

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

VARIAÇÃO SAZONAL DO ESTRESSE OXIDATIVO NO MO-
LUSCO *Megalobulimus oblongus* E RATOS WISTAR

MARIA ISABEL MORGAN MARTINS

Orientador
Prof. D^{ra}. Adriane Belló Klein

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, ênfase em Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas - Fisiologia.

Porto Alegre, dezembro de 1997.

O homem não evoluiu, está evoluindo. A evolução o leva ao centro espiritual do Universo. O homem e somente o homem sabe que o mundo evolui e ele evolui com o mundo. Mudando o que o homem conhece sobre o mundo, muda o mundo que ele conhece; e mudando o mundo em que ele vive, o homem muda a si mesmo.”

T. Dobzhansky

AGRADECIMENTOS

A Deus e à mãe de todas as mães, Maria, pela força que carrego, pelo apoio e consolo, que me concedem fazer coisas que às vezes detenho-me a pensar serem extremamente impossíveis.

Com amor ao meu esposo Heráclito, pela presença constante, a minha filha Marina, que nasceu, cresceu junto com este trabalho, e ao Daniel pelo carinho e incentivo.

Aos meus pais, Vasco e Ana, pelo incentivo constante à busca do crescimento e realização pessoal, e ajuda na criação dos moluscos.

À Adriane, *Nica*, uma pessoa especial, pelo seu exemplo de vida, pela ajuda constante, orientações seguras, e por presentear-me com esta linha de pesquisa, na qual me apaixonei. À Dra. Susana pela amizade, companheirismo e exemplo de trabalho.

A todos os meus familiares pelo apoio recebido, em especial a minha irmã Diná, pelo incentivo e colaboração na confecção dos desenhos e ao meu sobrinho Gabriel que ajudou na edição dos mesmos.

Aos colegas do laboratório de fisiologia cardiovascular Jaqueline Barp, Patricia Di Pietro, Alcir e Hélio pela sua colaboração na parte experimental, e ao Álvaro e Silvia pelo auxílio nas análises computacionais.

Às funcionárias Tânia Regina, Ritinha e Fátima pela amizade e sua pronta colaboração nas tarefas do laboratório.

Ao professor Belló pela amizade e orientação segura.

À Vovó Carolina, pela coleta e criação dos moluscos.

E a todos aqueles professores e colegas que ao longo deste trabalho compartilharam seus conhecimentos profissionais e principalmente humanos, e também, por aqueles que apenas passaram.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 07 |
| ÍNDICE DE TABELAS | 12 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 15 |
| RESUMO..... | 17 |
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Espécies ativas de oxigênio | 18 |
| 1.1.1 Considerações gerais..... | 18 |
| 1.1.2 Definição de radical livre | 21 |
| 1.1.3 Formação de EAO em sistemas biológicos | 22 |
| 1.1.4 Efeitos biológicos | 30 |
| 1.2 Defesas antioxidantes..... | 34 |
| 1.3 RL como espécies úteis | 39 |
| 1.4 Isquemia/reperfusão | 42 |
| 1.5 Molusco - <i>Megalobulimus oblongus</i> | 45 |
| 1.6 Ritmos biológicos | 47 |
| 1.7 Objetivo geral | 51 |
| 1.7.1 Objetivos específicos | 51 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 53 |
| 2.1 Animais | 53 |
| 2.2 Reagentes..... | 54 |
| 2.3 Soluções utilizadas..... | 55 |
| 2.3.1 Homogeneizado | 55 |
| 2.3.2 Medida de quimiluminescência | 55 |
| 2.3.3 Medida de TBA-RS | 56 |

| | |
|--|-----|
| 2.3.4 Medida de proteína | 56 |
| 2.3.5 Medida de catalase | 57 |
| 2.3.6 Medida da glutathiona peroxidase | 57 |
| 2.4 Grupos experimentais | 59 |
| 2.5 Procedimento experimental..... | 59 |
| 2.6 Preparação do homogeneizado | 60 |
| 2.7 Medidas de LPO | 61 |
| 2.7.1 Determinação da quimiluminescência..... | 61 |
| 2.7.2 Teste do TBA-RS no homogeneizado..... | 62 |
| 2.8 Medidas enzimáticas..... | 63 |
| 2.8.1 Catalase | 63 |
| 2.8.2 Glutathiona peroxidase | 64 |
| 2.9 Medida de proteína | 65 |
| 2.10 Análise estatística | 66 |
| 3 RESULTADOS | 67 |
| 3.1 Lipoperoxidação - TBA-RS..... | 68 |
| 3.2 Lipoperoxidação - QL..... | 80 |
| 3.3 Enzima catalase | 92 |
| 3.4 Glutathiona peroxidase | 104 |
| 3.5 Proteína lowry | 116 |
| 3.6 Resumo dos resultados..... | 128 |
| 4 DISCUSSÃO | 132 |
| 5 CONCLUSÕES | 146 |
| 5.1 Estresse oxidativo e variações sazonais..... | 146 |
| 5.2 Enzimas antioxidantes | 147 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 148 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| 1. Redução monoelétrica do oxigênio formando EAO | 22 |
| 2. Estrutura eletrônica de espécies ativas de oxigênio (EAO).. | 22 |
| 3. Representação eletrônica da dismutação do ânion radical superóxido, através do modelo atômico de Bohr | 24 |
| 4. Esquema geral das principais fontes celulares de produção e metabolização de EAO. | 29 |
| 5. Reações em cadeia da lipoperoxidação | 32 |
| 6. Efeito da LPO sobre as membranas celulares..... | 33 |
| 7. Sistemas de defesa antioxidante contra dano oxidativo induzido por RL. | 35 |
| 8. Mecanismo de defesa enzimática contra as EAO | 36 |
| 9. Processo de oxidação da glutathione. | 37 |
| 10. Esquema representando a ação das EAO nas infecções bacterianas..... | 41 |
| 11. Mecanismo gerador do dano celular mediado por EAO durante o processo de isquemia-reperfusão | 45 |
| 12. Representação do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 47 |

| | |
|--|----|
| 13. TBA-RS nas quatro estações do ano obtidos para o coração do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 70 |
| 14. TBA-RS nas quatro estações do ano obtidos para o hepatopâncreas do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 71 |
| 15. TBA-RS nas quatro estações do ano obtidos para o músculo do pé do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 72 |
| 16. TBA-RS nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 73 |
| 17. TBA-RS nas quatro estações do ano obtidos para o coração de ratos machos Wistar..... | 76 |
| 18. TBA-RS nas quatro estações do ano obtidos para o fígado de ratos machos Wistar..... | 77 |
| 19. TBA-RS nas quatro estações do ano obtidos para o músculo esquelético de ratos machos Wistar.. | 78 |
| 20. TBA-RS nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão de ratos machos Wistar..... | 79 |
| 21. QL nas quatro estações do ano obtidos para o coração do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 82 |
| 22. QL nas quatro estações do ano obtidos para o hepatopâncreas do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 83 |
| 23. QL nas quatro estações do ano obtidos para o músculo do pé do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 84 |
| 24. QL nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 85 |

| | |
|---|-----|
| 25. QL nas quatro estações do ano obtidos para o coração de ratos machos Wistar. | 88 |
| 26. QL nas quatro estações do ano obtidos para o fígado de ratos machos Wistar..... | 89 |
| 27. QL nas quatro estações do ano obtidos para o músculo esquelético de ratos machos Wistar..... | 90 |
| 28. QL nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão de ratos machos Wistar..... | 91 |
| 29. Catalase nas quatro estações do ano obtidos para o coração molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 94 |
| 30. Catalase nas quatro estações do ano obtidos para o hepatopâncreas do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 95 |
| 31. Catalase nas quatro estações do ano obtidos para o músculo do pé do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 96 |
| 32. Catalase nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 97 |
| 33. Catalase nas quatro estações do ano obtidos para o coração de ratos machos Wistar..... | 100 |
| 34. Catalase nas quatro estações do ano obtidos para o fígado de ratos machos Wistar. | 101 |
| 35. Catalase nas quatro estações do ano obtidos para o músculo esquelético de ratos machos Wistar | 102 |
| 36. Catalase nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão de ratos machos Wistar..... | 103 |

| | |
|--|-----|
| 37. Glutaciona peroxidase nas quatro estações do ano obtidos para o coração do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 106 |
| 38. Glutaciona peroxidase nas quatro estações do ano obtidos para o hepatopâncreas do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 107 |
| 39. Glutaciona peroxidase nas quatro estações do ano obtidos para o músculo do pé do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 108 |
| 40. Glutaciona peroxidase nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 109 |
| 41. Glutaciona peroxidase nas quatro estações do ano obtidos para o coração de ratos machos Wistar. | 112 |
| 42. Glutaciona peroxidase nas quatro estações do ano obtidos para o fígado de ratos machos Wistar.. | 113 |
| 43. Glutaciona peroxidase nas quatro estações do ano obtidos para o músculo esquelético de ratos machos Wistar..... | 114 |
| 44. Glutaciona peroxidase nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão de ratos machos Wistar. | 115 |
| 45. Proteína nas quatro estações do ano obtidos para o coração do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 118 |
| 46. Proteína nas quatro estações do ano obtidos para o hepatopâncreas do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 119 |
| 47. Proteína nas quatro estações do ano obtidos para o músculo do pé do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 120 |
| 48. Proteína nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão do molusco <i>Megalobulimus oblongus</i> | 121 |

| | |
|--|-----|
| 49. Proteína nas quatro estações do ano obtidos para o coração de ratos machos Wistar..... | 124 |
| 50. Proteína nas quatro estações do ano obtidos para o fígado de ratos machos Wistar. | 125 |
| 51. Proteína nas quatro estações do ano obtidos para o músculo esquelético de ratos machos Wistar. | 126 |
| 52. Proteína nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão de ratos machos Wistar..... | 127 |
| 53. Vista dorsal da cavidade palial. AU - aurícula; CO - coração; CR - cavidade respiratória (=pulmão); IM - intestino médio; IP - intestino posterior (=reto); ME - membrana pericárdica (=pericárdio); VE - ventrículo. | 134 |
| 54. Vista geral do fígado de molusco (hepatopâncreas)..... | 136 |

ÍNDICE DE TABELAS

1. Reagentes utilizados, seus respectivos pesos moleculares e fornecedores. ...54
2. Resultados obtidos de TBA-RS (nmol/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes tecidos estudados do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.69
3. Resultados obtidos de TBA-RS (nmol/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.75
4. Resultados obtidos da QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.81
5. Resultados obtidos de QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.87

6. Resultados obtidos da enzima catalase (μ moles/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.93
7. Resultados obtidos da enzima catalase (pmoles/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.99
8. Resultados obtidos da enzima glutaciona peroxidase (nmoles/min/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.....105
9. Resultados obtidos da enzima glutaciona peroxidase (nmoles/min/mg de proteína), nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.111
10. Resultados de Proteína (mg/ml) obtidos nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores são expressos em média \pm erro padrão da média.....117
11. Resultados de proteína (mg/ml) obtidos nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.123

12. Resultados obtidos nos ensaios de LPO (TBA-RS e QL) e enzimas antioxidantes (CAT e GPx) no verão e inverno para o molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.129
13. Resultados obtidos nos ensaios de LPO (TBA-RS e QL) e enzimas antioxidantes (CAT e GPx) no verão e no inverno para os diferentes órgãos de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.131

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| $O_2^{\bullet -}$ | Radical superóxido |
| ☀ | Símbolo representando a primavera |
| ♠ | Símbolo representando o inverno |
| ❖ | Símbolo representando o outono |
| ★ | Símbolo representando o verão |
| $^{\bullet}OH$ | Radical hidroxil |
| 1O_2 | Oxigênio singlet |
| AA | Sítio apurínico / apirimidínico |
| ADP | Difosfato de adenosina |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| CAT | Catalase |
| c-GMP | Guanosina monofosfato cíclico |
| CuZn -SOD | Superóxido dismutase que contém cobre e zinco (citosólica) |
| Cys | Cisteína |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EAO | Espécies ativas de oxigênio |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| EPM | Erro padrão da média |
| Glu | Glutamina |
| Gly | Glicina |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| GR | Glutathione reductase |
| GSH | Glutathione reduzida |
| GSSG | Glutathione oxidada |

| | |
|-------------------------------------|---|
| H ⁺ | Íon hidrogênio |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| Hb | Hemoglobina |
| KCl | Cloreto de potássio |
| LPO | Lipoperoxidação |
| Mn-SOD | Superóxido dismutase que contém mangânês (mitocondrial) |
| MPA | Ácido metafosfórico |
| n | Número de amostras |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido |
| NSQ | Núcleo supraquiasmático |
| O ₂ | Oxigênio molecular |
| Pi | Fosfato |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonila |
| PROT | Proteína |
| QL | Quimiluminescência |
| RL | Radical livre |
| ROO [•] | Radical peroxil |
| SH | Grupo sulfidril |
| SOD | Superóxido dismutase |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TBA-RS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| t-BOOH | Hidroperóxido de tert-butil |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TOA | Trato óptico acessório |
| TOP | Trato óptico principal |

RESUMO

Foi estudado neste trabalho o perfil oxidativo do molusco *Megalobulimus oblongus* e de ratos machos Wistar, nas distintas estações do ano. O *Megalobulimus oblongus*, é um caracol da América do Sul, que se enterra durante o inverno e, na primavera, retorna à superfície. Este comportamento sazonal nos pareceu ser um modelo natural de hipóxia e reoxigenação. Nesta situação, há aumento da formação de espécies ativas de oxigênio (EAO), que leva ao estresse oxidativo. Este trabalho teve por objetivo caracterizar o molusco em termos de estresse oxidativo, investigando os níveis de lipoperoxidação (LPO) e a atividade das enzimas antioxidantes em diferentes tecidos de ambas as espécies.

Os tecidos dos moluscos estudados foram: coração, hepatopâncreas, músculo do pé e pulmão, e os tecidos dos ratos foram: coração, fígado, músculo esquelético e pulmão. Foram estabelecidos quatro grupos experimentais: primavera, verão, outono e inverno para cada espécie, sendo utilizados 5 amostras de 10 animais por estação do molusco *Megalobulimus oblongus* e 5 amostras por estação de ratos machos Wistar. Nestes grupos foram realizadas medidas de LPO através da quimioluminescência (QL) e do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), bem como as medidas das enzimas antioxidantes: catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx).

Os resultados obtidos na LPO, para ambas as espécies, foram semelhantes, pois percebemos variações sazonais. No TBA-RS, observamos que em todos os tecidos estudados houve maior LPO na primavera e verão e queda dos níveis durante o inverno, o mesmo ocorrendo no ensaio da QL. Quanto às enzimas antioxidantes, nas amostras dos tecidos dos ratos observamos que a CAT apresentou-se diminuída nos meses mais frios e aumentada nos meses mais quentes. O mesmo foi observado para GPx. O molusco não apresentou um padrão homogêneo de resposta em todos os tecidos. A enzima catalase está na ordem de μ moles enquanto que no rato ela está na ordem de nmoles, o que confere ao molusco maior proteção ao ataque das EAO. Estas variações podem ser devidas a uma redução metabólica no outono e no inverno, bem como um aumento da atividade metabólica na primavera e no verão. Outro fator a ser considerado são os níveis de melatonina, que se apresentam aumentadas nas estações mais frias. A melatonina é uma substância que neutraliza o radical hidroxil, agindo como antioxidante. Para testar esta hipótese seria necessário medir os níveis de melatonina sazonalmente, bem como, a capacidade antioxidante total.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO

1.1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em toda a natureza, há formação de espécies ativas de oxigênio (EAO); na atmosfera, a formação de ozônio, elemento indispensável à vida humana, se faz através da formação prévia de EAO. E o que vemos na natureza é sempre um caráter bifacial; o mesmo oxigênio que nos é fundamental à sobrevivência também forma EAO. E seria assim o oxigênio como o deus Janus, com uma face sorridente e outra carrancuda, ou como a deusa hindu Kali, dando a vida com uma das mãos e tirando-a com a outra.

Aliás, os efeitos destrutivos do oxigênio se encontram em toda a natureza: ferrugem, manchas na prataria e corrosão de tubulações. A própria produção de ozônio é típica desse caráter bifacial: protege-nos contra as irradiações cósmicas e é deletério aos organismos, formando EAO em excesso (OLSZEWER, 1992).

Assim, sabemos que a evolução da vida na Terra está ligada intimamente ao oxigênio, pois a maioria dos animais e plantas requer oxigênio para eficiente produção de energia. Calcula-se que o oxigênio livre apareceu na atmosfera terrestre em quantidades significantes há 2×10^9 anos, provavelmente devido à evolução dos organismos fotossintetizantes. O aparecimento da camada de ozônio provavelmente

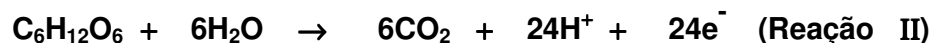
permitiu a evolução de organismos mais complexos na face da Terra (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1988).

Com a descoberta do oxigênio como componente químico do ar por Priestley (1774), foi descrita quase que simultaneamente a sua toxicidade. Lavoisier, já em 1783, provou que altas pressões de oxigênio tinham efeito tóxico sobre o pulmão de animais. No entanto, foi Paul Bert (1871), discípulo de Claude Bernard, que estabeleceu as bases da toxicidade do oxigênio hiperbárico, concluiu que todas as formas de matéria viva sofriam efeitos tóxicos sob estas circunstâncias experimentais.

O consumo de oxigênio pelos organismos aeróbios está intimamente ligado à otimização da extração de energia dos diversos substratos energéticos. Seu alto potencial oxidante pode ser verificado pela comparação da eficiência com que ocorrem as reações do metabolismo aeróbio. Por exemplo, a oxidação completa da glicose pode liberar energia suficiente para ressíntese de 38 ATP, enquanto no sistema anaeróbio apenas 2 ATP são obtidos. No primeiro caso, as células transformam glicose ($C_6H_{12}O_6$) em água e dióxido de carbono graças à oxidação por oxigênio molecular.



No processo de formação da água, a transferência de grande parte dos elétrons da glicose para o oxigênio é que produz formidável quantidade de energia. Para ficar mais claro como se dá a troca de elétrons na reação I, desdobra-se em duas sub-reações II e III.





Deste modo, 24 prótons (H^+) e 24 elétrons (e^-) provenientes da glicose (reação II) são consumidos pelo oxigênio (reação III) e não aparecem na reação final (reação I). Na realidade, a reação II pode ser desdobrada em outras, pois a célula efetua a queima da glicose em inúmeras etapas, de modo a aproveitar o máximo da energia produzida em cada uma. Se a reação ocorresse de uma só vez, com liberação repentina de toda a energia, o aproveitamento seria menor (MENEHINI, 1987).

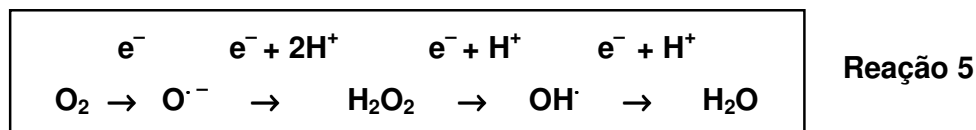
A síntese de ATP a partir de ADP e P_i , processo denominado fosforilação oxidativa, é realizada com energia liberada da cadeia respiratória. Ambos são processos acoplados que ocorrem na membrana interna mitocondrial. O processo final da respiração celular envolve o transporte dos equivalentes redutores (elétrons), oriundos do Ciclo de Krebs e outras rotas metabólicas, os quais serão transferidos ao oxigênio.

A redução completa de uma molécula de oxigênio à água requer quatro elétrons, redução tetraeletrônica do O_2 , que evita as reações intermediárias e ocorre na cadeia respiratória acoplada à fosforilação oxidativa, pelo sistema citocromo-oxidase, que forma ATP (DEL MAESTRO, 1980; FISHER;1988).

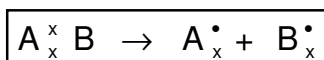


Porém, é preciso ressaltar que nem sempre o oxigênio se transforma em água diretamente. Em cerca de 5% do processo, o oxigênio tem uma tendência forte de receber um elétron de cada vez, redução monoeletrônica do oxigênio, formando

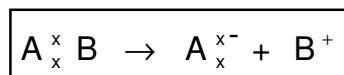
durante as reações uma série de intermediários tóxicos e reativos que são as espécies ativas de oxigênio (EAO) (MENEZHINI, 1987).



O rompimento das ligações entre as moléculas, também pode levar a formação de RL. Na fissão homolítica cada elemento fica com um elétron desemparelhado, formando assim dois RL. Na fissão heterolítica não há formação de RL, pois um elemento fica com os dois elétrons (com carga negativa) e o outro elemento fica sem nenhum elétron (com carga positiva) (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1989).



Reação 6: Fissão Homolítica



Reação 7: Fissão Heterolítica

1.1.2 DEFINIÇÃO DE RADICAL LIVRE

As EAO também são conhecidas como radicais livres (RL), no entanto, esta denominação não inclui só os radicais de oxigênio, mas vários outros como o átomo de hidrogênio, os íons de metais de transição, o óxido nítrico, o dióxido de nitrogênio, etc. Portanto: *“radical livre (RL) é qualquer espécie química (átomo, molécula) capaz de existência independente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados”*

relhados em qualquer orbital, normalmente no orbital mais externo” ((DEL MAESTRO, 1980; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; SOUTHORN, 1988).

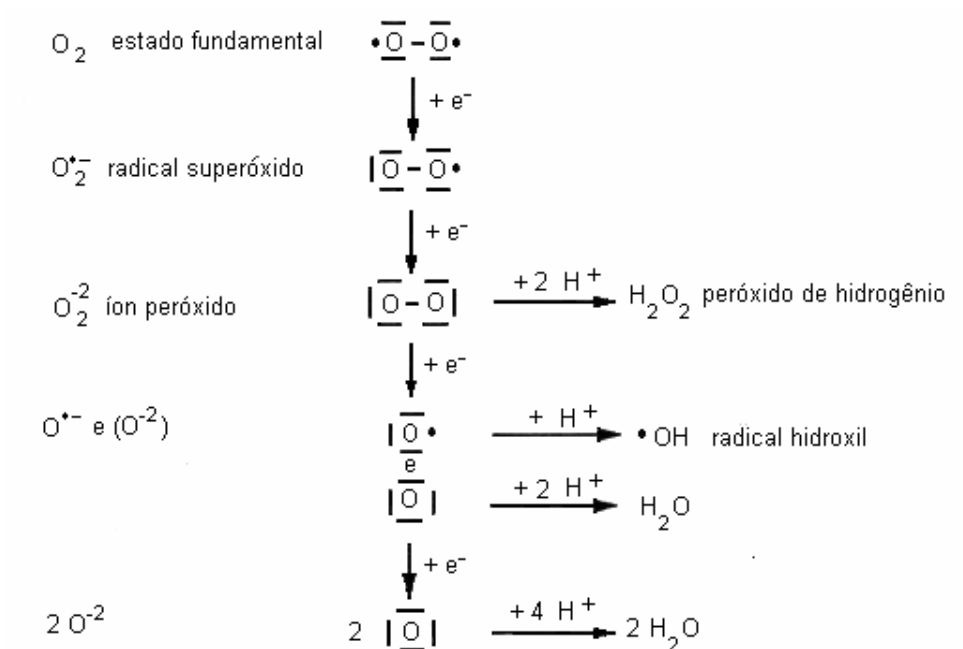


Figura 1 - Redução monoelétrica do oxigênio formando EAO (BAST et al., 1991).

1.1.3 FORMAÇÃO DE EAO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

As EAO são aquelas derivadas de reduções monoelétricas do oxigênio: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil ($\bullet OH$) e o oxigênio singlet, um estado excitado do oxigênio molecular que pode apresentar-se de duas formas: o estado sigma (mais reativo) e o estado delta (não é radical), listados na Figura 2.

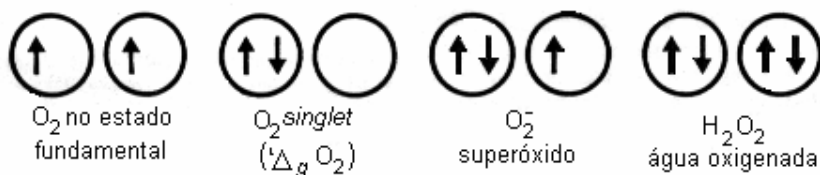


Figura 2: Estrutura eletrônica de espécies ativas de oxigênio (EAO). Mostrados apenas os dois orbitais π^* externos. Os demais orbitais internos ($\sigma 1s$, $\sigma^* 1s$, $\sigma 2s$, $\sigma^* 2s$, $\sigma 2p$ e $\pi 2p$) encontram-se todos plenamente ocupados. As flexas representam o sentido dos spins.

Os elétrons de uma molécula distribuem-se em orbitais, podendo cada orbital possuir até dois elétrons, caso em que estes terão spins opostos. Quando o orbital tem um único elétron, diz-se que este é desemparelhado. A molécula de oxigênio tem dois orbitais π^* mais externos, cada um com um elétron desemparelhado, ambos com o mesmo spin (FIGURA 2). Por isso, diz-se que a estrutura eletrônica do oxigênio é *triplet*, enquanto as biomoléculas oferecem dois elétrons de spins opostos. É por isso que as moléculas orgânicas, muito embora reajam espontaneamente com oxigênio no processo de combustão, são relativamente estáveis no ar. Há necessidade de se suprir inicialmente energia para romper alguma molécula em partes iguais, gerando radicais com oxigênio. Outra forma de aumentar a reatividade do oxigênio é mover um dos elétrons desemparelhados, de modo a aliviar a restrição de spins. Isto requer energia e gera o estado *singlet* de oxigênio, em que os dois elétrons têm spins opostos (Figura 2) (MENEZHINI, 1987).

O radical superóxido e o radical hidroxil apresentam elétrons desemparelhados, o peróxido de hidrogênio não é radical (Figura 3).

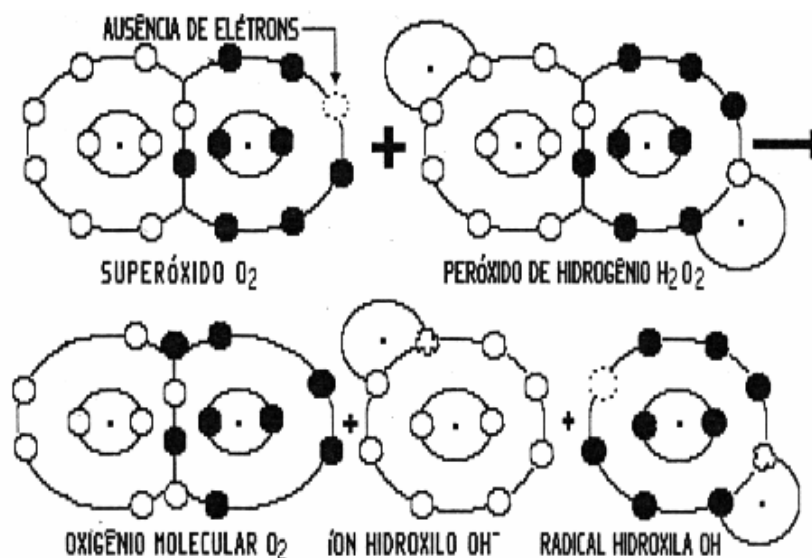
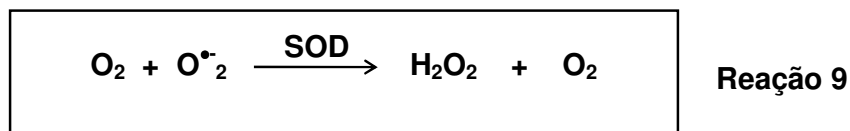
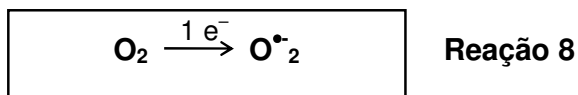


Figura 3: Representação eletrônica da dismutação do ânion radical superóxido, através do modelo atômico de Bohr (OLSZEWER, 1992).

O radical superóxido é instável com vida média de milissegundos em pH neutro. É instável (Figura 3) em meio aquoso, e em forma espontânea se dismuta para produzir peróxidos e oxigênio molecular.



O superóxido é um oxidante fraco, oxidando só alguns componentes, entre eles o ascorbato, compostos sulfidril, catecolaminas entre outros. Por outro lado foi demonstrado que é um potente redutor, com capacidade redutora perto do hidrossulfito sódico, e reduz várias substâncias, entre as quais podemos citar: ferro iônico

e seus complexos, hemoproteínas (citocromo c, metahemoglobina, mioglobina, peroxidase e quinonas).

A baixa reatividade do superóxido indica não ser ele um mediador final da toxicidade das células, apesar de que algumas pesquisas indicam que o superóxido pode exercer sua citotoxicidade inativando enzimas específicas essenciais para a célula, e, como exemplo, sabe-se que o superóxido inativa uma série de macromoléculas, entre as quais podemos citar: tRNase, desidrogenase de 3 fosfato gliceraldeído.

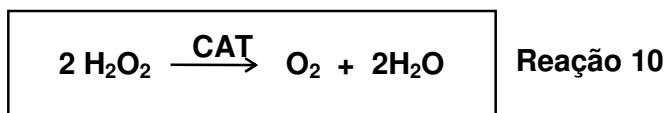
Apesar destas reações poderem alterar o equilíbrio metabólico dos tecidos, a maior parte da literatura sugere que o superóxido não é tóxico *per se*, mas age como precursor para gerar RL provenientes do metabolismo de oxigênio com propriedades citotóxicas mais acentuadas (OLSZEWER, 1992).

Uma variedade de sistemas enzimáticos catalisam a redução univalente do oxigênio molecular a radical superóxido, como a xantina oxidase, aldeídos oxidase, di-hidro-orótico desidrogenase, flavinas desidrogenases e peroxidases (SOUTHORN & POWIS, 1988). As enzimas que catalisam a formação de prostaglandinas (ciclo-oxigenase) e leucotrienos (lipoxigenase) são também fontes de superóxido (MACHLIN & BENDICH, 1987). Esta redução univalente ocorre tanto em sistemas não-enzimáticos como durante reações de autooxidação incluindo aquelas que envolvem catecolaminas, flavinas e ferridoxinas reduzidas. Uma importante fonte de radical superóxido é o sistema mitocondrial de transporte de elétrons (SOUTHORN & POWIS, 1988).

A reação de dismutação do superóxido é a maior fonte de peróxido de hidrogênio no organismo (SOUTHORN & POWIS, 1988). O peróxido de hidrogênio

pode ser formado com o resultado de dois tipos de reação: pela redução divalente do oxigênio molecular ou a partir da dismutação do ânion radical superóxido. O primeiro caso ocorre em organelas especializadas chamadas peroxissomas através de oxidases como a D-aminoácido oxidase e glicolato-oxidase. O segundo, durante a oxidação aeróbia dos substratos por certas enzimas, tais como, xantina oxidase (FRIDOVICH apud DEL MAESTRO, 1980) ou autoxidação de vários compostos com a subsequente dismutação do superóxido para peróxido de hidrogênio, como foi visto na reação 5 (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988).

Nos peroxissomas, há a presença da catalase (CAT), a qual cataliticamente reduz o peróxido de hidrogênio para água (reação 10).



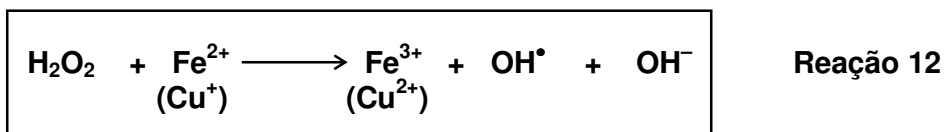
Entretanto, há outros mecanismos para tratar com o fluxo intracelular de H_2O_2 . Sugere-se que o maior sistema intracelular de decomposição de H_2O_2 é a glutathiona peroxidase (GPx). A GPx se utiliza de uma variedade de doadores de elétrons e também de glutathiona reduzida (GSH), esta por sua vez pode ser oxidada (GSSG) pelo peróxido de hidrogênio, removendo-o e formando H_2O (reação 11). A glutathiona peroxidase também catalisa a redução de lipoperóxidos, prevenindo, desta forma, a lipoperoxidação (LPO) (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988).

