

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**EFEITOS DA PRÉ-EXPOSIÇÃO AO COBRE
SOBRE RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DA
ANÊMOMA-DO-MAR *BUNODOSOMA
CANGICUM* A HIPÓXIA E REOXIGENAÇÃO**

LAÍS DONINI ABUJAMARA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Oceanografia Biológica da
Universidade Federal do Rio
Grande, como requisito parcial à
obtenção do título de MESTRE.

Orientador: Dr. Adalto Bianchini

**RIO GRANDE
Dezembro/2012**

À natureza,

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito a Deus por guiar e iluminar o meu caminho. À minha família, principalmente à minha amada Mãe, por todo o incentivo, amizade, companheirismo e compreensão por eu estar tão longe de casa.

Ao meu grande ídolo Dr. Adalto Bianchini, que se tornou meu orientador. Agradeço por ter me aceitado, por todas as oportunidades e por nunca ter me deixado faltar nada.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Eduardo Secchi e Dr. José Maria Monserrat, pelas idéias, e por aceitarem participar desse processo, com contribuições, sugestões e críticas, que terão grande importância na redação do documento final.

Ao caro Dr. Camilo Dias Seabra Pereira, por ter me orientado na graduação e quanto a que caminho ser tomado. Agradeço por sua participação em mais essa etapa, por sua amizade e confiança. Ao grande Robson Seriani, meus eternos agradecimentos, por ter sido crucial no meu desenvolvimento científico. Ao querido Lucas Buruaem, por toda ajuda, pelos conselhos e ensinamentos, e por ter se tornado um grande amigo. Ao Dr. Denis Abessa, pela amizade, oportunidades e por ter feito parte do meu crescimento.

A todo o grupo do Adalto, por terem me recebido tão bem e por compartilharem muito conhecimento. Entre todos, agradeço principalmente, a Martina, por ter me ajudado muito, ao Vinícius, por ter compartilhado comigo todas as idéias sobre as anêmonas. Também ao Abel e a Bruna, por terem se tornado meus queridos amigos. Agradeço também a Indi, Marina, Daka, Tati, Cinthia, Roberta, Lígia, Iuri, Edu, Jana, Samy, Camila, Mari's, e as que já foram Paloma e Mari Hoff... todos contribuíram de forma positiva para eu me sentir bem-vinda em Rio Grande e claro, para que esse trabalho pudesse ter sido desenvolvido.

Às minhas queridas amigas da Oceano, Mi, Flor, Bá, Helô, Thaís, Elisa, Vanessa por toda ajuda e por dividirem comigo tantos momentos de alegria. Cada uma de vocês tem um lugar especial no meu coração. Meu agradecimento especial ao pessoal da Fisio: Renatinha, Regina, Camila Dalmolin, Anahy, Maiara, Michele, Liliane, Bruno, Arthur (Grilo) por serem todos meus companheiros tão queridos e me ajudarem tanto. E também a Cleia, por ter me ajudado tanto quando cheguei aqui. Às minhas eternas amigas de São Paulo e Santos, algumas por serem minhas irmãs, e por compreenderem a minha ausência. A querida Laurinha, não sei onde te encaixo aqui, você está em todas! Muito obrigada pela amizade e por ajudar no meu crescimento.

Ao meu príncipe Gabriel Hallal, simplesmente por ser um anjo na minha vida. E também a sua amada família, que me acolhe como se já me conhecesse.

Por fim, agradeço a todos que passaram pelo meu caminho, que mesmo com simples palavras, de certo contribuíram para meu amadurecimento e evolução.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1.A hipóxia na zona intermarés.....	3
1.2.Reoxigenação.....	6
1.3.Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	7
1.4.Cobre	12
1.5. Anêmona-do-mar <i>Bunodosoma cangicum</i>	13
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Coleta e manutenção.....	16
3.2. <i>Experimento n°1</i> - Exposição ao cobre.....	16
3.3. Análise do cobre dissolvido na água.....	17
3.4. <i>Experimento n° 2</i> – Exposição à hipóxia/reoxigenação.....	17
3.5. Análises laboratoriais.....	18
3.5.1. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP).....	18
3.5.2. Atividade da SOD.....	19
3.5.3. Concentração de GSH.....	20
3.5.4. Peroxidação lipídica (LPO).....	20
3.5.5. Concentração de ATP	20
3.6. Análises estatísticas.....	21
4. SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	22
4.1. Concentração de cobre dissolvido na água.....	22

4.2. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP).....	22
4.3. Atividade da SOD.....	22
4.4. Concentração de GSH.....	23
4.5. Peroxidação lipídica (LPO).....	23
4.6. Concentração de ATP	24
4.7. Observações do comportamento de <i>B. cangicum</i>	24
5. CONCLUSÕES.....	24
6. LITERATURA CITADA.....	25
7. ANEXO I: Figuras.....	36
8. ANEXO II: Manuscrito a ser submetido ao periódico Aquatic Toxicology	38

RESUMO

Os organismos bentônicos intermareais enfrentam oscilações periódicas nos níveis de oxigênio na água associadas ao ciclo de marés. Durante o recuo da maré, eles ficam expostos ao ar e sujeitos a hipóxia, favorecendo uma redução nas espécies reativas de oxigênio (ERO) e nas defesas antioxidantes. Porém, na reoxigenação há um aumento acentuado na geração de ERO. Para minimizar os prejuízos desse processo, existem mecanismos antecipatórios, tal como o aumento das defesas antioxidantes durante a hipóxia. Por sua vez, o estresse causado por poluentes químicos, como o cobre, pode alterar o padrão destas respostas. Neste estudo foram avaliadas respostas de biomarcadores associados ao estresse oxidativo e metabolismo (capacidade antioxidante total contra radicais peroxil - ACAP, atividade da superóxido dismutase - SOD, concentração de glutatona reduzida - GSH, peroxidação lipídica - LPO e concentração de ATP) na anêmona *Bunodosoma cangicum* pré-exposta (96 h) ao cobre ($6,1 \pm 2.7 \mu\text{g.L}^{-1}$) e submetida a hipóxia (6 h a $0.5 \text{ mgO}_2\text{.L}^{-1}$) seguida da reoxigenação (6 h a $7.5 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$). Nas anêmonas controle não foram observadas variações na ACAP, GSH, LPO e ATP. Entretanto, a atividade da SOD aumentou durante a hipóxia. Nas anêmonas pré-expostas ao cobre, a ACAP foi reduzida na hipóxia e reoxigenação. A atividade da SOD não se alterou e a concentração de GSH aumentou no início do experimento, na hipóxia e na reoxigenação. A concentração de ATP diminuiu na reoxigenação, porém a LPO não se alterou em todas as condições experimentais. Estes resultados indicam a existência de mecanismos antecipatórios para prevenção dos efeitos negativos da reoxigenação em *B. cangicum* e que a exposição ao cobre em concentração ambientalmente relevante afeta negativamente estes mecanismos.

Palavras-chave: anêmona-do-mar, cobre, estresse oxidativo, hipóxia, reoxigenação.

ABSTRACT

Intertidal benthic organisms are subjected to changes in oxygen availability during the tidal cycle. A hypoxic condition may occur during air exposure, thus favoring a decreased level of oxygen reactive species (ROS) and antioxidant defenses. However, during re-oxygenation a ROS overproduction may occur. Anticipatory mechanisms such as a buildup of antioxidant defenses under hypoxia could be present to avoid a possible oxidative damage occurring during these processes. In turn, chemical stress induced pollutants such as copper may affect the response of these mechanisms. In the present study, the response of biomarkers associated with oxidative stress and energy (total antioxidant capacity against peroxy radicals - ACAP, superoxide dismutase activity - SOD, lipid peroxidation - LPO, reduced glutathione - GSH, and ATP concentration) were evaluated in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* pre-exposed (96 h) to copper ($6.1 \pm 2.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and submitted to hypoxia (6 h at $5 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$) followed by re-oxygenation (6 h at $7.5 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$). In sea anemones kept under control conditions, ACAP, GSH concentration, LPO and ATP concentration did not change over the experimental time. However, SOD activity was increased under hypoxia. In sea anemones pre-exposed to copper, ACAP was reduced under hypoxia and re-oxygenation. GSH concentration was increased during hypoxia and re-oxygenation, while ATP concentration was reduced during re-oxygenation. These findings indicate that *B. cangicum* shows anticipatory mechanisms to avoid the oxidative stress during re-oxygenation and that pre-exposure to an environmentally relevant concentration of copper affects these mechanisms.

Key-words: copper, hypoxia, oxidative stress, reoxygenation, sea anemone

1. INTRODUÇÃO

1.1. A hipóxia na zona intermarés

Os substratos rochosos da zona intermarés são ambientes dinâmicos de interface entre os ecossistemas marinho e terrestre (Helmuth *et al.*, 2006a), onde ocorrem complexas interações entre processos biológicos e físicos, determinantes da estruturação da comunidade bentônica (Firth & Williams, 2009). A distribuição e abundância de espécies intermareais são influenciadas por fatores climáticos, como a temperatura do ar (Somero, 2002; Helmuth *et al.*, 2006b), velocidade do vento, incidência de radiação solar e precipitação (Stenseth *et al.* 2003), além de outros fatores como ressurgência (Dahlhoff & Menge, 1996; Leslie *et al.*, 2005), flutuações nos níveis de oxigênio dissolvido na água (Service, 2004), interações biológicas (Harley, 2003) e poluição ambiental (Bustamante *et al.*, 2007). A ação das ondas, o ciclo de marés e a altura de fixação do organismo no substrato, interagem de forma a determinar a duração da exposição do mesmo a essas condições (Helmuth *et al.*, 2006b). No entanto, a percepção e resposta dos organismos aos sinais ambientais ocorrem de diferentes maneiras, dependendo do seu tamanho, morfologia e comportamento (Helmuth *et al.*, 2006b).

A exposição ao ar, que ocorre naturalmente com o recuo da maré, está entre os principais fatores determinantes do estabelecimento do limite biogeográfico ocupado por espécies intermareais, levando em consideração o tempo em que a área permanece emersa e a tolerância fisiológica da espécie (Harley & Helmuth, 2003). Para minimizar os efeitos da exposição ao ar, as anêmonas, frequentemente encontradas nas zonas intermareais, apresentam adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais para sobreviver nesse ambiente. As anêmonas possuem o corpo arredondado, com uma

relação superfície/volume pequena durante a maré baixa, o que reduz a dessecação (Newell, 1979). Além disso, entre as estratégias apresentadas por esses organismos, estão o recolhimento dos tentáculos e o fechamento do corpo em forma de cúpula, minimizando a superfície de evaporação. A estratégia de retenção de detritos junto ao corpo diminui a superfície de evaporação, bem como cria uma camada de ar isolante. Além disso, estes animais podem ainda produzir uma capa úmida protetora ou muco, bem como apresentar preferência por áreas abrigadas no substrato (Hart & Crowe, 1977; Stotz, 1979; Vidolin, 2007; Amado *et al.*, 2011). Espécies intermareais, tais como *Bunodosoma cangicum*, *B. caissarum*, *Phymactis clematis*, *Anthothoe chilensis*, *Actinia bermudensis* e *Anthopleura cascaia*, apresentam ainda um mecanismo de retenção de água na cavidade gastrovascular durante o período de exposição ao ar (Stotz, 1979; Vidolin, 2007).

Entre as principais consequências da exposição ao ar, está uma redução nos níveis de oxigênio, conhecida como hipóxia, a qual ocorre durante os períodos de maré baixa (Hermes-Lima *et al.*, 2001). Durante a emersão, a ineficiência das trocas gasosas e o isolamento dos tecidos para conservação de água induzem a hipóxia e respostas fisiológicas nos organismos intermareais (Shick *et al.*, 1978). Este tipo de hipóxia é conhecido como “hipóxia ambiental” e ocorre quando a taxa de consumo de oxigênio pelo organismo excede sua taxa de produção ou sua capacidade de difusão pelo ar (Graham, 1990), podendo ser definida como a condição onde a concentração de oxigênio dissolvido na água se encontra entre 0,28 e 4,00 mg O₂.L⁻¹ (Diaz & Rosenberg, 1995). Portanto, este tipo de hipóxia geralmente ocorre com organismos que ocupam habitats periodicamente expostos a baixos níveis de oxigênio e se diferencia da “hipóxia funcional”, uma vez que esta última ocorre durante atividade muscular excessiva, na qual a intensidade do processo metabólico ultrapassa a capacidade de

distribuição de O_2 para os tecidos e obtenção de ATP através da oxidação (Portner *et al.*, 1984; Via *et al.*, 1997).

A tolerância dos organismos a essas condições pode variar significativamente, sendo dependente tanto da vulnerabilidade da espécie quanto do estágio de desenvolvimento do indivíduo (Miller *et al.*, 2002). Algumas espécies podem viver em ausência de oxigênio por dias, semanas ou meses (Lutz & Storey, 1997). Entretanto, os efeitos da hipóxia começam a surgir geralmente em níveis abaixo de $2 \text{ mg } O_2.L^{-1}$, ou seja, cerca de 18% da saturação do ar (Diaz, 2001; Vaquer-Sunyer & Duarte, 2008).

