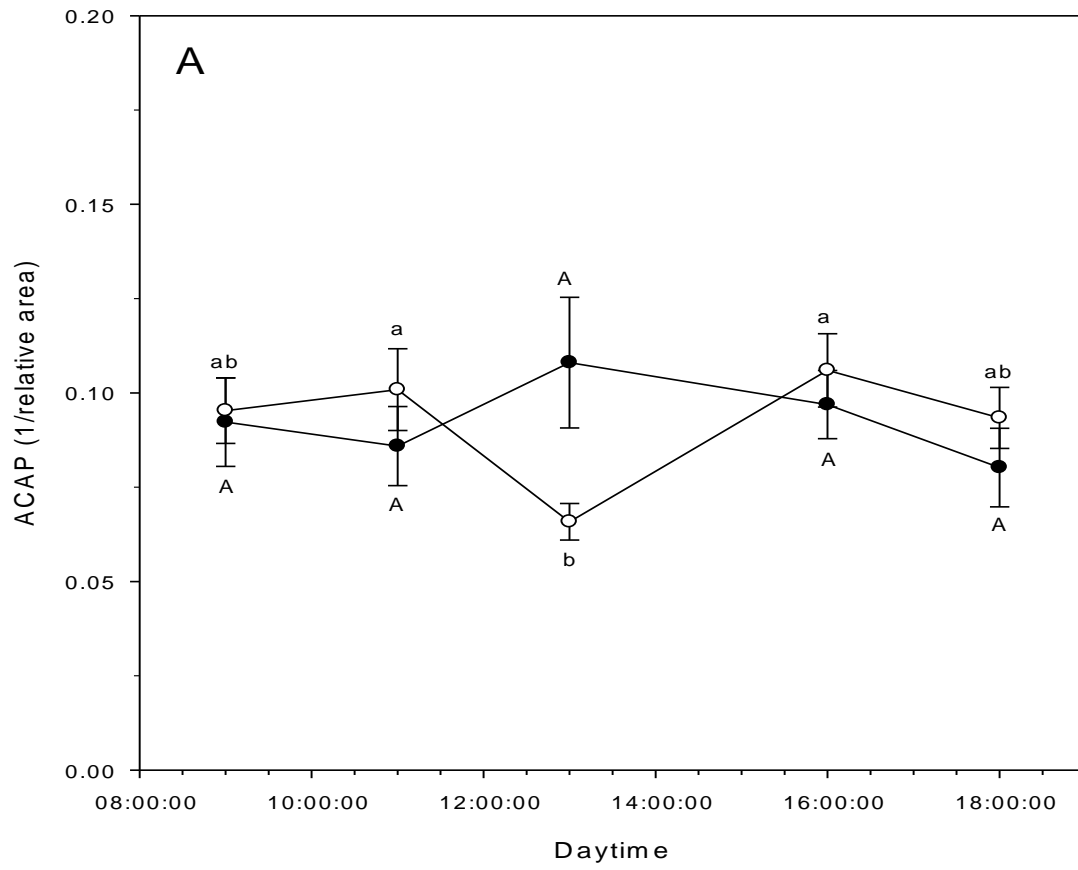


Figure 1B

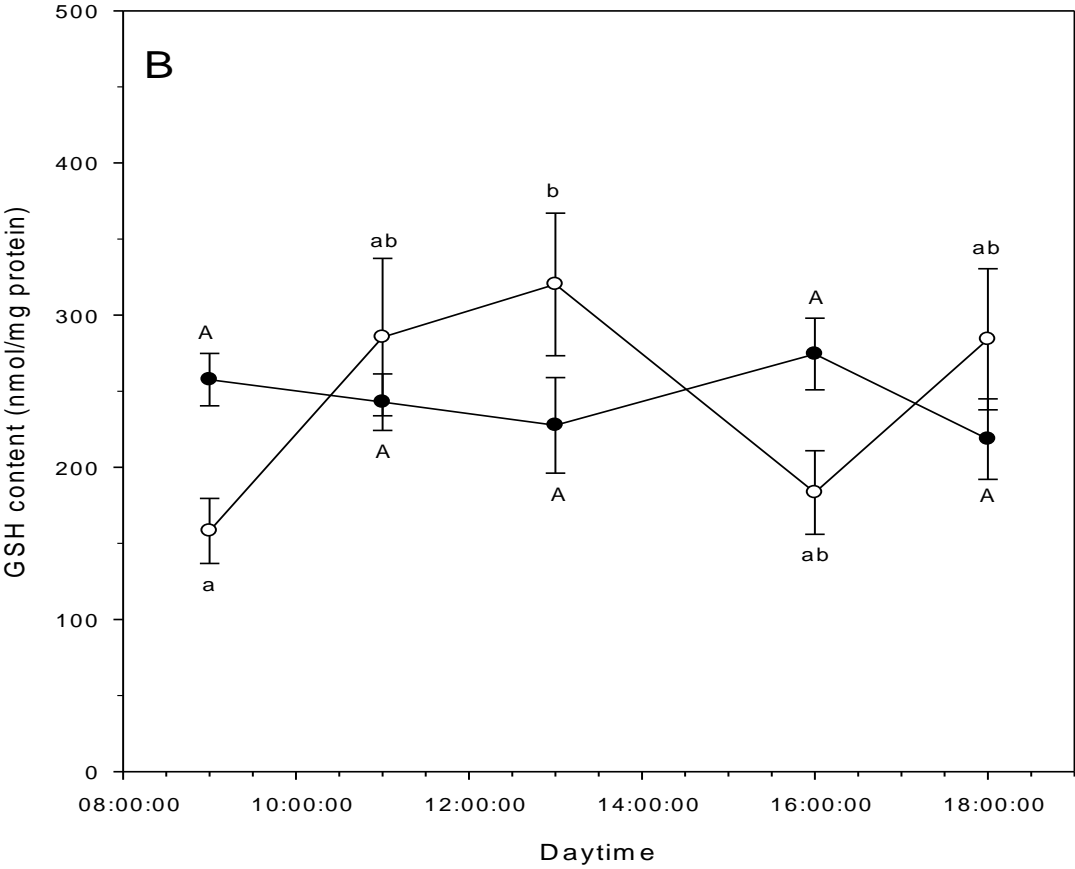