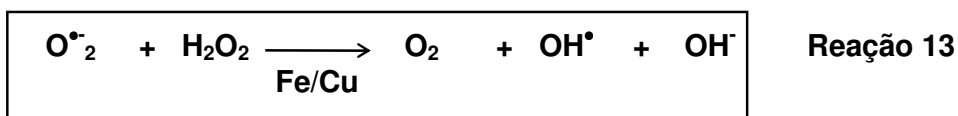


O peróxido de hidrogênio é uma molécula estável, e não é essencialmente tóxico para as células, mas possui a característica de poder atravessar as membranas celulares, portanto é bastante difusível (semelhante a água); isto torna-se potencialmente importante na medida em que o espaço extracelular possui pouca defesa antioxidante (SOUTHORN & POWIS, 1988).

A adição de um elétron ao peróxido de hidrogênio (Figura 1) forma o radical hidroxil (OH^\bullet). O OH^\bullet é o mais reativo, o mais lesivo, e portanto é a EAO mais instável, a qual reage com uma grande variedade de compostos orgânicos (DORFMAN & ADAMS apud DEL MAESTRO, 1980); como resultado apresenta uma meia-vida extremamente curta (medida em frações de segundos 10^{-9} s); não se distancia do seu sítio de formação mais que 30Å ; é altamente fugaz, apresenta-se em baixas concentrações nos tecidos e ao se formar reage rapidamente e os radicais encontrados nos tecidos são derivados do hidroxil (SOUTHORN, 1988).

O radical hidroxil pode ser formado através de duas reações: FENTON e HABER-WEISS. Sempre que o peróxido de hidrogênio entrar em contato com íons ferro ou cobre ocorre a reação de Fenton (REAÇÃO 12), que vai formar o radical hidroxil. Ele pode também ser formado pela interação entre o peróxido de hidrogênio e superóxido na presença de íons metais de transição na reação de Haber-Weiss (REAÇÃO 13). Outra fonte de radical hidroxil são as radiações ionizantes (SOUTHORN & POWIS, 1988).





As reações de Fenton e de Haber-Weiss ocorrem in vivo se houver Fe^{2+} livre no plasma. O ferro encontra-se ligado no plasma a proteínas (transferrina); nos tecidos, é acumulado sob a forma de ferritina ou hemossiderina (nos lisossomos no tecido hepático). A transferrina libera o ferro que vai para a hemoglobina. O ferro também encontra-se preso à porfirina ou proto-porfirina, que estão ligadas à hemoglobina-mioglobina (FERREIRA, 1994). A CAT é uma hemoproteína que contém ferro na sua estrutura. Portanto, não há ferro livre para fazer as reações de Fenton e de Haber-Weiss, assim se faz necessário agentes redutores que ajam nestas proteínas liberando o Fe^{2+} . O ascorbato age como um pró-oxidante liberando o ferro que pode então combinar-se com peróxido de hidrogênio ou superóxido para formar o radical hidroxil.

O radical hidroxil pode agir: abstraindo H de outras moléculas para completar o seu orbital; ou se intercalar em cadeias carbonadas e tornando o carbono um RL; ou transferindo elétrons.

Observamos na figura 4 as principais fontes celulares de EAO e sua metabolização.

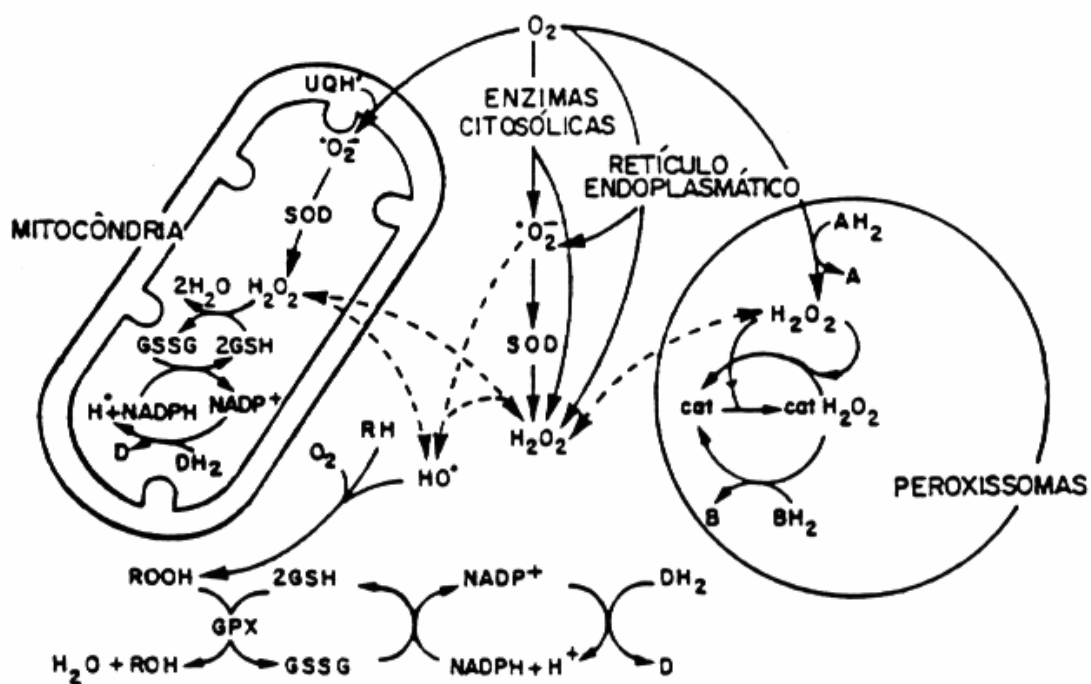


Figura 4: Esquema geral das principais fontes celulares de produção e metabolização de EAO. $UQH^•$ = ubiquinol; $GSSG$ = glutatona oxidada; GSH = glutatona reduzida; DH_2 e D = sistemas redutores de NADP não-específicos; SOD = superóxido dismutase; GPX = glutatona peroxidase; CAT = catalase; B e BH_2 = doadores de hidrogênio (CHANCE et al., 1979).

1.1.4 EFEITOS BIOLÓGICOS

Quando um RL reage com um composto não-radical, outro RL pode ser formado, induzindo, assim, reações em cadeia, como é o caso da lipoperoxidação (LPO). Dessa forma, podem ser produzidos efeitos biológicos distantes do sítio de geração do primeiro RL formado. As reações em cadeia têm uma série de etapas durante as quais: se consome uma espécie intermediária, os reativos se convertem em produtos e os intermediários são regenerados, permitindo que o ciclo recomece. As etapas do processo de LPO são: iniciação, propagação e terminação.

A iniciação é o primeiro passo das reações em cadeia, é necessário que o RL ataque uma molécula orgânica, abstraindo um átomo de hidrogênio de um grupamento químico. Na LPO, o RL é geralmente o radical hidroxil e o grupamento químico é um metileno pertencente a um ácido graxo poliinsaturado da membrana (MERSON et al., 1982).

A retirada de um átomo de hidrogênio do grupamento metileno, leva à formação de um radical centrado no carbono ($-\bullet\text{CH}-$), o qual, tende a se estabilizar por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado (Figura 5). Este, por sua vez, ao se combinar com o oxigênio, produz o radical peroxil também chamado radical peróxi.

No estágio de propagação, os radicais peroxil são capazes de abstrair hidrogênio de outra molécula lipídica, ou seja, de um ácido graxo adjacente. O radical peroxil pode, também, se combinar com o átomo de hidrogênio que ele abstraiu, produzindo um lipídio hidroperóxido. Os lipídios hidroperóxidos se decompõem numa reação catalisada por complexos de ferro e cobre, produzindo aldeídos como o

malondialdeído, hidrocarbonetos voláteis (como o gás pentano) e outros produtos que podem ser detectados experimentalmente (Figura 5) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Foi sugerido que as reações de degradação que ocorrem durante a LPO podem originar oxigênio singlet, acelerando este processo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Na etapa de terminação, dois radicais peroxil reagiriam entre si formando um tetróxido instável que se decompõe dando origem ao oxigênio singlet (1O_2) e carbonilas excitadas que retornam ao seu estado fundamental emitindo quantas de luz visível (RUSSEL, 1957) e podem ser medidas pelo processo de quimiluminescência (QL) e constitui-se num importante método de quantificação de LPO (CASTRO et al., 1990).

Além da perda da fluidez da membrana há também, desarranjo dos receptores e potenciação da lise celular. O dano dos RL a enzimas que contém enxofre e outras proteínas culmina em sua inativação, ligações cruzadas e desnaturação (Figura 6) (MACHLIN & BENDICH, 1987).

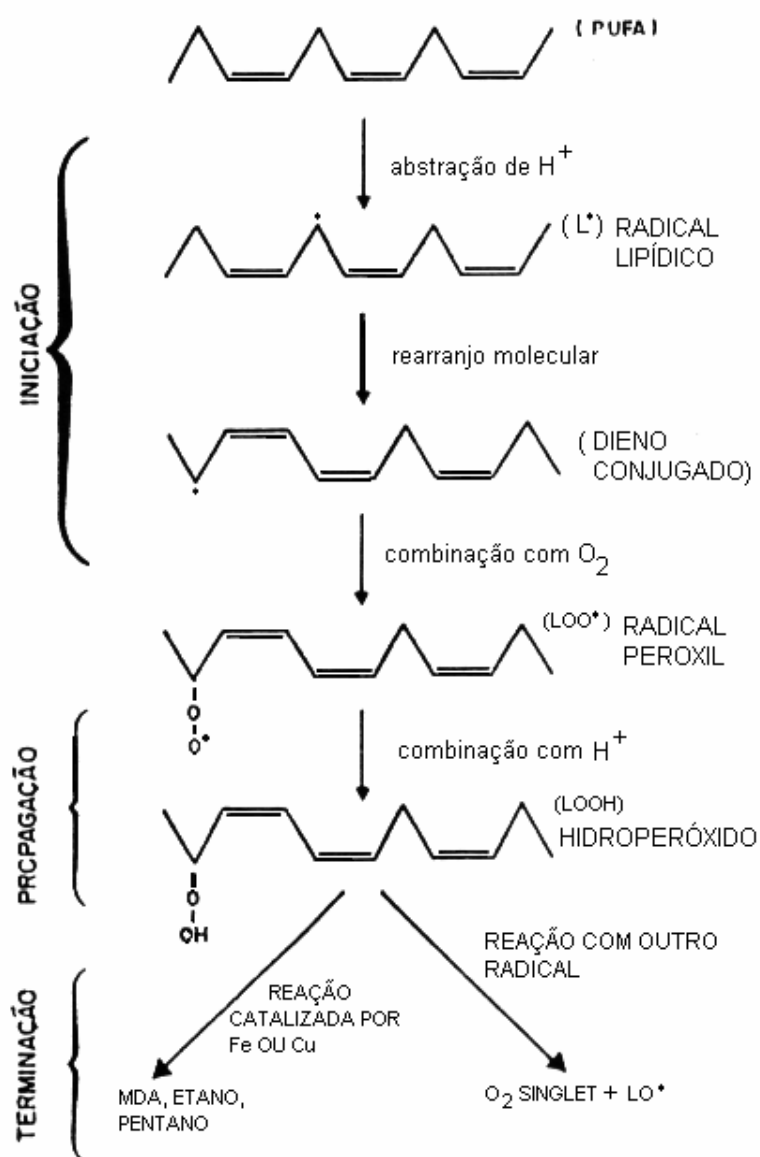


Figura 5: Reações em cadeia da lipoperoxidação (DEL MAESTRO, 1980).

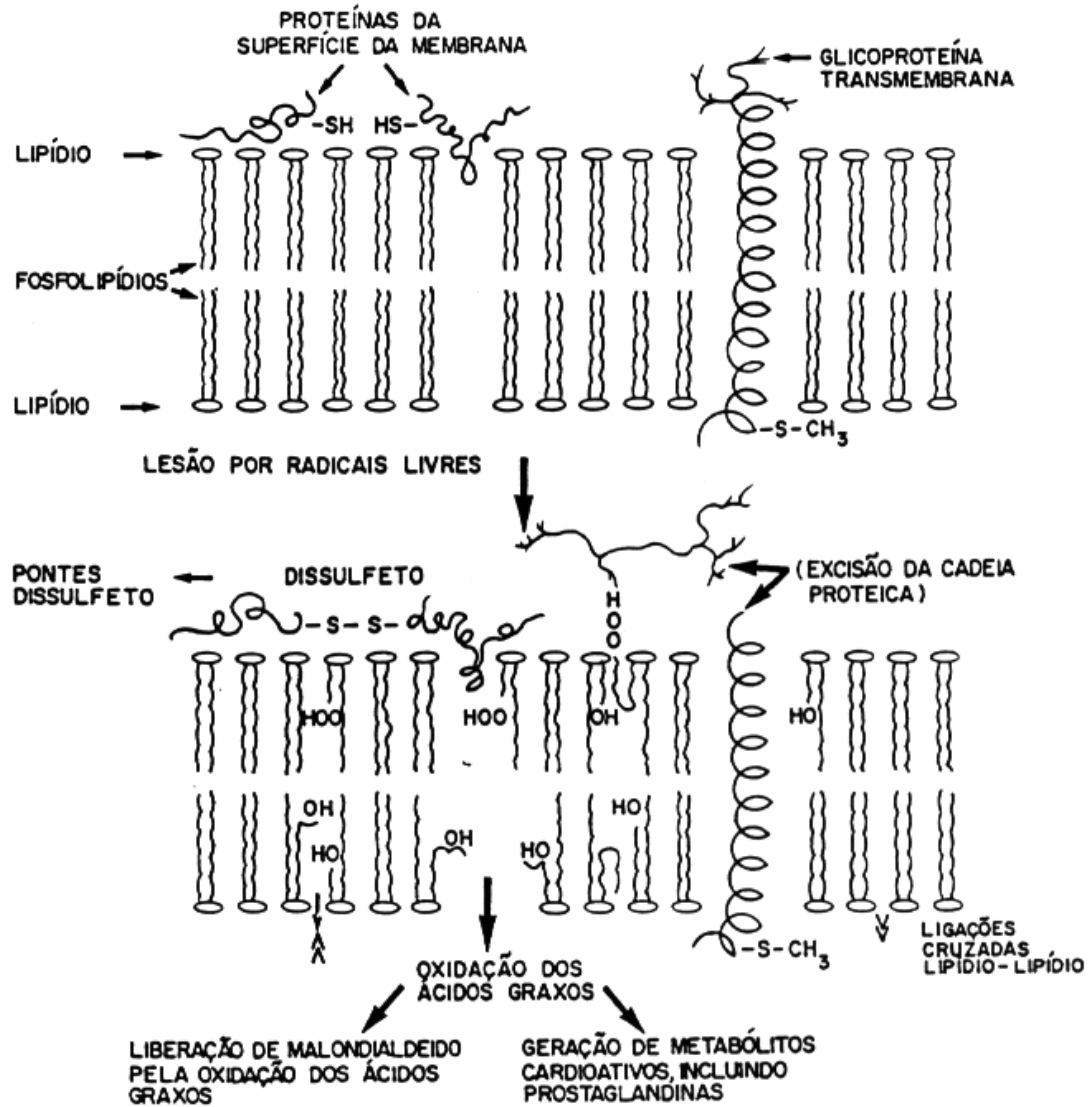


Figura 6: Efeito da LPO sobre as membranas celulares.

1.2 DEFESAS ANTIOXIDANTES

As EAO quando formadas, ao reagirem com biomoléculas, causam diferentes tipos de danos biológicos que podem levar à morte celular. Os organismos aeróbios desenvolveram diferentes tipos de defesas antioxidantes - enzimáticas e não-enzimáticas - prevenindo a formação de EAO, bem como, mecanismos para reparar os danos causados pelos mesmos.

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato - enzimático ou não enzimático (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

A defesa do organismo contra as EAO vai desde: a) prevenção da formação das EAO; b) interceptação dos radicais formados; c) reparo das células danificadas (FIGURA 7). a) Os sistemas que previnem a formação de EAO são consideradas biomoléculas ligantes de metais (Fe e Cu), são os quelantes. A presença de proteínas quelantes é de vital importância aos seres vivos, pois previnem às células dos processos oxidativos catalisados por íons metálicos. Pigmentos especializados previnem a ação da radiação ultravioleta: a melanina e os carotenóides impedem a ação do oxigênio *singlet*. As enzimas que controlam os níveis de EAO: GPx, SOD, CAT. b) A interceptação é a desativação das EAO, onde elas são destruídas de forma a impedir a oxidação posterior de outras moléculas. A desativação final de um composto radical consiste na formação de um outro produto não radical. O interceptador (antioxidante) mais eficiente deve combinar propriedades ótimas, onde irão reagir com RL iniciais, tais como, radicais peróxil (ROO•) e posteriormente intera-

gem com compostos hidrossolúveis para a sua própria regeneração. Estes transferem a função radical para longe do sítio-alvo potencial. São chamados “**scavengers**” de RL: a combinação de uma substância com um RL que leva à formação de um não radical ou um radical menos lesivo, exemplo: tocoferóis e carotenóides. Substâncias que funcionam como “**quenchers**” de oxigênio singlet, são aquelas que absorvem a energia de excitação e a liberam em forma de calor ou movimento.

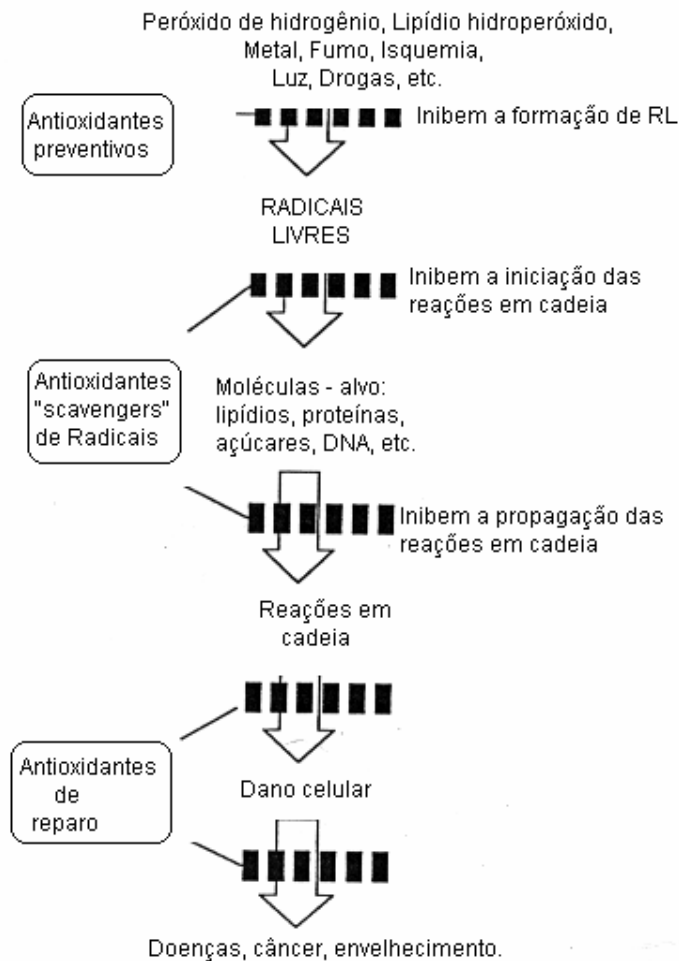


Figura 7: Sistemas de defesa antioxidante contra dano oxidativo induzido por RL (NIKI, 1993).

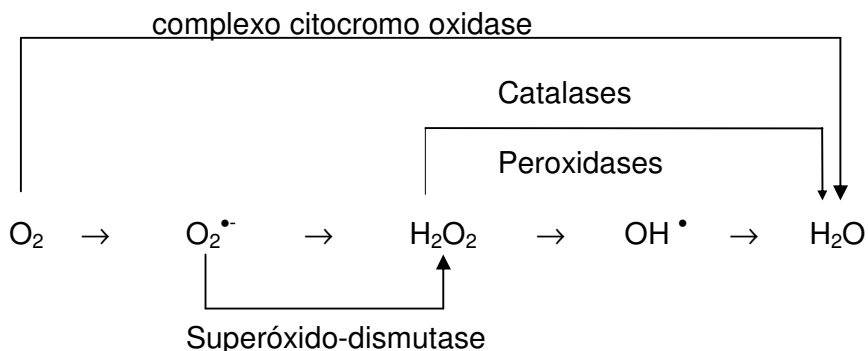


Figura 8: Mecanismo de defesa enzimática contra as EAO (DEL MAESTRO, 1980).

A mais importante reação envolvendo o superóxido, a qual ocorre espontaneamente, é sua própria dismutação para H_2O_2 e O_2 (DEL MAESTRO, 1980) (RE-AÇÃO 1). Entretanto, na presença da enzima superóxido dismutase (SOD), a dismutação do superóxido pode ser aumentada intracelularmente em 10^4 vezes (SOUTHORN & POWIS, 1988). Existem várias formas de SOD. Uma forma contendo manganês é encontrada na matriz mitocondrial (Mn-SOD), e outra contendo cobre e zinco é encontrada no citosol (CuZn-SOD). Uma superóxido dismutase contendo ferro existe em algumas bactérias e plantas. Tem sido sugerido que as três diferentes tipos da enzima SOD apresentam um papel fisiológico diferente.

A enzima CAT decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A maioria das CAT possuem um grupo heme (Fe^{+3} -protoporfirina) e ligado a cada subunidade uma molécula de NADPH que auxilia na estabilização da enzima (Figura 8).

A enzima GPx é uma peroxidase que utiliza doadores de e^- para reduzir o peróxido de hidrogênio à água. A mais importante peroxidase é a glutathiona peroxidase que utiliza selênio (Se) no sítio catalítico e utiliza o tripeptídeo tiólico glutathiona

(GSH - γ -glutamil-cisteil-glicina) como doador de e^- para a redução do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos, tais como os lipoperóxidos provenientes da LPO, impedindo assim a fase de propagação deste processo.

Durante o processo catalisado pela GPx, ocorre a oxidação da glutatona, formando-se uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de GSH (GSSG) (Figura 9).

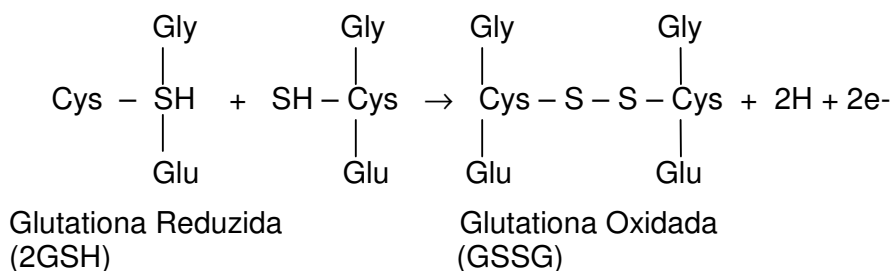


Figura 9: Processo de oxidação da glutatona.

Em células normais ocorre a presença de enzimas acessórias. A glutatona redutase (GR) utiliza elétrons do NADPH para a redução de pontes dissulfeto da GSSG e reestabelece os níveis intracelulares de GSH (DENEKE & FANBURG, 1989).

A distribuição das enzimas antioxidantes nas células está intimamente relacionada com as fontes de EAO. Estão em maior quantidade em locais particularmente expostos as EAO.

Caso os outros mecanismos antioxidantes (interceptação e prevenção) falhem, há o mecanismo de reparo das biomoléculas modificadas. O mecanismo de reparo do DNA se dá pela excisão das bases. A enzima DNA glicosilase remove as

bases danificadas (cliva a ligação entre a base nitrogenada e a pentose) e libera o sítio apurínico/apirimidínico, este é reconhecido por uma DNA-endonuclease que corta a cadeia no sítio AA, a porção danificada da enzima é removida e o DNA recém sintetizado preenche este espaço, que pela ação da DNA-ligase, une ao resto da cadeia (NIKI, 1993).

Existe uma variedade de antioxidantes não-enzimáticos que previnem o dano dos RL nos tecidos. Existem antioxidantes lipofílicos como tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides, e antioxidantes hidrofílicos como o ascorbato, glutathiona, indóis e catecóis. O α -tocoferol, também chamado vitamina E, é um antioxidante lipossolúvel eliminador de reação em cadeia muito importante: ligado à membrana da célula; reage com o radical superóxido, o radical hidroxil, radical peroxil convertendo-os em formas menos reativas agindo como scavenger (SIES & MURPHY, 1991); e reage com oxigênio singlet, absorvendo a energia de excitação agindo, assim, como quencher (KAISER et al., 1990). O antioxidante β -caroteno é o neutralizador mais potente do oxigênio singlet, conhecido como quencher do oxigênio singlet, impedindo a formação de lipídios hidroperóxidos. Possui propriedades antioxidantes particulares a uma baixa pressão de oxigênio (KRINSKY, 1989). A vitamina A reduziu a LPO induzido pelo peróxido de hidrogênio, em coração isolado e perfundido de rato, e isto pode ser um fator importante para a redução da contratatura cardíaca, favorecendo a proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (BELLÓ-KLEIN et al, 1994). A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel eliminador de reação em cadeia; reage diretamente com o superóxido e com oxigênio singlet; regenera o tocoferol, quando interage com o radical tocoferil e convertendo-se em radical ascorbil, muito estável (BISBY, 1990; SIES & MURPHY, 1991) .

1.3 RL COMO ESPÉCIES ÚTEIS

Até aqui os RL foram considerados os mais impiedosos inimigos dos sistemas biológicos, não tendo sido descrito praticamente benefício nenhum através da sua síntese. Porém, não podemos desconsiderar a possibilidade de que os RL possam trazer com eles alguns benefícios de importância para os sistemas orgânicos.

Pela sua reatividade assim como pela sua citotoxicidade os efeitos benéficos dos RL não foram estudados com tanta intensidade quanto os seus efeitos tóxicos, porém faremos um resumo acerca de alguns que estão em torno da efetividade dos RL para os seres vivos.

Um dos principais efeitos benéficos está relacionado à capacidade de algumas células brancas de desenvolverem RL tipo superóxido, peróxido de hidrogênio e principalmente radical hidroxil para ajudar nos processos infecciosos, acreditando-se que as linhas de defesa antibacteriana desenvolvidas pelos glóbulos brancos se devam a sua capacidade de gerar RL (Figura 6) (BABIOR, 1982).

O emprego fisiológico do RL superóxido é quando células fagocitárias (leucócitos) reconhecem células do próprio organismo que se tornam tumorais ou foram infectadas por parasitas, fungos, bactérias ou vírus. Os sinais químicos produzidos por uma infecção bacteriana atraem células fagocitárias, criando um sítio inflamatório. Há início de fagocitose, ao mesmo tempo em que se cria um estímulo para a produção de EAO nas membranas da célula fagocitária. O radical superóxido mata a bactéria e forma uma vesícula fagocitária englobando a bactéria morta, a vesícula fagocitária funde-se ao lisossomo, cujas enzimas digerem a bactéria (figura 7) (MENEHINI, 1987). Essa produção do radical superóxido pelos leucócitos é formada

pela redução univalente do oxigênio e catalisada por várias enzimas como a NADPH oxidase na membrana do fagócito (HALLIWELL, 1994)(também observadas no processo de isquemia/reperfusão) (Figura 10).



Figura 10: Esquema representando a ação das EAO nas infecções bacterianas (MENECHINI, 1987).

Como sabemos, as prostaglandinas são substâncias com atividade parecida com os hormônios e que são formadas bioquimicamente pelo metabolismo do ácido araquidônico. Como produto final vão determinar as prostaciclina e o tromboxano e por outro lado a formação de leucotrienos.

Nos processos de cicatrização é necessária uma estimulação das células de proliferação, que pode ser obtida pela ação da enzima guanilato ciclase, que catalisa a formação da guanosina monofosfato cíclica (c-GMP). A guanilato ciclase é estimulada pelo radical hidroxil, um dos RL formados pela união de superóxido com os radicais denominados peróxidos lipídicos.

A agregação plaquetária é um processo importante para iniciar a formação de coágulo nos processos de cicatrização. Acredita-se que este processo possa ser induzido pela presença de peróxido de hidrogênio (OLSZEWER, 1992).

Ainda que os químicos orgânicos conheçam as EAO há muitos anos, só recentemente sua importância em Biologia e Medicina tem sido avaliada. Somam-se evidências de que as EAO causam ou influenciam inúmeros processos orgânicos degenerativos como a catarata, o enfisema, a doença de Parkinson, a porfiria aguda intermitente, a lesão isquêmica, o diabetes aloxânico, e até mesmo a mutação, o câncer e o envelhecimento (MENEHINI, 1987; CHOW, 1990).

1.4 ISQUEMIA/REPERFUSÃO

No mecanismo de isquemia/reperfusão se observa a formação de superóxido e peróxido de hidrogênio. A falta de oxigênio é lesivo, mas a falta seguida da reperfusão é muito mais lesivo, pois levará à formação de EAO, ocorrendo então um

processo conhecido como o PARADOXO DO OXIGÊNIO, que foi primeiramente descrito em 1973, quando foi constatado que a reoxigenação abrupta do coração, após um episódio isquêmico, produzia alterações substanciais no músculo cardíaco (SOUTHORN). Uma das alterações mais graves que podem ocorrer nessa situação é a síndrome do “stunned heart” (coração arritmico, atordoado) e “stone heart” (contratura do coração, coração de pedra) (BELLÓ-KLEIN et al, 1994, HEARSE et al, 1977). Esta síndrome é uma condição rara e irreversível em que há parada do coração em sístole durante ou imediatamente após uma parada cárdio-respiratória, levando ao estresse oxidativo.

O estresse oxidativo se caracteriza, por um desequilíbrio no balanço pró-oxidantes/antioxidantes em favor dos pró-oxidantes (SIES & MURPHY, 1991).

Quando há a interrupção temporária da circulação (isquemia) em um tecido, seguida do seu restabelecimento (reperfusão), há a formação de EAO, como o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil (Figura 11)(MC CORD, 1985). Existem várias teorias propostas para explicar o fenômeno, no entanto, todas elas apontam para a geração de peróxido de hidrogênio. Este fato fez com que nos trabalhos realizados por: BIANCHINI & BELLÓ, 1988; BELLÓ & BELLÓ, 1988 se utilizassem injeções de peróxido de hidrogênio no coração isolado e perfundido (à pressão constante) de rato como modelo de estresse oxidativo.

No coração de rato, doses de peróxido de hidrogênio (8-64mM) induziram um efeito inotrópico positivo com potenciação pós-extrassistólica (efeito similar ao “stunned heart”) (BIANCHINI & BELLÓ, 1988). Doses mais altas (128-2048mM) induziram contraturas cardíacas (“stone heart”) (BELLÓ & BELLÓ, 1988).

O *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata) é um caracol regional da América do Sul (sul do Brasil e Paraguai e norte da Argentina e Uruguai). Durante o inverno, ele se enterra e na primavera retorna à superfície (JAEGER, 1961). Este comportamento sazonal nos pareceu um bom modelo natural de hipóxia-reoxigenação. Em estudos prévios, foi utilizado o coração isolado deste molusco a fim de avaliar a resposta do tecido frente ao estresse oxidativo produzido pelo peróxido de hidrogênio.

Foi verificado que o coração destes animais suporta muito bem o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio. Contraturas cardíacas irreversíveis ou mantidas foram observadas apenas com a dose 8192mM de peróxido de hidrogênio. Doses de até 4096mM provocaram um grande aumento do inotropismo e contraturas de breve duração (BELLÓ-KLEIN et al, 1993).