Muitos invertebrados bentônicos podem sobreviver à limitação de oxigênio por um curto período de tempo e tolerar níveis moderados e leves de hipóxia. Entretanto, a hipóxia severa ($<0.5 \text{ mg } O_2.L^{-1}$) é o limite que compromete a integridade ecológica dessas espécies (Riedel *et al.*, 2012). Estudos como os de Riedel *et al.* (2012) e Service (2004) demonstraram que a concentração de oxigênio na água é por si só um fator suficiente para causar um rápido e extenso colapso da comunidade bentônica. Ao nível de espécies, a hipóxia interfere na distribuição vertical e horizontal destas, bem como altera o seu comportamento (Ekau *et al.*, 2010). Dependendo da severidade e duração da hipóxia, os organismos apresentarão alterações fisiológicas que podem afetar o desenvolvimento ao longo do ciclo de vida, a capacidade de crescimento, o sucesso reprodutivo e a vulnerabilidade a doenças (Ekau *et al.*, 2010). Nas situações de hipóxia, o suprimento energético é reduzido, forçando as células a suportarem um déficit potencialmente fatal de energia (Hermes-Lima *et al.*, 2004).

Entre as adaptações bioquímicas a baixas concentrações de oxigênio em organismos intermareais estão principalmente a depressão metabólica, que inclui obtenção de energia por processos anaeróbicos, a fim de reduzir a demanda energética em situações de hipóxia, como relatado em cnidários (Rutherford & Thuesen, 2005); a

manutenção de grandes reservas de combustíveis da fermentação, como glicogênio e aspartato, em todos os tecidos; e a produção e tolerância a subprodutos metabólicos alternativos, tais como succinato, alanina, propionato e acetato, ao invés de lactato, que aumentam o rendimento de produção de ATP e/ou diminuem a produção de H^+ , o que leva a um aumento da relação ATP/ H^+ , maximizando a produção de ATP e diminuindo o problema da acidificação metabólica (Hochachka & Somero, 1984; Boutilier, 2001; Hermes-Lima *et al.*, 2001; Bickler & Buck, 2007).

Além disso, em situações de hipóxia, organismos bentônicos, tais como crustáceos, moluscos e poliquetas, podem reduzir as atividades de alimentação (Tamai, 1993; Llanso & Dias, 1994; Bell *et al.*, 2003) ou reduzir os batimentos cardíacos (Harper & Reiber, 1999). Uma notável adaptação a hipóxia pode ser observada em moluscos, que mesmo expostos ao ar, podem manter um baixo fluxo de oxigênio nos tecidos através da abertura e fechamento periódico da concha ('gapping behavior'), assegurando uma baixa renovação de oxigênio (Widdows *et al.*, 1979).

1.2. Reoxigenação

Além dos efeitos imediatos da anaerobiose, os animais tolerantes a situações de privação de oxigênio têm de lidar com os danos que ocorrem durante o processo de reoxigenação (Issartel *et al.*, 2009). Há um incremento marcado na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) quando a cadeia respiratória mitocondrial recobra a atividade (Storey, 1996). Durante a isquemia, por exemplo, os carreadores de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial são reduzidos, sendo que após o restabelecimento do fluxo do oxigênio, ocorre uma imediata reoxigenação desses carreadores, aumentando assim a produção de ERO (Lushchak *et al.*, 2001; Issartel *et al.*, 2009). Além disso, a isquemia resulta no catabolismo do ATP, aumentando o nível intracelular de AMP, que,

por sua vez, é catabolizado em vários produtos incluindo adenosina, inosina e, por fim, hipoxantina e xantina. O acúmulo de xantina e hipoxantina servem de substrato para o aumento da geração de O_2^- quando ocorre a reperfusão (McCord, 1985).

Entre as estratégias para lidar com oscilações periódicas nos níveis de oxigênio, estão: (a) manutenção de altos níveis de defesas antioxidantes durante todo o tempo (Rice & Cammach, 1991); (b) aumento da tolerância aos produtos ou aumento de mecanismos de eliminação destes; (c) estratégia antecipatória, também chamada de “preparação para o estresse oxidativo”. Neste processo, a capacidade antioxidante aumenta durante o estado de hipóxia para preparar o organismo para o estresse oxidativo que irá ocorrer quando o nível de oxigênio aumentar novamente (Lushchak *et al.*, 2001; Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002). Este fenômeno foi observado em muitas espécies de diferentes grupos animais, incluindo o gastrópode *Littorina littorea* (Pannunzio & Storey, 1998), a rã-leopardo *Rana pipiens* (Hermes-Lima & Storey, 1996), a carpa *Cyprinus carpio* (Vig & Nemsok, 1989; Lushchak *et al.*, 2005), o peixe-dourado *Carassius auratus* (Lushchak *et al.*, 2001) e a cobra *Thamnophis sirtalis parietalis* (Hermes-Lima & Storey, 1993). O aumento das defesas antioxidantes durante estados fisiológicos em que a produção de ERO deveria estar reduzida é um mecanismo preparatório para minimizar potenciais prejuízos devido ao estresse oxidativo que ocorre quando o consumo de oxigênio aumenta (Lushchak *et al.*, 2005).

1.3. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

As ERO são formadas como resultado da redução parcial do oxigênio a água (Hermes-Lima *et al.*, 2001) e são consideradas a classe mais importante de espécies radicais geradas nos sistemas vivos (Miller *et al.*, 1990). As ERO são altamente reativas e podem ser não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou radicalares,

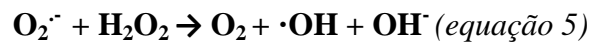
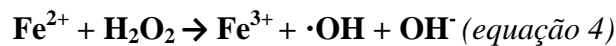
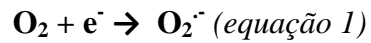
como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e os radicais hidroxil ($\cdot OH$), que possuem um elétron desemparelhado na última camada (Storey, 1996; Lushchak *et al.*, 2005). Grande parte das ERO (cerca de 90%) é produzida nas cadeias de transporte de elétrons - mitocôndria, retículo endoplasmático, membranas nucleares e no sistema fotossintético (Lushchak, 2011). Uma menor quantidade de ERO é gerada por enzimas como as oxidases (NADPH oxidase, lipoxigenases e xantina oxidase), através da auto-oxidação de diferentes moléculas (Lushchak, 2011).

O $O_2^{\cdot-}$, produto da redução de um elétron do oxigênio (*equação 1*), é o precursor da maioria das ERO e um mediador das reações oxidativas em cadeia (Storey, 1996). A produção do $O_2^{\cdot-}$ ocorre principalmente na mitocôndria (Cadenas & Sies, 1998). Durante o processo de produção de energia, os elétrons da cadeia transportadora de elétrons enfraquecem prematuramente, formando o $O_2^{\cdot-}$, sendo que alguns autores consideram que esse processo ocorre em cerca de 1-3% dos elétrons (Valko *et al.*, 2007), enquanto que para outros este percentual é de apenas 0.1% (Fridovich, 2004).

A dismutação do $O_2^{\cdot-}$, que se dá espontaneamente ou através da reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD), produz H_2O_2 (*equação 2*), que por sua vez, pode ser totalmente reduzido à água ou parcialmente reduzido a $\cdot OH$ (*equação 3*), a forma neutra do íon hidróxido (OH^-). O $\cdot OH$ é um dos mais fortes oxidantes presentes na natureza, possuindo alta reatividade e meia-vida *in vivo* muito curta (10^{-9} s) (Pastor *et al.*, 2000).

O estado redox de uma célula está diretamente ligado a um par redox, de ferro (ou cobre), e é mantido dentro de estreitos limites fisiológicos. Liochev e Fridovich (1994) propuseram que, através dessa estreita regulação, não sobram íons ferro livres no meio intracelular. Entretanto, quando há um excesso de $O_2^{\cdot-}$ *in vivo*, ocorre a liberação desses íons ferro. Estes podem participar da reação de Fenton, catalisando a formação do $\cdot OH$, através da redução do ferro ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$) ou cobre ($Cu^{2+} \rightarrow Cu^{1+}$) pelo $O_2^{\cdot-}$,

que, por sua vez, reage com o H_2O_2 formando o $\cdot\text{OH}$ (*equação 4*) (Sies, 1985). Outra forma do O_2^- gerar $\cdot\text{OH}$ é através da reação de Haber-Weiss, na qual o O_2^- reage com o H_2O_2 formando o $\cdot\text{OH}$ (*equação 5*) (Liochev & Fridovich, 2002).



As ERO podem exercer tanto um papel benéfico quanto deletério aos organismos (Valko *et al.*, 2007). Os efeitos benéficos das ERO ocorrem quando estas se encontram em baixas e moderadas concentrações. Nesses casos, elas participam de uma série de vias sinalizadoras em processos celulares, como ciclo celular, resposta ao estresse e metabolismo energético (Gorr *et al.*, 2010). Além disso, as ERO participam de processos tais como a defesa contra agentes infecciosos e indução da resposta mitogênica (Valko *et al.*, 2007). Estudos tem demonstrado que as ERO, como H_2O_2 , podem agir como segundo mensageiros em muitas vias de transdução, como aquelas envolvidas em receptores de membrana de tirosina quinase, mediando estímulos ao estresse oxidativo (Rhee *et al.*, 2000).

O estresse oxidativo é caracterizado por um aumento na produção de ERO a níveis que excedem a capacidade antioxidante do organismo, levando a uma perturbação na sinalização e no controle redox e/ou danos moleculares (Sies & Jones, 2007). O estresse oxidativo é responsável por causar danos às biomoléculas, especialmente lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, induzindo efeitos deletérios e alterando suas estruturas e/ou funções biológicas (Hicks *et al.*, 2006).

O processo de peroxidação lipídica (LPO) é considerado uma das principais causas de lesão celular, através da oxidação dos fosfolipídios da membrana, causando alterações estruturais, podendo levar o organismo à morte (Abuja & Albertini, 2001). A LPO é uma reação em cadeia, na qual as ERO afetam componentes celulares, envolvendo ácidos graxos poli-insaturados e resíduos de fosfolipídios, que são extremamente sensíveis à oxidação. Uma vez formados, os radicais peroxil ($\text{ROO}\cdot$) podem ser rearranjados produzindo o malondialdeído (MDA) e o 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) como produtos finais (Wang *et al.*, 1996). O MDA é mutagênico em bactérias e células de mamíferos, bem como carcinogênico em ratos. Por sua vez, o HNE é pouco mutagênico. Entretanto, este composto é um dos produtos mais tóxicos oriundos da LPO (Valko *et al.*, 2007).

A oxidação de proteínas pelas ERO ocorre nas cadeias laterais de todos os aminoácidos. Em particular, os resíduos de metionina e cisteína são os mais susceptíveis a oxidação, sendo que estes últimos podem gerar a formação reversível de dissulfetos entre grupos tióis ($-\text{SH}$), em particular da GSH (S-glutatilação) (Valko *et al.*, 2007). As proteínas podem ser danificadas por vários mecanismos mediados pelas ERO como: radiação, produtos da peroxidação lipídica (MDA e HNE) e oxidação de açúcares (principalmente aldeídos, formando aductos carbonila com proteínas), metabólitos derivados de óxidos nítricos e sistemas de oxidação catalisados por metais (Hermes-Lima, 2004).

Os danos ao DNA ocorrem principalmente pela reação deste com o $\cdot\text{OH}$, que causa danos principalmente nas bases nitrogenadas, purínica e pirimidínica (Halliwell & Gutteridge, 1999). A modificação permanente do material genético resultante do dano oxidativo representa o primeiro passo envolvido em processos mutagênicos, carcinogênicos e de envelhecimento (Valko *et al.*, 2007).

Entre as defesas antioxidantes, que combatem a excessiva produção de ERO, estão a SOD e a catalase (CAT), que detoxificam o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 , respectivamente, a espécies menos reativas, bem como a glutathiona peroxidase (GPx), uma enzima selênio-dependente que degrada peróxidos utilizando a glutathiona (GSH) como co-substrato (Hermes-Lima, 2004). Depois de utilizados, os níveis de GSH são renovados pela conversão da glutathiona oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH), através da glutathiona redutase (GR) ou da produção de novas moléculas de GSH (Maher, 2005). A GSH por si só, é uma defesa antioxidante não enzimática contra os radicais peróxil (Hermes-Lima, 2004). As vias de produção e eliminação das ERO são mostradas na Figura 1 do Anexo I.

Neste contexto, cabe ressaltar que a hipóxia pode favorecer um decréscimo na geração de ERO e, conseqüentemente, no nível das defesas antioxidantes (Hermes-Lima *et al.*, 2001). Isso pode ser explicado, pois em condições normais de disponibilidade de oxigênio, este serve como último receptor de elétrons durante o transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial. Na falta de oxigênio, espera-se que a geração do produto da redução de um elétron do oxigênio ($O_2^{\cdot-}$) também seja reduzida. A exposição à hipóxia altera o estado redox celular, deixando a célula em estado altamente reduzido e, considerando que a síntese de enzimas antioxidantes tipicamente responde ao estado redox da célula, espera-se que também haja uma redução das enzimas antioxidantes. Quando a pressão parcial de oxigênio (PO_2) está abaixo da pressão crítica de O_2 (P_{crit}), a difusão de oxigênio pela mitocôndria limita a fosforilação oxidativa (Boutilier, 2001) e reduz o processo de geração de ERO. No entanto, outros autores sugerem que a própria mitocôndria pode atuar como sinalizador de O_2 aumentando a produção de ERO durante a hipóxia. Essa última hipótese ocorre através do decréscimo da velocidade máxima de reação (V_{max}) do citocromo oxidase durante a hipóxia, sendo responsável

por um aumento do estado redox mitocondrial, fazendo com que os carreadores de elétrons operem de modo mais reduzido e, dessa forma acelerando a geração de ERO durante a hipóxia (Chandel & Schumacker, 2000).