Figure 1C

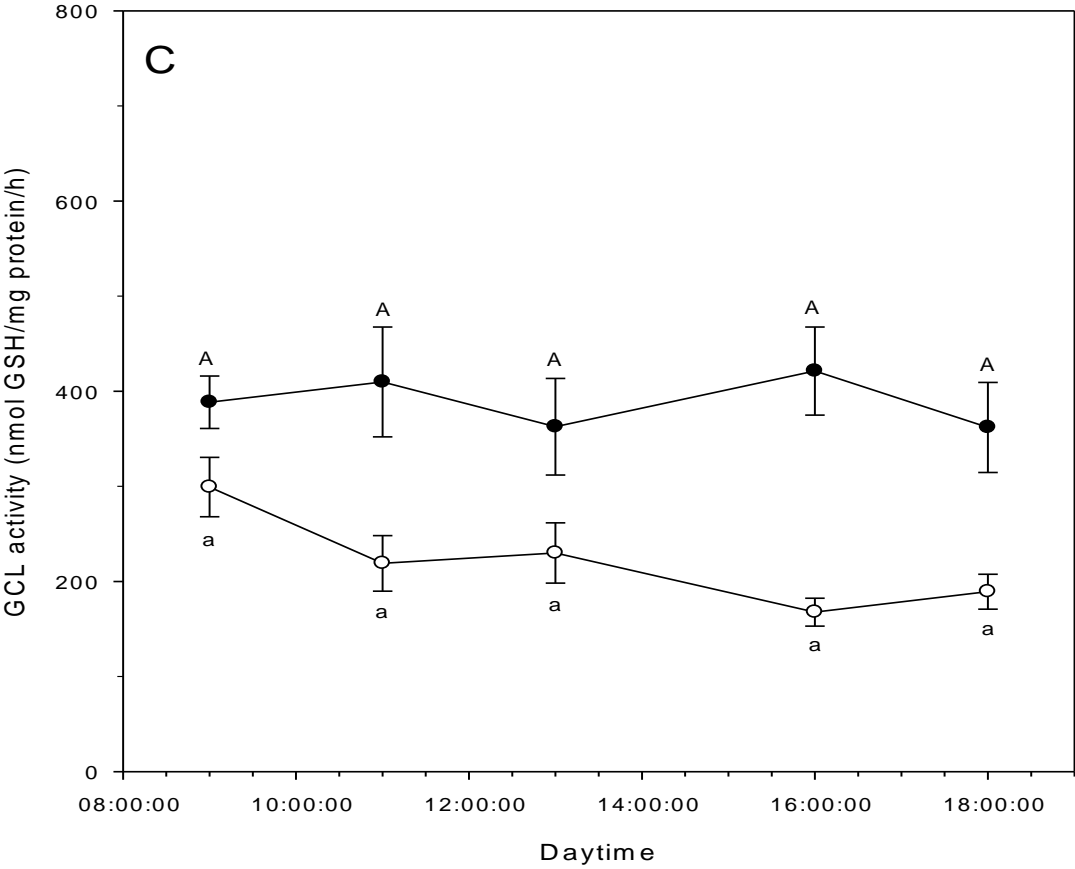


Figure 1D