Estes resultados se mostraram muito interessantes e, como era de se esperar, tendo em vista, o comportamento hibernante, sugeriram um potente sistema antioxidante nestes animais.

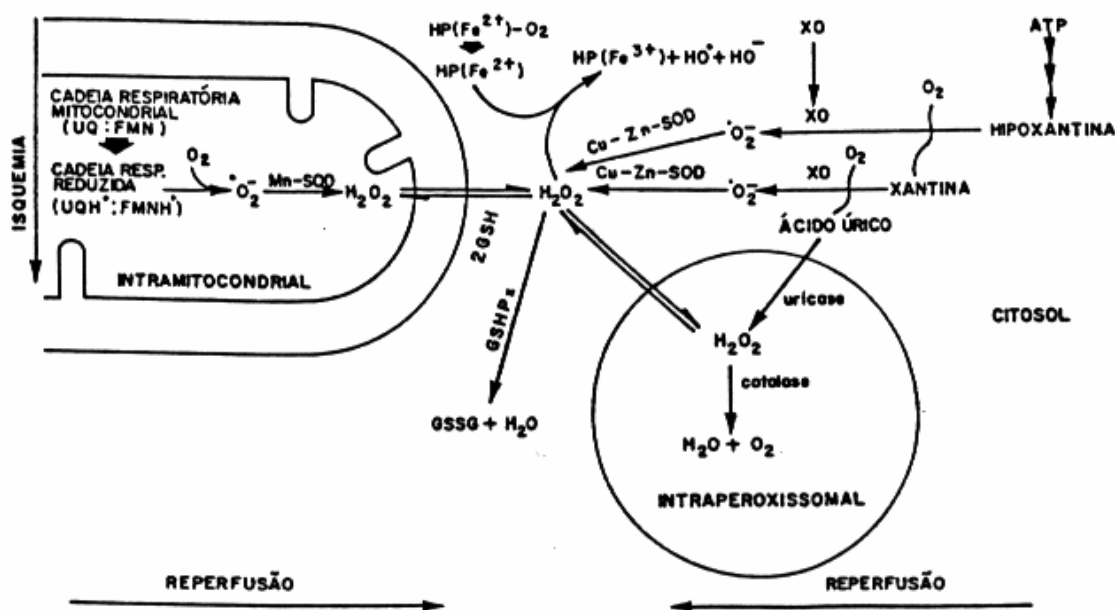


FIGURA 11: Mecanismo gerador do dano celular mediado por EAO durante o processo de isquemia-reperfusão (BAST et al., 1991) (Teoria de Mc Cord, 1985).

1.5 MOLUSCO - *Megalobulimus oblongus*

Os moluscos são denominados vulgarmente de caracol: são moluscos da classe dos gastrópodos, que apresentam concha única e espiralada, de hábitos terrestres e dulciaquícolas. O molusco de nosso interesse foi o *Megalobulimus oblongus*, por apresentar uma resistência grande ao estresse oxidativo, quando o coração era isolado e perfundido, como já foi descrito anteriormente. Pertencente a seguinte nomenclatura científica:

Filo: Mollusca

Classe: Gastropoda

Sub-classe: Euthyneura

Ordem: Stylommatophora

Família: Megalobulimidae

Gênero: Megalobulimus

Espécie: Megalobulimus oblongus (Müller)

A descrição do molusco *Megalobulimus oblongus* é utilizada para um complexo de espécies, cujo mecanismo de especiação está em estudo (LEME, 1977).

O *Megalobulimus oblongus* é o maior caracol terrestre de nosso meio. A concha pode apresentar um comprimento que varia de 5 a 16cm, sendo revestida externamente, por uma camada castanha, em geral ausente na concha vazia e rola-da, que se torna branca. No indivíduo adulto, a borda externa da abertura da concha torna-se espessa e cor-de -rosa. O corpo do animal é verde-acinzentado e a boca é ladeada por uma “franja” (FIGURA 12) (VEITENHEIMER-MENDES et al, 1993).

O *Megalobulimus* pode ser observado na mata e em áreas com solo úmido, ocorrem preferencialmente embaixo de troncos caídos, folhas em decomposição, frestas de muros, arbustos e húmus. Em dias chuvosos ou com neblina úmida, pode ser visto, nas primeiras horas da manhã, deslocando-se sobre gramados, campos e entre árvores de matas e bosques. Segundo diversos autores ocorrem em maior número nos terrenos calcáreos. Em épocas mais secas dificilmente são localizados, chegando a se enterrar completamente no solo. Na estação fria, inverno, os animais se enterram completamente. Hábitos noturnos, predominantemente herbívoro. É hermafrodita, entretanto, para a reprodução, são necessários dois indivíduos. Os ovos brancos, com cerca de 2cm, são colocados sob o solo fofo, folhas ou troncos caídos, podem ser confundidos com ovos de pássaros e lagartixas. Sua dis-

tribuição geográfica são encontrados na América do Sul (VEITENHEIMER-MENDES et al; 1993, PITONI et al; 1976).



Figura 12: *Megalobulimus oblongus*.

O comportamento hibernante deste animal sugere ser este ritmo biológico importante para sua sobrevivência e determinante de alterações adaptativas do sistema antioxidante para que ele possa suportá-lo periodicamente.

1.6 RITMOS BIOLÓGICOS

Os ritmos são evidentes na maioria dos seres vivos: plantas mostrando épocas de floração alternadas com fases vegetativas, ciclos de atividade e repouso nos animais, batimentos cardíacos e muitos outros. Quando se observa os diversos ambientes da Terra, pode-se igualmente detectar suas características cíclicas, muito bem definidas, tanto no meio biótico, como no abiótico. Assim, se o ambiente oscila,

uma espécie, para se adaptar a ele precisa oscilar também, e a adaptação temporal consiste na harmonização entre a ritmicidade biológica e os ciclos ambientais.

Pode-se definir ritmo como sendo um processo que varia periodicamente no tempo, a manifestação de um fenômeno que se repete com o mesmo período. O período é, então, o intervalo de tempo em que um ciclo se completa (MENNA-BARRETO & MARQUES, 1997).

Um astrônomo francês Jean Jacques De Mairan, em 1729, foi provavelmente o primeiro pensador a propor a possível existência de um relógio biológico. Ele observou o movimento regular de abertura e fechamento das folhas de uma sensível (provavelmente a *Mimosa pudica*) e observou que mesmo isolando das variações ambientais, observou a persistência dos movimentos das folhas coincidindo, aparentemente com o dia/noite ambiental. De Mairan elaborou um esquema para demonstrar a existência de relógios biológicos, que dizia: coloca-se o organismo sob condições constantes, isolando-o de variações ambientais que possam causar a ciclagem, e assim constata-se a persistência de ciclos. Esse desenho experimental é denominado situação de livre-curso e os ciclos observados são chamados ritmos biológicos (MENNA-BARRETO et al; 1988).

Os ritmos dos sistemas biológicos associados aos ciclos geofísicos são os ritmos circadianos, circamarés, circalunares e circanuais que respectivamente, permitem aos organismos adaptarem-se aos eventos recorrentes do mundo externo (PITTENRICH, 1981).

Todos os animais dividem as 24 horas do dia de forma sistemática e periódica, alocando, em momentos determinados, certas expressões comportamentais.

Essa temporização comportamental é altamente adaptativa, sendo necessária para a sobrevivência individual e da espécie (DAAN, 1981; DAAN & ASCHOFF, 1982; ESKES, 1982; KENAGY & VLECK, 1982). Assim, os ritmos biológicos são principalmente circadianos, sendo que qualquer variável fisiológica não se mantém estável e constante ao longo das 24 horas, mas apresenta uma flutuação diária regular, filogeneticamente incorporada e geneticamente determinada, cuja finalidade é preparar o organismo antecipadamente às alterações altamente previsíveis do dia e da noite.

Os estudos da ritmicidade circadiana mostram que os organismos vivos são fisiologicamente e comportamentalmente diferentes, dependendo da hora do dia em que são observados, assim, como reagem diferentemente a um mesmo estímulo quando aplicado em diferentes momentos das 24 horas do dia.

Estudos apontam para um controle neuroendócrino da ritmicidade circadiana, mais precisamente as vias ópticas. Os cones e bastonetes se projetam, por meio das células bipolares, sobre as células ganglionares da retina, cujos axônios formam os nervos ópticos, que se cruzam formando o quiasma óptico. A partir desse ponto, distinguem-se, tanto anatômica como fisiologicamente, duas grandes vias e projeção central. A maior delas, chamada de trato óptico principal (TOP), constitui a via clássica de projeção visual, terminando no corpo geniculado lateral - córtex estriado, colículo superior e núcleos pré-tectais. A segunda, chamada de trato óptico acessório (TOA), divide-se num fascículo superior que, caminhando junto ao TOP, projeta-se para o segmento mesencefálico; e num fascículo inferior que, desgarrando-se do

TOP, ao nível do quiasma, projeta-se, via hipotálamo lateral, sobre o mesencéfalo ventral.

Vários experimentos demonstram que a lesão das vias ópticas pré-quiasmáticas (enucleação ou lesão dos nervos ópticos) em mamíferos elimina a sincronização da ritmicidade ao ciclo de claro/escuro ambiental; enquanto a lesão das vias ópticas na porção pós-quiasmática não afeta nem a amplitude nem o acoplamento dos ritmos circadianos ao claro/escuro ambiental. Assim, mais tarde se descobriu a existência de uma projeção retiniana direta para a região hipotalâmica anterior, mais especificamente para os núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Assim, lesando-se os próprios NSQ, eliminava-se, em roedores, a própria ritmicidade circadiana de vários eventos fisiológicos e comportamentais: atividade e repouso, comportamento exploratório, comportamento de auto-limpeza, comer, beber, sono e vigília e outros como corticosterona adrenal, serotonina N-acetil-transferase pineal, temperatura, flutuação circadiana da frequência cardíaca, ritmos de desempenho, secreções de hormônio de crescimento.

Tem-se firmado o conceito de que os núcleos supraquiasmáticos constituem os osciladores circadianos por excelência em todos os mamíferos. Demonstrou-se que os NSQ captam, com um ciclo de 24 horas, glicose marcada, o que evidencia um ritmo circadiano de atividade metabólica celular de seus neurônios; esse neurônios apresentam ainda, seja in vivo, seja in vitro, um ritmo circadiano de atividade elétrica celular (TAKAHASHI & ZATZ, 1982; RIETVELD, 1985). Em primatas, no entanto, os NSQ não parecem ser os únicos osciladores circadianos, persistindo os

ritmos de temperatura central, secreções de cortisol e incidência circadiana de sono REM.

Em aves, ao lado dos NSQ existem suficientes evidências que apontam para a pineal como um oscilador circadiano de grande importância. A pineal é um órgão que ao longo da evolução nos vertebrados, passa de essencialmente fotorreceptor (em peixes, anfíbios, répteis e algumas aves) para um órgão exclusivamente endócrino nos mamíferos (UNDERWOOD & GROSS, 1982). Seu produto de secreção mais importante é a melatonina, um hormônio produzido a partir da serotonina pela ação de duas enzimas importantes, a hidroxindol-orto-metil-transferase e a N-acetil-transferase.

A melatonina, apesar de não ser responsável pelo controle da ritmicidade dos mamíferos, tem, nessa classe, ações extremamente importantes. A melatonina é a responsável pelos surtos sazonais de reprodução de várias espécies animais; regula a secreção de vários outros hormônios (MEES et al; 1979), principalmente os corticosteróides adrenais (HALBERG, 1983); age sobre o sistema imunológico (RELLA & LAPIN, 1976), estando, inclusive, relacionada com a patogênese de tumores da mama e da próstata (BARTSCH & BARTSCH, 1986), além de outros efeitos.

1.7 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o molusco *Megalobulimus oblongus* em termos de estresse oxidativo em diferentes órgãos, nas distintas estações do ano. O rato foi utilizado como parâmetro das medidas efetuadas no molusco.

1.7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar os níveis de lipoperoxidação, através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e quimiluminescência (QL) no coração, hepato-pâncreas, músculo do pé e pulmão do molusco, bem como, no coração, fígado, músculo esquelético e pulmão de ratos machos Wistar.

- b) Quantificar as defesas antioxidante enzimáticas: catalase e glutathione peroxidase nos tecidos citados das duas espécies em estudo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados moluscos da espécie *Megalobulimus oblongus* adultos, pesando em torno de 50 a 90 gramas, com comprimento da concha igual ou superior a 7cm e largura igual ou superior a 4cm. Os animais foram capturados nos municípios de Charqueadas e Canoas, Rio Grande do Sul, e mantidos no terrário do Biotério do Instituto de Biociências da UFRGS. Eles permaneceram em caixas plásticas, cobertas com terra, à temperatura ambiente e receberam água *ad libitum* e alface três vezes por semana.

Foram também utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 200 e 400 gramas, provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais eram mantidos em caixas de 270 x 260 x 310 mm com assoalho recoberto de serragem (5 animais por caixa). Eles recebiam água e ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS) *ad libitum*. Foram mantidos sob 12 horas de luz/ 12 horas de escuridão e sob temperatura de 22°C.

2.2 REAGENTES

Nos experimentos realizados neste trabalho, foram utilizados os reagentes apresentados na tabela 1, onde também foram colocados seus respectivos pesos moleculares e fornecedores.

Tabela 1 - Reagentes utilizados, seus respectivos pesos moleculares e fornecedores.

| REAGENTES | PESO MOLECULAR | FORNECEDOR |
|--|----------------------------------|------------|
| Ácido Etilenodiaminotetracético | 372,2 | Reagen |
| Ácido Metafosfórico | (HPO ₃) _n | Merck |
| Ácido Tiobarbitúrico | 144,1 | Sigma |
| Ácido Tricloroacético | 163,39 | Reagen |
| Albumina | -*- | Sigma |
| Azida Sódica | 65,01 | Sigma |
| Bicarbonato de sódio | 84,00 | Reagen |
| Butanol | 74,12 | Synth |
| Cianeto de Potássio | 65,12 | Synth |
| Cloreto de Potássio | 74,56 | Reagen |
| Ferricianeto de Potássio | 329,18 | Merck |
| Fluoreto de fenilmetilsulfonila | 174,2 | Sigma |
| Fosfato de Sódio dibásico heptahidratado | 268,07 | Reagen |
| Fosfato de Sódio monobásico hidratado | 137,99 | Reagen |
| Glutaciona Redutase | 200 units/mg prot | Sigma |
| Glutaciona Reduzida | 307,3 units/mg prot | Sigma |
| Hidroperóxido de Tert-butil | 90,12 | Sigma |
| Hidróxido de Sódio | 40,00 | Reagen |
| NADPH | 833,4 | Sigma |
| Peróxido de Hidrogênio | 34,01 | Merck |
| Sulfato de Cobre | 249,68 | Synth |
| Tartarato de Sódio e Potássio | 282,22 | Synth |

2.3 SOLUÇÕES UTILIZADAS

2.3.1 HOMOGENEIZADO

Para a preparação dos homogeneizados foi utilizado KCl 1,15% na proporção de 1:5 para coração e pulmão de molusco e rato e músculo de rato; e 1:9 para fígado de rato, hepatopâncreas e músculo do pé do molusco. Esta solução era preparada e mantida à temperatura ambiente. Acrescentava-se, também, ao homogeneizado, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF – 100mM) 17,42mg/ml em isopropanol comercial. Esta solução era preparada e guardada em freezer (-20°C).

2.3.2 PARA MEDIDA DE QUIMILUMINESCÊNCIA

As soluções utilizadas para as medidas de quimiluminescência consistiam numa solução reguladora de KCl 140mM e fosfatos 20mM, sendo o pH 7,3. Este tampão era preparado em duas soluções estoques (solução A e solução B) que eram armazenadas. Para preparar a solução A eram utilizados 27,6g (0,2moles) de fosfato monobásico de sódio em água destilada, para um volume total de 1000ml. Para preparar a solução B eram utilizados 28,4g (0,2moles) de fosfato de sódio dibásico anidro em água destilada para completar um volume total de 1000ml. Destes estoques, misturavam-se 19ml da solução A, mais 81ml da solução B e mais 10,43g de KCl, e completava-se com água destilada para um volume final de 1000ml. Esta solução podia ser mantida em temperatura ambiente.

Era acrescentado, também, no ensaio, um hidroperóxido orgânico de origem sintética, hidroperóxido de tert-butil (t-BOOH) na concentração de 400mM. A solução de tert-butil era utilizada a 70%. Para esta solução eram colocados 0,56ml de

tert-butil para um volume final de 10ml de água destilada. Desta solução a 400mM, torna-se 30 μ l no vial e, obtinha-se, assim, uma concentração de 30mM no vial. Esta solução era mantida em geladeira.

2.3.3 PARA MEDIDA DE TBA-RS

As substâncias usadas neste ensaio consistiam nas seguintes: o ácido tricloroacético (TCA) na concentração de 10%, esta solução era mantida em temperatura ambiente. O ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) encontrava-se numa concentração de 0,67%; assim, preparava-se 0,67g de TBA-RS em 100ml de água destilada, esta solução era armazenada na geladeira..

2.3.4 PARA MEDIDA DE PROTEÍNA

As soluções usadas para a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) neste ensaio consistiam no reativo A, que corresponde a bicarbonato de sódio numa concentração de 2% em hidróxido de sódio à 0,1N. Preparavam-se 4g de hidróxido de sódio (NaOH) em 1l de água destilada e, acrescentam-se 10g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). Esta solução devia ser mantida na geladeira. O reativo B1 corresponde ao sulfato de cobre pentahidratado (SO₄Cu.5H₂O) à uma concentração de 1%. Dissolvia-se 0,1g desta substância em 10ml de água destilada; esta solução era mantida na geladeira. O reativo B2 corresponde ao tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) à uma concentração de 2%, 0,2g da substância dissolvida em 10ml de água destilada e a solução mantida na geladeira. O reativo C era preparado no momento do ensaio, acrescentando-se 50ml do reativo A, mais 0,5ml do reativo B1 e mais 0,5ml do reativo B2. A albumina bovina era pre-

parada e mantida na geladeira, utilizando-se 1mg de albumina para cada 1ml de água destilada; esta solução não devia ser agitada após a diluição. A solução de Folin era preparada na concentração de 1/3, ou seja, para cada parte de Folin eram acrescentadas duas partes de água destilada, esta solução devia ser mantida na geladeira (LOWRY et al., 1951).

2.3.5 PARA MEDIDA DA CATALASE

Os reagentes utilizados neste ensaio foram o tampão fosfato 50mM e H₂O₂ (pH = 7,0). Para preparar este tampão utilizavam-se as mesmas substâncias do tampão fosfato usadas para as medidas de QL, nas seguintes proporções: 9,5ml da solução A mais 40,5ml da solução B para completar um volume final de 200ml de água destilada. Para preparar o peróxido de hidrogênio (0,3M) diluíam-se 340µl da solução a 30%, completando um volume final de 10ml de água destilada.

2.3.6 PARA MEDIDA DA GLUTATIONA PEROXIDASE

Para a técnica da glutathione peroxidase (GPx) era necessário o preparo da solução de Drabkin e da solução transformante, que serviam para quantificar a hemoglobina e transformá-la em cianometahemoglobina, a fim de que ela não participasse da reação.

Era feita uma solução mãe de cianeto de potássio e ferrocianeto de potássio e, no momento do ensaio, eram então preparadas nas devidas proporções. Para esta solução mãe, utilizava-se o cianeto de potássio à 9mM (29,3mg / 50ml de água destilada), e a outra solução de ferrocianeto de potássio à 0,9mM (14,8mg / 50ml de água destilada), ambas eram mantidas em temperatura ambiente. Para a solução

de Drabkin preparava-se: 0,85ml de cianeto de potássio, 6,6ml de ferrocianeto de potássio e completava-se então para 10ml de água destilada. Para a solução transformante preparavam-se 5,0ml de cianeto de potássio e 5,0ml de ferrocianeto de potássio.

Um tampão fosfato era preparado nas seguintes proporções: fosfato de sódio dibásico [$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] utilizavam-se 15,336g para 400ml de água destilada e para o fosfato ácido ou fosfato de sódio monobásico [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$] eram preparados 9,865g para 500ml de água destilada. Ambos podiam ser armazenados, e, no momento do ensaio, deviam ser acrescentados ao tampão fosfato 117,3mg de EDTA para cada 50ml dos fosfatos preparados. O ácido metafosfórico também devia ser preparado e acondicionado na geladeira, utilizando-se 5g para 100ml de água destilada.

Para a leitura no espectrofotômetro, eram preparadas as seguintes soluções no momento do ensaio: para o NADPH utilizavam-se 2mg para cada 10ml do tampão fosfato; para a solução de ázida sódica, eram preparados 3,25mg em 200 μl do tampão fosfato; para a solução da GSH utilizavam-se 6,1mg desta enzima para 1ml do ácido metafosfórico já preparado; para a GSSG redutase utilizavam-se 10 μl da enzima em 90 μl do tampão fosfato; o tert-butil era preparado utilizando-se 2 μl em 867 μl de água destilada.

2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais para cada espécie (rato e molusco), um para cada estação do ano: grupo de primavera, grupo de verão, grupo de outono e grupo de inverno. Cada grupo foi composto por cinco amostras, sendo que para cada amostra do molusco eram utilizados dez animais e para o rato cada animal correspondia a uma amostra.

Nestes oito grupos, foram realizadas medidas de lipoperoxidação (LPO) através da quimiluminescência (QL) e através do teste do ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como, as medidas das seguintes enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) nos tecidos.

2.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Cada rato foi pesado (balança Marte) e sacrificado com uma pancada na cabeça. O tórax foi aberto e foi removido o coração e o pulmão; da cavidade abdominal foi removido o fígado e da coxa foi retirado o músculo quadríceps. Cada órgão era colocado em um copo de becker e banhado com uma solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15% para ser homogeneizado.

Os moluscos utilizados eram sempre animais adultos, com dimensões da concha em torno de 7,0 a 8,5cm de comprimento e a largura da concha entre 4,0 a 4,5cm e pesando entre 60 e 90g. Era também observada a borda da concha, que deveria estar cor-de-rosa, o que indica ser um animal adulto. Os animais eram então lavados, para a retirada da terra que os envolvia, e após anestesiados em uma caixa de isopor contendo gelo picado (crioanestesia), onde ficavam em torno de trinta

minutos ou mais, até que não apresentassem mais movimentos. Com a utilização de ferramentas como alicate e pinça, os animais eram abertos a partir da sua concha rompendo-a de ponta a ponta, permitindo que o manto ficasse exposto. O manto era então cortado e os órgãos removidos, como o pulmão, o coração e o hepatopâncreas e o músculo do pé que se encontra fora do manto. Cada órgão era colocado em um copo de becker onde eram banhados com uma solução de KCl (1,15%), para serem homogeneizados.

Os tecidos eram homogeneizados. Alíquotas do sobrenadante de cada órgão eram separadas e congeladas para realizar as medidas de lipoperoxidação e das enzimas antioxidantes. Assim, eram separadas alíquotas para medir QL e TBA-RS, alíquotas para dosar as enzimas antioxidantes CAT e GPx e alíquotas para dosar proteínas. As medidas de QL e TBA-RS eram efetuadas até 72 horas após o sacrifício do animal nas amostras congeladas (-75°C). As medidas das enzimas antioxidantes foram efetuadas até seis meses após o congelamento.

2.6 PREPARAÇÃO DO HOMOGENEIZADO

A preparação do homogeneizado consistia em, remover os órgãos eram removidos, lavá-los por três vezes em solução de KCl 1,15%, secá-los e pesá-los após a retirada do excesso de gorduras.

Colocavam-se 5ml de KCl por grama de tecido do coração, tanto do molusco quanto do rato. E para cada grama de tecido do hepatopâncreas acrescentavam-se 9ml de KCl, o mesmo se dava com o fígado do rato. Para cada grama de tecido do músculo do pé do molusco acrescentavam-se 9ml de KCl, enquanto que para cada grama do tecido do músculo esquelético do rato acrescentavam-se 5ml de KCl.

Acrescentava-se ao pulmão do molusco e do rato 5ml de KCl para cada grama de tecido. E para cada 1ml de homogeneizado acrescentavam-se 10 μ l de PMSF. Após, eram colocados em tubos onde eram homogeneizados em Ultra-Turrax por 40 segundos. Estes homogeneizados eram centrifugados em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B - Rotor SM 24) por 10 minutos a 3000rpm (0-4°C) (LLESUY et al., 1985).

Para o molusco foi utilizado um “pool” de dez animais para cada amostra, pois determinados órgãos não apresentavam material necessário para a realização de todos os ensaios.

2.7 MEDIDAS DE LPO

2.7.1 DETERMINAÇÃO DA QUIMILUMINESCÊNCIA

Através deste método, avalia-se a capacidade de resposta, mediante a determinação de quimiluminescência produzida pela amostra.

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butil) ao homogeneizado do tecido em estudo. Este hidroperóxido orgânico não foi acrescentado às amostras já que no molusco, não se observava um padrão de resposta como no rato, onde há um perfil cinético de aumento de emissão e depois queda. As respostas do molusco ao t-BOOH foram irregulares, oscilavam.

Os homogeneizados de tecido foram colocados em vials de vidro de 25mm de diâmetro por 50mm de altura. Para evitar a fosforescência dos vials ativada pela luz fluorescente, estes foram conservados na obscuridade até o momento de seu uso e as determinações se realizaram em sala escura. As condições gerais do en-

saio foram: meio de reação consistindo numa solução reguladora de KCl 140mM e fosfatos 20mM, acrescentavam-se 3,5ml deste tampão no vial, faziam-se então três leituras e tomava-se o terceiro valor. Após esta leitura, adicionavam-se 500µl do homogeneizado de tecido, fazia-se então uma segunda leitura e para o molusco deixava-se contando até atingir um máximo de quimiluminescência. Para o homogeneizado de tecido do rato era adicionado o hidroperóxido de tert-butil 3mM (BOVERIS et al., 1983; BOVERIS et al., 1985; LLESUY, et al., 1990; GONZALEZ FLECHA et al., 1991; BELLÓ-KLEIN et al., 1994).

Para o cálculo da quimiluminescência, onde se avalia a capacidade de resposta, mediante a determinação da QL produzida em grande parte, pelas carbonilas excitadas e pelo oxigênio singlet da amostra, que foram formados na reação radicalar, calcula-se então: a QL = (QL máxima - QL basal) x 4,0 x 2 / [concentração de proteína] x 0,5 x 60. Os resultados foram expressos em contas por segundo (cps) por miligrama de proteína.

2.7.2 TESTE DO TBA-RS NO HOMOGENEIZADO

A técnica do TBA-RS (TBA-reactive substances, ou seja, substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico-TBA) consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de ácido tiobarbitúrico, sob condições ácidas, e medir a formação de um produto rosa (base de Schiff), espectrofotometricamente (o pigmento formado permanece estável por cerca de 6 horas) (BUEGE & AUST, 1978; OHKAWA et al., 1979; MERSON et al., 1982; HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1995).

Colocavam-se em tubo de ensaio: 750µl de ácido tricloroacético (TCA) à 10%, 250µl do homogeneizado, 500µl do TBA a 0,67%, 250µl de água destilada, agitava-se e, após, fervia-se por 15 minutos, esfriava-se em gelo e adicionavam-se 1,5ml de butanol para extrair o pigmento. Cada tubo era agitado por 40 segundos e, após eram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos, aspirava-se a fase superior e fazia-se a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 535nm.

Para a determinação da concentração de TBA-RS, era determinada a absorbância da amostra multiplicada pela sua diluição, dividido pelo ϵ e dividido pela concentração da proteína, assim temos: $C = A \times \text{diluição} / \epsilon / [\text{concentração de proteína}]$. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína.

2.8 MEDIDAS ENZIMÁTICAS

2.8.1 CATALASE

O princípio da técnica para detectar a atividade da CAT se baseia na medida da velocidade de consumo de peróxido de hidrogênio na amostra estudada. A decomposição do H_2O_2 é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece uma cinética de pseudo primeira ordem, sendo sua constante de velocidade (K') calculada experimentalmente e igual a: $K' = Kx[\text{CAT}]$, onde: K (constante específica da reação) = $4,6 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (BOVERIS & CHANCE, 1979; WEBSTER & NUNN, 1988).

Colocava-se o tampão fosfato na cubeta de quartzo do espectrofotômetro e adicionava-se 10µl de homogeneizado de tecido, a quantidade de tampão e da amostra variavam de acordo com o tecido, assim tínhamos: para o coração do mo-

lusco acrescentavam-se 910µl do tampão e 50µl da amostra, o mesmo se dava com o músculo do pé. Para o hepatopâncreas eram acrescentados 950µl de tampão e 10µl da amostra e para o pulmão do molusco acrescentava-se 920µl de tampão e 40µl da amostra. Para as amostras de tecido do rato colocavam-se para o coração e músculo esquelético 910µl de tampão e 50µl da amostra e para o fígado e pulmão era colocado 955µl de tampão e 5µl de amostra. Após zerava-se o espectrofotômetro e por fim adicionavam-se 40µl de H₂O₂ (concentração final de 50mM). Lia-se a 240nm ($\epsilon = 40M \text{ cm}$) durante 2 minutos aproximadamente. Após, quantificava-se a proteína da amostra para expressar os resultados.

Para o cálculo, tomava-se a inclinação da reta e calculava-se a concentração de catalase pela seguinte equação $[CAT] = \text{inclinação da reta} / 4,6 \times 10^7 \times \mu\text{l amostra} \times [\text{proteína}]$. A concentração de catalase foi expressa em pmoles/mg de proteína para o rato e µmoles/mg proteína para o molusco.

2.8.2 GLUTATIONA PEROXIDASE

A técnica para determinar a atividade da GPx pode ser efetuada pela taxa de oxidação de NADPH na presença de GSH e GR. A azida (N₃Na) é adicionada para inibir a atividade da catalase (MILLS, 1957; MILLS, 1960).

Para se dar início ao ensaio era necessário determinar a concentração de hemoglobina (Hb) presente na amostra de tecido. Para isso, era usado o reativo de Drabkin. Tomavam-se 100µl do homogeneizado de tecido mais 1ml de Drabkin. Lia-se no espectrofotômetro a 546nm. O cálculo da concentração de Hb = Absorbância x 16 (em mg/ml de Hb).

Uma vez conhecida a concentração de Hb, transformava-se a Hb em cianometahemoglobina (para inibir a atividade pseudoperoxidativa da Hb) por meio da seguinte relação para cada 0,6mg/ml de Hb colocavam-se 100 μ l de solução transformante. Como o molusco não apresenta Hb, e sim hemocianina, foi realizada esta inibição apenas para as amostras de tecido do rato.

Adicionavam-se, então, na cubeta do espectrofotômetro: tampão e amostra, estes variavam de acordo com o tecido, para as amostras de rato usava-se: 330 μ l de tampão e 50 μ l de amostra para todos os tecidos. Para o molusco, colocava-se no coração e pulmão 180 μ l de tampão e 200 μ l de amostra, para o hepatopâncreas adicionavam-se 330 μ l de tampão e 50 μ l da amostra, para o músculo adicionavam-se 280 μ l de tampão e 100 μ l da amostra.

Os passos seguintes eram: adicionavam-se 500 μ l de NADPH; 10 μ l de azida sódica (concentração final de 1mM); acrescentavam-se 50 μ l de GSH (concentração final 5mM); acrescentavam-se 10 μ l de GR (concentração final de 0,25 U/ml); misturava-se e colocava-se no espectrofotômetro e monitorava-se a absorbância em 340nm ($\epsilon = 6,22 \text{ M cm}$) por um período de 2 a 4 minutos para obter a linha de base; por fim, adicionavam-se 50 μ l de tert-butil (concentração final de 0,5mM) e lia-se por mais alguns minutos.