1.4. Cobre

Eventos de hipóxia associados a um aumento excessivo na entrada de nutrientes e materiais orgânicos provenientes de atividades industriais e da urbanização em áreas costeiras têm sido documentados mundialmente (Diaz, 2001; Gray *et al.*, 2002). Esta condição afeta diretamente as comunidades bentônicas, bastante sensíveis a processos de eutrofização (Jørgensen, 1996). Associados a esses eventos, encontram-se os metais como o cobre, um dos contaminantes inorgânicos mais relevantes que atinge áreas costeiras (Baumgartem & Niencheski, 1998).

O cobre lançado nos oceanos é resultante de processos como o escoamento de rios adjacentes a áreas de mineração, fundição, descargas de tratamento de efluentes, incineradores de resíduos, fertilizantes, tintas anti-incrustantes e refinarias (Guzmán & Jiménez, 1992; Jones, 1997; Pedroso & Lima, 2001; Mitchelmore *et al.*, 2003). De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, Resolução nº 357/05), o limite máximo permitido para o lançamento de cobre em águas costeiras é de 5 µg/L, mas em condições especiais permite-se até 1 mg/L.

O cobre é um elemento-traço essencial necessário para a manutenção das funções celulares e é parte integrante de várias metalo-enzimas (Liu *et al.*, 2006). Entretanto, é considerado potencialmente tóxico aos organismos aquáticos quando em excesso na água (Martins *et al.*, 2011). A bioacumulação de cobre está diretamente associada ao estresse oxidativo, aumentando a produção de ERO através das reações de Fenton e Haber-Weiss (*ver item 1.2*), com consequente dano às biomoléculas (Stohs &

Bagchi, 1995; Formigari *et al.*, 2007; Main *et al.*, 2010). A sensibilidade a este metal depende da regulação homeostática de sua captação, armazenamento e excreção (Depledge & Rainbow, 1990) bem como da permeabilidade da membrana, através da qual o cobre pode ser absorvido (Newman & Heagler, 1991).

Em geral, o estresse causado por poluentes causa um aumento do gasto energético devido aos processos de eliminação e detoxificação. Isso pode neutralizar a depressão metabólica que ocorre em anaerobiose, o mais importante mecanismo de adaptação para suportar um longo prazo de ausência de oxigênio, reduzindo, portanto, o tempo de sobrevivência dos organismos nessas situações (de Zwaan *et al.*, 1995). Além disso, o aumento da concentração de cobre pode favorecer a produção de ERO durante a reoxigenação, pois esse metal poderia favorecer a produção do radical hidroxila através das reações de Fenton e Haber-Weiss.

1.5. Anêmona-do-mar *Bunodosoma cangicum*

As anêmonas-do-mar são cnidários da Classe Anthozoa, subclasse Zoantharia, Ordem Actiniaria. Embora não seja o grupo mais abundante, os cnidários constituem um dos grupos mais conspícuos dos costões rochosos (De Capitani, 2007). Eles são organismos solitários que se alimentam de pequenas presas, como peixes e crustáceos, além de terem a capacidade de absorver matéria orgânica dissolvida, e de muitas espécies apresentarem endossimbiontes fotossintetizantes (Shick, 1991). Os actiniários são animais de vida longa, atingindo uma média de 50 anos de idade, podendo inclusive chegar aos 210 anos (Ottaway, 1980; Shick, 1991).

A espécie em estudo, *Bunodosoma cangicum* (Corrêa, 1964) (Fig. 2, Anexo I), é encontrada em regiões próximas à linha da água, na maioria das vezes rente à areia, ficando submersas com a descida da maré (De Capitani, 2007). Esta espécie fica

completamente fechada durante a maré baixa e apresenta comportamento de agregação quando exposta a dessecação, como observado em *Antopleura elegantissima* (Pineda & Escofet, 1989).

A anêmona-do-mar *B. cangicum* apresenta uma base fortemente aderente, bem desenvolvida, podendo ser circular ou irregular, sempre muito expandida quando fixada ao substrato e, portanto, tendo um diâmetro maior que a coluna. Pode chegar a 8 cm de diâmetro. A coluna é cilíndrica e extremamente distensível com altura bastante variável, dependendo do grau de distensão do animal. A parede da coluna apresenta vesículas simples distribuídas de forma irregular, mas na margem podem ser duplas, triplas ou até quádruplas. Na borda interna da margem há uma coroa dupla de esférulas marginais globosas, simples ou múltiplas, de tamanho variado. Apresenta coloração amarelada, esverdeada, oliva ou castanho-sujo. Possui tentáculos retráteis, relativamente longos, simples e pontiagudos. Apresenta 96 tentáculos distribuídos em 5 ciclos. Os tentáculos apresentam coloração variada, sendo geralmente azulados ou rosados, atingem 2 cm de comprimento e são bastante uniformes em um mesmo indivíduo. O disco oral é liso e muitas vezes de cor uniforme castanha ou rósea, atingindo 3 cm de diâmetro (Vidolin, 2007). Com relação à sua distribuição, *B. cangicum* habita zonas intermarés ao longo do litoral do Brasil e Uruguai, em ambientes costeiros, onde a contaminação por cobre pode ser problemática (Lagos *et al.*, 2001).

A redução da concentração de oxigênio dissolvido na água reflete uma redução na taxa de consumo de oxigênio nas anêmonas *Metridium senile* e *Hacloclava producta*, que cessam o consumo de oxigênio em concentrações pouco acima de zero (Sassaman & Mangum, 1972). Uma vez que o metabolismo aeróbico cessa, as anêmonas, como *B. cavernata*, podem sobreviver por bastante tempo na ausência de oxigênio que pode

sobreviver em anóxia por seis semanas e se recuperar rapidamente quando o oxigênio é reintroduzido (Sassaman & Mangum, 1972).

A escolha de *B. cangicum* para realização do presente estudo foi baseada na sua abundância, fácil coleta e manutenção em laboratório. Além disso, considerando que as anêmonas apresentam um metabolismo aeróbico baixo, espera-se uma menor produção de ERO e, conseqüentemente, uma menor concentração de defesas antioxidantes, o que deveria representar um problema frente à exposição a um agente pró-oxidante como o cobre. Cabe ressaltar que pesquisas ecológicas utilizando modelos biológicos não convencionais, como anêmonas-do-mar, e situações semelhantes àsquelas encontradas em campo podem contribuir para uma compreensão mais aprofundada a respeito da fisiologia do estresse oxidativo que ocorre na natureza (Constantini, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar as respostas da anêmona-do-mar *B. cangicum* exposta a uma situação de hipóxia e reoxigenação, considerando a hipótese de preparação para o estresse oxidativo, bem como o efeito da pré-exposição a uma concentração de cobre ambientalmente relevante sobre estas respostas.

2.2. Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral proposto, foram definidos os seguintes objetivos específicos para o presente estudo:

- Avaliar os efeitos da hipóxia e da reoxigenação sobre as defesas antioxidantes (capacidade antioxidante total contra radicais peroxil - ACAP, atividade da SOD e

concentração de GSH), os danos oxidativos (lipoperoxidação - LPO) e o nível energético (concentração de ATP) na anêmona-do-mar *B. cangicum*;

- Investigar a existência de um mecanismo preparatório para lidar com situações de hipóxia/reoxigenação em *B. cangicum* através da análise temporal das respostas dos parâmetros bioquímicos indicados acima;
- Determinar o efeito da exposição a uma concentração ambientalmente relevante de cobre sobre a resposta dos parâmetros bioquímicos indicados acima;
- Avaliar se a exposição a uma concentração ambientalmente relevante de cobre pode afetar o mecanismo preparatório para lidar com situações de hipóxia/reoxigenação, caso ele esteja presente em *B. cangicum*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta e manutenção dos animais

Indivíduos da anêmona-do-mar *B. cangicum* foram coletados manualmente nos molhes da barra da Praia do Cassino, Rio Grande, RS (32°09'39.56"/52°05'53.78") em março de 2011. Os organismos foram transferidos para o laboratório e acondicionados em aquários com aeração e filtração constantes, em condições fixas de fotoperíodo (12h claro: 12h escuro), temperatura (20°C ± 1) e salinidade (33), onde foram aclimatados por 15 dias. Durante este período, as anêmonas-do-mar foram alimentadas diariamente com pequenos pedaços de peixes de *Poecilia vivipara*.

3.2. Experimento 1- Exposição ao cobre

Anêmonas-do-mar foram individualmente expostas (96 h) ao cobre (5 µg.L⁻¹) em sistema semi-estático com renovação total do meio experimental a cada 24 h (Fig. 3;

Anexo I). Os meios experimentais foram preparados a partir de uma solução de CuCl_2 (Vetec) em água do mar natural com 24 h de antecedência da introdução dos animais nos experimentos, visando o completo equilíbrio do cobre na água. A concentração de cobre nominal utilizada ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$) foi escolhida por ser o limite estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, Resolução n° 357/05) para águas salinas. Durante o experimento, nenhum alimento foi fornecido aos animais. Todo o material utilizado nos testes foi previamente limpo com ácido nítrico a 1%.

3.3. Análise do cobre dissolvido na água

Durante as renovações do meio experimental foram coletadas amostras de água antes (0 h) e após a exposição (24 h) dos animais ao cobre. As amostras de água foram acondicionadas em tubos plásticos tipo Falcon e acidificadas (0.5% HNO_3) para determinação da concentração de cobre total (amostra não filtrada) e dissolvido (amostra filtrada - filtro de $0.45 \mu\text{m}$) por espectrofotometria de absorção atômica (AAS 932 Plus, GBC, Austrália).

3.4. Experimento 2 – Exposição à hipóxia/reoxigenação

Todos os experimentos iniciaram sempre na mesma hora do dia (08:00), uma vez que possíveis variações diurnas nos parâmetros bioquímicos analisados poderiam ocorrer. Para investigar os efeitos da hipóxia, foram preparados dois tanques contendo água do mar com baixos níveis de oxigênio dissolvido ($0.5 \pm 0.1 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$), obtidos através do borbulhamento de nitrogênio por cerca de 10 min (Fig. 4 - anexo I). A condição de hipóxia, e não de exposição ao ar, como aconteceria na natureza, foi escolhida para o presente estudo, pois inúmeras variáveis, como flutuações na temperatura, dessecação e exposição à luz, poderiam exercer influência nas respostas de

estresse oxidativo das anêmonas-do-mar. Indivíduos previamente expostos ao cobre foram transferidos para um desses tanques, enquanto no outro foram colocados indivíduos controle, não pré-expostos ao cobre. Essa condição de exposição foi mantida por um período de 6 h, após o qual a água dos tanques foi substituída por outra em condições normais de saturação de oxigênio ($7.5 \pm 0.1 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$), a qual foi obtida através do borbulhamento de oxigênio. Essa condição também foi mantida por um período de 6 h. Ambas as condições foram monitoradas através do uso de um medidor de oxigênio (LT Lutron DO-5519). Portanto, o experimento foi realizado perfazendo um total de 12 h, sendo que a cada 1,5 h foram coletados aleatoriamente 4 indivíduos de cada tanque, os quais foram acondicionados em tubos plásticos tipo Falcon e imediatamente congelados e mantidos em ultrafreezer (-80°C) até a realização das análises, conforme descrito abaixo.

3.5. Análises bioquímicas

As anêmonas coletadas foram pesadas e separadas em alíquotas, utilizadas nas análises descritas a seguir (itens 2.5.1 a 2.5.5). Para as análises descritas nos itens 2.5.1 a 2.5.3, alíquotas das amostras foram homogeneizadas mecanicamente com seus respectivos tampões de homogeneização. Os homogeneizados foram centrifugados ($10.000 \times g$; 4°C ; 20 min) em tubos plásticos do tipo Eppendorf utilizando-se uma centrífuga refrigerada (Mikro 22r, Hettch, Alemanha). O sobrenadante foi utilizado como fonte de compostos antioxidantes. A dosagem de proteínas das amostras homogeneizadas foi determinada através do reagente Biureto, utilizando-se um kit comercial de reagentes (Doles Reagentes, Goiânia, GO, Brasil). Para as análises, a concentração de proteínas no homogeneizado foi padronizada em $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.5.1. Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)

Esse ensaio foi realizado para medir a resistência do tecido a oxiradicais, fornecendo assim um indicador para prever efeitos adversos mediados por oxiradicais nas condições fisiológicas dos organismos (Regoli, 2000). A ACAP foi medida de acordo com o protocolo descrito por Amado *et al.* (2009), com modificação do tampão de homogeneização, o qual foi composto por Tris-Base (20 mM), EDTA (1 mM), DTT (1 mM), sacarose (500 mM), KCl (150 mM) e PMSF (0,1 mM). Este protocolo baseia-se na detecção de ERO por fluorimetria (excitação: 485 nm; emissão: 530 nm) com o uso de 2',7' diclorofluorescina (H₂DCF-DA) como substrato, e a geração de radicais peroxil por decomposição térmica do composto 2,2'-azobis (ABAP) a 35°C. Uma placa de 96 poças foi preparada com as amostras em triplicata, para leitura com e sem ABAP. Nas poças para leitura com ABAP foi adicionado o tampão de reação descrito acima contendo H₂DCF-DA na concentração final de 16 µM. A leitura da fluorescência foi realizada em leitora de microplacas (Victor 2, Perkin Elmer) a 37°C e em intervalos de 5 min, durante 60 min. A ACAP foi determinada pela diferença da fluorescência obtida nas áreas com e sem ABAP. Os resultados de ACAP foram expressos considerando o inverso da área relativa entre a área com ABAP e a diferença entre a área com ABAP e sem ABAP.