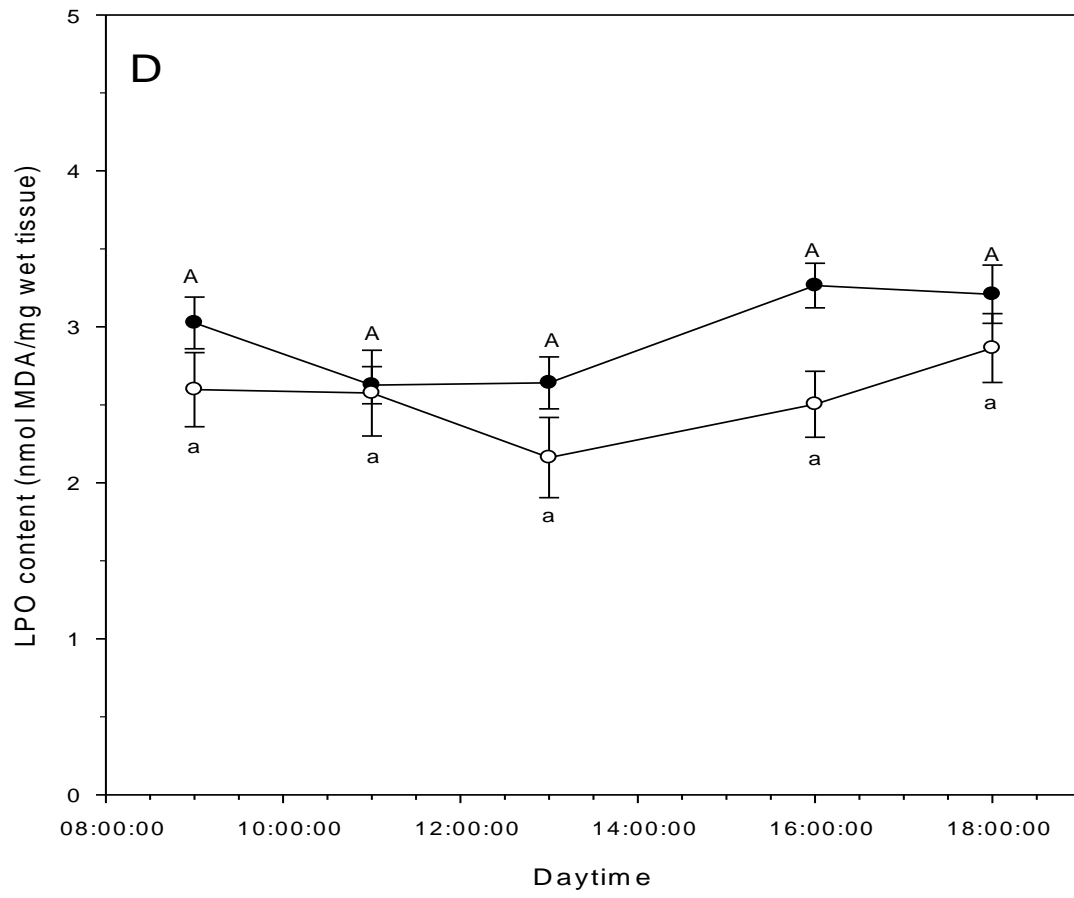


Figure 2A

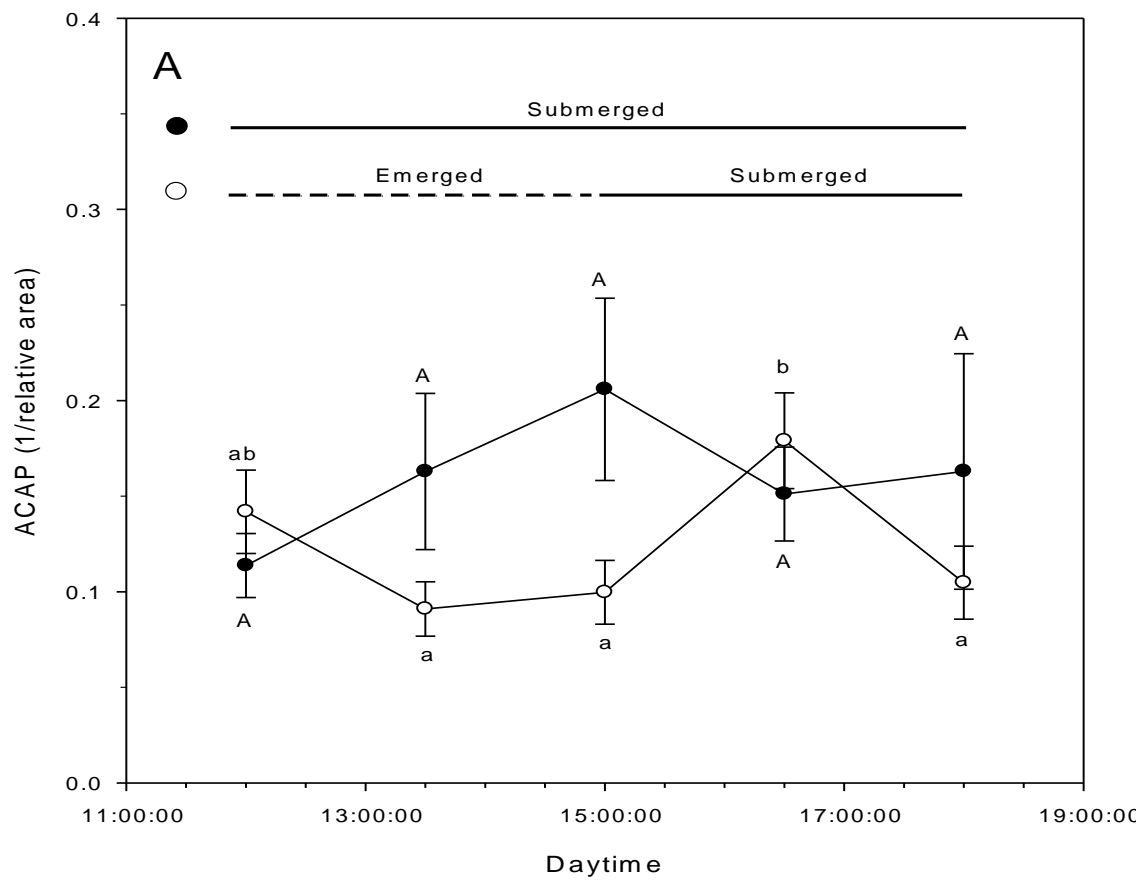