2.9 MEDIDA DE PROTEÍNA

Para se quantificar a proteína nos tecidos do molusco e do rato utilizamos a técnica de Lowry et al., 1951. Em tubos de ensaio pequenos colocávamos: T1, T2 e

T3 que correspondiam a curva de calibração da albumina (proteína bovina), tubos para as amostras e para o branco.

Em cada tubo colocavam-se: 800µl de água, 20µl de amostra e para a curva de calibração é colocado em T1 50µl de albumina, em T2 colocava-se 100µl de albumina e em T3 colocavam-se 150µl de albumina, após adicionava-se 2ml do reativo C e esperava-se dez minutos para acrescentar 200µl de Folin. Esperava-se trinta minutos, e só então era feita a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 625nm.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos dados coletados, foram calculadas as médias e o erro padrão da média para cada grupo experimental. Foi utilizado o teste t de Student para dados não pareados, para comparar os valores obtidos em cada um dos grupos experimentais. Além disso, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para dados não pareados, a fim de comparar as diferenças observadas dentro de cada parâmetro de estudo. Quando for afirmado que existem diferenças estatisticamente significativas, o nível de significância é de, pelo menos 5% ($p \leq 0,05$). Foi feita a análise de variância de uma via, com teste complementar de Student Newman-Keuls, sendo as diferenças consideradas significativas para $p \leq 0,05$. A análise estatística foi efetuada com o auxílio do programa computacional Primer of Biostatistics.

3 RESULTADOS

A apresentação dos resultados obedece à seguinte ordem: observando as técnicas de LPO através de TBA-RS e QL, das enzimas antioxidantes CAT e GPx e da quantificação de proteína na primavera, verão, outono e inverno e as variações sazonais. Os órgãos estudados foram: coração, hepatopâncreas, músculo do pé e pulmão do molusco *Megalobulimus oblongus* e coração, fígado, músculo esquelético e pulmão de ratos machos Wistar. Ao final do capítulo, é apresentado um resumo dos resultados obtidos para um melhor entendimento dos mesmos, levando em consideração as estações culminantes o verão e o inverno.

3.1 LIPOPEROXIDAÇÃO - TBA-RS

A tabela 2 apresenta as medidas de LPO, avaliadas pela técnica de TBA-RS, nos tecidos do molusco *Megalobulimus oblongus*. Foram observadas variações sazonais entre os diferentes órgãos estudados.

No coração, a LPO foi máxima na primavera e verão, com valores significativamente menores no outono e inverno. Os valores obtidos no outono são significativamente menores quando analisados em relação ao verão, e há uma diminuição da LPO no inverno, sendo significativos os valores obtidos em relação à primavera e ao verão (Figura 13).

No hepatopâncreas, a LPO foi máxima na primavera, e houve uma diminuição progressiva dos valores da LPO no verão, outono e inverno. Na primavera os valores obtidos foram significativamente maiores em relação ao verão, outono e inverno; e significativamente maiores no verão em relação ao outono e inverno (Figura 14).

Para o músculo, a LPO foi máxima na primavera e verão, com valores significativamente maiores da primavera em relação ao verão, outono e inverno (Figura 15)

No pulmão, obtivemos resultados significativamente menores no inverno quando comparados ao verão (Figura 16).

Tabela 2: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) (nmol/mg de proteína) no molusco *Megalobulimus oblongus*, nas quatro estações do ano, em diferentes tecidos. estudados do. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Estação/tecido | Coração (n=5) | Hepatopâncreas (n=5) | Músculo (n=5) | Pulmão (n=5) |
|-----------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| PRIMAVERA | 1,28 \pm 0,08 | 1,74 \pm 0,09 | 1,01 \pm 0,21 | 0,37 \pm 0,05 |
| VERÃO | 1,64 \pm 0,48 | 0,94 \pm 0,30 [⊗] | 0,60 \pm 0,15 [⊗] | 0,75 \pm 0,23 |
| OUTONO | 0,58 \pm 0,16 [*] | 0,38 \pm 0,11 ^{⊗*} | 0,17 \pm 0,02 [⊗] | 0,41 \pm 0,05 |
| INVERNO | 0,27 \pm 0,12 ^{⊗*} | 0,18 \pm 0,04 ^{⊗*} | 0,16 \pm 0,02 [⊗] | 0,21 \pm 0,02 [*] |

Diferença significativa $p \leq 0,05$

Diferenças significativas em relação à:

⊗ = primavera

* = verão

◆ = outono

❖ = inverno

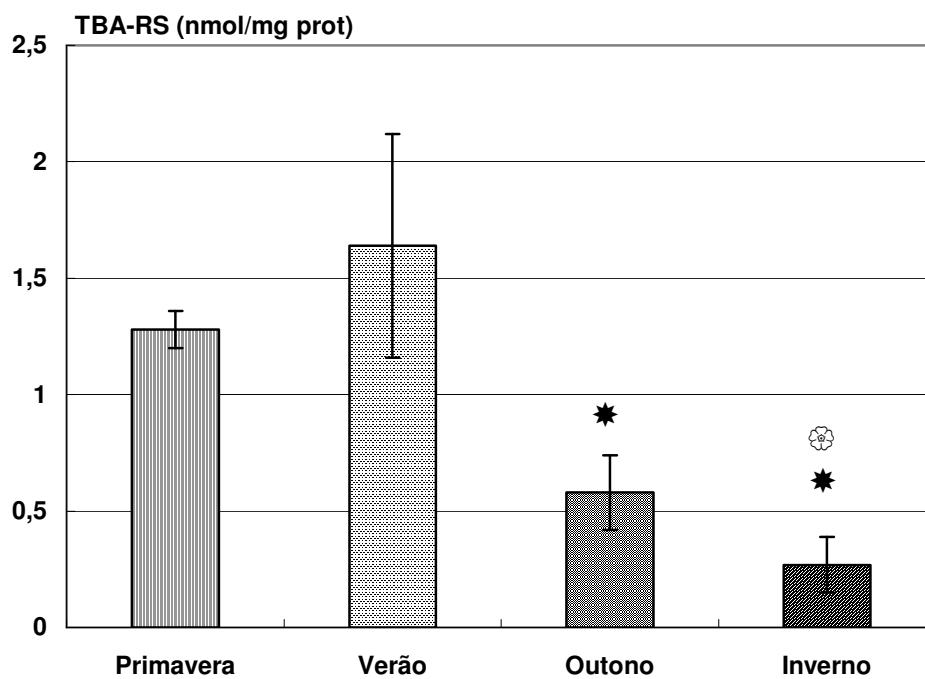


Figura 13 - Resultados de TBA-RS (nmol/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o coração do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

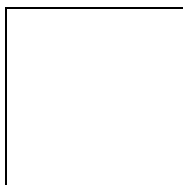


Figura 14 - Resultados de TBA-RS (nmol/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o hepatopâncreas do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

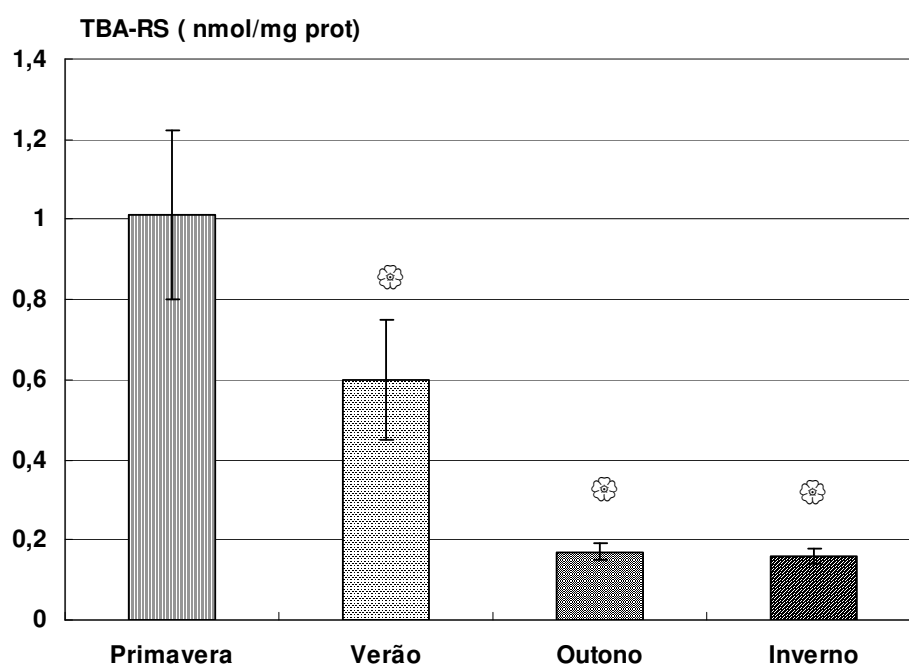


Figura 15. - Resultados de TBA-RS (nmol/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o músculo do pé do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

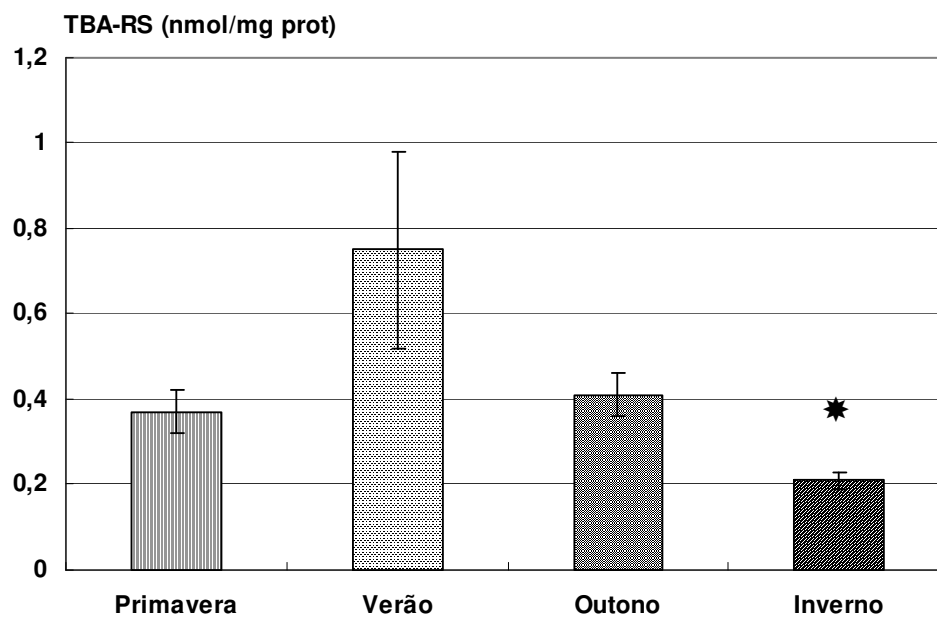


Figura. 16 . Resultados de TBA-RS (nmol/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

A tabela 3 mostra os resultados obtidos com a técnica de TBA-RS para os diferentes órgãos de ratos machos Wistar, nas diferentes estações.

No coração, a LPO foi máxima na primavera e verão, com valores significativamente menores da primavera em relação ao verão, outono e inverno (Figura 17).

No fígado, os resultados de TBA-RS foram maiores na primavera e verão, mostrando uma tendência de queda do verão para o outono e inverno, contudo, os valores obtidos não apresentaram diferenças significativas (Figura 18).

No músculo, os resultados de TBA-RS foram maiores na primavera e no verão e menores no outono e inverno. Sendo que, os valores obtidos no outono e inverno não apresentaram diferenças significativas (Figura 19).

Para o pulmão, os resultados do TBA-RS foram maiores na primavera e verão e menores no outono e inverno. Sendo que, os valores obtidos não foram significativos (Figura 20).

Tabela 3: Resultados obtidos de TBA-RS (nmol/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Estação/tecido | Coração (n=5) | Fígado (n=5) | Músculo (n=5) | Pulmão (n=5) |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| PRIMAVERA | 0,70 \pm 0,12 | 0,51 \pm 0,17 | 0,70 \pm 0,14 | 0,97 \pm 0,16 |
| VERÃO | 0,46 \pm 0,07 ☼ | 0,64 \pm 0,29 | 1,65 \pm 0,72 | 0,94 \pm 0,12 |
| OUTONO | 0,19 \pm 0,05 ☼ | 0,31 \pm 0,10 | 0,20 \pm 0,05 | 0,53 \pm 0,06 |
| INVERNO | 0,29 \pm 0,03 ☼ | 0,17 \pm 0,02 | 0,19 \pm 0,03 | 0,58 \pm 0,09 |

Diferença significativa $p \leq 0,05$

Diferenças significativas em relação à:

☼ = primavera

* = verão

◆ = outono

❖ = inverno

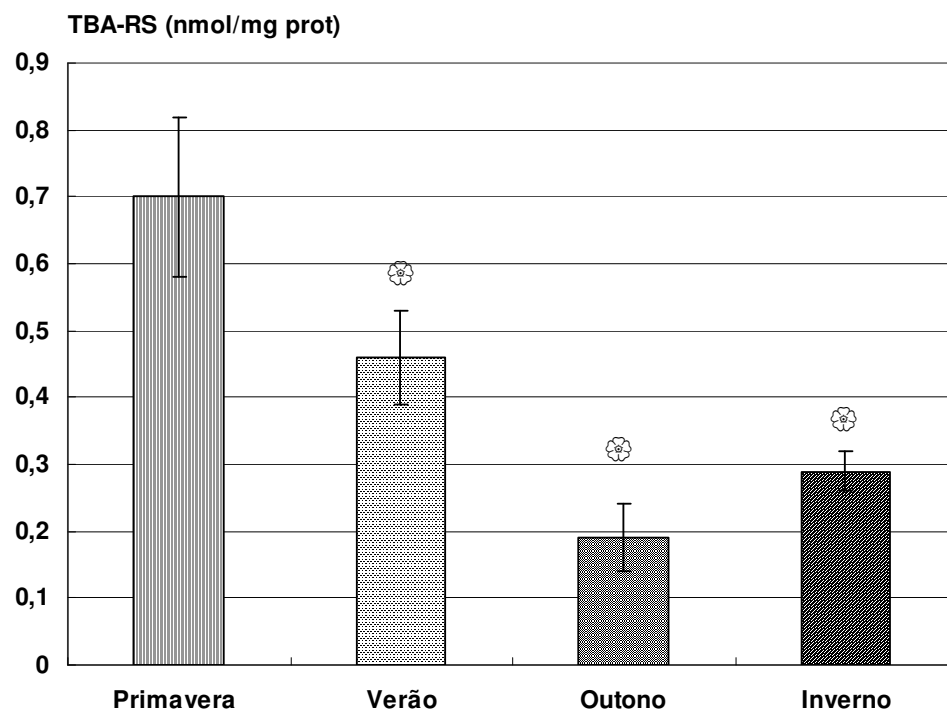


Figura 17. Resultados de TBA-RS (nmol/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o coração de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

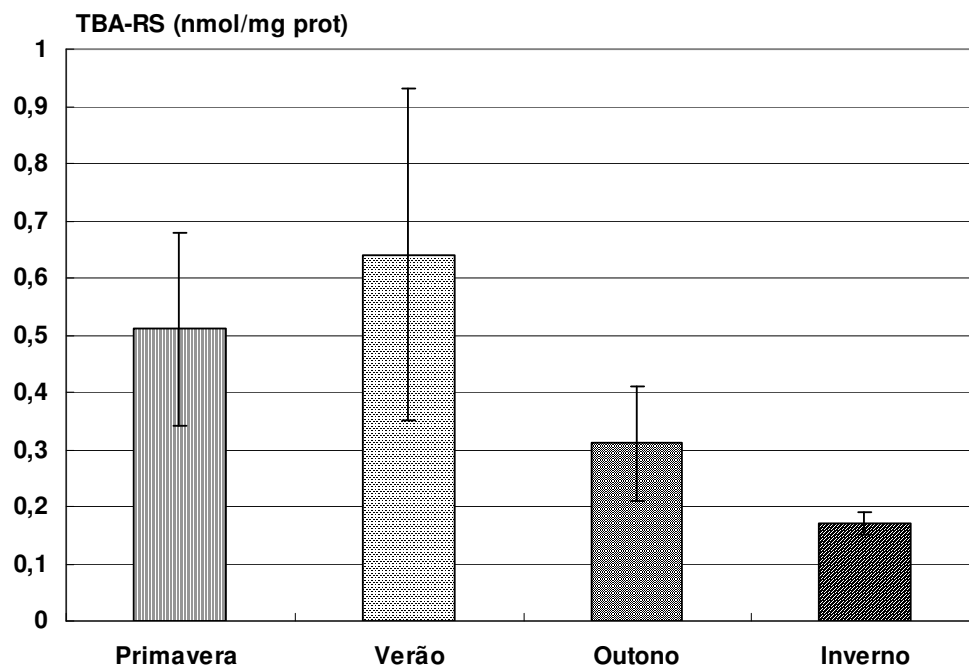


Figura 18. Resultados de TBA-RS (nmol/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o fígado de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

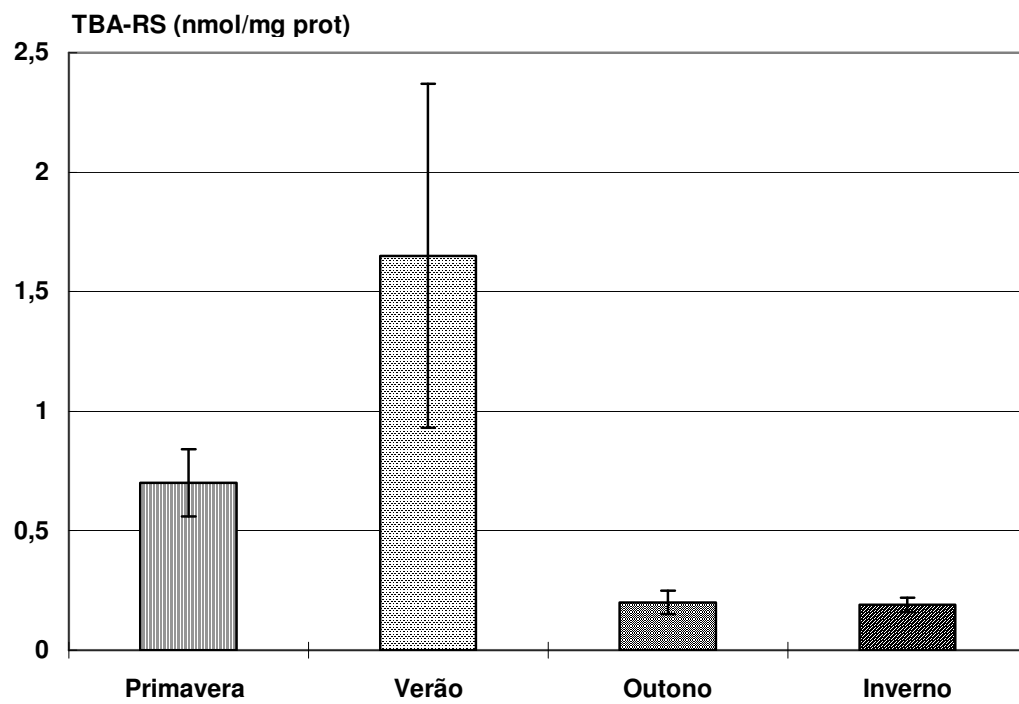


Figura 19 - Resultados de TBA-RS (nmol/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o músculo esquelético de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

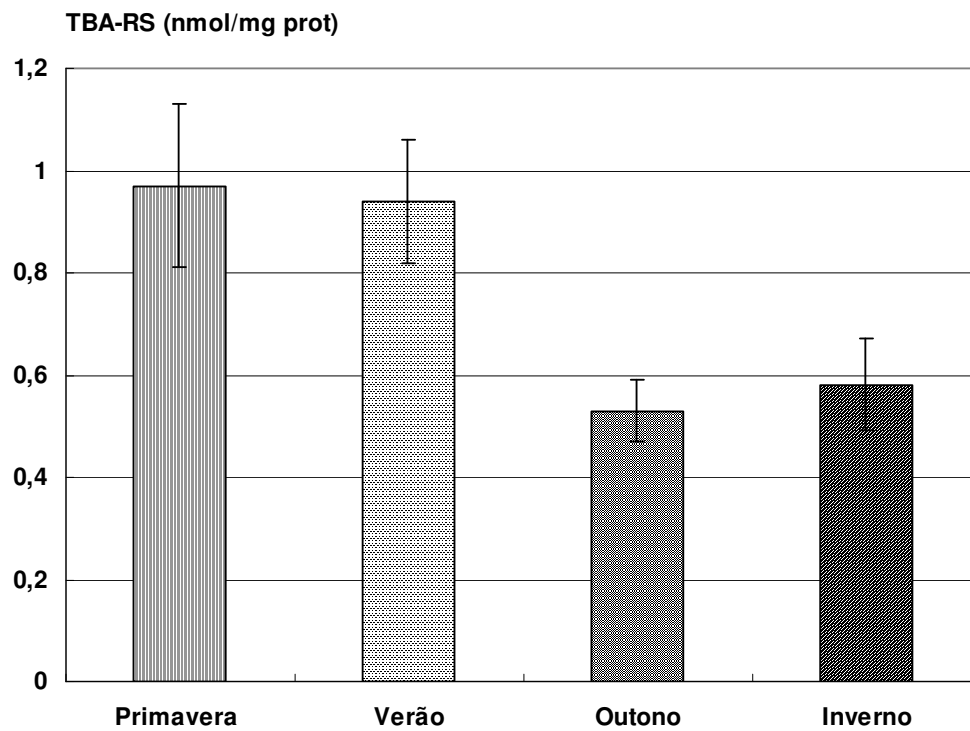


Figura 20 - Resultados de TBA-RS (nmol/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

3.2 LIPOPEROXIDAÇÃO - QUIMILUMINESCÊNCIA (QL)

A tabela 4 mostra os resultados obtidos com a técnica de quimiluminescência (QL) para os diferentes órgãos estudados de *Megalobulimus oblongus*, nas diferentes estações.

Os resultados da QL para o coração mostram valor máximo no verão em relação as outras estações, mas não foi significativo (Figura 21).

No hepatopâncreas, a QL foi máxima no verão e com valores significativamente maiores e relação à primavera, outono e inverno (Figura 22).

No músculo, a QL foi máxima na primavera, os valores obtidos não foram significativos (Figura 23).

No pulmão, o resultado da QL foi máximo no verão, e com valores significativamente maiores no verão em relação ao inverno (Figura 24).

Tabela 4 Resultados obtidos na QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Estação/tecido | Coração (n=5) | Hepatopâncreas (n=5) | Músculo (n=5) | Pulmão (n=5) |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| PRIMAVERA | 115,02 \pm 15,33 | 215,67 \pm 24,82* | 141,44 \pm 41,39 | 180,62 \pm 14,69 |
| VERÃO | 152,53 \pm 46,52 | 603,38 \pm 152,87 | 84,30 \pm 30,92 | 266,42 \pm 44,71 |
| OUTONO | 70,44 \pm 22,77 | 220,38 \pm 44,48* | 131,01 \pm 27,37 | 174,29 \pm 45,70 |
| INVERNO | 47,76 \pm 15,19 | 171,08 \pm 20,08* | 33,61 \pm 8,14 | 71,62 \pm 20,61* |

Diferença significativa $p \leq 0,05$

Diferenças significativas em relação à:

⊗ = primavera

* = verão

◆ = outono

❖ = inverno

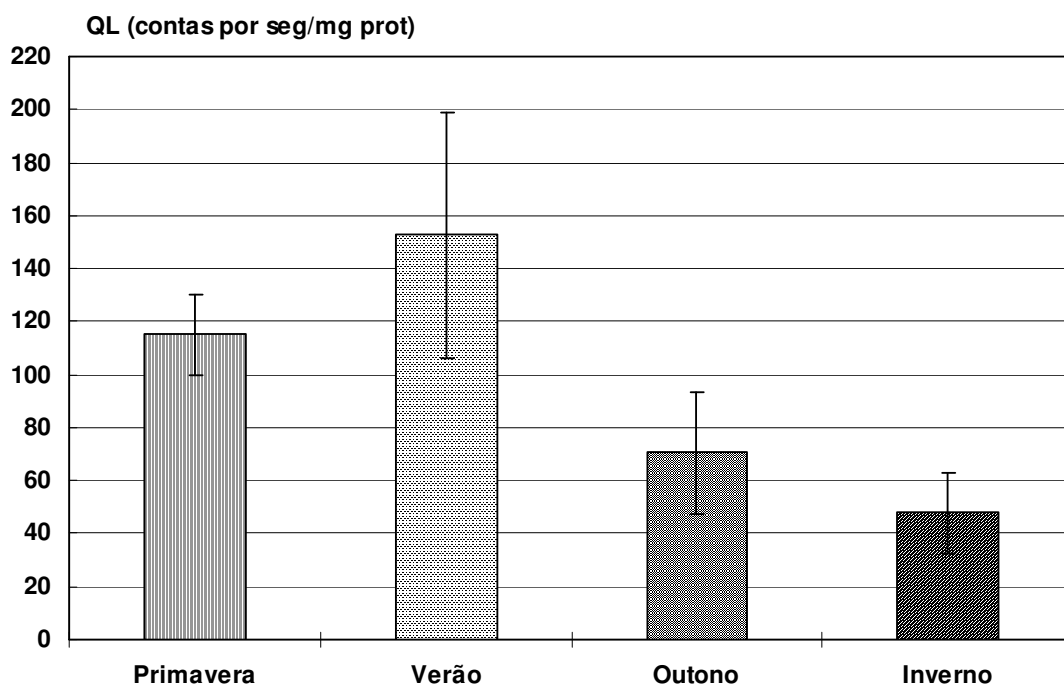


Figura 21 - Resultados de QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o coração do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

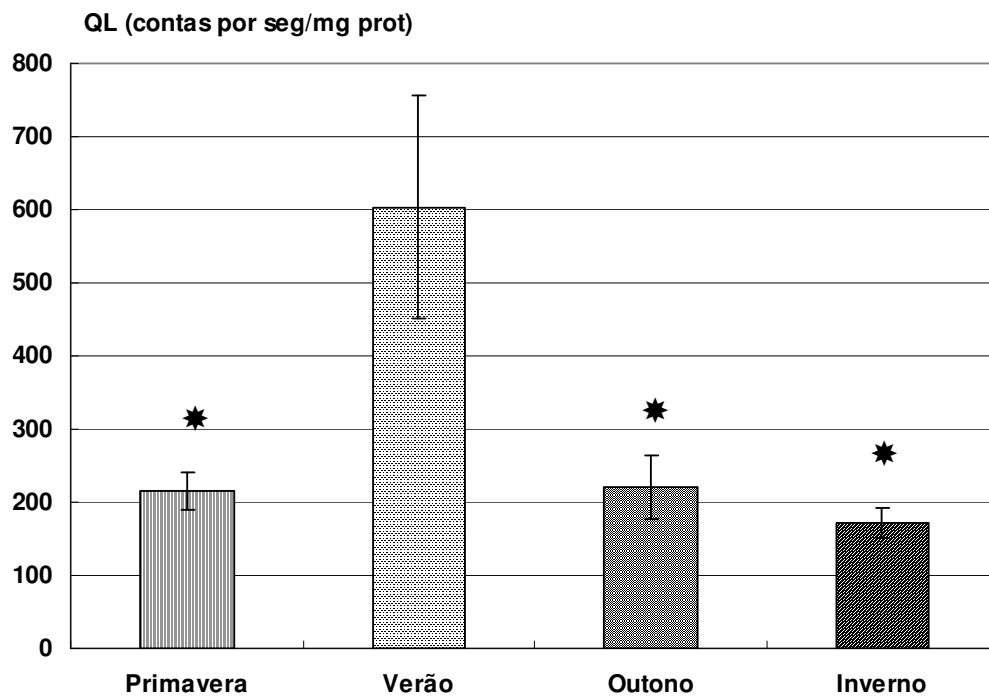


Figura 22 - Resultados de QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o hepatopâncreas do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

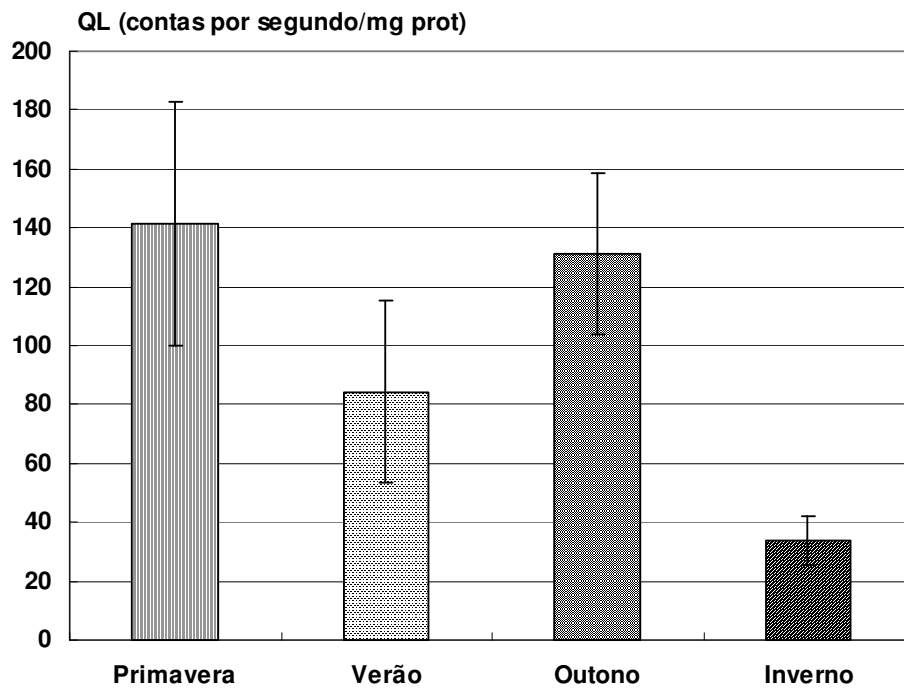


Figura 23 - Resultados de QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o músculo do pé do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

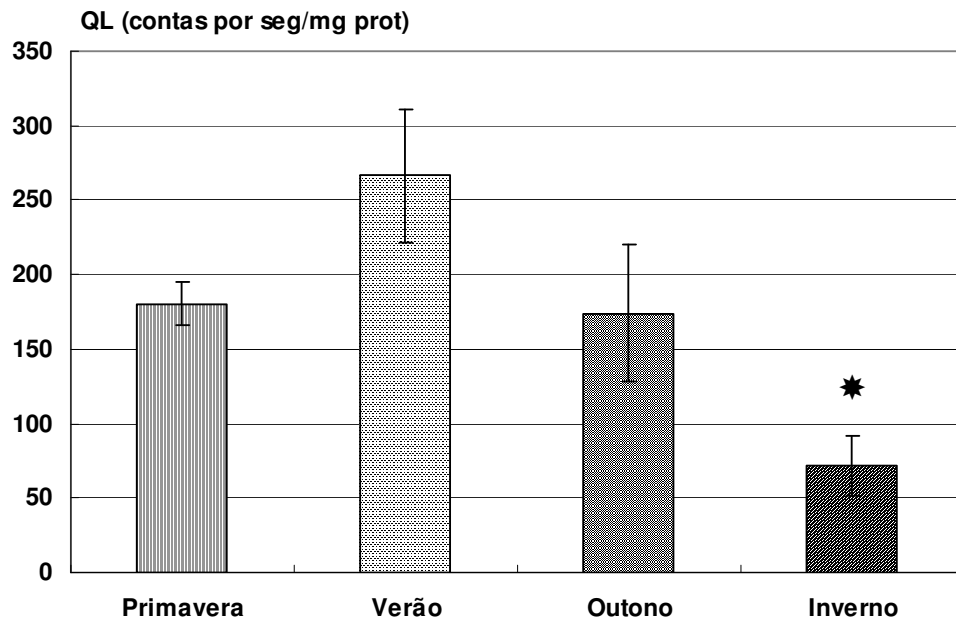


Figura 24 - Resultados de QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

A tabela 5 mostra os resultados obtidos com a técnica de quimiluminescência nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar, nas diferentes estações.