3.5.2. Atividade da superóxido-dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada por espectrofotometria de acordo com o protocolo descrito por McCord e Fridovich (1969), no qual o radical superóxido é gerado através do sistema xantina/xantina oxidase e a redução do citocromo *c* é monitorada espectrofotometricamente a 550 nm. O protocolo utilizado para esse ensaio foi modificado, uma vez que o tampão de homogeneização utilizado foi o mesmo

daquele usado para determinar a ACAP. A atividade enzimática foi expressa por unidade de SOD, sendo que esta corresponde à quantidade de enzima necessária para inibir 50 % da redução do citocromo *c* em 1 min/mg de proteína a 25°C e pH 7,8.

3.5.3. Concentração de GSH

A determinação da concentração de GSH foi realizada com base no protocolo de White *et al.* (2003). A separação dos dipeptídios e subsequente reação com o 2,3 naftalenedicarboxialdeído (NDA) gera um complexo fluorescente medido por fluorimetria (excitação: 485 nm; emissão: 535 nm) em leitora de microplacas (Victor 2, Perkin Elmer). Os dados de GSH foram expressos em μmol de GSH/mg de proteínas.

3.5.4. Peroxidação lipídica (LPO)

Para a determinação dos níveis de LPO foi utilizado o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Oakes & van der Kraak (2003). Esse ensaio quantifica os danos oxidativos lipídicos através da reação do MDA, um dos produtos da peroxidação lipídica, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), produzindo tetrametoxipropano (TMP), um cromógeno que pode ser medido por espectrofluorimetria (excitação: 520 nm; emissão: 580 nm). Os resultados da concentração da LPO foram expressos em nmol MDA/mg peso úmido.

3.5.5. Concentração de ATP

A concentração de ATP corporal foi determinada utilizando-se um kit comercial de reagentes (Fluorimetric & Colorimetric ATP Quantitation Kit, PromoKine, Alemanha). O método utiliza a fosforilação do glicerol para gerar um produto que é

quantificado por fluorimetria (excitação: 520 nm; emissão = 590 nm). Os dados foram expressos em nmol ATP/mg peso úmido.

3.6. Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Em todos os casos foram analisados 4 animais ($n = 4$), exceto para a determinação da concentração de ATP e GSH, onde foram utilizados apenas 3 indivíduos ($n = 3$). No presente estudo, o tempo zero [$t(0)$] foi considerado aquele após pré-exposição ao cobre e imediatamente antes da exposição das anêmonas-do-mar à hipóxia e reoxigenação. Por sua vez, o grupo controle foi considerado aquele em que as anêmonas-do-mar não foram pré-expostas ao cobre. Uma vez que, de forma geral, não foram observadas variações significativas ao longo do tempo experimental, também foi calculada a média (\pm erro padrão da média) dos dados agrupados por tratamento experimental, i.e., $t(0)$, hipóxia e reoxigenação, independentemente do tempo em que os animais se encontravam em hipóxia ou reoxigenação. Diferenças significativas entre os valores médios nos tempos de exposição e tratamentos experimentais foram analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida do teste *a posteriori* de Tukey. Os pressupostos da ANOVA (homogeneidade de variâncias e normalidade dos dados) foram testados e verificados previamente somente para os grupos. Em todas as análises foi adotado $\alpha = 0,05$ (Zar, 1984).

4. SÍNTESE DOS RESULTADOS

4.1. Cobre dissolvido na água

A concentração média de cobre total e dissolvido no meio experimental utilizado para pré-exposição das anêmonas-do-mar no presente estudo foi de $8,5 \pm 1,2$ e $6,1 \pm 2,7$ $\mu\text{g Cu.L}^{-1}$, respectivamente. Não houve mortalidade em nenhuma das condições experimentais.

4.2. ACAP

Os resultados de ACAP foram expressos considerando o inverso da área relativa, o que significa que quanto maior o valor de ACAP dos organismos, menor é a capacidade antioxidante. Não foi observada diferença significativa entre as anêmonas controle e aquelas pré-expostas ao cobre no $t(0)$. Também não foram observadas variações temporais significativas da ACAP tanto nas anêmonas controle quanto naquelas pré-expostas ao cobre, quando os dados foram comparados em relação ao $t(0)$. Quando os dois grupos experimentais foram comparados ao longo do tempo de exposição, foi observada uma diferença significativa entre as anêmonas controle e aquelas pré-expostas ao cobre após 90 min de hipóxia. Quando os dados foram agrupados por tratamento experimental, foi observada uma maior ACAP nas anêmonas controle do que aquelas pré-expostas ao cobre, tanto na hipóxia quanto na reoxigenação. Os resultados podem ser visualizados na Figura 1 do anexo II.

4.3. Atividade da SOD

No $t(0)$, não foi observada diferença significativa na atividade da SOD entre as anêmonas controle e aquelas pré-expostas ao cobre. Nas anêmonas controle, houve uma variação significativa transitória da atividade da SOD após 90 min de reoxigenação. Porém, esta variação não foi significativa em relação ao $t(0)$ e não houve diferença significativa entre as anêmonas controle e aquelas pré-expostas ao cobre neste tempo e

condição experimental. Nas anêmonas pré-expostas ao cobre, não houve variação temporal significativa em relação ao $t(0)$. Também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ao longo do tempo experimental. Quando os dados foram agrupados por tratamento experimental, foi observada uma maior atividade da SOD nas anêmonas controle do que naquelas pré-expostas ao cobre durante a hipóxia. Os resultados podem ser visualizados na Figura 2 do anexo II.

4.4. Concentração de GSH

No $t(0)$, não foi observada diferença significativa na concentração de GSH entre as anêmonas controle e aquelas pré-expostas ao cobre. Também não foi observada variação temporal na concentração de GSH durante a hipóxia e reoxigenação, tanto nas anêmonas controle quanto naquelas pré-expostas ao cobre. Durante o período experimental, foi observada uma maior concentração de GSH nas anêmonas pré-expostas ao cobre do que nas anêmonas controle após 270 min (4,5 h) de hipóxia. Quando os dados foram agrupados por tratamento experimental, foi observada uma maior concentração de GSH nas anêmonas pré-expostas ao cobre do que nas anêmonas controle, tanto no $t(0)$ quanto durante os períodos de hipóxia e reoxigenação. Os resultados podem ser visualizados na Figura 3 do anexo II.

4.5. Peroxidação lipídica (LPO)

A LPO não variou ao longo dos períodos de hipóxia e reoxigenação, quando comparada aos valores observados no $t(0)$, tanto para as anêmonas controle quanto para aquelas pré-expostas ao cobre. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quando os animais foram agrupados por tratamento experimental. Os resultados podem ser visualizados na Figura 4 do anexo II.

4.6. Concentração de ATP

A concentração de ATP no $t(0)$ não foi diferente entre as anêmonas-do-mar controle e aquelas pré-expostas ao cobre. Além disso, não houve variação significativa na concentração de ATP ao longo do tempo experimental, tanto para as anêmonas-do-mar controle quanto para aquelas pré-expostas ao cobre. Quando os dados foram agrupados por tratamento experimental, este parâmetro não variou entre os grupos controle e pré-exposto ao cobre. No entanto, durante a reoxigenação foi observada uma menor concentração de ATP nas anêmonas pré-expostas ao cobre em relação àquela observada nas anêmonas controle. Os resultados podem ser visualizados na Figura 5 do anexo II.

4.7. Observações comportamentais

Durante a hipóxia, as anêmonas retraíram seus tentáculos e se fecharam. Foi observado também um comportamento de agregação entre as anêmonas, uma resposta comportamental para reduzir, provavelmente, o gasto energético. Próximo às 6 h de exposição à hipóxia, as anêmonas abriram seus tentáculos, numa possível tentativa de absorver o máximo de O_2 possível disponível na água. Durante a reoxigenação, as anêmonas se expandiram abrindo seus tentáculos.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a anêmona do mar *B. cangicum* apresenta um mecanismo bioquímico adequado para lidar com os ciclos de variação na disponibilidade de oxigênio na água. Além disso, observou-se e que a pré-exposição a

uma concentração ambientalmente relevante de cobre afeta a resposta desse mecanismo, porém sem causar danos oxidativos aos lipídios.

6. LITERATURA CITADA

- ABUJA, PM & R ALBERTINI. 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* 306: 1-17.
- AMADO, LL, ML GARCIA, PB RAMOS, RF FREITAS, B ZAFALON, JLR FERREIRA, JS YUNES & JM MONSERRAT. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total Environ.* 407: 2115-2123.
- AMADO, EM, D VIDOLIN, CA FREIRE & MM SOUZA. 2011. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. *Comp. Biochem. Physiol. A* 158: 542-551.
- BAINS, JS & CA SHAW. 1997. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res. Rev.* 25: 335-358.
- BAUMGARTEM, MGZ & LF NIENCHESKI. 1998. Avaliação da qualidade hidroquímica da área portuária da cidade de Rio Grande - RS. Documentos Técnicos 09, Rio Grande, editora da FURG, pp. 5-66.
- BELL, GW, DB EGGLESTON & TG WOLCOTT. 2003. Behavioral responses of free-ranging blue crabs to episodic hypoxia. I. Movement. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 259: 215-225.

- BICKLER, PE & LT BUCK. 2007. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu. Rev. Physiol.* 69: 145-170.
- BOUTILIER, RG. 2001. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J.Exp. Biol.* 204: 3171-3181.
- CADENAS, E & H SIES. 1998. The lag phase. *Free Rad. Res.* 28: 601-609.
- CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, Brasil, 23p.
- CHANDAL, NS & PT SCHUMACKER. 2000. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *J. Appl.Physiol.* 88:1880-1889.
- CONSTANTINI, D. 2010. Redox physiology in animal function: The struggle of living in an oxidant environment. *Current Zoology* 56: 687-702.
- DAHLHOFF, EP & BA MENGE. 1996. Influence of phytoplankton concentration and wave exposure on the ecophysiology of *Mytilus californianus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 144: 97-107.
- DE CAPITANI, JD. 2007. Estrutura populacional e variabilidade genética de anêmonas-do-mar da região entremarés de costão rochoso. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- DE ZWAAN, A, P CORTESIB & O CATTANIB. 1995. Resistance of bivalves to anoxia as a response to pollution-induced environmental stress. *Sci. Total Environ.* 171: 121-125.
- DEPLEDGE, MH & PS RAINBOW. 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C* 97: 1-7.
- DIAZ, RJ & R ROSENBERG. 1995. Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanogr. Mar. Biol.* 33: 245-303.

- DIAZ, RJ. 2001. Overview of hypoxia around the world. *J. Environ. Qual.* 30: 275-281.
- EKAU, W, H AUDEL, H-O PÖRTNER, D GILBERT. 2010. Impacts of hypoxia on the structure and processes in pelagic communities (zooplankton, macro-invertebrates and fish). *Biogeosciences* 7: 1669-1699.
- FIRTH, LB & GA WILLIAMS. 2009. The influence of multiple environmental stressors on the limpet *Cellana toreuma* during the summer monsoon season in Hong Kong. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 375: 70-75.
- FORMIGARI, A, P IRATO & A SANTON. 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146: 443-459.
- FRIDOVICH, I. 2004. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging cell.* 3:13-16.
- GORR, TA, D WICHMANN, J HU, M HERMES-LIMA, AF WELKER, N TERWILLIGER, JF WREN, M VINEY, S MORRIS, GE NILSSON, A DETEN, J SOLIZ & M GASSMAN. 2010. Hypoxia Tolerance in Animals: Biology and Application. *Physiol. Biochem. Zool.* 83: 733-752.
- GRAHAM, JB. 1990. Ecological, evolutionary, and physical factors influencing aquatic animal respiration. *Am. Zool.* 30, 137-146.
- GRAY, JS, JS WU & YY OR. 2002. Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 238: 249-279.
- GUZMÁN, HM & CE JIMÉNEZ. 1992. Contamination of coral reefs by heavy metals along the Caribbean coast of Central America (Costa Rica and Panama). *Mar. Pollut. Bull.* 24: 554-561.
- HALLIWELL, B & JMC GUTTERIDGE. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3 ed. Oxford University Press.