Figure 2B

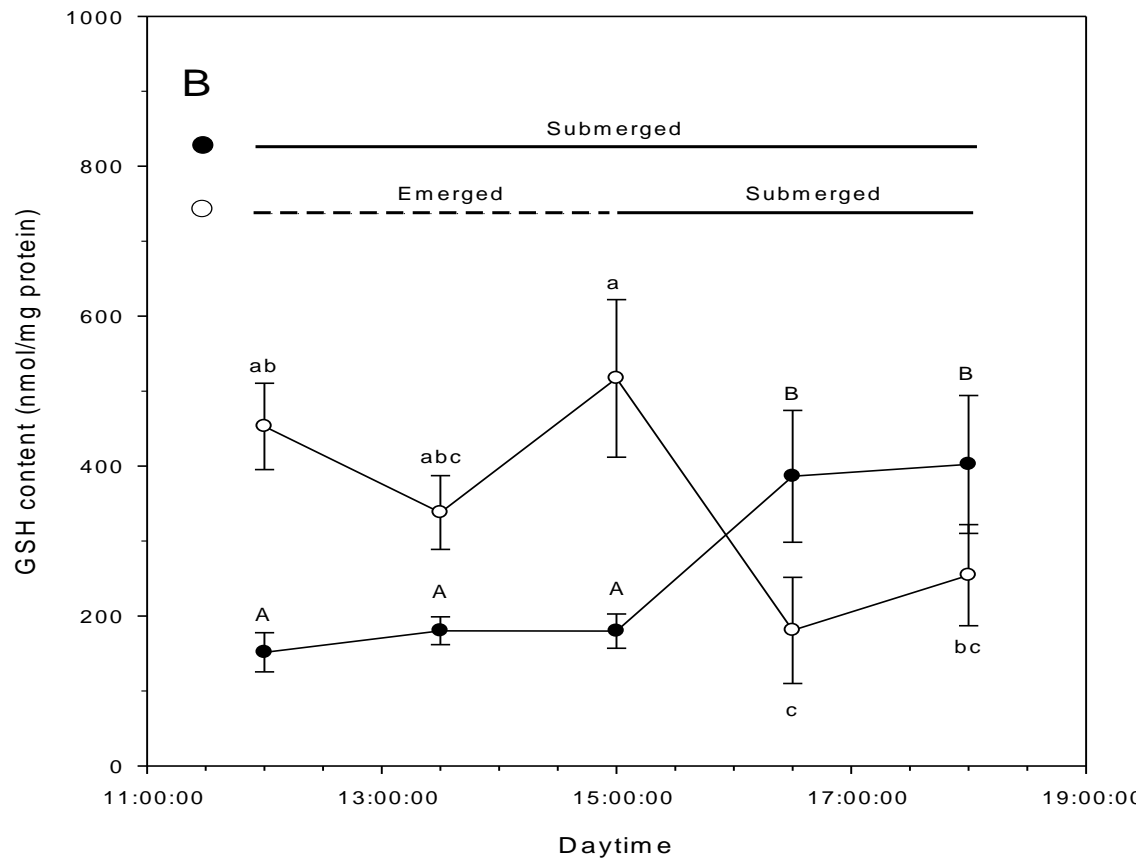


Figure 2C