No coração de rato, houve uma tendência de queda no verão em relação ao outono e inverno (Figura 25).

No fígado, houve valor máximo no outono e mínimo no inverno, não houve diferenças significativas (Figura 26).

No músculo, a QL foi máxima no verão, com valores significativamente maiores no verão em relação ao outono e inverno e da primavera em relação ao outono e inverno (Figura 27).

No pulmão, a QL foi máxima no verão, não houve diferenças significativas (Figura 28).

Tabela 5: Resultados obtidos de QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Estação/tecido | Coração (n=5) | Fígado (n=5) | Músculo (n=5) | Pulmão (n=5) |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| PRIMAVERA | 7,34 \pm 2,30 | 5,20 \pm 1,53 | 76,28 \pm 5,19 | 25,61 \pm 4,12 |
| VERÃO | 10,00 \pm 3,32 | 6,84 \pm 2,48 | 100,84 \pm 27,20 | 33,58 \pm 12,21 |
| OUTONO | 4,09 \pm 0,79 | 10,37 \pm 4,64 | 18,98 \pm 4,76*⊗ | 6,22 \pm 4,32 |
| INVERNO | 3,06 \pm 0,82 | 3,45 \pm 1,02 | 24,09 \pm 1,02*⊗ | 7,48 \pm 4,48 |

Diferença significativa $p \leq 0,05$

Diferenças significativas em relação à:

⊗ = primavera

* = verão

◆ = outono

❖ = inverno

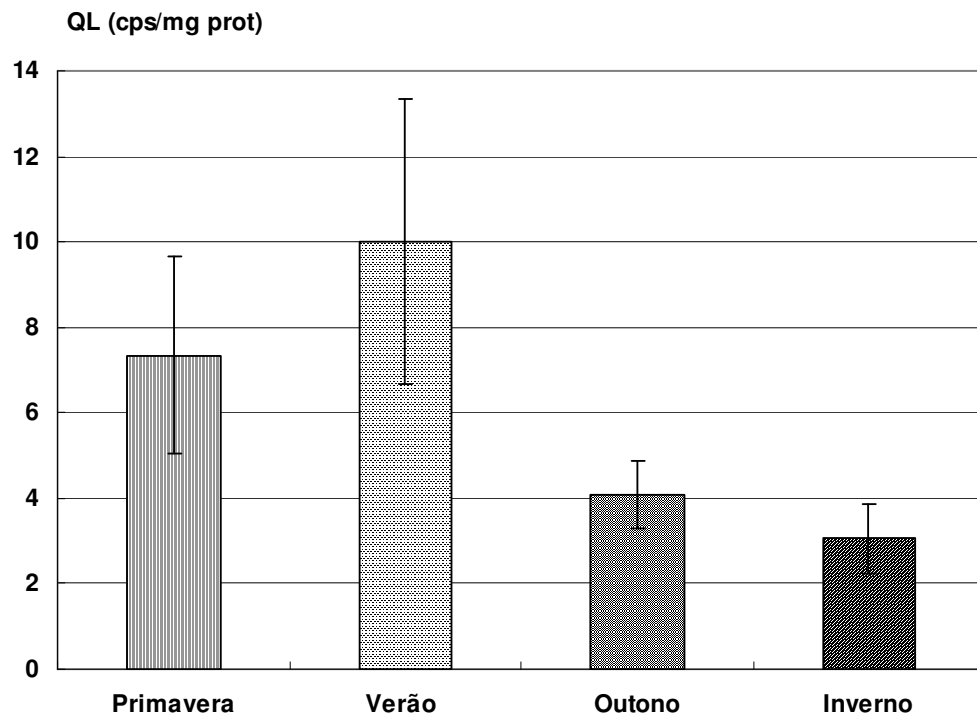


Figura 25 - Resultados de QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o coração de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

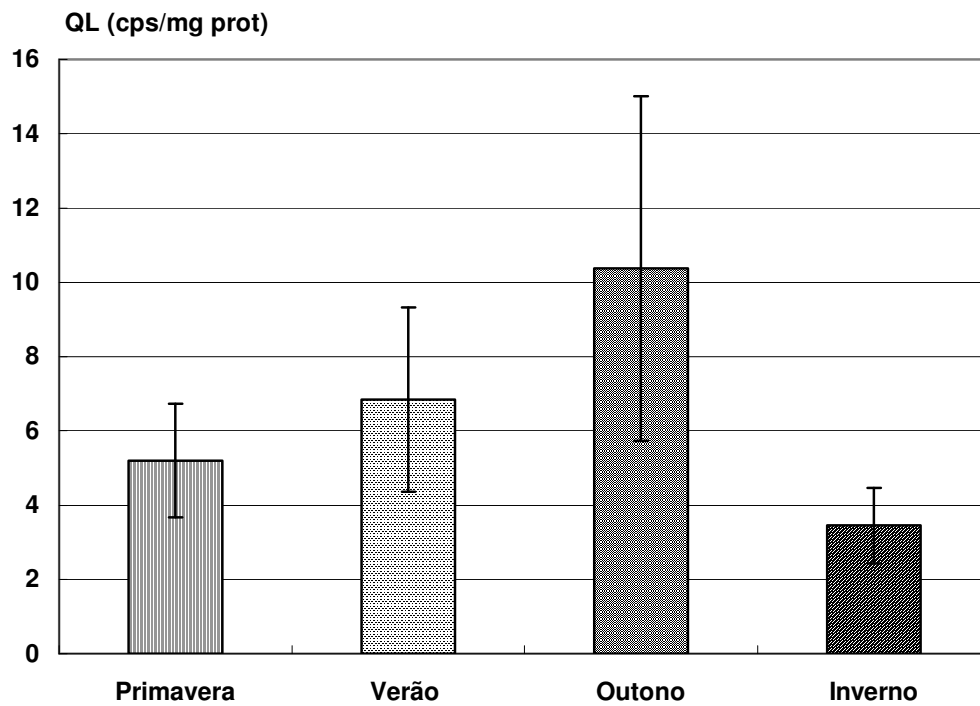


Figura 26 - Resultados de QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o fígado de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

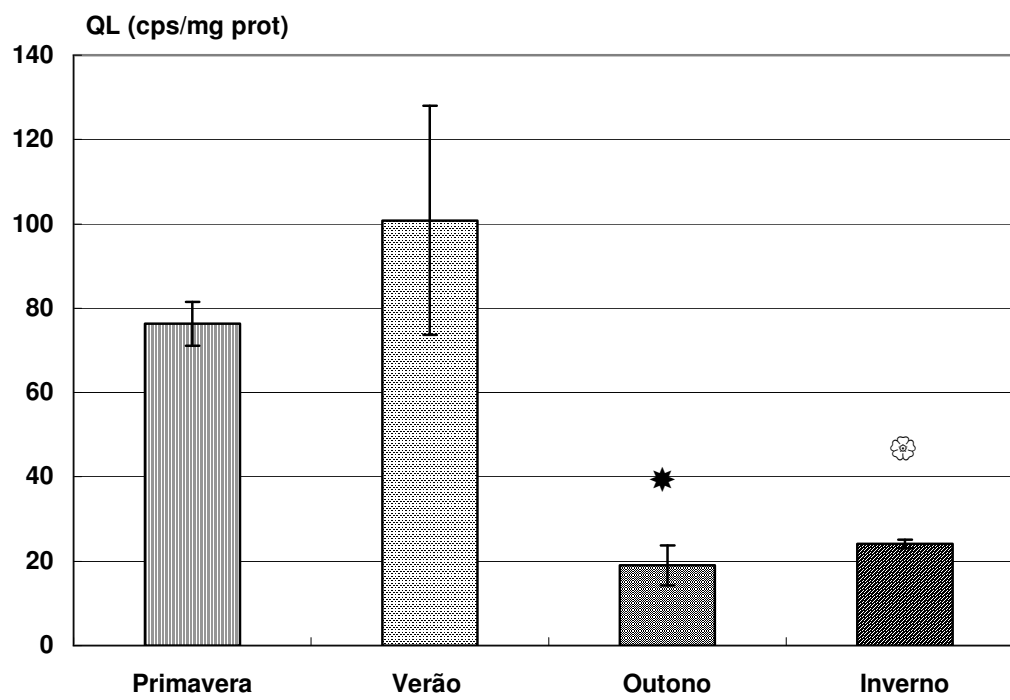


Figura 27 - Resultados de QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o músculo esquelético de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

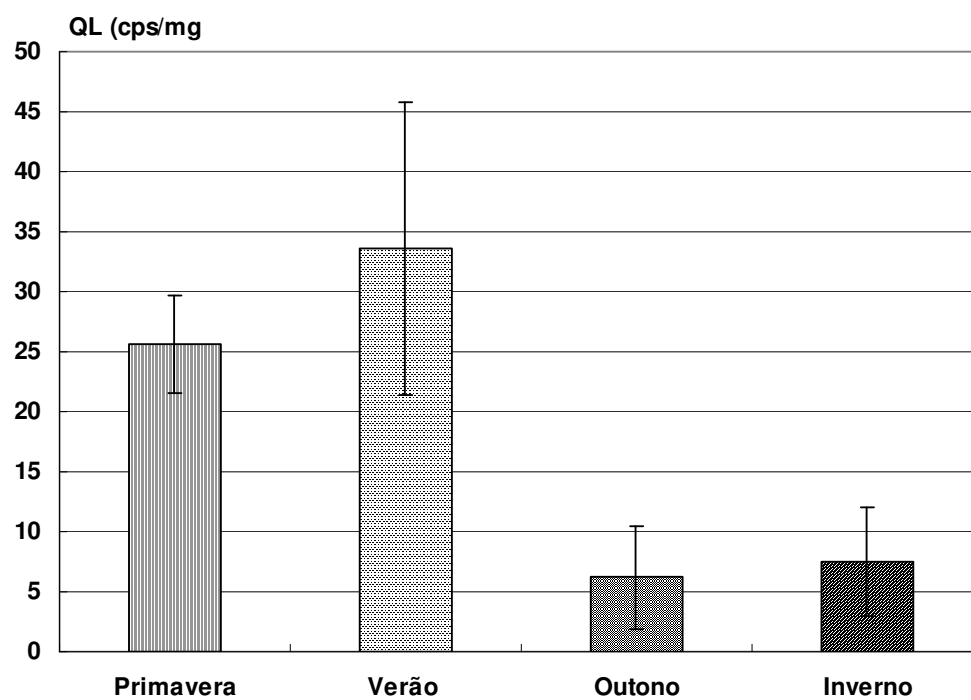


Figura 28 - Resultados de QL (contas por segundo/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

3.3 ENZIMA CATALASE

Na tabela 6, encontram-se os resultados obtidos com o ensaio da catalase (CAT) nos diferentes órgãos do molusco *Megalobulimus oblongus*, nas diferentes estações.

No coração do molusco não foi observada diferença significativa entre as estações (Figura 29).

No hepatopâncreas, a enzima catalase foi máxima no inverno, e apresentou diferenças significativas do inverno em relação à primavera, verão e outono (Figura 30).

No músculo, não foram verificadas diferenças significativas entre as estações, com tendência a aumento no outono e inverno (Figura 31).

No pulmão, não foram constatadas diferenças significativas da enzima catalase nas diferentes estações, com tendência a aumento no verão (Figura 32).

Tabela 6: Resultados obtidos da enzima catalase ($\mu\text{moles/mg}$ de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Estação/tecido | Coração (n=5) | Hepatopâncreas (n=5) | Músculo (n=5) | Pulmão (n=5) |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| PRIMAVERA | 0,63 \pm 0,08 | 1,5 \pm 0,24♣ | 0,28 \pm 0,04 | 0,42 \pm 0,07 |
| VERÃO | 1,10 \pm 0,23 | 1,40 \pm 0,18♣ | 0,26 \pm 0,03 | 0,46 \pm 0,17 |
| OUTONO | 1,20 \pm 0,20 | 1,80 \pm 0,21♣ | 0,31 \pm 0,04 | 0,43 \pm 0,07 |
| INVERNO | 0,78 \pm 0,20 | 3,7 \pm 0,63 | 0,30 \pm 0,03 | 0,29 \pm 0,02 |

Diferenças significativas $p \leq 0,05$

Diferenças significativas em relação à:

♣ = primavera

* = verão

♣ = outono

❖ = inverno

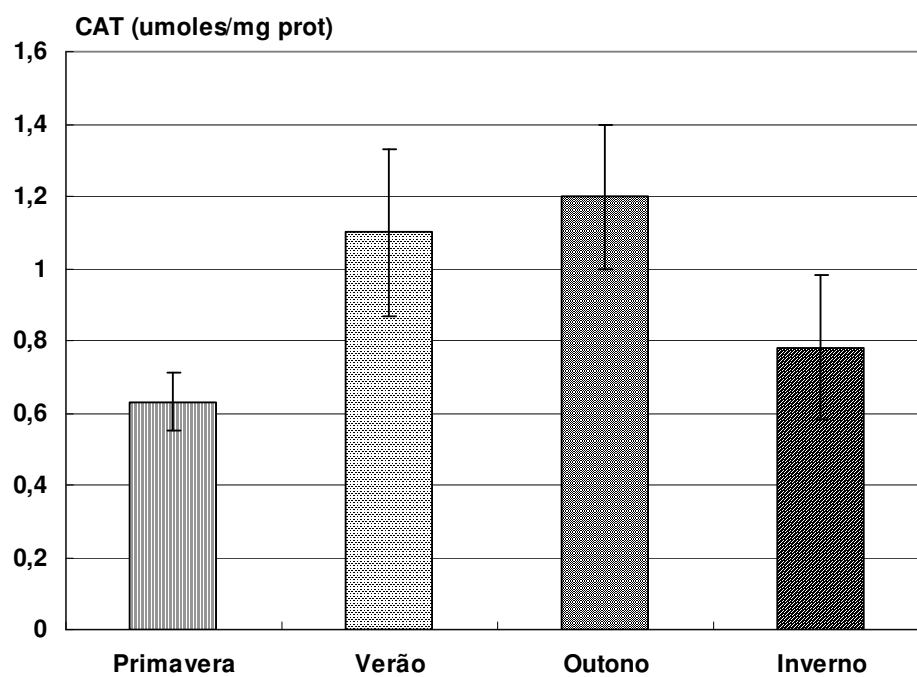


Figura 29: Resultados da enzima catalase ($\mu\text{moles/mg}$ de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o coração molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

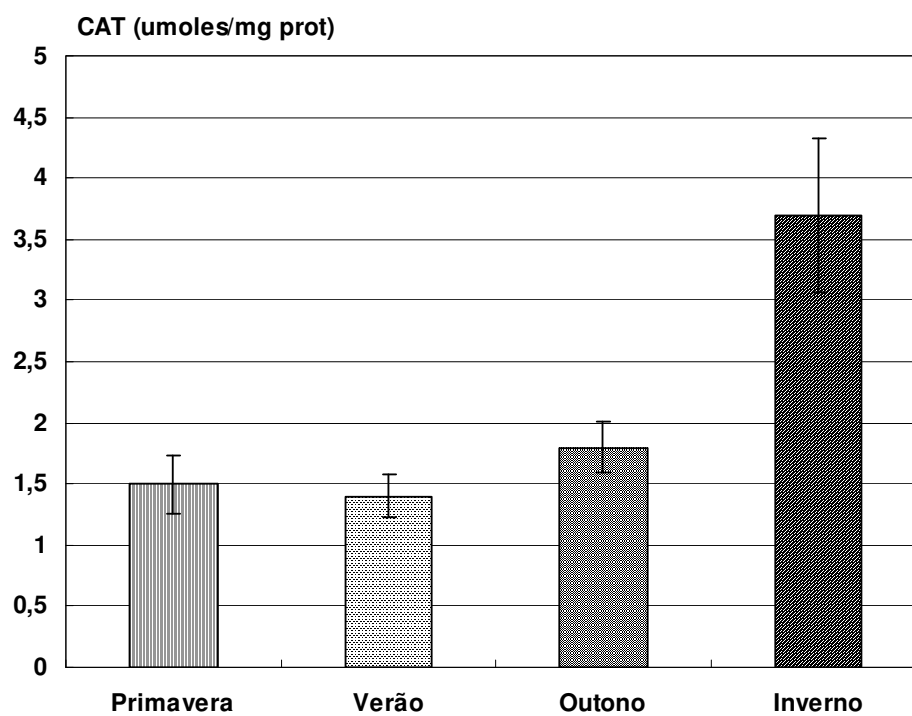


Figura 30: Resultados da enzima catalase ($\mu\text{moles/mg}$ de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o hepatopâncreas do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

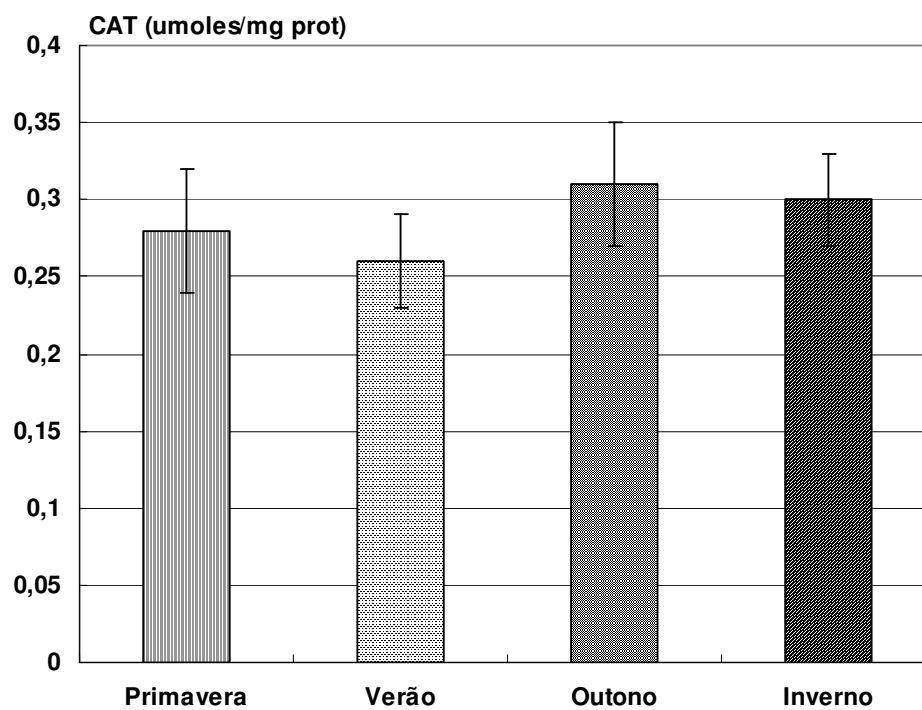


Figura 31: Resultados da enzima catalase ($\mu\text{moles/mg}$ de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o músculo do pé do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

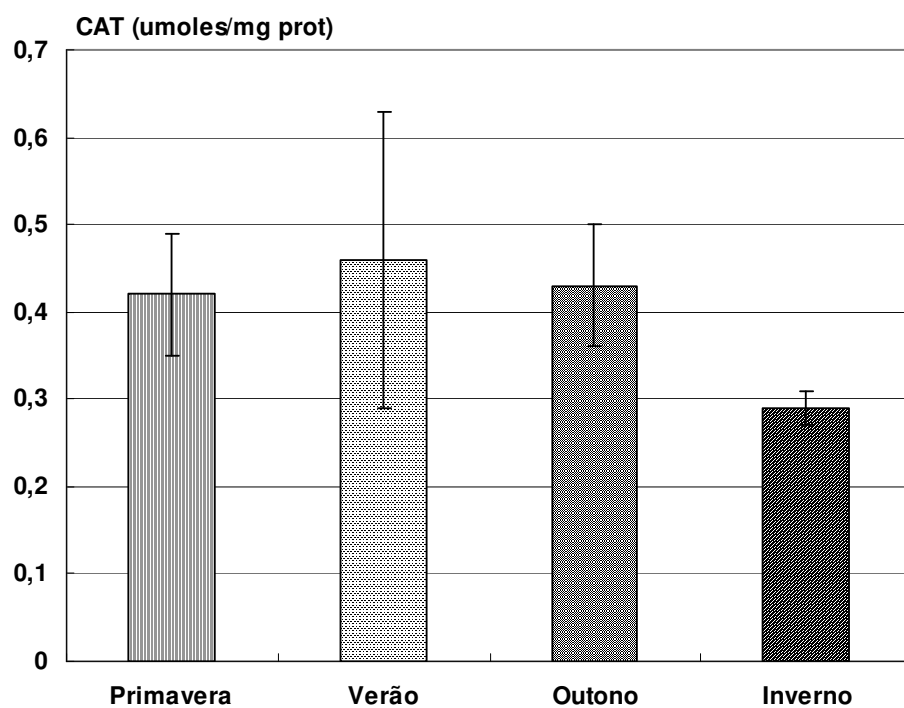


Figura 32: Resultados da enzima catalase ($\mu\text{moles/mg}$ de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

Na tabela 7 observamos os resultados obtidos para o ensaio da enzima CAT nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar, nas diferentes estações.

No coração, a enzima catalase foi máxima no verão, e apresentou diferenças significativas do verão em relação à primavera, ao outono e inverno (Figura 33).

No fígado, a enzima catalase foi máxima no verão, e com resultados significativamente maiores desta estação em relação à primavera, ao outono e inverno (Figura 34).

No músculo, não houve diferenças significativas entre as estações da enzima catalase, com tendência a aumento no verão (figura 35).

No pulmão, a enzima catalase foi máxima na primavera, e com diferença significativa desta estação em relação ao outono (Figura 36).

Tabela 7: Resultados obtidos da enzima catalase (pmoles/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Estação/tecido | Coração (n=5) | Fígado (n=5) | Músculo (n=5) | Pulmão (n=5) |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| PRIMAVERA | 11,0 \pm 0,96 * | 210,0 \pm 18,00 * | 7,7 \pm 2,3 | 48,00 \pm 5,7 |
| VERÃO | 24,0 \pm 2,20 | 550,0 \pm 69,0 | 11,0 \pm 3,32 | 43,0 \pm 6,9 |
| OUTONO | 8,6 \pm 2,10 * | 130,0 \pm 44,0 * | 6,2 \pm 0,79 | 20,0 \pm 9,6 ☼ |
| INVERNO | 9,20 \pm 2,10 * | 190,0 \pm 9,6 * | 4,0 \pm 0,65 | 28,0 \pm 1,74 |

Diferença significativa $p \leq 0,05$

Diferenças significativas em relação à:

☼ = primavera

* = verão

◆ = outono

❖ = inverno

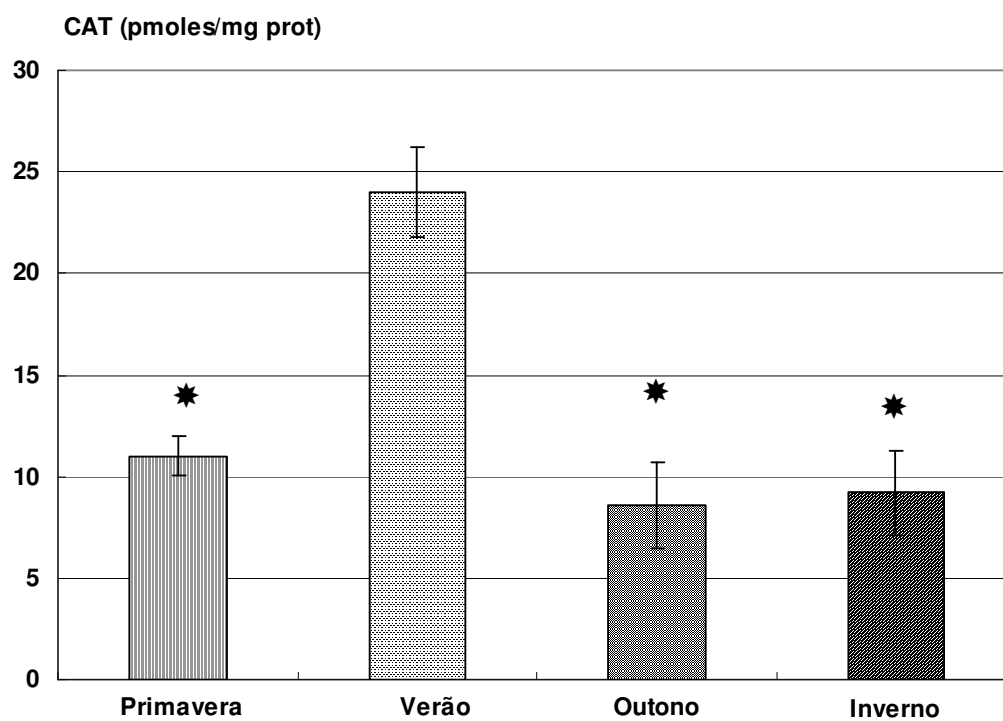


Figura 33: Resultados da enzima catalase (pmoles/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o coração de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

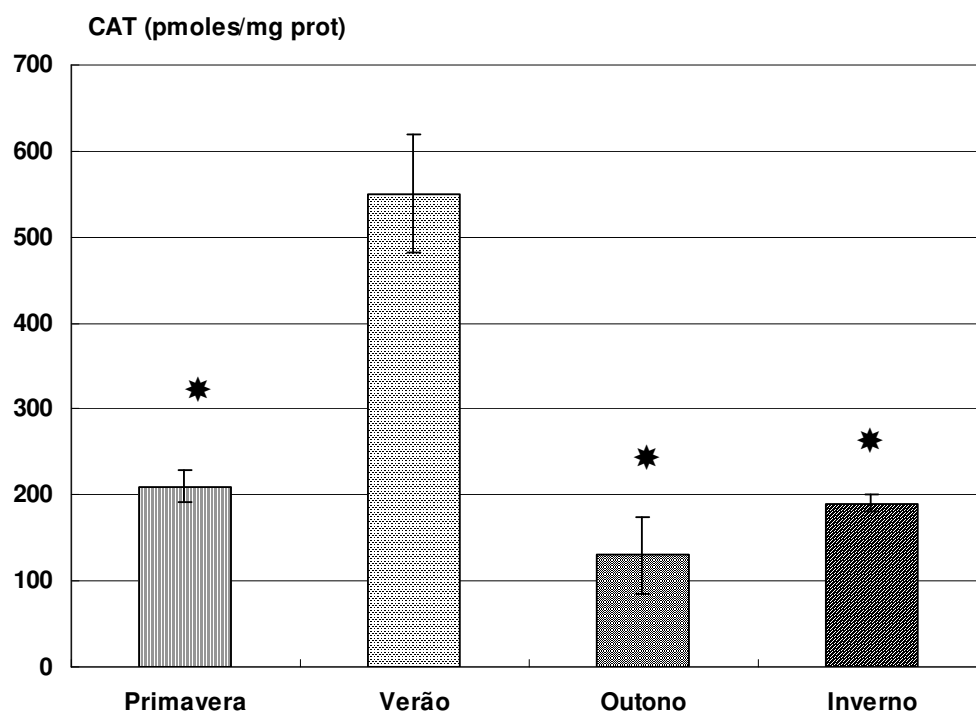


Figura 34: Resultados da enzima catalase (pmoles/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o fígado de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

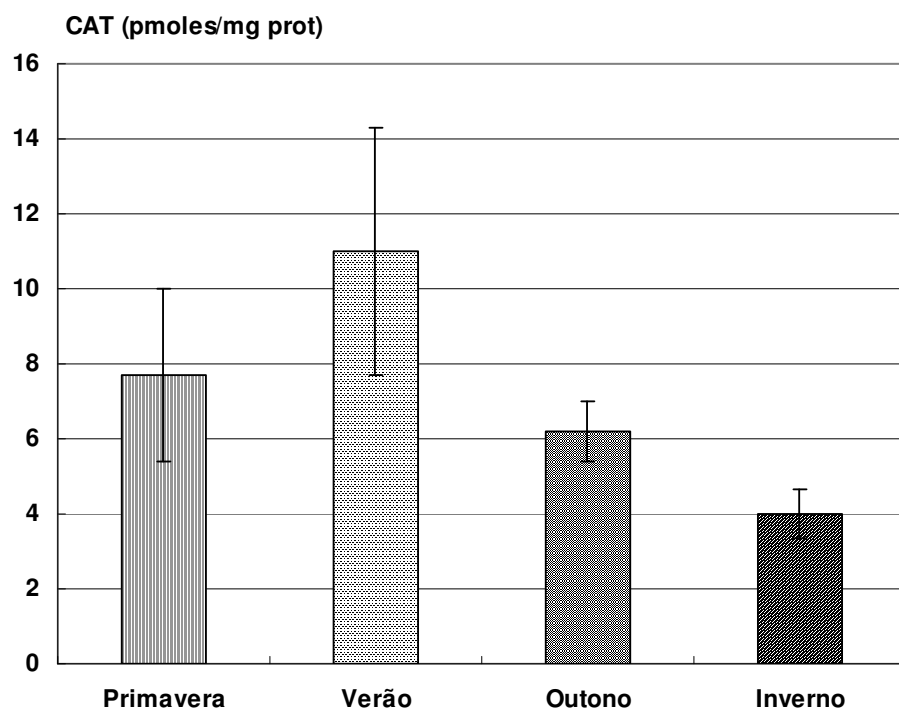


Figura 35: Resultados da enzima catalase (pmoles/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o músculo esquelético de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

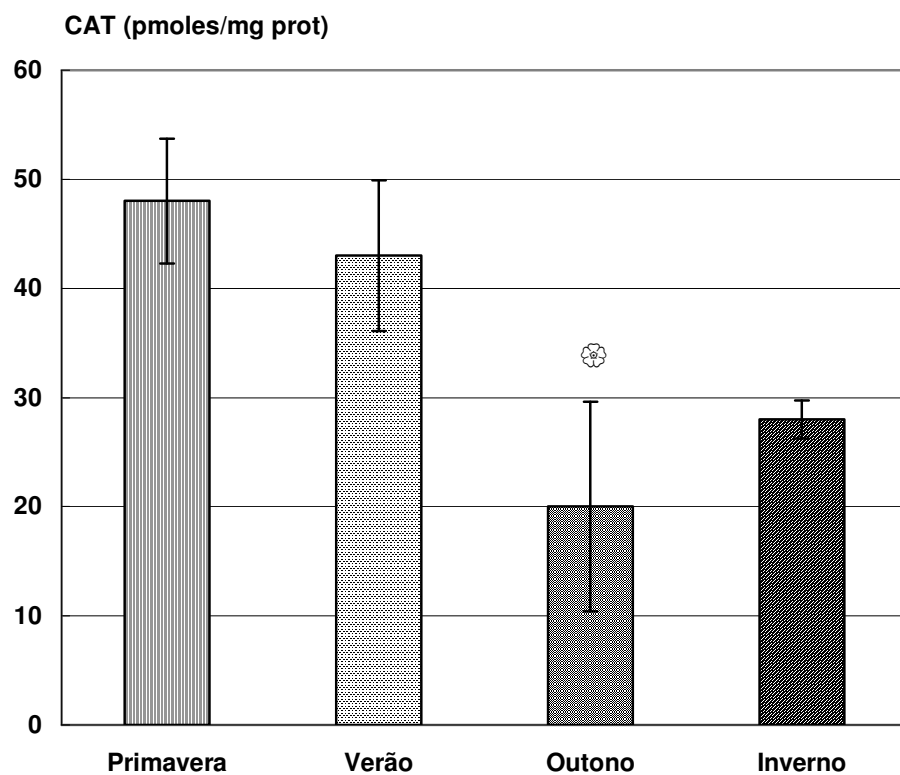


Figura 36: Resultados da enzima catalase (pmoles/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

3.4 ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE

A tabela 8 mostra os resultados obtidos no ensaio da enzima glutaciona peroxidase (GPx) nos diferentes órgãos estudados do molusco *Megalobulimus oblongus*, nas diferentes estações.