- HARLEY, CDG. 2003. Abiotic stress and herbivory interact to set range limits across a two-dimensional stress gradient. *Ecology* 84: 1477-1488.
- HARLEY, CDG & BST HELMUTH. 2003. Local and regional scale effects of wave exposure, thermal stress, and absolute vs. effective shore level on patterns of intertidal zonation. *Limnol. Oceanogr.* 48: 1498-1508.
- HARPER, SL & C REIBER. 1999. Influence of hypoxia on cardiac functions in the grass shrimp (*Palaemonetes pugio* Holthuis). *Comp. Biochem. Physiol. A* 124: 569-573.
- HART, CE & JH CROWE. 1977. The Effect of Attached Gravel on Survival of Intertidal Anemones. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 96: 28-41.
- HELMUTH, B, BR BROITEMAN, CA BLANCHETTE, S GILMAN, P HALPIN, CDG HARLEY, MJ O'DONNELL, GE HOFMANN, B MENGE & D STICKLAND. 2006b. Mosaic patterns of thermal stress in the rocky intertidal Zone: implications for climate change. *Ecol. Monogr.* 76: 461-479.
- HELMUTH, B, N MIESZKOWSKA, P MOORE & SJ HAWKINS. 2006a. Living on the Edge of Two Changing Worlds: Forecasting the Responses of Rocky Intertidal Ecosystems to Climate Change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 373-404.
- HERMES-LIMA, M & KB STOREY. 1993. Role of antioxidants in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 265: R646-R652.
- HERMES-LIMA, M & KB STOREY. 1996. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status of the frog *Rana pipiens*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 271: R918-R925.
- HERMES-LIMA, M, JM STOREY & KB STOREY. 2001. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: STOREY,

- K.B., STOREY, J.M. (eds.) Cell and Molecular Responses to Stress, Elsevier, Amsterdam, 2: 263-287.
- HERMES-LIMA, M & T ZENTENO-SAVÍN. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133: 537-556.
- HERMES-LIMA, M. 2004. Oxidative stress and medical sciences. In: STOREY, K.B. (ed.), Functional Metabolism: Regulation, and Adaptation. New York: John Wiley and Sons, p.269-282.
- HERMES-LIMA, M, GR RAMOS-VASCONCELOS, LA CARDOSO, AL ORR, PM RIVERA & KL DREW. 2004. Animal Adaptability to Oxidative Stress: Gastropod Estivation and Mammalian Hibernation. In: Life in the Cold: Evolution, Mechanisms, Adaptation, and Application. Twelfth International Hibernation Symposium. Biological Papers of the University of Alaska, n.27. Institute of Arctic Biology, University of Alaska Fairbanks, Alaska, USA.
- HICKS, M, A HING, L GAO, J RYAN & PS MACDONALD. 2006. Organ preservation. *Methods Mol. Biol.* 333: 331-374.
- HOCHACHKA, PW & GN SOMERO. 1984. Biochemical Adaptation. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- ISSARTEL, J, F HERVANT, F DE MICHELLE, J CLOBERT & Y VOITURON. 2009. High anoxia tolerance in the subterranean salamander *Proteus anguinus* without oxidative stress nor activation of antioxidant defenses during reoxygenation. *J. Comp. Physiol. B* 179: 543-551
- JONES, RJ. 1997. Zooxanthellae loss as a bioassay for assessing stress in corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 149: 163-171.

- JØRGENSEN, BB. 1996. Material flux in the sediment. In: JØRGENSEN BB & RICHARDSON K (eds) *Eutrophication in Coastal Marine Ecosystems*, 115–135. American Geophysical Union, Washington DC.
- LAGOS, P, R DURAN, C CERVENĀNSKY, JC FREITAS, R SILVEIRA. 2001. Identification of hemolytic and neuroactive fractions in the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Biol. Res.* 34: 895-902.
- LESLIE, HM, EM BRECK, F CHAN, L LUBCHENCO & BA MENGE. 2005. Barnacle reproductive hotspots linked to nearshore ocean conditions. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 10534-10539.
- LIOCHEV, SI & I FRIDOVICH. 1994. The role of O₂ in the production of HO: *In vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* 16: 29-33.
- LIOCHEV, SI & I FRIDOVICH. 2002. The Haber–Weiss cycle—70 years later: An alternative view. *Redox Rep.* 7: 55-57.
- LIU, H, W WANG, J ZHANG & X WANG. 2006. Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotox. Environ. Safety* 65: 350-354.
- LLANSO, RJ & RJ DIAZ. 1994. Tolerance to low dissolved oxygen by the tubicolous polychaete *Loimia medusa*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 74: 143-148.
- LUSHCHAK, VI, LP LUSHCHAK, AA MOTA & M HERMES-LIMA. 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 280: 100-107.
- LUSHCHAK, VI, TV BAGNYUKOVA, OV LUSHCHAK, JM STOREY & KB STOREY. 2005. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 1319-1330.

- LUSHCHAK, VI. 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 153:175-190.
- LUTZ, PL & KB STOREY. 1997. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In: W. H. DANTZLER (ed.) *Handbook of Physiology: Comparative Physiology*. Oxford University Press, Oxford. 13(2): 1479-1522.
- MAHER, P. 2005. The effects of stress and aging glutathione metabolism. *Ageing Res. Rev.* 4: 288-314
- MAIN, WPL, C ROSS & GK BIELMYER. 2010. Copper accumulation and oxidative stress in the sea anemone, *Aiptasia pallida*, after waterborne copper exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 151: 216-221
- MARTINS, CMG, IF BARCAROLLI, EJ MENEZES, MM GIACOMIN, CM WOOD & A BIANCHINI. 2011. Acute toxicity, accumulation and tissue distribution of copper in the blue crab *Callinectes sapidus* acclimated to different salinities: In vivo and in vitro studies. *Aquat Toxicol.* 101: 88-99.
- MCCORD, JM & I FRIDOVICH. 1969. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- MCCORD, JM. 1985. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312: 159-163.
- MILLER, DM, GR BUETTNER & SD AUST. 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Rad. Biol. Med.* 8: 95-108.
- MILLER, D, S POUCHER & LL COIRO. 2002. Determination of lethal dissolved oxygen levels for selected marine and estuarine fishes, crustaceans, and a bivalve, *Mar. Biol.* 140: 287-296.

- MITCHELMORE, CL, EA VERDE, AH RINGWOOD, VM WEIS. 2003. Differential accumulation of heavy metals in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* as a function of symbiotic state. *Aquat. Toxicol.* 64: 317-329.
- NEWELL, RC.1979. Biology of Intertidal animals, 3 ed. Marine Ecological Surveys Ltd, Kent.
- NEWMAN, MC & MG HEAGLER. 1991. Allometry of metal bioaccumulation and toxicity. In: NEWMAN, MC & MCINTOSH AW (eds.), Metal Ecotoxicology. Lewis, Boca Raton, FL, USA.
- OAKES, KD & GJ VAN DER KRAAK. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63: 447-463.
- OTTAWAY, JR.1980. Population ecology of the intertidal anemone *Actinia tenebrosa* IV. Growth rates and longevities. *Aust. J. Mar. Fresh. Res.* 31: 385-395.
- PANNUNZIO, TM & KB STOREY. 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221: 277-292.
- PASTOR, N, H WEINSTEIN, E JAMISON & M BRENOWITZ. 2000. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBPDNAcomplex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequencespecific binding. *J. Mol. Biol.* 304: 55-68.
- PEDROSO, MF & IV LIMA. 2001. Ecotoxicology of copper and compounds. Environmental Reference Booklet, Environmental resource center (BA), vol.2, p.127.
- PINEDA, J & A ESCOFET. 1989. Selective effects of disturbance on populations of sea anemones from northern Baja California, Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55: 55-62.

- PORTNER, H-O, U KREUTZER, B SIEMUND, N HEISLER & MK GRIESHABER.
Metabolic adaptation of the intertidal worm *Sipunculus nudus* to functional and environmental hypoxia. *Mar. Biol.* 79:237-247.
- REGOLI, F. 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 50: 351-361.
- RHEE, SG, YS BAE, SEUNG-ROCK LEE & J KWON. 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci. STKE.* 53.
- RICE, ME & J CAMMACK. 1991. Anoxia-resistant turtle brain maintains ascorbic acid content in vitro. *Neurosci. Lett.* 132: 141-145.
- RIEDEL, B, Z MARTIN & M STACHOWITSCH. 2012. Tolerance of benthic macrofauna to hypoxia and anoxia in shallow coastal seas: a realistic scenario. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 458: 39-52
- RUTHERFORD, LD & EV THUESEN. 2005. Metabolic performance and survival of medusae in estuarine hypoxia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 294: 189-200.
- SASSAMAN, C & CP MANGUM. 1972. Adaptations to environmental oxygen levels in infaunal and epifaunal sea anemones. *Biol. Bull.*, 143:657-678.
- SERVICE, RF. 2004. Oceanography. New dead zone off Oregon coast hints at sea change in currents. *Science* 305: 1099-1099.
- SHICK, JM.1991. A functional biology of sea anemones Chapman & Hall, London.
- SIES, H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In: SIES, H. (ed.) Oxidative Stress, p. 1-8. Academic Press, London.
- SIES, H & D JONES. 2007. Oxidative stress. In: FINK, G. (ed.) Encyclopedia of Stress. 2 ed. USA: Elsevier, Academic Press, 3:45-48,

- SOMERO, GN. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integr. Comp. Biol.* 42: 780-789.
- STENSETH, NC, G OTTERSEN, JW HURRELL, A MYSTERUD, M LIMA, K-S CHAN, NG YOCCOZ & B ADLANDSVIK. 2003. Studying climate effects on ecology through the use of climate indices: the North Atlantic Oscillation, El Niño, Southern Oscillation and beyond. *P. R. Soc. London B* 270: 2087-2096.
- STOHS, SJ & D BAGCHI. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 321-336.
- STOREY, KB. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 1715-1733.
- STOTZ, WB. 1979. Functional morphology and zonation of three species of sea anemones from rocky shores in southern Chile. *Mar. Biol.* 50: 181-188.
- TAMAI, K. 1993. Tolerance of *Theora fragilis* (Bivalvia, Semelidae) to low concentrations of dissolved oxygen. *Nippon Suisan Gakk.* 59: 615-620.
- VALKO, M, D LEIBFRITZ, J MONCOL, MTD CRONIN, M MAZUR & J TELSER. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. B* 39: 44-84.
- VAQUER-SUNYER, R & CM DUARTE. 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *PNAS Direct Submission* 105: 40.
- VIA, JD, G van der THILLART, O CATTANI & P CORTESI. 1997. Environmental versus functional hypoxia/anoxia in sole *Solea solea*: the lactate paradox revisited. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 154:79-90.
- VIDOLIN, D. 2007. Tolerância à variação de parâmetros ambientais e sua influência sobre a distribuição espacial de anêmonas-do-mar na zona entremarés de um costão

rochoso no sul do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Brasil.

VIG, E & J NEMCSOK. 1989. The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp *Cyprinus carpio* L. *J. Fish. Biol.* 35: 23-25.

WANG, MY, K DHINGRA, WN HITTELMAN, JG LIEHR, M DEANDRADE & DH LI. 1996. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde–DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidem. Biomar.* 5: 705-710.

WHITE, CC, H VIERNES, CM KREJSA, D BOTTA & TJ KAVANAGH. 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.* 318: 175-180.

WIDDOWS, J, BL BAYNE, DR LIVINGSTONE, RIE NEWELL & P DONKIN. 1979. Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air. *Comp. Biochem. Physiol.* 62:301-308.

ZAR, JH. 1984. *Biostatistical Analysis* Prentice-Hall, New Jersey.

7. ANEXO I: Figuras

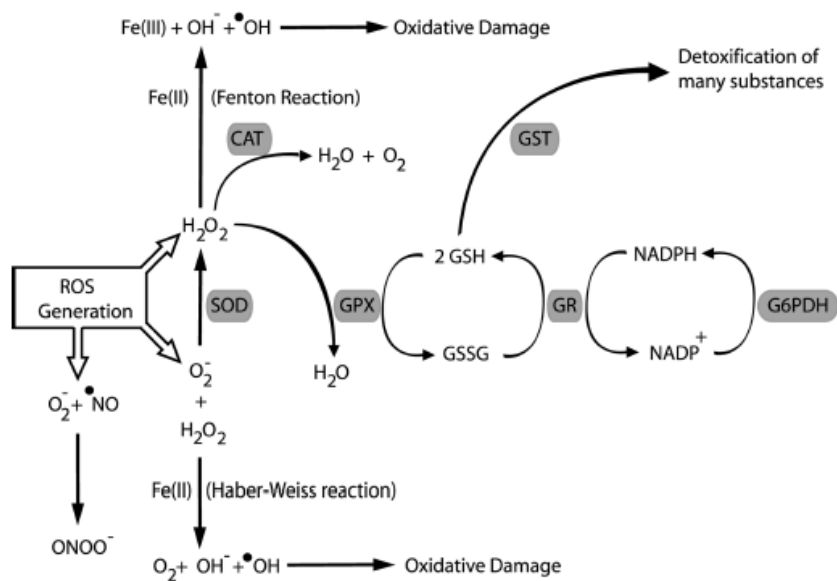


Figura 1. Vias de produção e eliminação das espécies reativas de oxigênio (ERO).



Figura 2. Indivíduo da espécie *Bunodosoma cangicum* parcialmente recoberto por areia (Extraído de De Capitani, 2007).



Figura 3. Estrutura utilizada para exposição de *Bunodosoma cangicum* ao cobre.



Figura 4. Experimento de hipóxia/reoxigenação utilizado em *Bunodosoma cangicum*.

8. ANEXO II: Manuscrito a ser submetido ao periódico *Aquatic Toxicology*

Biochemical responses of the sea anemone *Bunodosoma cangicum* to changes in oxygen availability: Influence of copper pre-exposure

Laís Donini Abujamara^a; Martina de Freitas Prazeres^b; Vinícius Dias Borges^c; Adalto Bianchini^{b*}

^a Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália, km 8, Rio Grande, RS, Brazil, 96203-900.

^b Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande. Av. Itália, km 8, Rio Grande, RS, Brazil, 96203-900.

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália, km 8, Rio Grande, RS, Brazil, 96203-900.