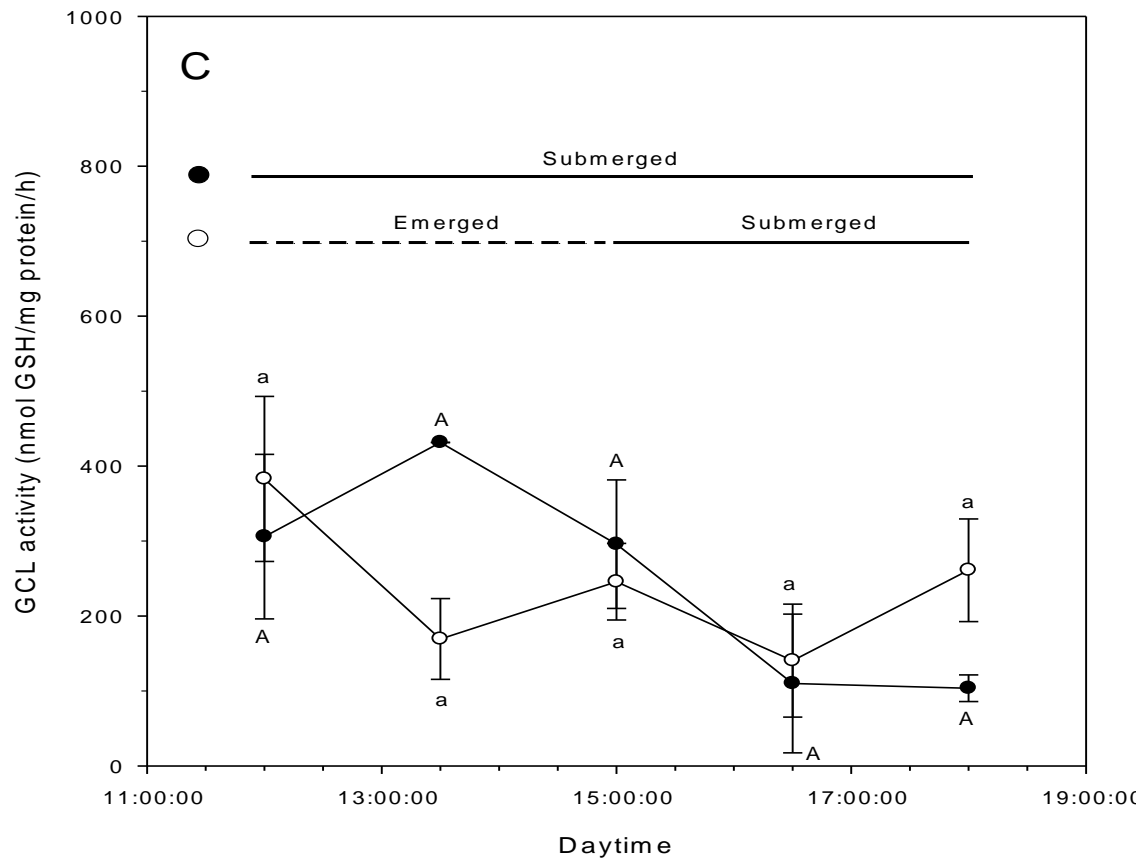


Figure 2D

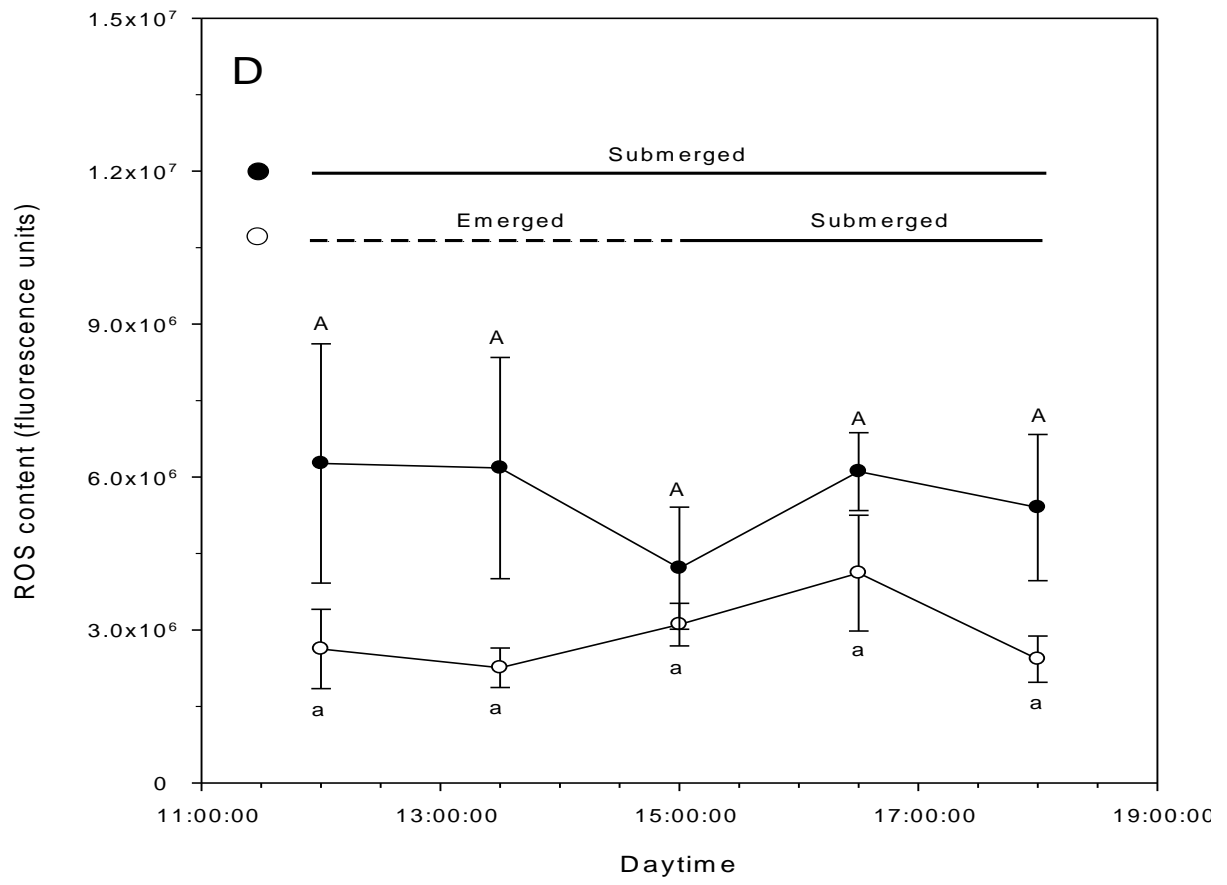


Figure 2E