No coração, não verificamos diferenças significativas nas diferentes estações, com tendência a aumento no inverno (Figura 37).

No hepatopâncreas, verificamos que há valores significativamente maiores no verão em relação à primavera, ao outono e inverno (Figura 38).

No músculo, não verificamos diferenças significativas entre as estações (Figura 39).

No pulmão, não verificamos diferenças significativas entre as estações (Figura 40).

Tabela 8: Resultados obtidos da enzima glutatona peroxidase (nmoles/min/mg de proteína) nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Estação/Tecido | Coração (n=5) | Hepatopâncreas (n=5) | Músculo (n=5) | Pulmão (n=5) |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| PRIMAVERA | 3,18 \pm 1,08 | 4,88 \pm 1,94* | 9,00 \pm 3,17 | 4,39 \pm 2,33 |
| VERÃO | 4,76 \pm 0,64 | 13,25 \pm 1,79 | 11,38 \pm 1,74 | 6,50 \pm 1,42 |
| OUTONO | 4,22 \pm 0,39 | 5,18 \pm 0,63* | 10,66 \pm 0,91 | 9,92 \pm 1,45 |
| INVERNO | 4,81 \pm 1,34 | 3,69 \pm 0,51* | 7,29 \pm 0,66 | 5,27 \pm 0,48 |

Diferenças significativas $p \leq 0,05$

Diferenças significativas em relação à:

☼ = primavera

* = verão

◆ = outono

❖ = inverno

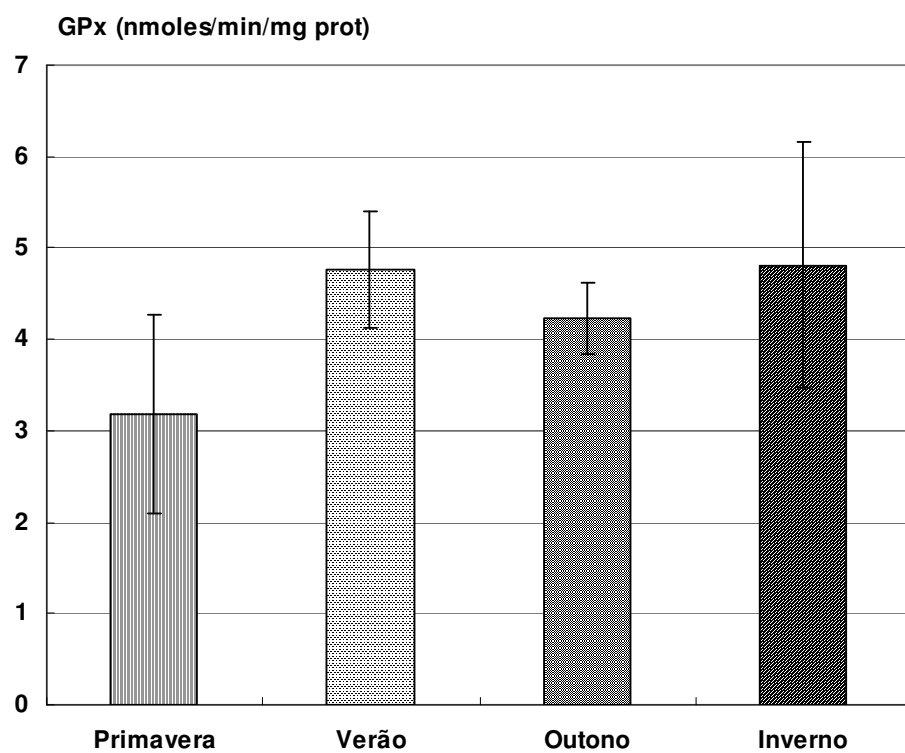


Figura 37: Resultados da enzima glutathione peroxidase (nmoles/min/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o coração do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

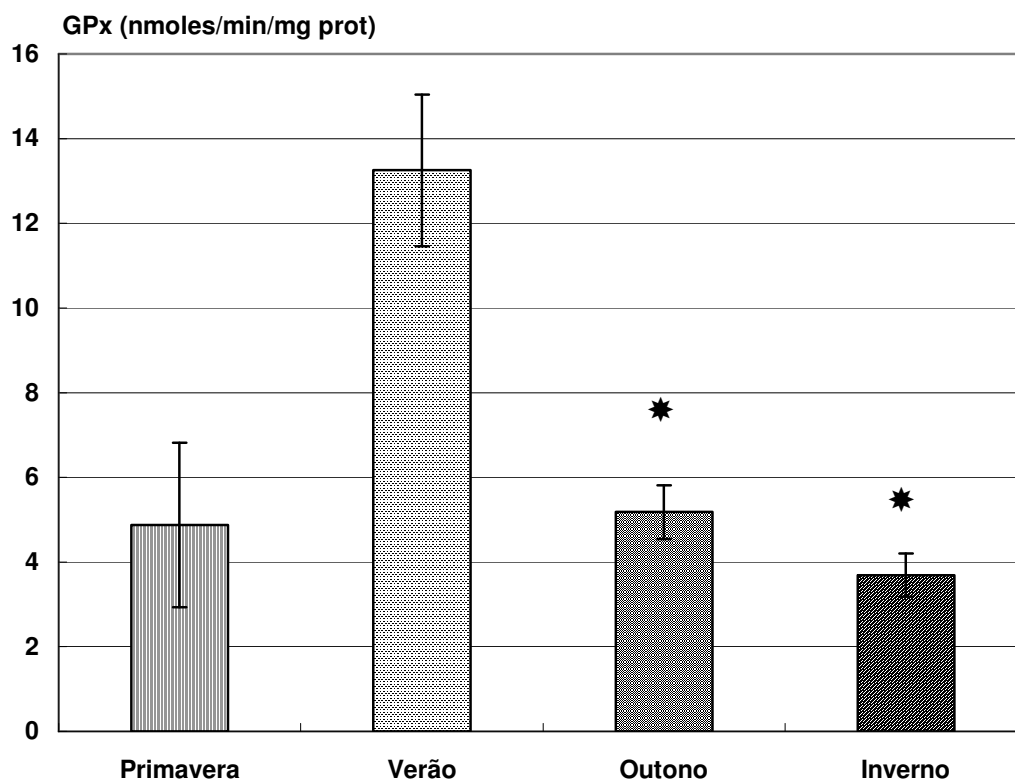


Figura 38: Resultados da enzima glutatona peroxidase (nmoles/min/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o hepatopâncreas do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

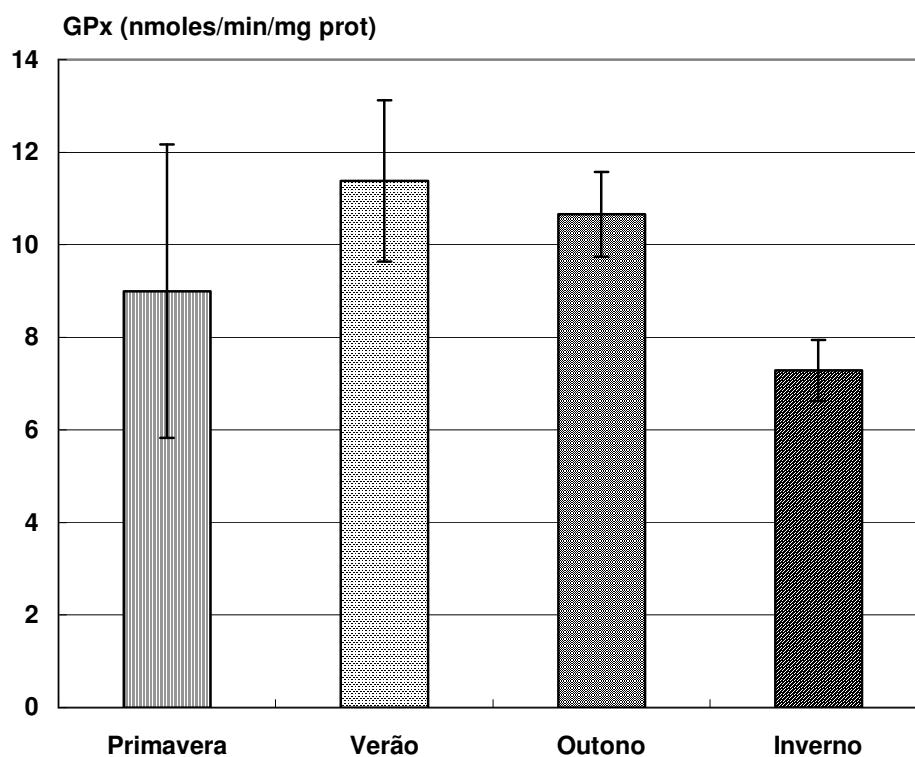


Figura 39: Resultados da enzima glutatona peroxidase (nmoles/min/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o músculo do pé do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

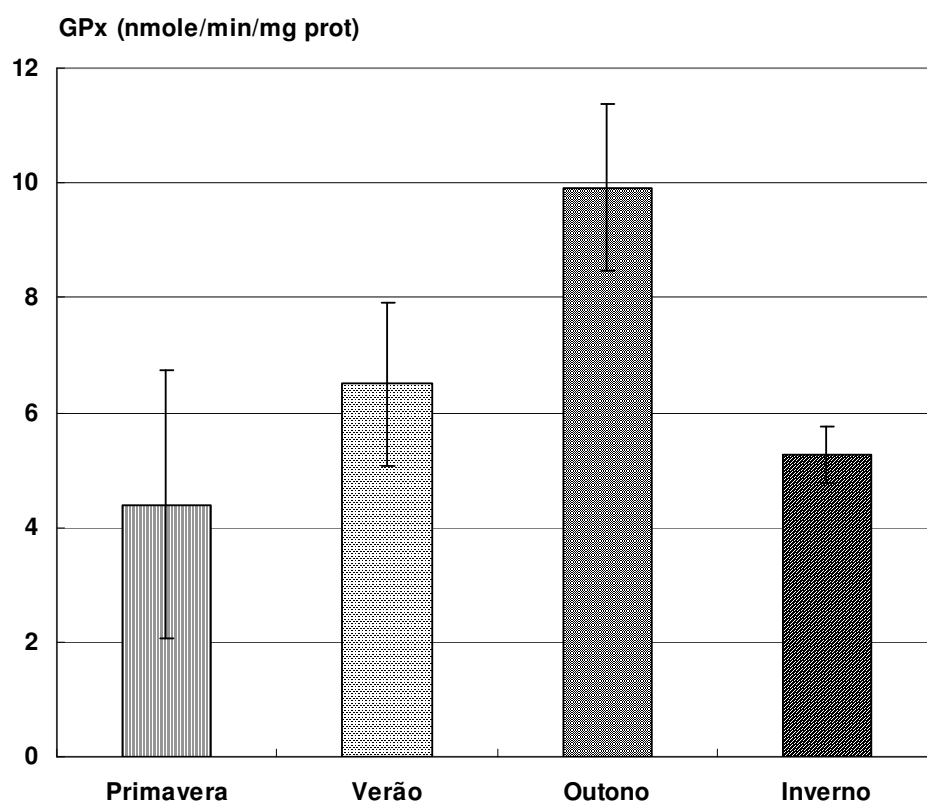


Figura 40: Resultados da enzima glutatona peroxidase (nmoles/min/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

A tabela 9 mostra os resultados obtidos no ensaio da GPx para ratos machos Wistar nos diferentes órgãos estudados.

No coração, foram observados valores significativamente maiores no verão em relação à primavera, ao outono e inverno (Figura 41).

No fígado, foi percebido que há diferenças significativas no verão em relação à primavera, ao outono e inverno (Figura 42).

No músculo, há valores significativamente maiores no verão em relação à primavera, ao outono e inverno (Figura 43).

No pulmão, há valores significativamente maiores no verão em relação à primavera, ao outono e inverno (Figura 44).

Tabela 9: Resultados obtidos da enzima glutathiona peroxidase (nmoles/min/mg de proteína), nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Estação/tecido | Coração (n=5) | Fígado (n=5) | Músculo (n=5) | Pulmão (n=5) |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| PRIMAVERA | 25,89 \pm 2,03* | 31,37 \pm 3,06* | 11,64 \pm 2,67* | 7,45 \pm 2,05* |
| VERÃO | 86,25 \pm 11,13 | 135,13 \pm 25,87 | 34,63 \pm 2,49 | 19,17 \pm 5,06 |
| OUTONO | 23,69 \pm 4,84* | 47,38 \pm 5,11* | 5,35 \pm 1,21* | 6,36 \pm 0,85* |
| INVERNO | 36,78 \pm 8,50* | 70,22 \pm 5,72* | 11,82 \pm 0,89* | 9,07 \pm 2,15* |

Diferença significativa $p \leq 0,05$

Diferenças significativas em relação à:

⊗ = primavera

* = verão

◆ = outono

❖ = inverno

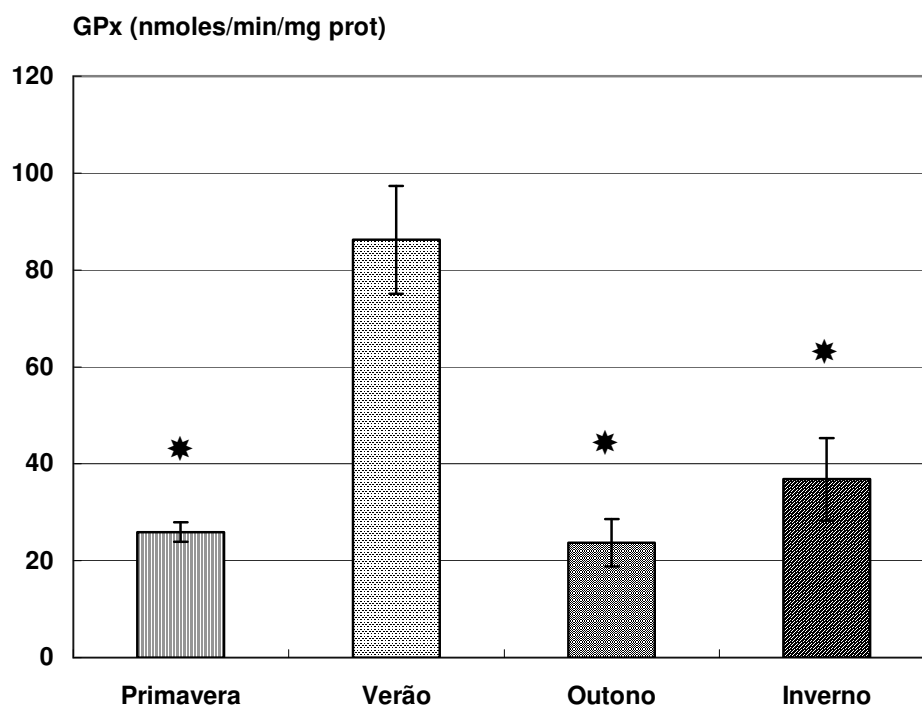


Figura 41: Resultados da enzima glutathiona peroxidase (nmoles/min/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o coração de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

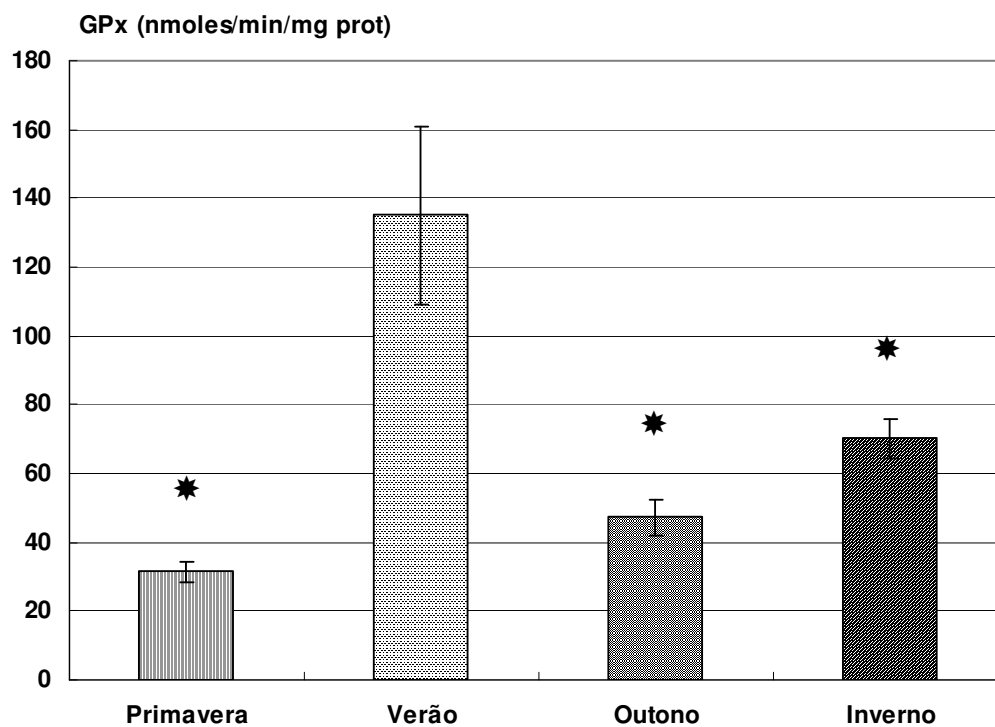


Figura 42: Resultados da enzima glutathione peroxidase (nmoles/min/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o fígado de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

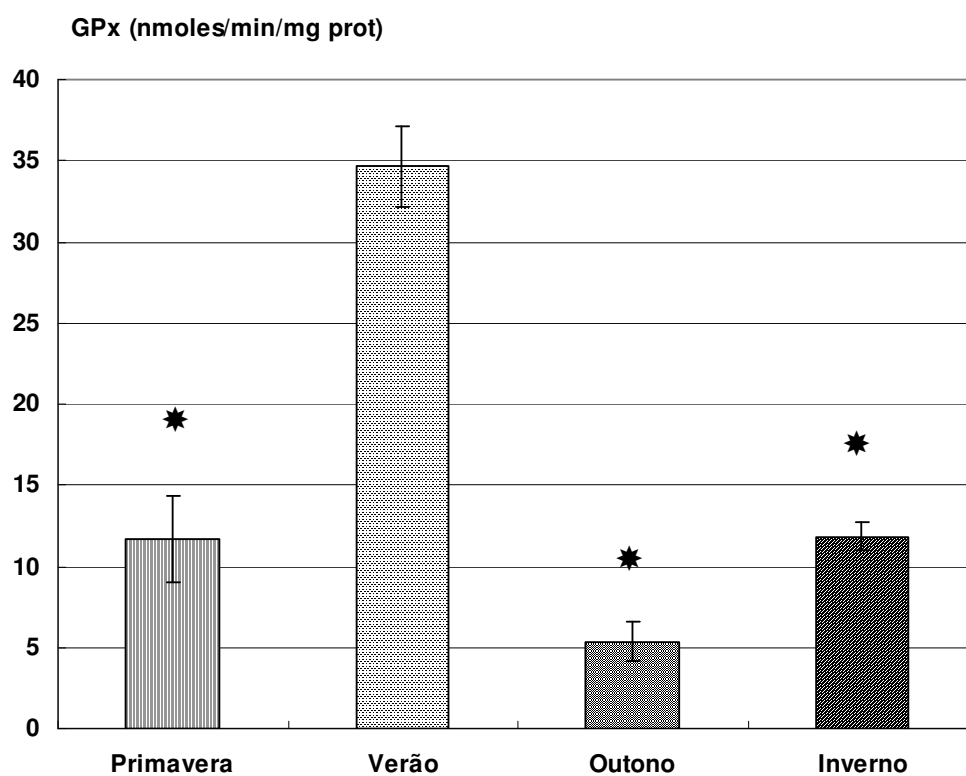


Figura 43: Resultados da enzima glutatona peroxidase (nmoles/min/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o músculo esquelético de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

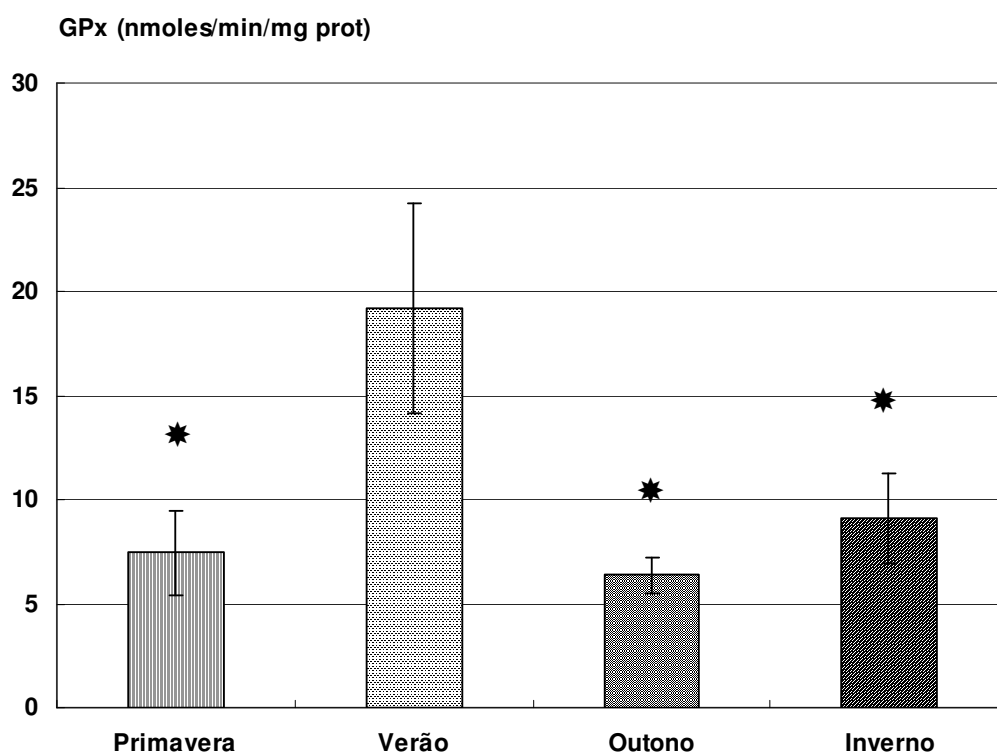


Figura 44: Resultados da enzima glutathiona peroxidase (nmoles/min/mg de proteína) nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

3.5 PROTEÍNA LOWRY

A tabela 10 mostra a quantificação da proteína pelo método de Lowry nos diferentes órgãos estudados do molusco *Megalobulimus oblongus*, nas diferentes estações do ano.

No coração, o valor máxima de proteína foi encontrados no inverno, porém as diferenças em relação as demais estações não foram estatisticamente significativo (Figura 45).

No hepatopâncreas, foram verificadas diferenças significativas na primavera em relação ao outono e inverno, e valores significativamente menores do verão em relação ao outono e inverno, sendo que a quantificação foi máxima no período do inverno (Figura 46).

No músculo, foi percebido que houve diferenças significativamente maiores do inverno em relação à primavera, ao verão e outono (Figura 47).

No pulmão, não foram observadas diferenças significativas entre as estações (Figura 48).

Tabela 10: Resultados de proteína (mg/ml) obtidos nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Estação/tecido | Coração (n=5) | Hepatopâncreas (n=5) | Músculo (n=5) | Pulmão (n=5) |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| PRIMAVERA | 6,29 \pm 0,39 | 8,81 \pm 0,45 | 3,87 \pm 0,49♣ | 6,49 \pm 0,32 |
| VERÃO | 9,73 \pm 1,81 | 11,61 \pm 1,25 | 3,69 \pm 0,44♣ | 5,76 \pm 2,08 |
| OUTONO | 10,73 \pm 1,21 | 26,70 \pm 3,12⊗* | 4,75 \pm 0,51♣ | 6,23 \pm 0,98 |
| INVERNO | 11,37 \pm 3,71 | 39,42 \pm 8,74⊗* | 6,91 \pm 0,81 | 6,47 \pm 0,80 |

Diferenças significativas $p \leq 0,05$

Diferenças significativas em relação à:

⊗ = primavera

* = verão

♣ = outono

❖ = inverno

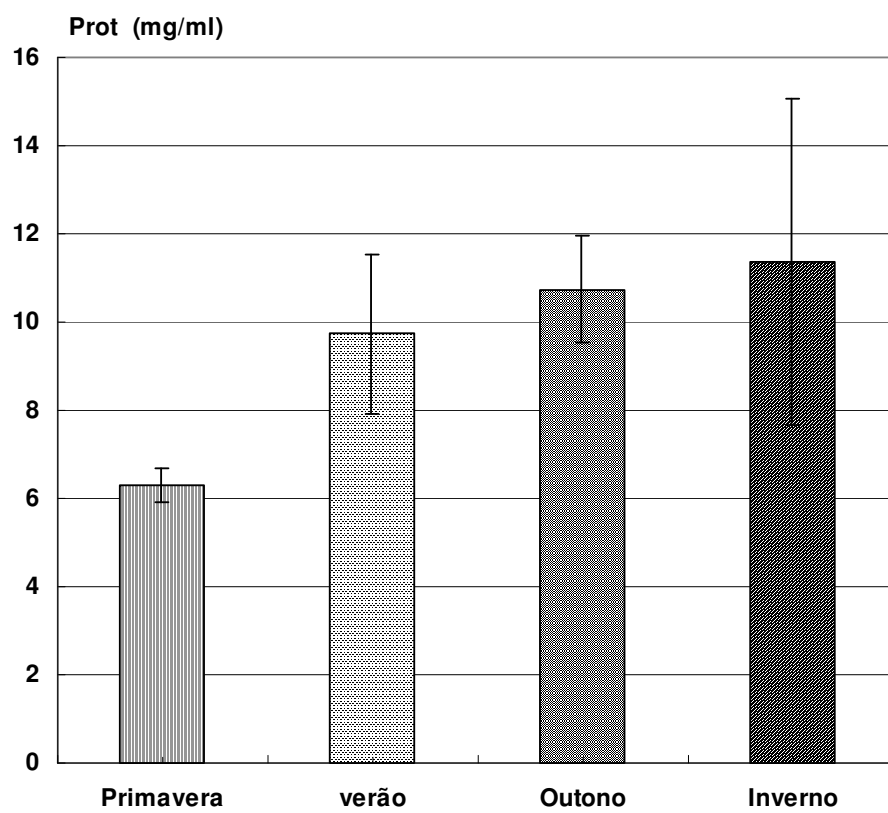


Figura 45: Resultados de proteína (mg/ml) nas quatro estações do ano obtidos para o coração do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

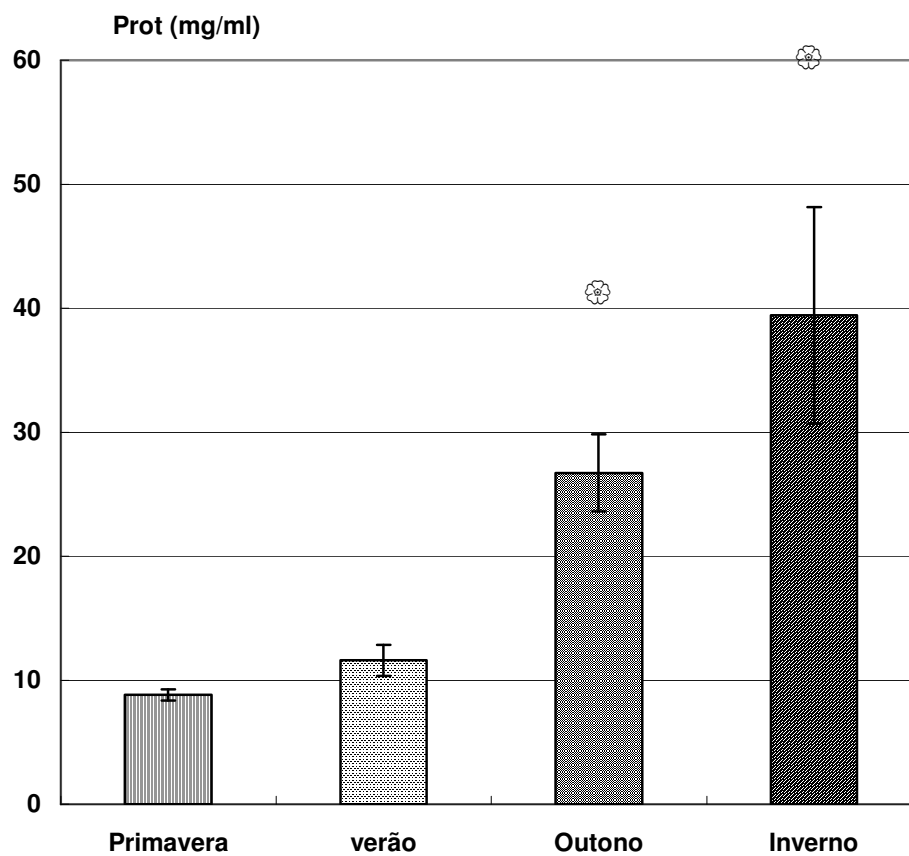


Figura 46: Resultados de proteína (mg/ml) nas quatro estações do ano obtidos para o hepatopâncreas do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

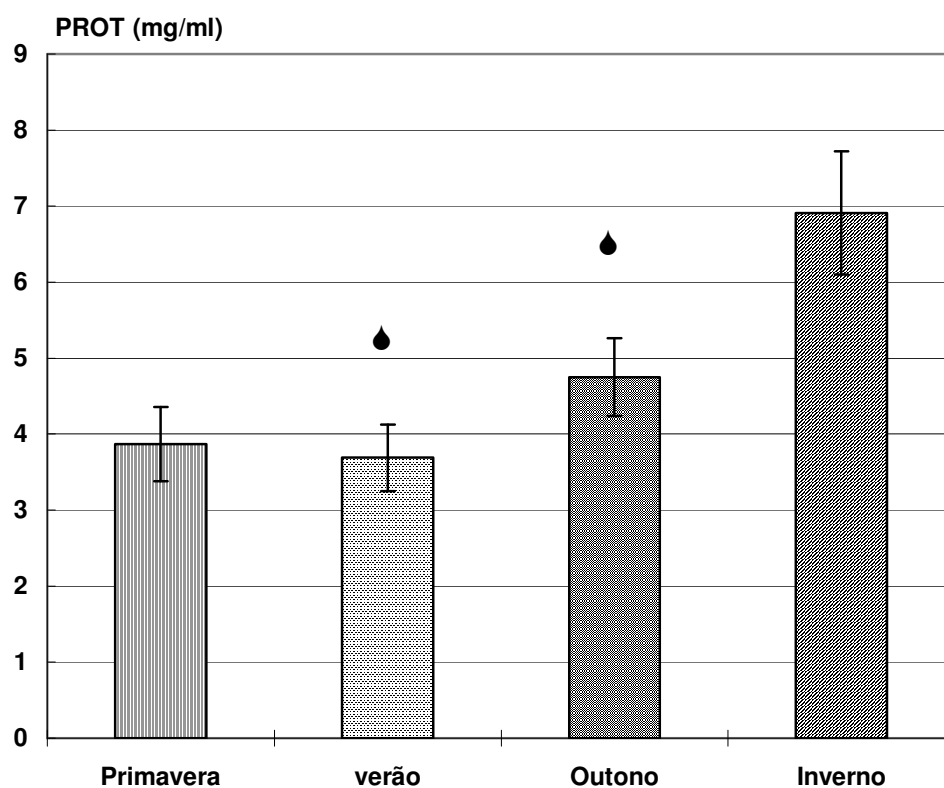


Figura 47: Resultados de proteína (mg/ml) nas quatro estações do ano obtidos para o músculo do pé do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

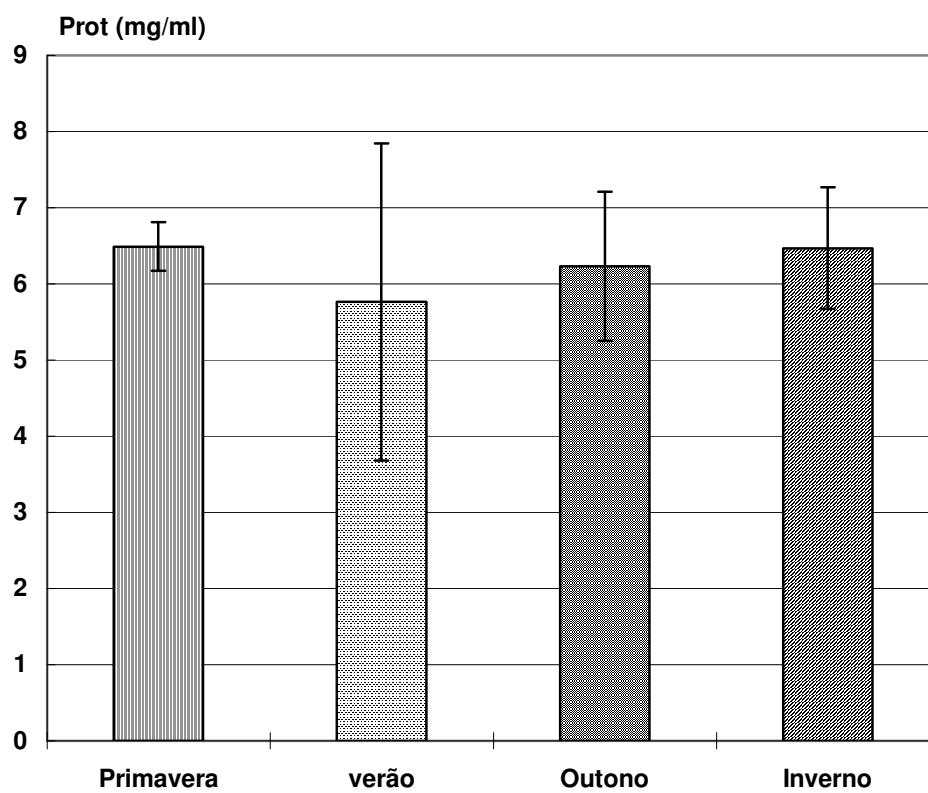


Figura 48: Resultados de proteína (mg/ml) nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão do molusco *Megalobulimus oblongus*. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

A tabela 10 mostra a quantificação de proteína nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar, nas diferentes estações.