* Corresponding author: Adalto Bianchini
Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Instituto de Ciências Biológicas – ICB
Av. Itália km 8, Campus Carreiros
96.203-900 – Rio Grande – RS – Brazil
Phone: +55 53 32935193
FAX: +55 53 32336633
e-mail: adaltobianchini@furg.br

Abstract

Benthic species are often subjected to hypoxia, mainly the intertidal ones since they need to cope with the oxygen deprivation associated with the tidal cycle. Moreover, the hypoxia-tolerant organisms must also be able to prevent the negative effects of the reoxygenation process associated with an increased reactive oxygen species (ROS) generation. Therefore, anticipatory mechanisms may be present to avoid oxidative damage resulting from this transient process. In turn, these mechanisms may be sensitive to aquatic contaminants such as copper. In the present study, biomarkers associated with oxidative stress and metabolism [total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP), superoxide dismutase (SOD) activity, lipid peroxidation (LPO), and reduced glutathione (GSH) and ATP concentration] were evaluated in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* kept under control condition (non pre-exposed to copper) or pre-exposed (96 h) to copper ($6.1 \mu\text{g} \pm 2.7 \mu\text{g.L}^{-1}$) and subjected (6 h) to hypoxia ($0.5 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$) followed (6 h) by reoxygenation ($7.5 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$). ACAP did not change in control sea anemones, but reduced in copper pre-exposed ones under hypoxia and reoxygenation. SOD activity was higher in control anemones than in copper pre-exposed ones under hypoxia. GSH concentration was affected by copper pre-exposure, but not altered by changes in oxygen availability. No LPO was found in control and copper pre-exposed sea anemones. ATP concentration did not change in control sea anemones, but reduced in copper pre-exposed sea anemones under hypoxia. Taken altogether, these findings indicate that *B. cangicum* shows a mechanism to anticipate and prevent against the possible oxidative stress generated by changes in

oxygen availability associated with the tidal cycle. They also show that pre-exposure to an environmentally relevant concentration of copper can disturb this mechanism.

Keywords: copper exposure, hypoxia, oxidative stress, sea anemone, tidal cycle

Introduction

Environmental hypoxia is a naturally occurring phenomenon in many aquatic ecosystems (Diaz & Breitburg, 2009). However, marine hypoxia mainly due to the increasing anthropogenic input of nutrients and organic matter in coastal areas has been considered as one of the major ecological concerns in the world (Diaz & Rosenberg, 1995). Aquatic systems most susceptible to oxygen depletion are typically coastal areas and semi-enclosed seas (Diaz & Rosenberg, 2008). In these environments, physical structure and both spatial and temporal heterogeneity of the water column may lead to an eutrophication process, thus decreasing the environmental oxygen concentrations (Breitburg, 2002; Gray *et al.*, 2002).

Benthic communities are particularly sensitive to hypoxia, considering that most of benthic organisms have limited mobility (Wu, 2002). Consequences for benthic species vary according to the intensity, duration and frequency of hypoxic events, as well as the relative ability of the organism to withstand exposure to physiologically sub-optimal oxygen levels (Diaz & Rosenberg, 1995). The rocky intertidal habitat represents the ocean margin marks where organisms are subjected to environmental challenges posed by both aquatic and aerial climatic regimes (Holt & Keitt, 2005; Helmuth *et al.*, 2006). Ecosystems suffering from intermittent or recurring hypoxia, such as the intertidal zones, are among the most extreme marine environments based on both the severity of conditions and instability of the disturbance (Riedel *et al.*, 2012).

Benthic species living in the intertidal zones must to cope with oxygen deprivation on a twice-daily due to the aerial exposure associated with the tide cycle (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002). During emersion, the inefficiency of gas

exchange and the isolation of body tissues for water conservation induce a hypoxic stress and physiological responses in intertidal organisms (Shicket *et al.*, 1978). However, these organisms have developed a combination of morphological, physiological and behavioral adaptations to successfully survive fluctuating and short-term hypoxia (Gomes *et al.*, 1998; Pannuzio & Storey, 1998; Larade & Storey, 2002). In addition to the effects of low oxygen, hypoxia-tolerant animals must also cope with the oxidative damage occurring during re-oxygenation (Storey, 1996). The abrupt reintroduction of oxygen leads to a rapid generation of reactive oxygen species (ROS), which are not expected to occur under hypoxia (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002). An example of this situation is the well-studied oxidative stress occurring in mammalian organs subjected to ischemia and reperfusion (Ambrosio & Tritto, 1999). However, it is important to note that many animals experience this situation naturally in the wild (Hermes-Lima *et al.*, 2001; Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002).

To successfully survive hypoxia exposures, an organism must not only maintain its viability under low oxygen conditions, but also have effective mechanisms to minimize or prevent oxidative stress during the transition back from hypoxic to aerobic conditions (Lushchak *et al.*, 2005). Some strategies seen in hypoxia-tolerant animals are: (a) continuous maintenance of constitutively high levels of antioxidant defenses; (b) great tolerance to damaging products or improved mechanisms for their clearance; (c) enhancement of antioxidant defenses during the period of hypoxia exposure, characterizing an anticipatory process known as “preparation for oxidative stress” (Hermes-Lima *et al.*, 1998; Pannuzio & Storey, 1998; Lushchak *et al.*, 2001). The last mechanism has been reported in species that regularly experience wide variations in

oxygen availability, such as transitions between hypoxia/normoxia, freezing-thawing, or estivation-arousal (for review: Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002).

Discharge of wastes from industrial and agricultural activities can contaminate aquatic systems with both organic matter and heavy metals, making the combination of low oxygen content and increased heavy metal levels a likely phenomenon (Pilgaard *et al.*, 1994). Among heavy metals, copper is one of the most relevant inorganic contaminants reaching coastal waters of sandy beaches in Southern Brazil (Baumgarten & Niencheski, 1998). In general stress caused by chemical pollutants will increase the energy expenditure associated with their active elimination or detoxification, counteracting the reduced energy expenditure that would occur during anoxia or hypoxia, a key adaptation mechanism showed by animals to survive under low oxygen conditions (De Zwaan *et al.*, 1995). Although copper is an essential trace element required for cellular function maintenance and integral part of a number of copper-containing enzymes (Liu *et al.*, 2006), it can induce ROS formation due its participation in Fenton and Harber-Weiss reactions (Bopp *et al.*, 2008). Previous studies have been suggested that exposure to chemical contaminants may exacerbate the oxidative stress observed in hypoxia-challenged organisms (De Zwaan *et al.*, 1995; Gorokhova *et al.*, 2010).

In the present study, we simulated changes in oxygen availability observed over a tidal cycle (6-h period of hypoxia followed by a 6-h period of reoxygenation) to evaluate some biochemical responses of the sea anemone *Bunodosoma cangicum* associated with oxidative stress and energy metabolism. Endpoints associated with energy metabolism (ATP concentration), antioxidant system [total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP), superoxide dismutase (SOD) activity, reduced

glutathione (GSH) concentration] and oxidative damage [lipid peroxidation (LPO)]. The possible influence of pre-exposure to an environmentally relevant concentration of copper on these parameters was also considered.

2. Material and methods

2.1. Animal collection and acclimation

Individuals of the sea anemone *B. cangicum* were manually collected from their rocky substrate during low tide at Cassino Beach [Rio Grande, RS, southern Brazil (32°09'39.56"/52°05'53.78")] in March 2011. They were brought to the laboratory in recipients containing local sea water. They were acclimated for 15 days in an aquarium containing continuously filtered and aerated sea water (salinity 33 ppt). Room temperature ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) and photoperiod 12 h L:12 h D were fixed. Sea anemones were fed daily with small pieces of guppies *Poecilia vivipara*.

2.2. First experiment: Copper exposure

Sea anemones were individually exposed (96 h) to an environmentally relevant concentration of dissolved copper ($6.1 \pm 2.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in natural sea water (salinity 33 ppt). Room temperature was fixed at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. The experimental medium was prepared from a stock solution of copper (CuCl_2 , Vetec) at least 3 h prior animal's introduction into the test chamber to allow copper to equilibrate with the sea water. The experimental medium was completely renewed every 24 h. All glassware was previously cleaned with dilute nitric acid (1%) and thoroughly rinsed several times with Milli-Q water before use. Sea anemones were not fed during the experiment.

Water samples were collected before (0 h) and after (24 h) introduction of sea anemones into the new experimental medium. They were placed in clean plastic Falcon-type tubes and acidified (0.5% HNO₃) for determination of total (non-filtered samples) and dissolved (filtered samples, 0.45- μ m mesh filter) copper concentration by atomic absorption spectrophotometry (AAS 932 Plus, GBC, Australia).

2.3. Second experiment: Hypoxia/Re-oxygenation

Anemones previously exposed to copper were carefully transferred to a 15-L tank containing sea water (salinity 33 ppt). Room temperature was fixed at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Control (non-exposed to copper) anemones were transferred to another tank and kept under the same experimental conditions described above. The experiment started around 8 a.m. and sea water of both tanks was deoxygenated for ~20 min by bubbling pure nitrogen gas until water oxygen content reached $0.5 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$. This hypoxic condition was continuously monitored with an oxygen meter (LT Lutron DO-5519) and kept for 6 h. The experimental medium was then completely replaced with natural sea water (salinity 33 ppt) saturated with O₂ ($7.5 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$). This re-oxygenation condition was also kept for 6 h. Every 90 min, four anemones were collected from each tank, placed into a plastic Falcon-type tube and immediately frozen (-80°C) for further analyses.

2.4. Biochemical analyses

Samples were separated into aliquots, weighed, homogenized and used in the analyses described below. For analyses described from subsection 2.5.1 to 2.5.3, the total protein content in homogenates was determined using a commercial reagent kit

(Dole's Reagents, Goiania, GO, Brazil) based on the Biuret reagent. Determinations were done in triplicate by spectrophotometry (550 nm).

2.4.1. ACAP

ACAP assay was performed to measure the biological resistance to various kinds of oxyradicals, thus providing useful indications to predict oxyradical-mediated adverse effects on the physiological condition of the organisms (Regoli, 2000). The antioxidant capacity was measured using a fluorescent technique and following the protocol described by Amado *et al.* (2009) with a modification of the homogenization buffer. In this case, the buffer solution contained tris(hydroxymethyl)aminometano (Trizma-Base; 20 mM), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; 1 mM), dithiothreitol (DTT; 1 mM), saccharose (500 mM), KCl (150 mM) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; 0.1 mM). ACAP results were expressed as 1/relative area.

2.4.2. SOD activity

SOD activity was determined according to McCord & Fridovich (1969). This assay is based on the generation of superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) which reduces cytochrome *c* (10 AM; Sigma, USA). Enzyme activity values were expressed in SOD units, where one unit is the amount of enzyme inhibiting 50% of cytochrome *c* reduction per minute and per milligram of protein at 25°C and pH 7.8.

2.4.3. GSH concentration

Glutathione is a tripeptide composed of glutamic acid, cysteine, and glycine. GSH determination was performed after separation of dipeptides by centrifugation and

subsequent reaction with the fluorescent NDA (White *et al.*, 2003). Fluorescence was measured at a microplate reader (Victor 2, Perkin Elmer) at excitation/emission wavelengths of 485/535 nm.

2.4.4. LPO

The 2-thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay quantifies oxidative stress by measuring the peroxidative damage to lipids. In the present study, LPO was measured following the fluorescence method described by Oakes & van der Kraak (2003). Fluorescence was measured at a microplate reader (Victor 2, Perkin Elmer) at excitation/emission wavelengths of 520/580 nm.

2.4.5. ATP concentration

ATP concentration was determined using a commercial reagent kit (PromoKineATP Colorimetric and Fluorometric Quantitation Kit, Germany). The method employed utilizes the phosphorylation of glycerol to generate a product that is easily quantified by fluorometry (excitation: 520 nm; emission: 590 nm).

2.5. Data analyses

Data were expressed as mean \pm 1 standard error ($n = 4$, except for GSH and ATP where $n = 3$). Time zero [$t(0)$] was considered when sea anemones pre-exposed to copper started to be exposed to hypoxia followed by re-oxygenation. Significant differences among the exposure times and treatments were assessed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. ANOVA assumptions (data

normality and homogeneity of variances) were previously verified (Zar, 1984). The significance level adopted was 5% ($\alpha = 0.05$).

In a broad view, no significant changes were observed over the experimental time for each parameter analyzed in both groups of sea anemones (see Results section). Therefore, a general mean (± 1 standard error) was also calculated considering all data for each experimental condition, *i.e.*, $t(0)$, hypoxia and re-oxygenation, irrespective the time that sea anemone was exposed to that specific experimental condition. Significant differences among experimental conditions and treatments were statistically analyzed as described above.

3. Results

3.1. Copper concentration in the water and sea anemone survival

Concentration of total and dissolved copper measured in the water corresponded to 8.5 ± 1.2 and $6.1 \pm 2.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. No mortality of sea anemones was observed over the whole experimental time.

3.2. Biochemical parameters

3.2.1. ACAP

ACAP value was similar in sea anemones kept under control conditions and in those pre-exposed to copper at $t(0)$. Over the whole experimental time, ACAP was only significantly different ($p < 0.05$) between groups of sea anemones after 90 min of hypoxia (09:30 h). In this case, it was higher in sea anemones kept under control

conditions than in those pre-exposed to copper (Fig. 1A). When data were group by experimental condition, ACAP was significantly higher ($p < 0.05$) in sea anemones kept under control conditions than in those pre-exposed to copper during both hypoxia and reoxygenation periods (Fig. 1B).

3.2.2. SOD activity

No significant differences were observed ($p > 0.05$) between sea anemones kept under control conditions or pre-exposed to copper at $t(0)$. In control anemones, SOD activity significantly changed over the experimental time. It was significantly lower ($p < 0.05$) at 15:30 h, which was the first time of collection during the 6-h re-oxygenation period, that SOD activity measured at other experimental times (09:30, 12:30, 14:00 and 17:00 h). In sea anemones pre-exposed to copper, SOD activity did not change over the experimental time (Fig. 2A). When data were grouped by experimental condition, SOD activity was significantly lower ($p < 0.05$) in sea anemones pre-exposed to copper than in those kept under control conditions during hypoxia. During the re-oxygenation period, no significant differences ($p > 0.05$) were observed between groups of sea anemones (Fig. 2B).