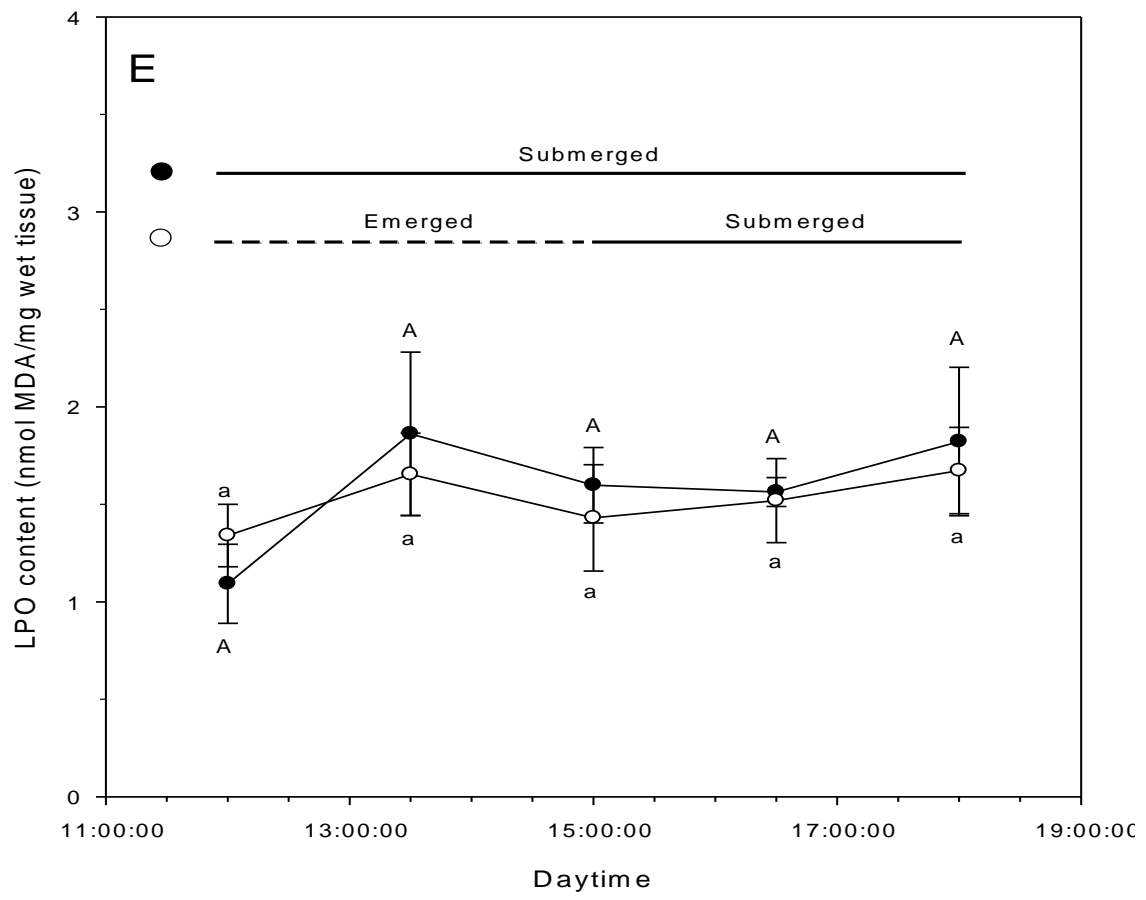
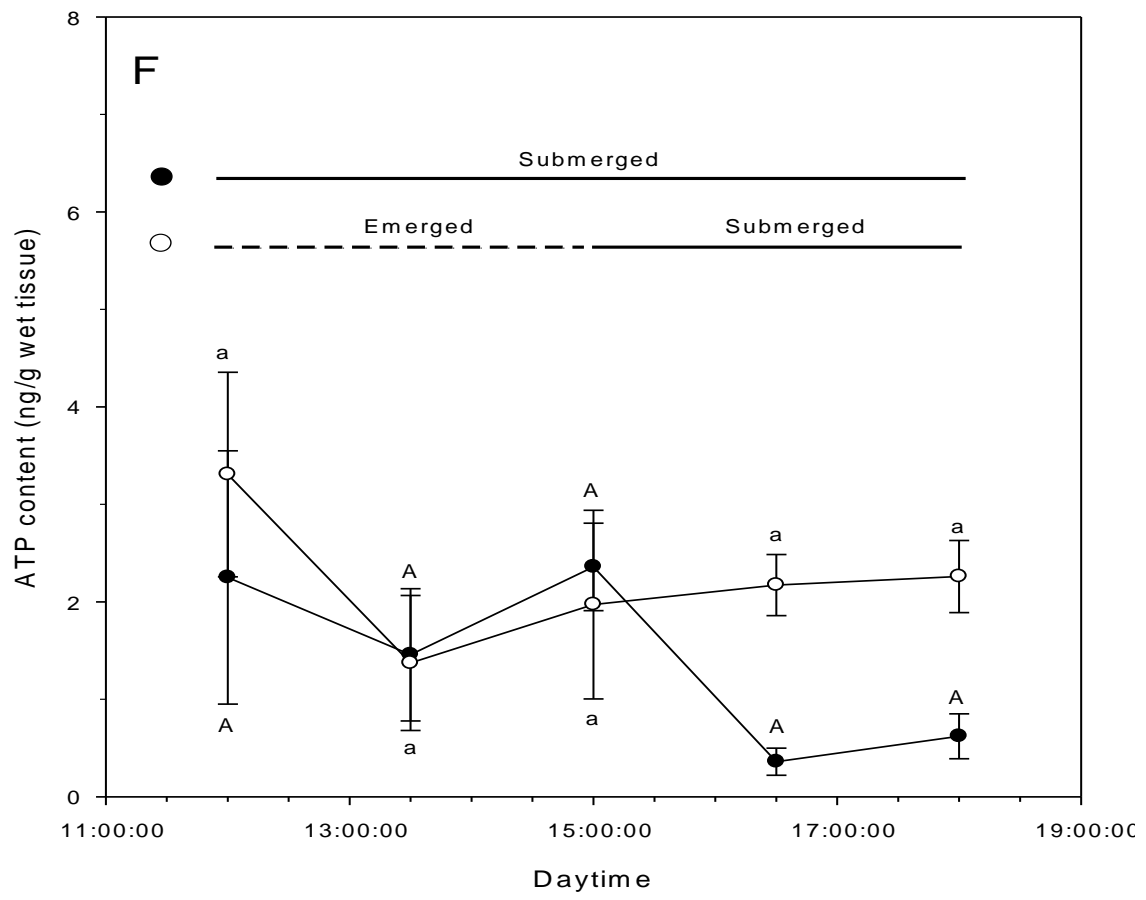