No coração, não foram observadas diferenças significativas entre as estações, tendo a ser maior no período do outono (Figura 49).

No fígado, não foram observadas diferenças significativas entre as estações, tendo a ser maior no período do outono (Figura 50).

No músculo, há diferenças significativas, sendo menor no verão em relação à primavera, ao outono e inverno, sendo que a quantificação foi maior no período do outono (Figura 51).

No pulmão, não foram observadas diferenças significativas entre as estações, tendendo a ser maior no período do outono (Figura 52).

Tabela 11: Resultados de proteína (mg/ml) obtidos nas quatro estações do ano, nos diferentes órgãos estudados de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Estação/tecido | Coração (n=5) | Fígado (n=5) | Músculo (n=5) | Pulmão (n=5) |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| PRIMAVERA | 10,69 \pm 0,43 | 11,26 \pm 0,13 | 11,14 \pm 1,17* | 14,06 \pm 1,20 |
| VERÃO | 10,33 \pm 1,25 | 12,74 \pm 0,27 | 6,03 \pm 1,52 | 11,78 \pm 0,71 |
| OUTONO | 13,70 \pm 2,78 | 16,33 \pm 2,90 | 12,61 \pm 1,66* | 21,23 \pm 4,35 |
| INVERNO | 12,71 \pm 3,03 | 13,83 \pm 0,57 | 10,00 \pm 0,32* | 16,38 \pm 1,27 |

Diferença significativa $p \leq 0,05$

Diferenças significativas em relação à:

⊗ = primavera

* = verão

◆ = outono

❖ = inverno

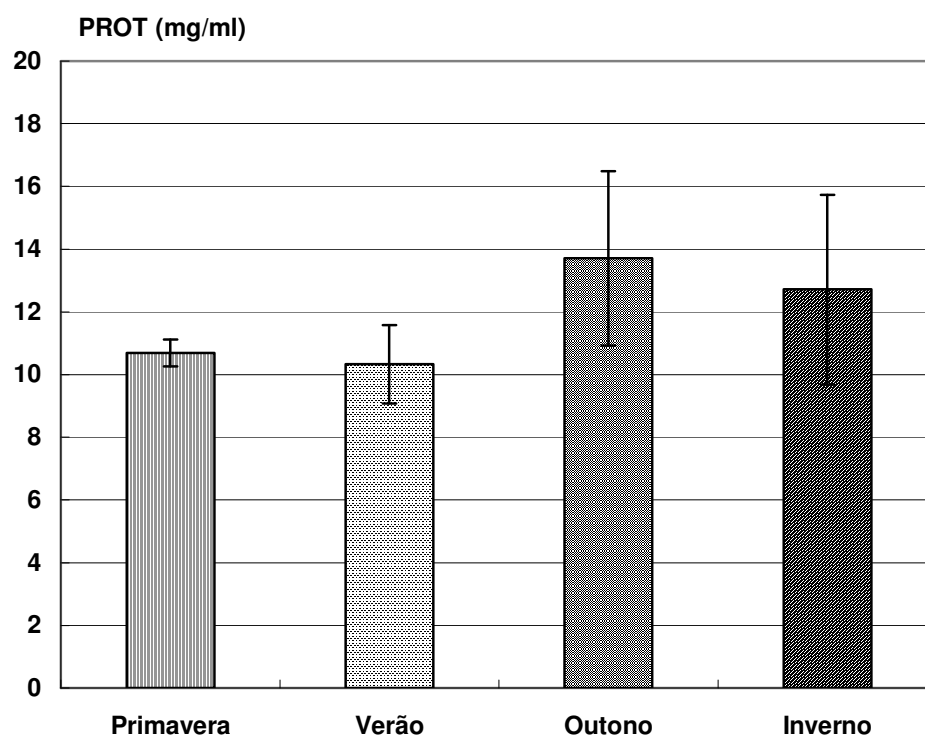


Figura 49: Resultados de proteína (mg/ml) nas quatro estações do ano obtidos para o coração de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

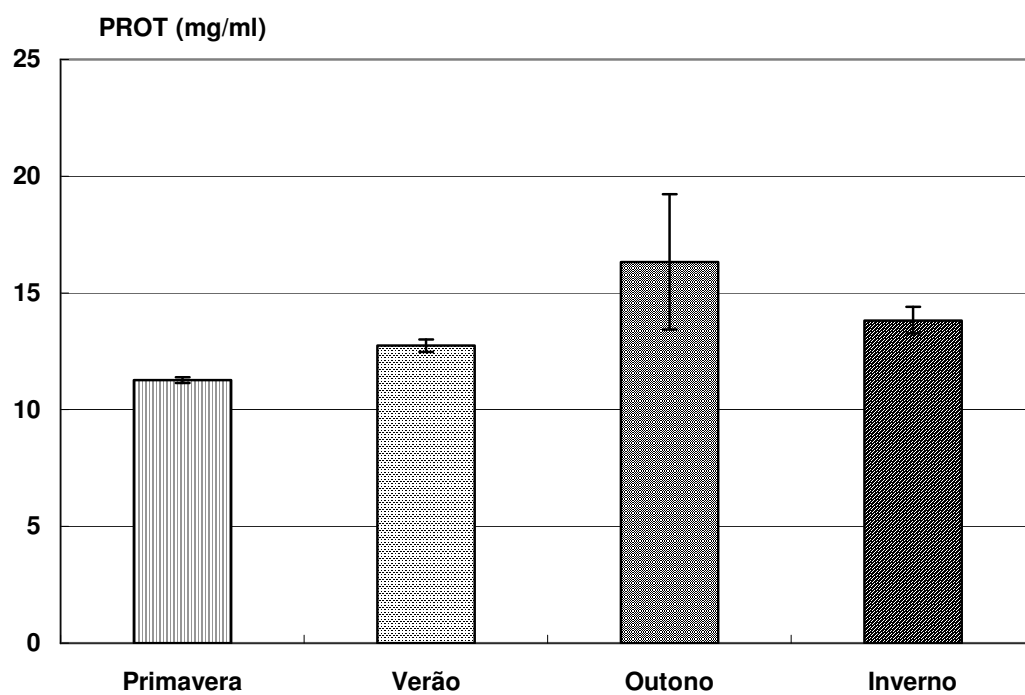


Figura 50: Resultados de proteína (mg/ml) nas quatro estações do ano obtidos para o fígado de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

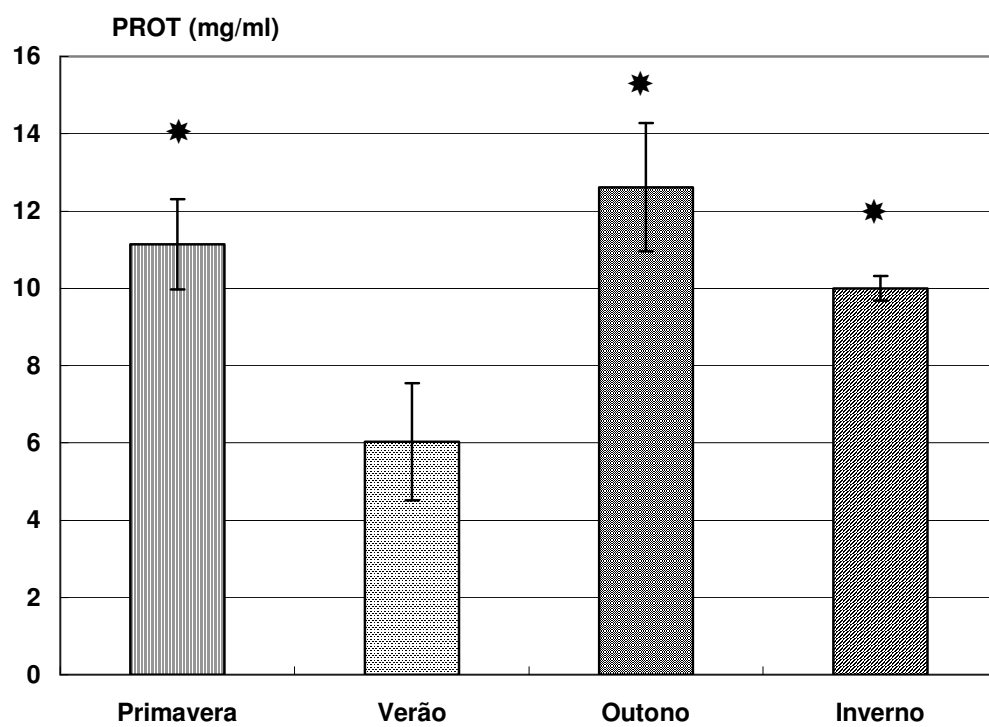


Figura 51: Resultados de proteína (mg/ml) nas quatro estações do ano obtidos para o músculo esquelético de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

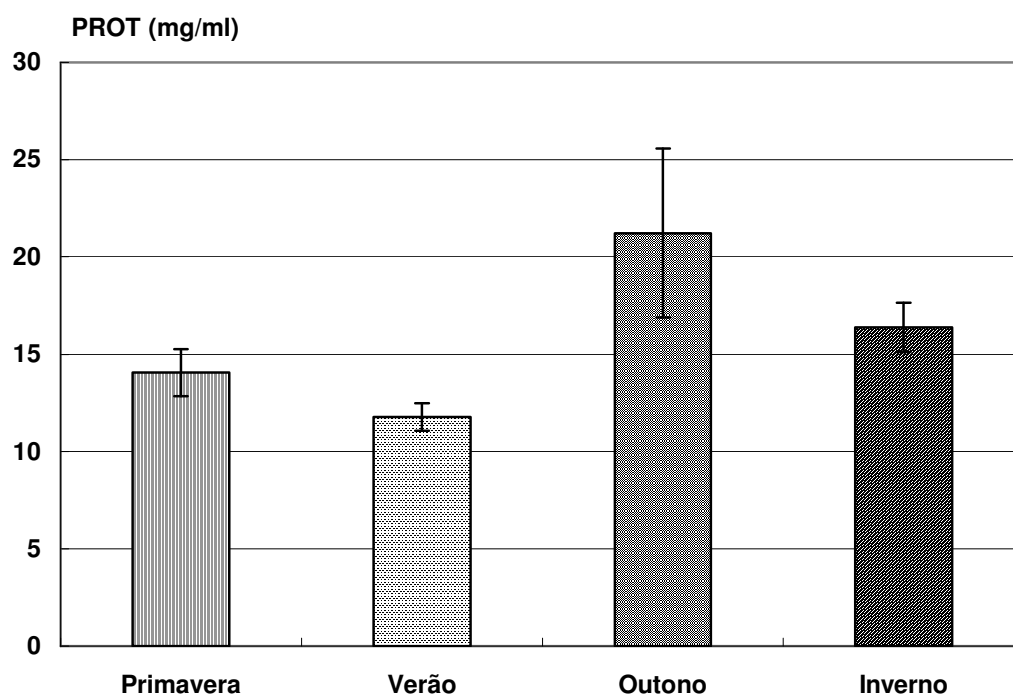


Figura 52: Resultados de proteína (mg/ml) nas quatro estações do ano obtidos para o pulmão de ratos machos Wistar. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

3.6 RESUMO DOS RESULTADOS

Para melhor entendimento dos resultados obtidos, são apresentadas as tabelas 12 e 13 com os valores de cada técnica realizada, nas estações culminantes verão e inverno.

Na tabela 12, apresentamos uma síntese dos resultados obtidos no molusco *Megalobulimus oblongus*. Percebe-se claramente que houve um aumento do estresse oxidativo, medido pelos ensaios de TBA-RS e QL, nos meses mais quentes (primavera e verão), quando comparados aos meses mais frios, sendo estes valores significativos em todos os órgãos avaliados pelo método de TBA-RS. Já para a QL as diferenças entre os dados de inverno e verão foram estatisticamente significativos no hepatopâncreas e no pulmão.

Quanto à enzima catalase, (ver tabela 5) percebemos que ela apresentou-se em maior quantidade nos meses mais frios e em menor quantidade nos meses mais quentes, exceto para o pulmão, onde ela se encontra máxima nos meses mais quentes e mínima nos meses mais frios.

A enzima glutathiona peroxidase apresentou-se reduzida no inverno no hepatopâncreas e músculo; nos outros órgãos estudados não houve um padrão de aumento ou diminuição quando comparadas as diferentes estações.

Quanto à quantificação de proteínas (ver tabela 9) percebemos que há um aumento nos meses mais frios, outono e inverno e uma diminuição da quantidade nos meses mais quentes, especialmente no hepatopâncreas.

Tabela 12: Resultados obtidos nos ensaios de LPO (TBA-RS e QL) e enzimas antioxidantes (CAT e GPx) no verão e inverno para o molusco *Megalobulimus oblongus*.

Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Molusco | TBA-RS (nmol/mg prot) | QL (cps/mg prot) | CAT (μmoles/mg rot) | GPx (nmoles/min/mg prot) |
|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------|---|-------------------------------------|
| Coração: V | 1,64 \pm 0,48 | 152,67 \pm 46,52 | 1,10 \pm 0,23 | 4,76 \pm 0,64 |
| I | 0,27 \pm 0,12* | 47,76 \pm 15,19 | 0,78 \pm 0,20 | 4,81 \pm 1,34 |
| Hepatopâncreas: V | 0,94 \pm 0,30 | 603,38 \pm 152,87 | 1,40 \pm 0,1833 | 13,25 \pm 1,79 |
| I | 0,18 \pm 0,04* | 171,08 \pm 20,08* | 0,7 \pm 0,63 * | 3,69 \pm 0,51 * |
| Músculo: V | 0,60 \pm 0,15 | 84,30 \pm 30,92 | 0,26 \pm 0,03 | 11,38 \pm 1,74 |
| I | 0,16 \pm 0,02* | 33,61 \pm 8,14 | 0,30 \pm 0,03 | 7,29 \pm 0,66 |
| Pulmão: V | 0,75 \pm 0,23 | 266,42 \pm 44,71 | 0,46 \pm 0,17 | 6,50 \pm 1,42 |
| I | 0,21 \pm 0,02* | 71,62 \pm 20,61* | 0,29 \pm 0,02 | 5,27 \pm 0,48 |

V = Verão; I = Inverno

Diferença significativa em relação ao verão (=*) para $p \leq 0,05$.

Na tabela 13, apresentamos um resumo dos resultados obtidos nas estações mais culminantes verão e inverno para ratos machos Wistar. Percebemos claramente um aumento do estresse oxidativo medido pelos ensaios de TBA-RS e QL nos meses mais quentes, primavera e verão, quando comparados aos meses mais frios, outono e inverno.

A enzima catalase, apresenta-se aumentada no período do verão e diminuída nas estações frias, especialmente no hepatopâncreas.

A enzima glutathiona peroxidase, apresenta-se aumentada nos meses mais quentes, primavera e verão e diminuída nos meses mais frios, outono e inverno, especialmente no hepatopâncreas.

Quanto à quantificação de proteínas (ver tabela 11) foi percebido que há um aumento, no hepatopâncreas e no músculo, nos meses mais frios, outono e inverno, e apresenta-se em menor quantidade nos meses mais quentes, primavera e verão.

Tabela 13: Resultados obtidos nos ensaios de LPO (TBA-RS e QL) e enzimas antioxidantes (CAT e GPx) no verão e no inverno para os diferentes órgãos de ratos machos Wistar. Os valores são expressos como média \pm erro padrão da média.

| Rato | TBA-RS (nmol/mg prot) | QL (cps/mg prot) | CAT (pmoles/mg prot) | GPx (nmoles/min/mg prot) |
|-------------------|------------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Coração: V | 0,46 \pm 0,07 | 10,00 \pm 3,32 | 24,0 \pm 2,20 | 86,25 \pm 11,13 |
| I | 0,29 \pm 0,03 | 3,06 \pm 0,82 | 9,20 \pm 2,10* | 36,78 \pm 8,50* |
| Fígado: V | 0,64 \pm 0,29 | 6,84 \pm 2,48 | 550,0 \pm 69,0 | 135,13 \pm 25,87 |
| I | 0,17 \pm 0,02 | 3,45 \pm 1,02 | 190,0 \pm 9,6* | 70,22 \pm 5,72* |
| Músculo: V | 1,65 \pm 0,72 | 100,84 \pm 27,20 | 11,0 \pm 3,32 | 34,63 \pm 2,49 |
| I | 0,19 \pm 0,03 | 24,09 \pm 1,02* | 4,0 \pm 0,65 | 11,82 \pm 0,89* |
| Pulmão: V | 0,94 \pm 0,12 | 33,58 \pm 12,21 | 43,01 \pm 6,9 | 19,17 \pm 5,06 |
| I | 0,58 \pm 0,09* | 7,48 \pm 4,48 | 28,0 \pm 1,74 | 9,07 \pm 2,15 |

V = Verão; **I** = Inverno

Diferença significativa em relação ao verão (=*) para $p \leq 0,05$.

4 DISCUSSÃO

O estresse oxidativo pode ser definido como uma situação em que se tem aumento da produção de EAO e/ou redução das defesas antioxidantes, ou por um desequilíbrio no balanço pró-oxidantes/antioxidantes em favor dos pró-oxidantes (SLES & MURPHY, 1991).

A escolha dos tecidos estudados está ligada à maior suscetibilidade destes ao ataque das EAO. O coração e o pulmão são órgãos que estão ligados diretamente com a captação e transporte de oxigênio, portanto, sujeitos ao ataque direto das EAO. O músculo esquelético passa por períodos de hipóxia quando em repouso e por períodos de reoxigenação quando encontra-se em atividade. O hepatopâncreas do molusco e o fígado do rato, são glândulas importantes, pois produzem muitas enzimas, e, têm, portanto, atividade importante em todo o metabolismo do animal.

O coração do molusco, localiza-se no interior da cavidade palial, em disposição transversal ao corpo, apresenta uma aurícula e um ventrículo e está envolto por uma membrana pericárdica (Figura 53). O ventrículo ramifica-se em aorta anterior, que ascende para a região cefálica e a aorta posterior (ou visceral) para as vísceras (THOMÉ et al., 1994). A hemolinfa é coletada do corpo (circulação aberta), é oxigenada no pulmão e, então, bombeada pelo coração, através das artérias, para a ca-

beça, pé e vísceras. A hemolinfa apresenta como pigmento respiratório a hemocianina que contém cobre, ao contrário da hemoglobina que é constituída por ferro (STORER et al., 1984).

Estudos realizados sobre o efeito da temperatura na frequência cardíaca do *Megalobulimus sanctipauli*, (um grupo de animais com desnervação cardíaca e outro grupo sem desnervação) indicam que a frequência cardíaca aumenta linearmente com a variação da temperatura, isto foi observado em ambos os grupos, sugerindo então que o nervo visceral não tem efeito sobre a resposta da frequência cardíaca à mudança da temperatura. Isto indica que a temperatura atua diretamente sobre o músculo cardíaco. O aumento da frequência cardíaca é devido à natureza miogênica do batimento cardíaco (ROMERO & HOFFMANN, 1995). Percebemos então, a influência das variações ambientais sobre o metabolismo do molusco, justificando, assim, os objetivos deste trabalho.

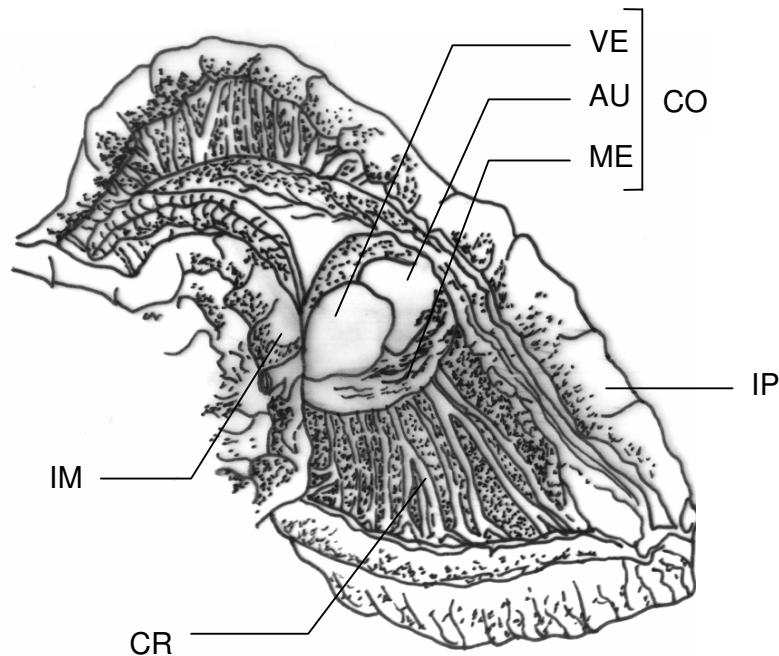


Figura 53: Vista dorsal da cavidade palial. AU - aurícula; CO - coração; CR - cavidade respiratória (=pulmão); IM - intestino médio; IP - intestino posterior (=reto); ME - membrana pericárdica (=pericárdio); VE - ventrículo.

O pulmão do molusco em estudo, substitui as brânquias dos outros gastrópodos e moluscos em geral. Situado na parede externa do manto, na região da grande cavidade do manto, constitui-se de uma cavidade de coloração escura, na qual sobressai uma rica e variada rede de nervuras, originadas da intensa vascularização e que serve de “pulmão”, abrindo-se na borda do manto pelo pneumostômio (Figura 53) (STORER et al., 1984; THOMÉ et al., 1994). Nesta região, quando da abertura da concha, foram encontrados em nossos ensaios, muitos cistos de parasitas, que em geral são larvas de Nematóides (THOMÉ et al., 1994).

O hepatopâncreas do *Megalobulimus* é uma estrutura encontrada particularmente em moluscos e crustáceos, embora alguns representantes de outros gru-

pos possam exibi-la. Vários outros nomes foram sugeridos para designar tão conspícuo órgão, porém a denominação hepatopâncreas parece ser a mais adequada, pois existem indicativos de que essa estrutura realize funções “hepáticas” pois armazena substâncias de reserva, como glicogênio e lipídios, e “pancreáticas” com produção de várias enzimas digestivas (Figura 54) (VAN WEEL, 1974). Na falta de um tecido adiposo diferenciado, é nesse órgão que são estocadas as reservas de lipídios, que pode ser alvo das EAO. Sabe-se que em gastrópodos pulmonados, a glicose é o principal substrato energético, utilizado nos períodos de hibernação ou estiva, de crescimento e de reprodução (HEMMINGA, 1984; GERAERTS, 1992). Além disso, a concentração de glicose circulante é um dos principais fatores necessários para a síntese e a mobilização de glicogênio no hepatopâncreas (ROSSI & DA SILVA, 1993).

Nos moluscos gastrópodos, o metabolismo anaeróbico nos tecidos é ativado quando há uma diminuição da disponibilidade de oxigênio no meio, causada pelas inundações ou quando espécies terrestres enterram-se no solo nos períodos de estiva ou hibernação. Nestas condições anaeróbicas, os moluscos intensificam a utilização dos carboidratos, satisfazendo as necessidades energéticas e aumentando as concentrações de D-lactato e succinato que se acumulam, especialmente na hemolinfa (WIAJSMAN et al., 1985). Estudos realizados nos gastrópodos de água doce *Lymnaea stagnalis* e no terrestre *Helix pomatia* demonstraram um aumento do D-lactato e succinato na hemolinfa durante a anóxia (WIJSMAN et al., 1985; WIESER, 1981). Dessa forma, a manutenção de uma alta atividade gliconeogênica permitiria a esse molusco responder às variações dos fatores ambientais com a produção de seu principal substrato energético, a glicose (DIAS, 1996).

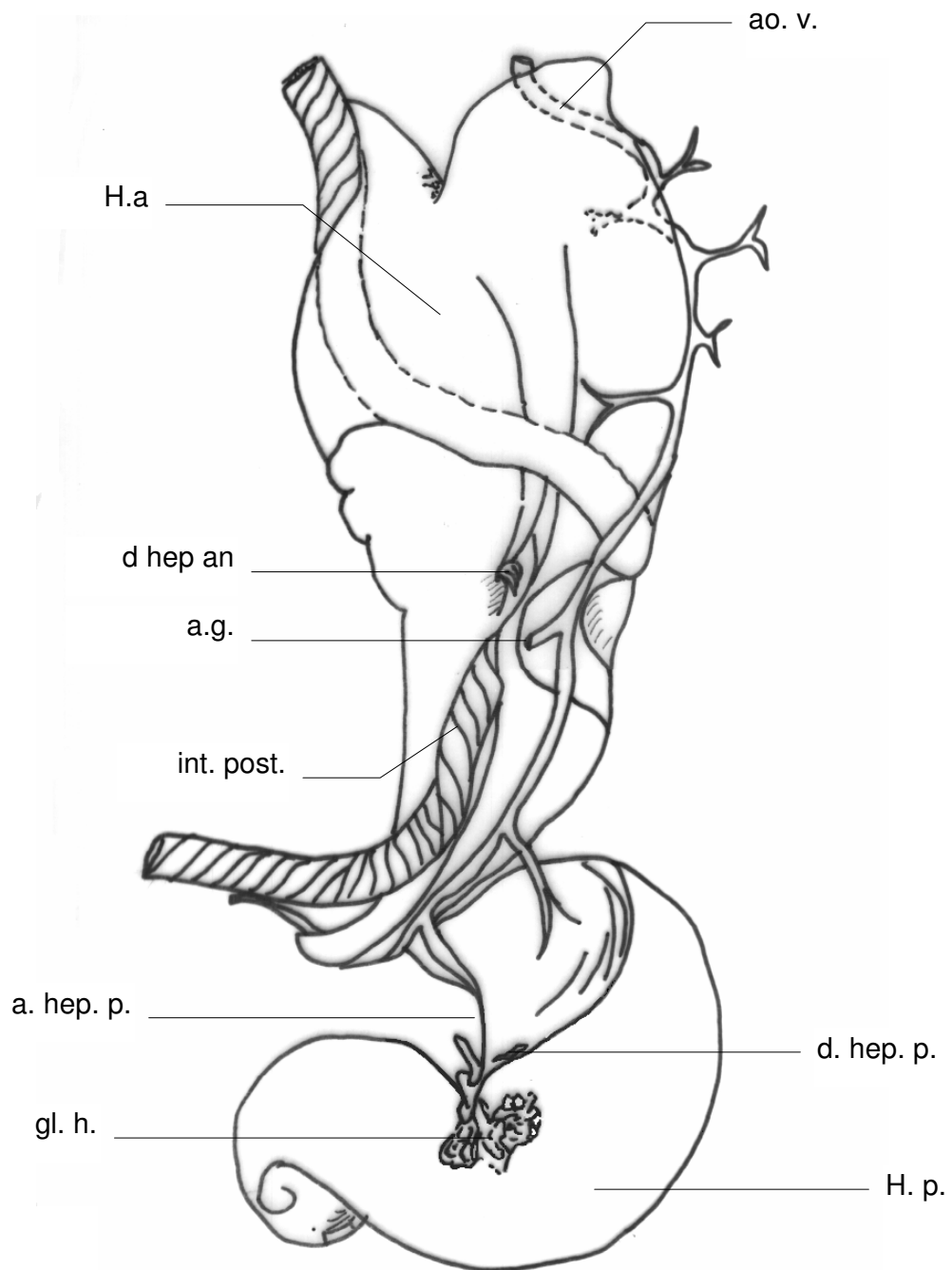


Figura 54: vista geral do fígado de molusco (hepatopâncreas). H.a. - lóbulo hepático anterior; H.p. - lóbulo hepático posterior; ao.v. - aorta visceral; d.hep.an. - ducto hepático anterior; d.hep.p. - ducto hepático posterior; ag. - artéria gástrica; int.post. - intestino médio; a.hep.p. - artéria hepática posterior; gl.h. - glândula hepática posterior.

Foi observado um ritmo sazonal de mobilização das reservas energéticas em *Megalobulimus oblongus*: durante o outono e o inverno, quando estes animais reduzem a ingestão de alimentos e permanecem enterrados, os níveis de glicose e de glicogênio nos tecidos diminuem significativamente em comparação aos meses de primavera e de verão (MARQUES & PEREIRA, 1970; DA SILVA & ZANCAN, 1991).

O sistema muscular do molusco é bem desenvolvido, onde os feixes musculares estendem-se por debaixo e ao longo do bulbo bucal, esôfago e órgãos genitais. A uma certa distância da porção anterior, o emaranhado muscular reduz-se a três conjuntos principais de músculos: o retrator bulbar, músculos retratores do pé e pediosos/tentaculares, estes terminam convergindo, fundindo-se no músculo columelar propriamente dito. O músculo retrator do pé, por apresentar atividade de deslocar o animal, foi o escolhido para que realizássemos as medidas de LPO e enzimas antioxidantes, embora ele se constitua de musculatura lisa (FASSIONI-HEUSER et al., 1997). O músculo do pé apresenta a glândula pediosa a qual é responsável pela forte secreção mucosa, que o animal deixa sobre a superfície, por onde rasteja. Este muco é altamente resistente, permitindo que o animal possa rastejar sobre superfícies cortantes. Foi necessário lavar muitas vezes o tecido até retirar o muco para que pudéssemos utilizá-lo em nossos experimentos.

Diversos trabalhos sugerem que, em gástrópodos, o glicogênio muscular estocado em quantidades consideráveis, seria usado somente como reserva de energia intracelular (LIVINGSTONE & ZWAAN, 1993). Em *Megalobulimus oblongus* os níveis de glicogênio no músculo diafragma também estão sujeitos às variações sa-

zonais e à influência do jejum e da realimentação (DA SILVA & ZANCAN, 1991; SCHIMIDT, 1989).