3.3.3. GSH concentration

No significant differences ($p > 0.05$) were observed between groups of sea anemones at $t(0)$. Also, no significant changes ($p > 0.05$) in GSH concentration were observed over the experimental time in sea anemones kept under control conditions or in those pre-exposed to copper. During the hypoxic period, GSH concentration was significantly higher ($p < 0.05$) in sea anemones pre-exposed to copper than in control

ones at 12:30 and 17:00 h (Fig. 3A). When data were grouped by experimental condition, GSH concentration was significantly higher ($p < 0.05$) in sea anemones pre-exposed to copper than in control ones in all experimental conditions [$t(0)$, hypoxia, and reoxygenation] (Fig. 3B).

3.3.4. LPO

Lipid peroxide level was similar ($p > 0.05$) in sea anemones kept under control conditions and in those pre-exposed to copper. No significant changes ($p > 0.05$) were observed over the experimental time in both control and copper pre-exposed sea anemones (Fig. 4A). When data were grouped by experimental condition, no significant differences ($p > 0.05$) were also observed among groups of anemones in all experimental conditions tested (Fig. 4B).

3.4. ATP concentration

ATP concentration was similar ($p > 0.05$) in control and copper pre-exposed sea anemones at the beginning of the experimental period [$t(0)$]. Also, ATP concentration did not significantly change ($p > 0.05$) over the experimental time in control and copper pre-exposed sea anemones (Fig. 5A). When data were grouped by experimental condition, no significant differences ($p > 0.05$) between groups of sea anemones were observed at $t(0)$ and under hypoxia. However, ATP concentration was significantly higher in control anemones ($p < 0.05$) than in those pre-exposed to copper during the reoxygenation period (Fig. 5B).

4. Discussion

In the coastal area where sea anemones tested in the present study were collected, the tidal regime is mixed semidiurnal with daily amplitude of 0.47 m (Silva *et al.*, 2003). However, the wind action and barometric pressure shifts play an important role in sea-level changes along the coast (Silva *et al.*, 2003). Therefore, it is expected that the sea anemone *B. cangicum* has an inherent mechanism to deal with changes in the oxygen availability associated with the tidal cycle. In the present study, it was simulated a laboratory-controlled hypoxic condition followed by a re-oxygenation period similar to that sea anemones may be subjected in nature. However, it is important to stress that some physical factors such as solar irradiation, temperature and wave action may exert influence on desiccation and physiological mechanisms involved in the organism tolerance to environmental oxygen depletion under natural conditions (Nybakken, 1997; Levinton, 2001). The rates of oxygen consumption (V_{O_2}) of the intertidal sea anemones are lower in air than in water by an average of 35%, which may be related to the retraction of the tentacles and cessation of direct irrigation of the coelenteron during emersion limiting the oxygen delivery to internal tissues of these animals (Shick *et al.*, 1978).

Biochemical responses evaluated in the present study were chosen to link the antioxidant responses (ACAP, SOD activity and GSH concentration) to oxidative damage (LPO) and energetic status (ATP concentration). In a broad view, hypoxia followed by re-oxygenation did not induce marked changes in parameters associated with the antioxidant system (SOD activity and GSH concentration) in sea anemones kept under control conditions. Constant levels of GSH were also found in the frog *Rana pipiens* subjected to anoxia (Hermes-Lima & Storey, 1996), as well as in liver and brain

of the goldfish *Carassius auratus* during transition between anoxia and re-oxygenation (Lushchaket *et al.*, 2001). A common response of increasing or maintaining the antioxidant defenses during hypoxia have been reported in several species from different groups of aquatic animals, such as the bivalve *Astarte borealis* (Abele-Oeschger & Oeschger, 1995), the amphipod *Monoporeia affinis* (Gorokhova *et al.*, 2012), the carp *Cyprinus carpio* (Vig & Nemcsok, 1989), the estuarine fish *Leiostomus xanthurus* (Cooper *et al.*, 2002), and the garter snake *Thamnophis sirtalis parietalis* (Hermes-Lima & Storey, 1993).

The maintenance of more or less constant levels of SOD activity (enzymatic antioxidant defense) and GSH concentration (non-enzymatic antioxidant defense) over the experimental period could explain the observed lack of significant change in ACAP of control sea anemones. As a consequence, it would be expected that no significant oxidative damage would occur in control sea anemones subjected to hypoxia followed by re-oxygenation. The observed lack of significant change in LPO over the experimental period in *B. cangicum* kept under control conditions supports this prediction.

Regarding the possible presence of anticipatory mechanisms in the sea anemone *B. cangicum* to prevent oxidative damage arising from ROS production during the re-oxygenation process, it is important to note that a non-significant but marked (70%) increase in SOD activity was observed during the hypoxic period when compared to the beginning of the experiment [$t(0)$]. Considering that there is no ROS generation during anoxia, the observed mean increase in SOD activity in the sea anemone *B. cangicum* during hypoxia could characterize a possible anticipatory response to the oncoming stress of re-oxygenation (Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002).

On the energetic point of view, ATP concentration was maintained over the whole experimental period (hypoxia followed by re-oxygenation) in control sea anemones. In mammals, as the O₂ flow to tissues decreases, the cellular ATP demands of most cells tend to remain constant, leading to an energetic deficit that can be made up for only by activation of anaerobic ATP supply pathways, known as ‘Pasteur Effect’ (Boutilier, 2001). It has been shown that despite the reduced O₂ supply to cells induced by hypoxia, ATP production could be maintained by increasing carbohydrate catabolism and therefore the anaerobic metabolism in oysters. This increase is often replaced by a suppression of the rates of ATP production and of ATP utilization, in order to reduce metabolic rate and ATP turnover rate, thus saving energy by maintaining the ATP supply demand balance (Larade & Storey, 2002). Furthermore, hypoxia exposure modifies the hierarchy of energy-consuming processes in cells in order to maintain the ATP supply demand balance. In turn, transcription rates and protein synthesis drop dramatically to sustain the ATP supply (Hochachka *et al.*, 1996; Larade & Storey, 2002; David *et al.*, 2005). Therefore, future studies focused on these issues would be very important for a better understanding of the mechanism employed by the sea anemone *B. cangicum* to keep constant the ATP level during hypoxia and re-oxygenation.

Let us now to consider the possible effect of the copper pre-exposure on the ability of *B. cangicum* to respond to hypoxia followed by re-oxygenation. Copper pre-exposure by itself did not affect ACAP. However, the ability of sea anemones to keep the control levels of ACAP during hypoxia followed by re-oxygenation was markedly affected by pre-exposure to copper. This statement is based on the fact that a lower ACAP level was observed in sea anemones pre-exposed to copper respect to that

showed by control sea anemones during hypoxia and re-oxygenation periods. Since the GSH concentration was higher in *B. cangicum* pre-exposed to copper than in those kept under control conditions in all experimental conditions [$t(0)$, hypoxia and reoxygenation], the lower ACAP level observed in sea anemones pre-exposed to copper could be explained considering the lack of an increased SOD activity in these animals during hypoxia. This idea is in agreement with the fact that we have observed a reduced ACAP in the sea anemone *Actinia bermudensis* exposed to copper ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) associated with a decreased activity of the glutathione peroxidase (GPx), an enzyme that detoxify organic peroxides (unpublished data).

A lack of response of antioxidant enzymes following copper exposure could be due to either a delay in protein synthesis or to a direct inhibitory effect of the metal on the activity of antioxidant enzymes (Geracitano *et al.*, 2002). The fact that SOD activity did not increase in *B. cangicum* pre-exposed to copper and subjected to hypoxia indicate that although copper serves as an essential cofactor in Cu-Zn SODs, elevated concentrations of this metal may inhibit the pathway(s) required for the transcriptional up-regulation of SOD. Alternatively, increased levels of copper may induce sea anemone to divert energy into other pathways rather than SOD production (Main *et al.*, 2010). In the amphipod *Monoporeia affinis* exposed to contaminated sediment, the anticipatory response is altered as indicated by the higher baseline of SOD during hypoxia and suppressed response under re-oxygenation (Gorokhova *et al.*, in press). As opposed to SOD, pre-exposure to copper significantly increased the GSH concentration in all experimental conditions [$t(0)$, hypoxia and recovery]. This finding suggests that the non-enzymatic antioxidant system is being activated to protect against the ROS generated by copper exposure. This statement is based on the fact that GSH is

a nucleophilic molecule, which plays a predominant role in contaminant detoxification, such as quenching radicals directly and supplying reducing equivalents for the reduction of peroxides by GPx (Randal, 1995). Considering that SOD did not increase as an anticipatory mechanism and no lipid damage was detected in the anemones previously exposed to copper, we suggest that an increase in the non-enzymatic defense (GSH) would be an efficient protection against ROS in the sea anemone *B. cangicum* exposed to copper. In fact, Freedman *et al.* (1989) showed that the resistance to copper toxicity in cell lines is due to increases in GSH levels.

There are other protective mechanisms against copper toxicity, such as the induction of metallothioneins synthesis, copper-binding thionein-like proteins (Viarengo *et al.*, 1980). Metallothioneins can protect cells from oxidative stress by acting as an oxyradical scavenger and binding the transition metals in Fenton reactions (Fe,Cu) (Viarengo *et al.*, 2000). Metallothioneins induction has been observed in response to anoxia stress in the marine gastropod *Littorina littorea* (Murphy *et al.*, 1999) and the oyster *Crassostrea gigas* (David *et al.*, 2005).

On the energetic point of view, it is important to note that ATP concentration was higher in control sea anemones than in those pre-exposed to copper during the re-oxygenation period. This is likely due to an elevated metabolic activity induced by copper, which would lead to a faster depletion of energy reserves during hypoxic events followed by re-oxygenation. The glutamate-cysteine ligase (GCL) catalyses the first step of GSH synthesis ($L\text{-glutamate} + L\text{-cysteine} + \text{ATP} \rightarrow L\text{-}\delta\text{-glutamyl-L-cysteine} + \text{ADP} + \text{Pi}$), and the dipeptide product is converted to GSH by glutathione synthetase ($L\text{-}\delta\text{-glutamyl-L-cysteine} + \text{glycine} + \text{ATP} \rightarrow \text{GSH} + \text{ADP} + \text{Pi}$). Therefore, two molecules of ATP are required in the synthesis of GSH (Halliwell & Gutteridge, 2007). This may

be the explanation for the observed decrease in ATP concentration in the copper pre-exposed sea anemones, which showed an increased GSH concentration. In general, pollutants will cause elevated energy expenditure associated with the increased activity of the detoxification systems (De Zwaan *et al.*, 1995). In the bivalve *Mytilus edulis*, a significant decrease was observed in ATP concentration during the anoxic survival time after cadmium and PCBs exposure (Veldhuizen-Tsoerkan *et al.*, 1991; De Zwaan *et al.*, 1995).

Finally, it is important to stress that some behaviors of *B. cangicum* were observed while experiments were being conducted. The first behavior observed during hypoxia was that anemones closed their tentacles and grouped themselves. Approaching the end of the 6-h period of hypoxia, anemones opened their tentacles, probably trying to maximize the O₂ absorption without the risk of drying. Increases in body volume that maximize diffusion surface and reduces the diffusion distance through tissues have been also reported in the sea anemones *Metridium senile* and *Haloclava producta* (Sassaman & Mangum, 1972) and *Cerianthus americanus* (Sassaman & Mangum, 1974) during exposure to low dissolved O₂ content in the water. In the re-oxygenation period, *B. cangicum* showed a maximum extension of their tentacles and distension of the body wall. These behavioral changes were also observed in the sea anemones *Antopleura elegantissima* and *M. senile* (Shick *et al.*, 1978).

In conclusion, data reported in the present study indicate that the sea anemone *B. cangicum* shows a well-developed mechanism to cope with cyclic changes in the water oxygen content. They also clearly show that sea anemone pre-exposure to an environmentally relevant concentration of copper induces a significant disturbance in this mechanism.

Acknowledgements

We thank the International Development Research Centre (IDRC; Ottawa, Canada), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Programa Ciências do Mar – CAPES; Brasília, DF, Brazil), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Brasília, DF, Brazil) for financial support. LDA and MFP were MSc fellows from the Brazilian CNPq. AB is a research fellow from the Brazilian CNPq (Proc. # 304430/2009-9) and is supported by the International Canada Research Chair Program from IDRC.

References

- Abele-Oeschger, D., Oeschger, R., 1995. Hypoxia-induced autoxidation of haemoglobin in the benthic invertebrates *Arenicola marina* (Polychaeta) and *Astarte borealis* (Bivalvia) and the possible effects of sulphide. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 187, 63-80.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Total. Environ.* 407, 2115-2123.
- Ambrosio, G., Tritto, I., 1999. Reperfusion injury: Experimental evidence and clinical implications. *Am. Heart J.* 138, 2.
- Bopp, S.K., Abicht, H.K., Knauer, K., 2008. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquat. Toxicol.* 86, 197-204.