Figure 2F



CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os parâmetros oxidativos analisados na anêmona-do-mar *B. cangicum* não variam expressivamente em função da hora do dia. Porém, eles demonstram claramente que estes parâmetros variam significativamente com a estação do ano (atividade da GCL e LPO) ou com a exposição ao ar (ACAP e conteúdo de GSH). Além disso, foi observada uma resposta diferencial dos parâmetros oxidativos durante a exposição das anêmonas-do-mar ao ar em campo ou sob condições controladas em laboratório. Este resultado indica que os parâmetros controlados em laboratório, tais como temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa, tem uma importante influência na resposta dos Parâmetros oxidativos analisados quando *B. cangicum* é exposta ao ar em campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amado, E.M., Vidolin, D., Freire, C.A., Souza, M.M., 2011. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. *Comp. Biochem. Physiol.* 158, 542-551.
- Amaral, F.D., Hudson, M.M., Silveira, F.L.D., Migotto, A.E., Pinto, S.M., Longo, L., 2000. Cnidarians of Saint Peter and Saint Paul Archipelago, Northeast Brazil. 9th International Coral Reef Symposium, pp. 23-27.
- Arduini, A., Mezzetti, A., Porreca, E., Lapenna, D., DeJulia, J., Marzio, L., Polidoro, G., Cuccurullo, F., 1988. Effect of ischemia and reperfusion on antioxidant enzymes and mitochondrial inner membrane proteins in perfused rat heart. *Biochim. Biophys.* 970, 113-121.

- Bains, J.S., Shaw, C.A., 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res. Rev.* 25, 335-58.
- Bergendi, L., Benes, L., Duracková, Z., Ferencik, M., 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65, 1865-1874.
- Bickler, P.E., Buck, L.T., 2007. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 145-170.
- Borges, J.T., Guedes, S., Moura, E.F., Dias, D., 2007. Densidade, uso do hábitat e distribuição de *Bunodosoma cangicum* Corrêa, 1964 (Cnidaria, Anthozoa, Actiniidae) nos recifes do Cabo Branco (João Pessoa, PB). *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu.*
- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913-921.
- Boutilier, R.G., 2001. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J. Exp. Biol.* 204, 3171-3181.
- Cha, H.-R., Buddemeier, R.W., Fautin, D.G., Sandhei, P., 2004. Distribution of sea anemones (Cnidaria, Actiniaria) in Korea analyzed by environmental clustering. *Hydrobiologia* 530, 497-502.
- Connell, J.H., 1972. Community interactions on marine rocky intertidal shores. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 3, 169-192.
- Corrêa, D.D., 1964. Corallimorpharia e Actiniaria do Atlântico Oeste Tropical. Tese de Livre Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Dahms, H.U., Lee, J.S., 2010. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquat. Toxicol.* 97, 3-14.

- Dalle-Done, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milazani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim.* 329, 23-38.
- De Capitani, J.D., 2007. Estrutura populacional e variabilidade genética de anêmonas-do-mar da região entremarés de costão rochoso. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Fautin, D.G., Allen, G.R., 1994. *Anemone Fishes and Their Host Sea Anemones*. Tetra Sales, Blacksburg.
- Ferreira, R., Milei, J., Grana, D. 1999. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in the heart. *J. Publ. Health* 8, 97-101.
- Gomes, P.B., Belém, M.J., Schlenz, E. 1998. Distribution, abundance and adaptations of three species of Actiniidae (Cnidaria, Actiniaria) on an intertidal beach rock in Carneiros beach. Pernambuco, Brazil. *Misc. Zool.* 21, 65-72.
- Gondran, M., Eckeli, A.L., Miguez, P.V., Gabilan, N.H., Rodrigues, A.L.S., 2002. The crude extract from the sea anemone, *Bunodosoma caissarum* elicits convulsions in mice: possible involvement of the glutamatergic system. *Toxicon* 40, 1667-1674.
- Halliwell, B., 1993. Oxidative DNA damage: meaning and measurement. In: Halliwell, B., Auroma, O.I. (Eds.), *DNA and Free Radicals*. Ellis Horwood, New York.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford University Press, New York.
- Hart, C.E., Crowe, J.H., 1977. The effect of attached gravel on survival of intertidal anemones. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 96, 28-41.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 2001. Protein adaptations and signal to oxygen availability during environmental stress. Elsevier Science.
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savin, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 133, 537-556.

- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, pp. 319-368.
- Hickman, C.P.J., Roberts, L.S., Larson, A., 2009. *Princípios Integrados de Zoologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, Princeton.
- Issartel, J., Hervant, F., Fraipont, D.E.M., Clobert, J., Voituron, Y., 2009. High anoxia tolerance in the subterranean salamander *Proteus anguinus* without oxidative stress nor activation of antioxidant defenses during reoxygenation. *J Comp. Physiol.* 179, 543-551.
- Joyner-Matos, J., Downs, C.A., David, J., 2006. Increased expression of stress proteins in the surf clam *Donax variabilis* following hydrogen sulfide exposure. *Comp. Biochem. Physiol. A* 145, 245-257.
- Keeling, P.L., Smith, L.L., 1982. Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3243-3249.
- Lemaire, P., Livingstone, D.R., 1993. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 1, 1119-1147.
- Letendre, J., Chouquet, B., Rocher, B., Manduzio, H., Le Boulenger, F., Durand, F., 2008. Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 148, 211-216.

- Letendre, J., Chouquet, B., Manduzio, H., Marin, M., Bultelle, F., Leboulenger, F., Durand F., 2009. Tidal height influences the levels of enzymatic antioxidant defences in *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* 67, 69-74.
- 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. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, 100-107.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 36-41.
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebr. Surviv. J.* 2, 91-104.
- Malanga, G., Estevez, M.S., Calvo, J., Abele, D., Puntarulo, S., 2007. The effect of seasonality on oxidative metabolism in *Nacella (Patinigera) magellanica*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146, 551-558.
- Melo, K.V., Amaral, F.D., 2005. Ampliação da distribuição das anêmonas-do-mar (Cnidaria, Actiniaria) no estado de Pernambuco, Brasil. *Trop. Oceanogr.* 33, 19-31.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005. *Lehninger - Princípios de Bioquímica*. W.H. Freeman.
- Newell, R.C., Walkey, M., 1966. Oxidative activity of mammalian liver mitochondria as a function of temperature. *Nature* 212, 428-429.
- Nybakken, J.W., 1988. *Marine Biology: An Ecological Approach*. Harper-Collins Publishers, New York.
- Nogueira Jr., M., Robert, M.C., Haddad, M.A., 2006. *Calliactis tricolor* (Anthozoa, Acontinaria) epibionte em *Brachyura* (Crustacea, Decapoda) no litoral sul do Paraná e Norte de Santa Catarina. *Acta Biol. Par.* 35, 233-248.

- Power, A., Sheehan, D., 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 114, 99-103.
- Reed, D.J., 1986. Regulation of reductive processes by glutathione. *Biochem. Pharmacol.* 35, 7-13.
- Regoli, F., Nigro, M., Chiantore, M., Winston, G.W., 2002. Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Sci. Total Environ.* 289, 205-211.
- Ribeiro, S.M., Queiroz, J.H., Pelúzo, M.C.G., Costa, N.M.B., Matta, S.L.P., Queiroz, M.E.L.R., 2005. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. *Biosci. J.* 12, 133-149.
- Ribeiro-Costa, C.S., Da-Rocha, R.M., 2006. *Invertebrados: Manual de Aulas Práticas*. Holos Editora, Ribeirão Preto.
- Richardson, D.L., Harriott, V.J., Harrison, P.L., 1997. Distribution and abundance of giant sea anemones (Actiniaria) in subtropical eastern Australian waters. *Mar. Fresh. Res.* 48, 59-66.
- Rutherford, L.D., Thuesen E.V., 2005. Metabolic performance and survival of medusae in estuarine hypoxia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 294, 189-200.
- Santovito, G., Piccinni, E., Cassini, A., Irato, P., Albergoni, V., 2005. Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140, 321-329.
- Sassaman, C., Mangum, C.P., 1972. Adaptations to environmental oxygen levels in infaunal and epifaunal sea anemones. *Biol. Bull.* 143, 657-678.
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. C* 123, 193-199.

- Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. *FEBS Lett.* 103, 287-290.
- Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defenses. *Eur. J. Biochem.* 215, 213-219.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715-1733.
- Stotz, W.B., 1979. Functional morphology and zonation of three species of sea anemones from rocky shores in Southern Chile. *Mar. Biol.* 50, 181-188.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335-344.
- Vidolin, D., 2007. Tolerância à variação de parâmetros ambientais e sua influência sobre a distribuição espacial de anêmonas-do-mar na zona entremarés de um costão rochoso no sul do Brasil. Tese de Doutorado. Pós-graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.
- Zaharenko, A.J., Ferreira Jr, W.A., Oliveira, J.S., Richardson, M., Pimenta, D.C., Konno, K., Portaro, F.C.V., Freitas, J.C., 2008a. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins. *Comp. Biochem. Physiol.* 3, 219-225.
- Zaharenko, A.J., Ferreira, JR W.A., Oliveira, J.S., Richardson, M., Pimenta, D.C., Konno, K., Portaro, F.C.V., Freitas, J.C., 2008b. Revisiting cangitoxin, a sea anemone peptide: Purification and characterization of cangitoxins II and III from the venom of *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon* 51, 1303-1307.