O comportamento sazonal do molusco *Megalobulimus oblongus*, que no período do inverno se enterra completamente, passando por um período de hibernação, e na primavera retorna à superfície chamou nossa atenção. A observação deste fato nos levou a pensar que, por estar sujeito periodicamente a episódios de hipóxia-reoxigenação, este animal deveria apresentar poderosos mecanismos de defesa antioxidante para enfrentar este estresse oxidativo. A falta de oxigênio é lesiva, mas a falta seguida da reposição é muito mais lesiva, podendo aumentar a produção de EAO, sendo este fenômeno descrito como paradoxo do oxigênio (MCCORD, 1985) (ver capítulo 1). Nossos resultados corroboram esta hipótese já que constatamos que o estresse oxidativo está bastante aumentado na primavera e verão (reoxigenação) e diminuído no outono e no inverno (período de hipóxia). Ao abrirmos a concha, nos meses mais quentes, notávamos que o pulmão estava bastante inflado. Acreditamos ser isso devido ao aumento do metabolismo nos meses mais quentes, o que leva há um consumo maior de oxigênio, provocando um aumento de EAO, e, portanto, aumento da LPO. Já no inverno, percebia-se, quando da abertura da concha do molusco, que o pulmão estava “murcho”, “vazio”, sugerindo menor consumo de oxigênio, menor formação de EAO, e, portanto, menor LPO, quantificada através dos ensaios de TBA-RS e QL (ver figuras 13-16 e 21-24). Esta variação no teste de TBA-RS e QL também foi percebida nas amostras de tecido do rato. Para todos os tecidos analisados percebemos também que a LPO foi sempre maior nos períodos mais quentes, primavera e verão, e apresentou-se diminuída nos meses mais frios, outono e inverno (ver figuras 17-20 e 25-28). Os valores obti-

dos sempre foram mais significativos para o hepatopâncreas do molusco e o fígado do rato.

Para a detecção da geração de radicais livres, tem-se a avaliação da lipoperoxidação (LPO) que é uma medida do dano causado por estas espécies às membranas celulares (FERREIRA et al., 1988). Para a análise da LPO, Halliwell e Gutteridge (1989, p234) aconselham o uso de, no mínimo, duas técnicas distintas; sendo os resultados concordante, considera-se que houve resposta positiva. Neste trabalho, utilizaram-se as técnicas de TBA-RS e QL. O TBA-RS (BUEGE & AUST, 1978) é um teste colorimétrico freqüentemente utilizado para medida de peroxidação dos ácidos graxos, membranas celulares e produtos alimentícios (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Esse teste mede, entre outras substâncias, a concentração de malondialdeído (MDA), formado a partir dos lipídios das membranas celulares na etapa de terminação da LPO (ver figura 5). Várias outras substâncias podem reagir com o TBA, formando a base de Schiff que pode ser detectada a 535nm, tais como: ácido siálico, deoxiglicose, glicina, arginina, e outros (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Como o teste do MDA (TBA-RS) possui artefatos que podem superestimar a medida de LPO, alguns pesquisadores têm utilizado outros métodos para a quantificação do MDA nos homogeneizados de tecidos, como, por exemplo, por HPLC (cromatografia líquida de alta performance) (CECONI et al., 1992; TEARE et al., 1993). Embora o TBA-RS não seja um método de alta especificidade para a quantificação de LPO, ainda é amplamente utilizado por sua facilidade e baixo custo. Verificamos em nossos experimentos que, para todas amostras de tecido do molusco e do rato, o teste do TBA-RS mostrou-se elevado nos meses mais quentes, primavera e verão, enquanto que nos meses mais frios, outono e inverno, o teste do TBA-RS

mostrou-se diminuído. Isso significa que tivemos um aumento do estresse oxidativo nos meses mais quentes, metabolismo aumentado, maior consumo de oxigênio e, portanto, maior formação de EAO (ver tabelas 2 e 3)

A quimiluminescência detecta a formação de moléculas excitadas (especialmente oxigênio singlet e carbonilas excitadas) geradas no final das reações em cadeia produzidas pelos radicais livres, durante a LPO (Figura 5). A QL tem maior sensibilidade do que o teste do MDA (FERREIRA et al., 1988). Para as medidas de fotoemissão associadas à LPO (QL), normalmente se utiliza um hidroperóxido de origem sintética (hidroperóxido de tert-butil) a fim de amplificar este fenômeno para sua melhor detecção (CADENAS & SIES, 1982). Em ensaios preliminares para a detecção da QL nos tecidos do molusco, verificamos uma oscilação dos valores ao acrescentarmos o hidroperóxido de tert-butil. Não havia um padrão de resposta como o observado no rato: um perfil de aumento da emissão luminosa até um ponto máximo e depois queda. Então, passamos a medir a QL espontânea, ou seja, aquela presente nos tecidos estudados. Assim, passamos a utilizar também para os tecidos do rato a QL espontânea, pois um dos nossos objetivos era utilizar o rato como um parâmetro, a fim de tecer um paralelo.

Em estudos prévios realizados em nosso laboratório (BELLÓ-KLEIN et al., 1993), foi percebido que o coração do molusco apresentava uma resistência maior ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio do que a observada nos ratos. Contraturas irreversíveis ou mantidas foram observadas apenas com a dose 8192mM de peróxido de hidrogênio, enquanto que, no rato, estas surgiam com doses a partir de 128mM (BELLÓ & BELLÓ, 1988). Doses menores, provocaram um

grande aumento do inotropismo e contraturas de breve duração. Um dos motivos pelo qual o molusco apresenta menor suscetibilidade ao estresse oxidativo, induzido pelo peróxido de hidrogênio, poderia ser devido ao baixo conteúdo de ferro do músculo cardíaco, que é pobre em mioglobina. A proteína transportadora de oxigênio na hemolinfa (hemocianina) também não contém ferro e sim cobre. E o cobre é menos efetivo na catálise da reação de Fenton (Reação 12), que leva à formação do radical hidroxil, o qual é bastante lesivo para a célula, capaz de iniciar a LPO nas membranas celulares. Os dados desta dissertação constataram que o molusco apresenta uma grande quantidade da enzima catalase, o que pode ser responsável por esta maior proteção observada.

As enzimas antioxidantes investigadas foram glutathiona peroxidase e catalase. Observamos que a quantidade de catalase no molusco é da ordem de μmoles , enquanto que no rato encontramos valores da ordem de pmoles , o que representa uma concentração de 10^6 vezes menor. A enzima superóxido dismutase (SOD) não foi detectada no molusco pelo método utilizado, embora, tenham-se feito incansáveis tentativas com diferentes concentrações de amostras de tecido. A técnica da SOD utilizada era baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50mM, pH 10) e adrenalina (1mM) (MCCORD & FRIDOVICH, 1969; SOUTHORN & POWIS, 1988; CHANCE et al., 1979; BOVERIS et al., 1983). A determinação da atividade da SOD em tecidos do molusco

poderá ser feita em uma próxima etapa e com uma técnica mais apropriada e sensível, talvez o método do citocromo c utilizado com sucesso em outros moluscos .

No molusco, não percebemos, nos ensaios realizados para detectar a atividade enzimática, um comportamento sazonal uniforme em todos tecidos (ver tabelas 6 e 8, ver figuras 29-32 e 37-40). No coração, a enzima GPx apresentou-se aumentada no inverno e diminuída na primavera, enquanto que a CAT mostrou-se aumentada no outono e diminuída na primavera. No hepatopâncreas, percebemos que a GPx está aumentada no verão e diminuída no inverno, enquanto que a CAT está diminuída no inverno e aumentada no verão. No músculo percebemos que a GPx está aumentada no verão e diminuída no inverno, já a CAT apresentou-se aumentada no outono e diminuída no verão. No pulmão percebemos que, a GPx está aumentada no outono e diminuída na primavera, já a CAT apresenta-se aumentada no verão e diminuída no inverno. Um trabalho realizado com *Biomphalaria tenagophila* à respeito do papel das enzimas antioxidantes durante a estivação e anóxia, demonstrou que as enzimas CAT e SOD tiveram um decréscimo nos dias de estivação e anóxia, enquanto que a GPx aumentou nos dias de estivação e anóxia. Sugere-se que as alterações das atividades das enzimas antioxidantes foram similares durante a estivação e a anóxia, sugerindo a existência de um processo regulatório comum. A elevação da atividade da GPx durante o hipometabolismo pode ser uma resposta compensatória ao decréscimo das atividades da catalase e superóxido dismutase. O metabolismo da GPx parece ter um importância crucial na maquinaria bioquímica do hipometabolismo em *Biomphalaria tenagophila* (FERREIRA et al., 1997). Quanto às medidas enzimáticas no rato, percebemos claramente (ver tabelas 7 e 9) que, houve um comportamento semelhante em todas as amostras de tecidos.

do analisadas. Em todos os tecidos percebemos que a GPx apresentou-se diminuída no outono e aumentada no verão (ver figuras 41-44). A CAT apresentou o mesmo comportamento, estando aumentada nos meses mais quentes e diminuída nos meses mais frios (ver figuras 33-36).

Com relação às medidas de proteína, houve um comportamento semelhante no molusco e no rato. Em todas as amostras de tecido sempre houve uma tendência de maior concentração de proteína nos meses mais frios e menor concentração nos meses mais quentes. Este fato poderia ser explicado em termos de aumentada produção de melatonina nos meses mais frios, onde os períodos de luz são menores (GANONG,1991).

A melatonina é um dos pontos importantes a ser sugerido como o responsável por vários surtos sazonais de muitas espécies de animais. Ela foi descoberta em 1958, é um hormônio produzido e secretado pela glândula pineal (localizada no terceiro ventrículo), pela retina e por outros pequenos órgãos segundo ritmos circadianos com aumento dos níveis durante a noite (DUBOVICH et al, 1997; REITER, 1997; CLAUSTRAT et al., 1997). Descartes considerava a glândula pineal como sendo a sede da alma (GANONG, 1989). Bem conhecido como regulador dos ritmos circadianos, a melatonina é um hormônio pleiotrópico que apresenta diversas funções no sistema nervoso central, bem como, no periférico, incluindo regulação do ciclo celular, por exemplo, morte celular programada (apoptose) (WIESENBERG et al, 1997). É um hormônio noturno e candidato natural para a regulação do ciclo humano sono / vigília.

A secreção da melatonina pode influenciar a arquitetura do sono ou a manutenção dele. Recentemente levantou-se a hipótese de que a melatonina deve ser um sincronizador endógeno, hábil para estabilizar os ritmos ou reforçá-los, provoca diminuição da temperatura, um acontecimento que facilita o início do sono (CLAUSTRAT et al., 1997). Os níveis no plasma de melatonina são bastante baixos à noite ($\leq 0,5$ nmol/l), sugerindo que é o momento de sua maior atividade (CLAUSTRAT et al., 1997).

Segundo Reiter (1997), a melatonina apresenta uma ação direta como antioxidante “scavenger” de RL, como por exemplo do radical superóxido, neutralizando-o e transformando-se em radical indolil ou melatonil, menos lesivo. Ela também age como “quencher” de radical hidroxil, do radical peroxil, do oxigênio singlet e do ânion peroxinitrito. A melatonina age indiretamente estimulando várias enzimas antioxidantes, como por exemplo, superóxido dismutase, glutathione redutase e glicose 6-fostato dehidrogenase. A melatonina inibe a enzima pró-oxidante óxido nítrico sintase no cerebelo e no hipotálamo. Um fator muito importante é que ela atua nas membranas celulares estabilizando-as e tornando-as mais resistentes ao ataque oxidativo (REITER, 1997). Para explicar as variações sazonais do estresse oxidativo observadas no rato, apesar destes animais se encontrarem sob condições controladas de temperatura e luminosidade, não pode ser descartada a participação da melatonina. Segundo Jean Jacques De Mairan (1729), colocando-se o organismo sob condições constantes, isolando-o de variações ambientais que possam causar a ciclagem, e, assim mesmo, constata-se a persistência de ciclos. Os ciclos biológicos funcionam independente da exposição dos organismos aos ciclos ambientais (MENNABARRETO et al., 1988). Sugerimos que a melatonina esteja agindo no controle da

ritmicidade do estresse oxidativo observado em nossos experimentos. Para testar esta hipótese da participação da melatonina nesta situação experimental, seria necessário fazer medidas sazonais dos níveis de melatonina nos animais e, após, administrar este hormônio nos períodos em que sua concentração se encontra reduzida (provavelmente nos meses mais quentes), avaliando o estresse oxidativo. Também seria muito interessante se pudesse ser realizado um estudo comparativo entre o molusco *Megalobulimus oblongus* e um mamífero hibernante. Outra sugestão seria medir a capacidade total antioxidante da hemolinfa dos moluscos e do plasma dos ratos, a fim de avaliar a participação das defesas antioxidantes não enzimáticas. E, também, para podermos assegurar que as variações sazonais observadas neste estudo se constituem realmente num ritmo biológico, seria necessário, de acordo com os estudiosos da cronobiologia, ampliar a coleta de dados por pelo menos três anos.

5 CONCLUSÕES

5.1 Estresse oxidativo e variações sazonais

Quanto ao estresse oxidativo, verificamos que houve variações nas distintas estações do ano, tanto no molusco *Megalobulimus oblongus* quanto no rato.

A análise dos resultados mostra que houve variações sazonais de LPO no molusco. Isto sugere que há diferenças no metabolismo destes animais. Observou-se uma queda nos valores de LPO no inverno, sugerindo um metabolismo mais baixo nesta estação o que salienta o seu comportamento hibernante. Na primavera, quando o animal retorna do período de hibernação, foi verificado que os valores da LPO estão aumentados sugerindo um maior consumo de oxigênio, o que provoca maior produção de EAO.

Nas amostras de tecidos dos ratos estudados percebemos também variações sazonais de LPO. Sugere-se que estas diferenças estejam relacionadas à presença da melatonina. Nos meses mais quentes, a LPO apresentou-se aumentada, e nos períodos mais frios ela esteve diminuída, padrão oposto ao observado para secreção de melatonina. Segundo Reiter (1997), a melatonina estabiliza as membranas celulares, as quais resistem ao ataque oxidativo. A melatonina aumenta no período escuro do dia e mantêm-se em nível baixo durante as horas de claridade. Esta

variação diária de sua secreção funciona como um tipo de sinal cronométrico, que coordena os eventos internos dos ciclos de claridade-escuridão do ambiente. A melatonina é responsável pelos surtos sazonais de reprodução de várias espécies; regula a secreção de vários hormônios principalmente os corticosteróides adrenais e age sobre o sistema imunológico.

A melatonina apresenta mecanismos endógenos antioxidantes, exercendo ações de “quenchers” dos radicais hidroxil, peroxil, oxigênio singlet e ânion peroxinitrito; e ação de “scavengers” do ânion radical superóxido, neutralizando estes radicais livres, transformando-se em radical melatonil.

5.2 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Não foi observado um padrão homogêneo de resposta nos tecidos do molusco, mas constatamos que o molusco apresenta uma quantidade de 10^6 vezes maior de catalase que o rato, o que lhe confere maior proteção ao ataque das EAO.

Nos tecidos dos ratos verificamos que as enzimas apresentam um padrão homogêneo de resposta nas distintas estações do ano. A CAT e GPx apresentam-se sempre aumentadas nos meses mais quentes, primavera e verão, e diminuídas nos meses mais frios, outono e inverno, denotando que há uma indução do mecanismo enzimático a fim de conferir proteção ao ataque das EAO. Segundo Reiter (1997), a melatonina apresenta uma ação indireta como antioxidante por estimular diversas enzimas, como: superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glicose-6-fosfato desidrogenase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 BARTSCH, C. & BARTSCH, E. The link between the pineal gland and cancer: na interaction involving chronobiological mechanisms. In: HALBERG, Reale & Tarquini, p. 105-126, 1986.
- 02 BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M.; DOELMAN, C. J. A. Oxidants and antioxidants: state of the art. Am. J. Med. 91(sup. 3C): 2-13 1991,.
- 03 BELLÓ, A . R. & BELLÓ, A . A . Cardiac Contracture Induced by Hydrogen Peroxide. Med. Sci. Res. 16: 1149-1150, 1988.
- 04 BELLÓ-KLEIN, A .; OLIVEIRA, A .R.; BRUNETTO, A .F.; IRIGOYEN, M.C.; LLESUY, S. & BELLÓ, A .A. Effect of vitamin A on cardiac contracture induced by hydrogen peroxide. Med. Sci. Res. 22: 411-413, 1994.
- 05 BELLÓ-KLEIN, A .; WHILHELMS, F.M.; SOUZA, D.T.; et al . Effect of Hydrogen Peroxide on the isolated heart of the snail *Megalobulimus oblongus*. Med. Sci. Res. 21: 357-358, 1993.
- 06 BELLO-KLEIN, A. Ação da Vitamina A e do Trolox sobre o Stress Oxidativo Produzido pelo Peróxido de Hidrogênio no Miocárdio Isolado de Rato. Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 220p, 1993.
- 07 BIANCHINI, A . & BELLÓ, A . A . Hydrogen Peroxide effects on the Contractile Force and the Coronary Flow of the Rat Isolated Heart. Med. Sci. Res. 16: 1265-1266, 1988.
- 08 BISBY, R.H. Interactions of Vitamin E with Free Radicals and Membranes. Free Rad. Res. Comms. 8: 4-6, 1990.
- 09 BOVERIS, A . & CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Biochem. J. 134: 707-716, 1973.

- 10 BOVERIS, A .; FRAGA, C.G.; VARSAVSKY, A . & KOCH, O. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. Arch. Biochem. Biophys. 227: 534-541, 1983.
- 11 BOVERIS, A .; LLESUY, S. & FRAGA, C.G. Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice. Free Rad. Biol. & Med. 1: 131-138, 1985.
- 12 BUEGE, J.A . & AUST, S.D. Microsomal Lipid Peroxidation. Meth. Enzymol. 52: 302-309, 1978.
- 13 CADENAS, E. & SIES, H. Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by tert-butyl hydroperoxide - relation to microsomal hemoproteins, oxygen dependence, and lipid peroxidation. Eur. J. Biochem., 124: 349-356, 1982.
- 14 CASTRO, L.S.; COELHO, A.C.J.; BAGOSSIAN, L., PERROTA, U. Radicais Livres de Oxigênio - Aspectos Químicos, Biológicos e Fisiopatológicos em Medicina, in: Jornal Brasileiro de Medicina, 59(4):11-21, outubro/1990,.
- 15 CECONI, C.; CARGNONI, A .; PASINI, E.; CONDORELLI, E.; CURELLO, S. & FERRARI, R. Lipid peroxidation during myocardial reperfusion. In: Molecular and Biochemistry, 111: 49-54, 1992.
- 16 CHOW, C.K. Vitamin E and Oxidative Stress. Free Rad. Biol. & Med. 11: 215-232, 1991.
- 17 CLAUSTRAT, J.B. Physiological and pharmacological effects of melatonin in humans. In: Second International Symposium on Oxidative Stress and Brain Damage, September 26-28, Chicago, IL, USA, 1997.
- 18 DA SILVA, R.M.S.; ZANCAN, D.M. Efeito da variação sazonal sobre o metabolismo energético do gastrópoda pulmonado *Megalobulimus oblongus*. In: ENCONTRO ANUAL DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS. Porto Alegre, Resumos. 20:18, 1991.
- 19 DAAN, S. & ASCHOFF, J. Circadian Contributions to Survival. In: ASCHOFF, DAAN & GROOS, 1982.
- 20 DAAN, S. Adaptative daily strategies in behavior. In ASCHOFF, J., ed. Handbook of Behavioral Neurobiology; Biological rhythms. Plenum Press, New York, p. 275, 1981.
- 21 DEL MAESTRO, R. F. An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology, in: Acta Physiol Scand, Suppl. 492: 153-168, 1980.
- 22 DENEKE, S.M. & FANBURG, B.L. Regulation of Cellular Glutathione. Am. J. Physiol. 257 (Lung Cell. Mol. Physiol. 1): L163-L173, 1989.
- 23 DIAS, G.S.; DE OLIVEIRA, L.M.; DA SILVA, R.S.M. Efeito de diferentes dietas e do jejum sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios no gastrópoda pul-

- monata Megalobulimus oblongus. In: VII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, resumo nº 13.29, Caxambú, p. 244, 1992.
- 24 DUBOCOVICH, M.L.; MASANA, M.I.; HUDSON, R.L.; KRAUSE, D.N. and BENLOUCIF, S. Melatonin receptor subtypes in mammals: pharmacology, regulation and function. In: Second International Symposium on Oxidative Stress and Brain Damage, September 26-28, Chicago, IL, USA, 1997.
- 25 ESKES, G.A. Functional significance of Daily Cycles in Sexual Behavior of the Male Golden Hamster. In: ASCHOFF, DAAN & GROOS, 347p, 1982.
- 26 FASSIONI-HEUSER, M.C.; ZANCAN, D.M.; LOPES, C. & ACHAVAL, M. Ultra-structure of the pedal muscle of the snail *Megalobulimus oblongus*. Braz. J. Morphol. Sci., 14 (1): 102, 1997.
- 27 FERREIRA, M.V.R. & HERMES-LIMA, M. Papel das enzimas antioxidantes em gastrópodes *Biomphalaria tenagophila* durante a estivação e anóxia. In: XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, resumo nº 11053, Caxambú, pp. 275, 1997.
- 28 FERREIRA, R.; LLESUY, S.; MILEI, J.; SCORDO, D.; HOURQUEBIE, H.L; MOLTENI, L. DE PALMA, C. & BOVERIS, A. Assessment of myocardial oxidative stress in patients after myocardial revascularization. In: American Heart Journal, 115 (2): 307-312, 1988.
- 29 FISHER, A.B. Intracellular Production of Oxygen - Derived Free Radicals. Proceedings of a Brook Lodge Symposium, Augusta, Apr. 27-29, pp. 99-104, 1988.
- 30 FRIDOVICH, I. Oxygen radical, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. in: Free Radicals in Biology (Pryor, W.A. ed.), Academic Press, New York, pp 239-277, 1976.
- 31 GANONG, W.F. Fisiologia Médica. 15 ed. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda, 1993.
- 32 GERAERTS, W.P.M. Neurohormonal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells in *Lymnaea stagnalis*. Gen. Comp. Endocrinol. 86: 433-444, 1992.
- 33 GONZALEZ-FLECHA, B.S.; LLESUY, S. & BOVERIS, A. Free Rad. Biol. & Med. 10: 93-100, 1991.
- 34 HALBERG, F. Quo vadis basic and clinical chronobiology; promise for health maintenance. Am. J. Anat. 168: 543-594, 1983.
- 35 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine - second edition, Clarendon Press, Oxford, 1995.
- 36 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radical in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford, 2 ed., 1989.

- 37 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease, in Biochem. J. 219: 1-14, 1984.
- 38 HEARSE, D.J.; GARLICK, P.B.; HUMPHREY, S.M. Ischemic Contracture of the Miocardium: Mechanism and Prevention. Am. J. Cardiol. 39: 986-993, 1977.
- 39 HEMMINGA, M.A. Regulation of glycogen metabolism in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. Doctoral Thesis, Amsterdam, 1984.
- 40 JAEGER, C.P. Physiology of molusca – I. Action of acetilcholina on the heart of *Strophocheilos oblongus*. Comp. Biochem. Physiol. 4: 30-32, 1961.
- 41 KAISER, S.; DI MASCIO, P.; MURPHY, M. & SIES, H. Physical and Chemical Scavenging of SingletMolecular Oxygen by Tocopherols. Arch. Biochem. Biophys. 277(1): 101-108, 1990.
- 42 KENAGY, G.J. & VLECK. D. Daily Temporal organization of Metabolism in Small Mammals; Adaptation and Diversity. In: ASCHOFF, DAAN & GROOS, 322p, 1982.
- 43 KRINSKY, N.I. Antioxidant Functions of Carotenoids. Free Rad. Biol. & Med. 7: 617-635, 1989.
- 44 LAVOISIER, A.L. Memories de Médecine et de Physique Médicale. Paris, Soc. Roy. De Medicine, 5: 569, 1783.
- 45 LEME, J.L.M. A Fauna Malacológica de Escavações em Lagoa Santa, Minas Gerais. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. Na. Acad. Brasil. Ciên., 49 (2), pp. 355, 1977.
- 46 LIVINGSTONE, D.R. and DE ZWAAN, A. Carbohydrate metabolism of gastropods. In: Wilbur, K.M. (ed) The Mollusca, New York: Academic Press, 1: 177-242, 1983.
- 47 LLESUY, S.; MILEI, J.; GONZALEZ-FLECHA, B.S. & BOVERIS, A. Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide – initiated chemiluminescence and morphology. Free Rad. Biol. & Med. 8: 259-264. 1990.
- 48 LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, M.J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. In: J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- 49 MACHLIN, L. & BENEDICH, A. Free Radical Tissue Damage: Protective Role of Antioxidant Nutrientes, in : FASEB J., 1: 441-445. 1987.
- 50 MARQUES, M.; PEREIRA, S. Seasonal variations in blood glucose and glycogen leves of some tissues of *Strophocheilus oblongus*. Ver. Brasil Biol. 30 (1): 43-38, 1970.
- 51 MC CORD, J.M. Oxygen-derived Free Radicals in postischemic injury. New Engl. J. Med. 312 (3): 159-163, 1985.

- 52 MEERSON, F.Z.; KAGAN, V.E.; KOZLOV, V.P.; BELHINA, L.M. & ARKIPENKO, Y.V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and antioxidant protection of the heart. Basic Res. Cardiol. 77: 465-485, 1982.
- 53 MEES, B.; TRENTINI, G.P.; RUSZAS, C. & DE GAETANI, C.F. Some endocrine effects of the pineal gland and melatonin with special reference to reproduction. Progress Brain Res., 52: 329-340, 1979.
- 54 MENEHINI, R. A Toxicidade do Oxigênio. Ciência Hoje 5(6): 57 - 62, 1987.
- 55 MENNA-BARRETO, L.; MARQUES, N. Cronobiologia: Princípios e Aplicações. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 1997.
- 56 MENNA-BARRETO, L.; MARQUES, N.; CIPOLLA-NETO, J. Introdução ao Estudo da Cronobiologia. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 1988.
- 57 MILLS, G.C. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. Arch. Biochem. Biophys. 86: 1-5, 1960.
- 58 MILLS, G.C. J. Glutathione peroxidase and erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. Biol. Chem. 229: 189-197, 1957.
- 59 NIKI, E. Antioxidant Defenses in Eukariotic Cells: an Overview. in: Free Radicals: From Science to Medicine, G. Pole, E. Albano & M. U. Dianzani (eds), 1993.
- 60 OHKAWA, H.; OHISHI, N. & YAGI, K. Assay of lipid peroxidases in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 351-358, 1979.
- 61 OLSZEWER, E. Radicais Livres em Medicina. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 122p, 1992
- 62 PITONI, V.L.L.; VEITENHEIMER, I.L.; DREHER-MANSUR, M.C. Moluscos do Rio Grande do Sul: Coleta, Preparação e Conservação. Porto Alegre, Iheringia, 5: 25-68, maio 1976.
- 63 PITTENDRICH, C.S. Circadian Systems; General Perspective. In ASCHOFF, J. ed. Handbook of Behavioral Neurobiology; Biological rhythms. New York, Plenum Press, v. 4, 1981.
- 64 PRIESTLEY, J. in The discovery of oxygen, Part 1. Alembic Club Reprints, n 7, London, Simpkin, Marshall, Hamilton and Kent, 1894.
- 65 REITER, R.J. Endogenous antioxidative mechanisms: role of melatonin. In: Second International Symposium on Oxidative Stress and Brain Damage, September 26-28, Chicago, IL, USA, 1997.
- 66 RELLA, W. & LAPIN, V. Immunocompetence of pinealectomized and simultaneously pinealectomized and thymectomized rats. Oncology. 33:3-6, 1976.

- 67 RIETVELD, W.J. Clinical Aspects of Chronobiology. Meducation Service Hoechst, 1984.
- 68 ROMERO, S.M.B. & HOFFMANN, A. Efeito da temperatura na freqüência cardíaca do caracol *Megalobulimus sanctipauli*. In: Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, resumo n° 22.24, Caxambú, p. 346, 1995.
- 69 ROSSI, I.C. & DA SILVA, R.S.M. Effects of starvation and a carbohydrate-rich diet on glycogen metabolism in a gastropod mollusc, *Megalobulimus oblongus*. Comp. Biochem. Physiol. 106A (4): 831-836, 1993.
- 70 RUSSEL, G.A. Deuterium-isotopo Effects in the Autoxidation of Aaralkyl Hydrocarbons. Mecanism of the Interaction of Peroxy Radicals, in: J. Am. Chem. Soc., 79: 3871-3880, 1957.
- 71 SCHMITZ, M.; DIAS, G.S.; HORN, A. ; DA SILVA, R.S.M. Influência do estado alimentar sobre o metabolismo de carboidratos e de lipídios no gastrópoda *Megalobulimus oblongus musculus*. In: Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, resumo n° 13.26, Caxambú, p. 341, 1989.
- 72 SIES, H. & MURPHY, M.E. Role of Tocopherols in the protection of Biological Against Oxidative Damage. J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 8: 211-224, 1991.
- 73 SOUTHORN, P. & POWIS, G. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions, in: Mayo Clin Proc., 63: 381-389, 1988.
- 74 SOUTHORN, P. & POWIS, G. Free Radicals in Medicine. II. Involvement in Human Disease, in: Mayo Clin. Proc. 63: 390-408, 1988.
- 75 STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C.; NYBAKKEN, J.W. Zoologia Geral. Companhia Editora Nacional, 6ª ed., São Paulo, 1984.
- 76 TAKAHASHI, J.S. & ZATS, M. Regulation of Circadian Rhythmicity. Science 217:1104-1111, 1982.
- 77 TEARE, J.; GREENFIELD, S.M.; MARWAY, J.S.; PREEDY, V.R.; PUNCHARD, N.A. ; PETERS, T.J.; THOMPSON, R.P.H. Effect of thyroidectomy and adrenalectomy on changes in liver glutathione and malonaldehyde levels after acute ethanol injection. IN: Free Radical Biology and Medicine, 14: 655-660, 1993.
- 78 THOMÉ, J.W.; CARAR, A .E.Q.; MALLMANN, M.T.O.; LOPES, P.T.C. & SCHENEIDER, V.I. Manual de Aulas Práticas de Zoologia: Estudo morfo-anatômico de um Molusco Gástrópode Mesuretra. Porto Alegre, Cadernos EDIPUCRS, 1994.
- 79 UNDERWOOD, H. & GROSS, G. Vertebrate circadian rhythms; retinal and estra-retinal photorreception. Experientia. 38: 1013-1019, 1982.
- 80 VAN WEEL, P.B. Hepatopancreas? Comp. Biochem. Physiol. 47: 1-9, 1974.

- 81 VEITENHEIMER-MENDES, I.L.; MONDIN, C.A. ; STREHL, T. Guia Ilustrado de Fauna e Flora para o Parque Copesul de Proteção Ambiental. Copesul/FZB/IEL, Porto Alegre, 97p, 1993.
- 82 WENDEL, A . Glutathione peroxidase. Meth. Enzymol. 77: 325-333, 1981.
- 83 WIESENBERG, I.; MISSBACH, M. and CARLBERG, C. Pharmacology and functional role of nuclear melatonin receptors. In: Second International Symposium on Oxidative Stress and Brain Damage, September 26-28, Chicago, IL, USA, 1997.
- 84 WIESER, W. Responses of *Helix pomatia* to anoxia: change of solute activity and other properties of the haemolymph. J. Comp. Physiol. 141B: 503-509, 1981.
- 85 WIJSMAN, T.C.; VAN DER LUGT, H.C.; HOOGLAND, H.P. Anaerobic metabolism in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*: haemolymph as a reservoir of D-lactate and succinate. Comp. Biochem. Physiol. 81B (4): 889-895, 1985.