- Breitburg, D., 2002. Effects of hypoxia, and the balance between hypoxia and enrichment on coastal fishes and fisheries. *Estuaries* 25, 767-781.
- Boutilier, R.G., 2001. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J. Exp. Biol.* 204: 3171-3181.
- Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., West, T.L., 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 279, 1-20.
- David, E., Tanguy, A, Pichavant, K., Moraga, D., 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS Journal* 272, 5635-5652.
- De Zwaan, A., Cortesib, P., Cattanib, O. 1995. Resistance of bivalves to anoxia as a response to pollution-induced environmental stress. *Sci. Total Environ.* 171, 121-125.
- Diaz, R.J., Breitburg, D.L., 2009. The hypoxic environment, in: Richards, J.G., Farrel, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Hypoxia*, Elsevier, San Diego, pp. 1-23.
- Diaz, R.J., Rosenberg, R., 1995. Marine benthic hypoxia: review of ecological effects and behavioural responses on benthic macrofauna. *Oceanogr. Mar. Biol.* 33, 245–303.
- Diaz, R. J., Rosenberg, R., 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321, 926-929.
- Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J., 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598-5605.

- Geracitano, L., Monserrat, J.M., Bianchini, A., 2002. Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 277, 145-156.
- Gorokhova, E., Löf, M., Halldórsson, H.P., Tjärnlund, U., Lindström, M., Elfving, T., Sundelin, B., 2010. Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 99, 263-274.
- Gorokhova, E., Löf, M., Reutgard, M., Lindström, M., Sundelin, B., 2012. Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia. *Aquat. Toxicol.* In press.
- Gomes, P. B., Belém, M. J., Schlenz, E., 1998. Distribution, abundance and adaptations of three species of Actiniidae (Cnidaria, Actiniaria) on an intertidal beach rock in Carneiros beach, Pernambuco, Brazil. *Misc. Zool.* 21, 65-72.
- Gray, J.S., Wu, J.S., Or, Y.Y., 2002. Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 238, 249-279.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. Free radicals in biology and medicine. 4rd. ed. Biogeosc. Oxford.
- Helmuth, B., Mieszkowska, N., Moore, P., Hawkins, S.J., 2006. Living on the edge of two changing worlds: Forecasting the responses of rocky intertidal ecosystems to climate change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37, 373-404.
- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1993. Role of antioxidants in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 265, 646-652.

- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1996. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status of the frog *Rana pipiens*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 271, 918-925.
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133, 537-556.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol. B* 120, 437-448.
- Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B., 2001. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: Storey, K.B., Storey, J.M. (Eds.), *Cell and Molecular Responses to Stress*, vol. 2. Elsevier, Amsterdam, pp. 263-287.
- Hochachka, P.W., Buck, L.T., Doll, C.J., Land, S.C., 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular and metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9493-9498.
- Holt, R. D., Keitt, T. H., 2005. Species' borders: a unifying theme in ecology. *Oikos* 108, 3-6.
- Larade, K., Storey, K.B. 2002. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. In: Storey, K.B., Storey, J.M. (Eds.), *Cell and Molecular Responses to Stress*, Vol. 3, Elsevier Press, Amsterdam, pp. 27-46.
- Levinton, J.S., 2001. *Marine Biology: Function, Biodiversity, Ecology*, second ed. Oxford University Press, Oxford.

- Liu, H., Wang, W., Zhang, J., Wang, X., 2006. Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 65, 350-354.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M., 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280,100-107.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Husak, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., Storey, K.B., 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1670-1680.
- Main, W.P.L., Ross, C., Bielmyer, G.K., 2010. Copper accumulation and oxidative stress in the sea anemone, *Aiptasia pallida*, after waterborne copper exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 151, 216-221.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Murphy, B.J., Andrews, G.K., Bittel, D., Discher, D.J., McCue, J., Green, C.J., Yanovsky, M., Giaccia, A., Sutherland, R.M., Laderoute, K.R., Webster, K.A., 1999. Activation of metallothionein gene expression by hypoxia involves metal response elements and metal transcription factor-1. *Cancer Res.* 59, 1315-1322.
- Nybakken, J.W., 1997. *Marine Biology: an Ecological Approach*. Addison Wesley Educational Publishers, Menlo Park.
- Oakes, K.D., Kraak, G.J.V.D., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63, 447-463.

- Pannunzio, T.M., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 221, 277-292.
- Pilgaard, L, Malte, H., Jensen, F.B., 1994. Physiological effects and tissue accumulation of copper in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under normoxic and hypoxic conditions. Aquat. Toxicol. 29, 197-212.
- Randal, G.M., 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Taylor & Francis. Washington, DC.
- Regoli, F., 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. Aquat. Toxicol. 50, 351-361.
- Riedel, B., Zuschin, M., Stachowitsch, M., 2012. Tolerance of benthic macrofauna to hypoxia and anoxia in shallow coastal seas: a realistic scenario. Mar. Ecol. Prog. Ser. 458, 39-52.
- Sassaman, C., Mangum, C.P., 1972. Adaptations to environmental oxygen levels in infaunal and epifaunal sea anemones. Biol. Bull. 143, 657-678.
- Sassaman, C., Mangum, C.P., 1974. Gas exchange in a cerianthid. J. Exp. Zool. 188, 297-306.
- Shick, J.M., Brown, W.I., Dolliver, E.G., Kayar, S.R., 1978. Oxygen uptake in sea anemones: effects of expansion, contraction and exposure to air and the limitations of diffusion. Physiol. Zool. 52, 50-62.
- Silva, R.P., Calliari, L.J., Tozzi, H.A.M., 2003. The influence of washouts on the erosive susceptibility of the Rio Grande do Sul Coast between Cassino and Chuí Beaches, Southern Brazil. J. Coastal Res. 35, 332-338.

- Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., Holwerda, D.A., Zandee, D.I. 1991. Anoxic survival time and metabolic parameters as stress indices in sea mussels exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 259-265.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Zanicchi, G., Orunesu. 1980. Rapid induction of copper-binding proteins in the gills of metal exposed mussels. *Comp. Biochem. Physiol.* 67:215-218.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative review. 46(2):407-417.
- Vig, E., Nemcsok, J., 1989. The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp *Cyprinus carpio L.* *J. Fish. Biol.* 35, 23-25.
- White, C.C., Viernes, H., Krejsa, C.M., Botta, D., Kavanagh, T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal. Biochem.* 318, 175-180.
- Wu, R.S.S., 2002. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 35-45.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, New Jersey.

Legend to Figures

Figure 1. Total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* over the experimental time (A) or grouped by experimental condition (B). Data are expressed as mean \pm standard error. Different lowercase (control) and uppercase (Cu pre-exposed) letters indicate significantly different ($p < 0.05$) mean values over the experimental time (panel A) or among experimental conditions (panel B) for each treatment. * denotes significant different ($p < 0.05$) mean values between treatments for the same experimental time (panel A) or the same experimental condition (panel B).

Figure 2. Superoxide dismutase (SOD) activity in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* over the experimental time (A) or grouped by experimental condition (B). Data are expressed as mean \pm standard error. Different lowercase (control) and uppercase (Cu pre-exposed) letters indicate significantly different ($p < 0.05$) mean values over the experimental time (panel A) or among experimental conditions (panel B) for each treatment. * denotes significant different ($p < 0.05$) mean values between treatments for the same experimental time (panel A) or the same experimental condition (panel B).

Figure 3. Reduced glutathione (GSH) concentration in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* over the experimental time (A) or grouped by experimental condition (B). Data are expressed as mean \pm standard error. Different lowercase (control) and uppercase (Cu pre-exposed) letters indicate significantly different ($p < 0.05$) mean values over the experimental time (panel A) or among experimental conditions (panel B) for

each treatment. * denotes significant different ($p < 0.05$) mean values between treatments for the same experimental time (panel A) or the same experimental condition (panel B).

Figure 4. Lipid peroxidation (LPO) levels in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* over the experimental time (A) or grouped by experimental condition (B). Data are expressed as mean \pm standard error. Different lowercase (control) and uppercase (Cu pre-exposed) letters indicate significantly different ($p < 0.05$) mean values over the experimental time (panel A) or among experimental conditions (panel B) for each treatment. * denotes significant different ($p < 0.05$) mean values between treatments for the same experimental time (panel A) or the same experimental condition (panel B).

Figure 5. ATP concentration in the sea anemone *Bunodosoma cangicum* over the experimental time (A) or grouped by experimental condition (B). Data are expressed as mean \pm standard error. Different lowercase (control) and uppercase (Cu pre-exposed) letters indicate significantly different ($p < 0.05$) mean values over the experimental time (panel A) or among experimental conditions (panel B) for each treatment. * denotes significant different ($p < 0.05$) mean values between treatments for the same experimental time (panel A) or the same experimental condition (panel B).

Figure 1

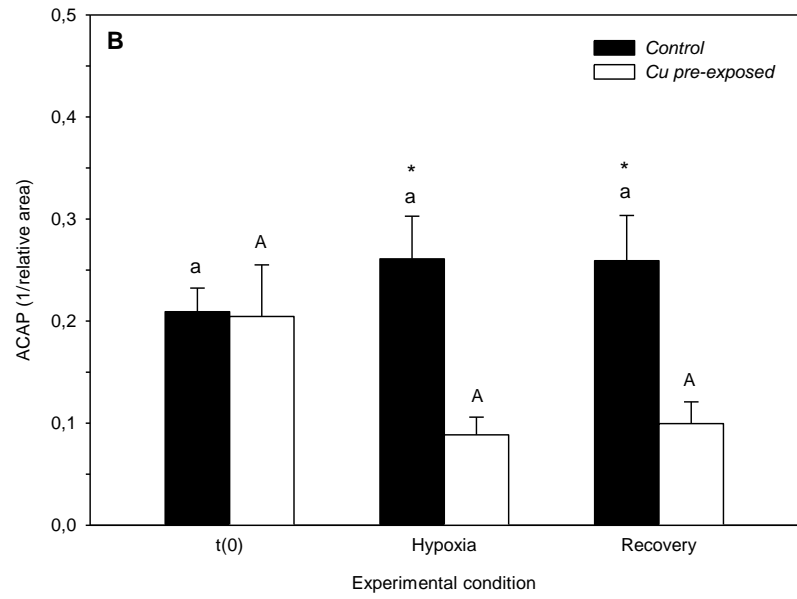
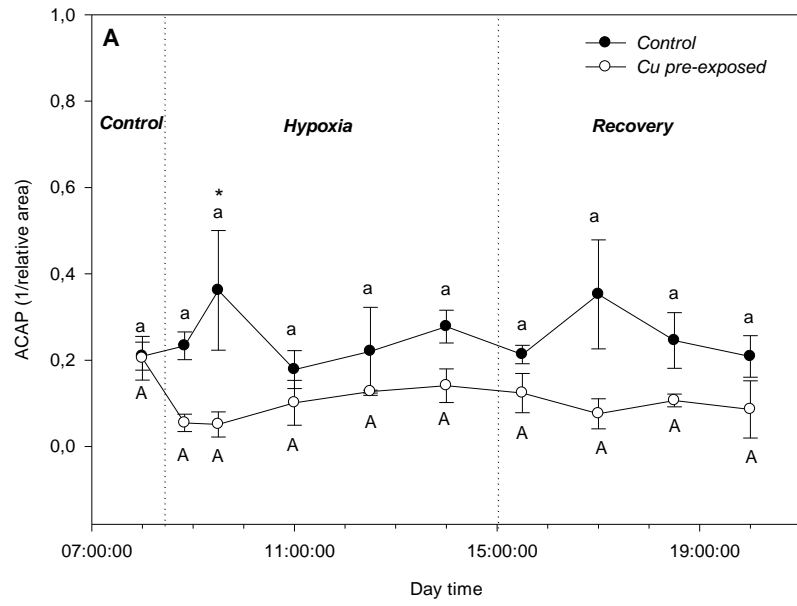


Figure 2

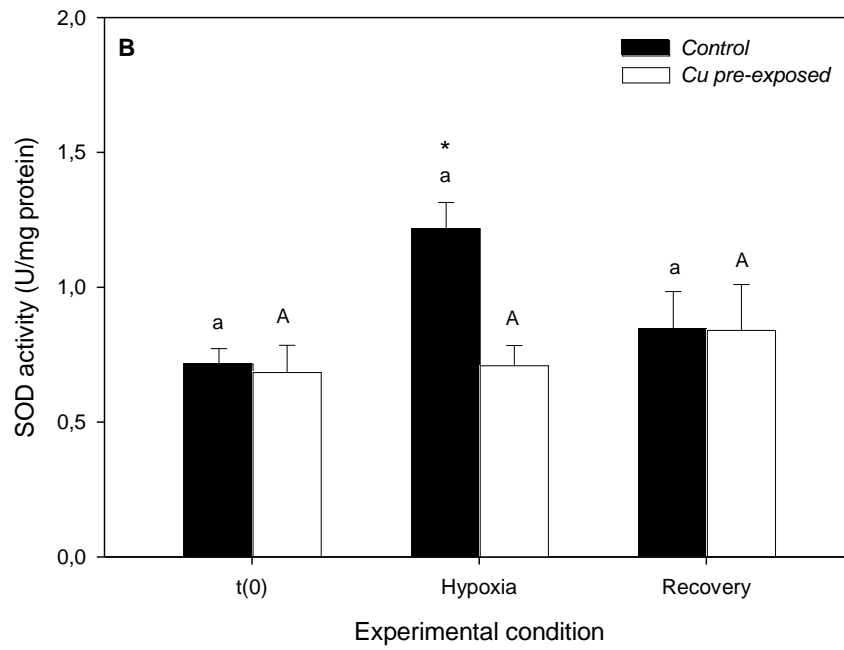
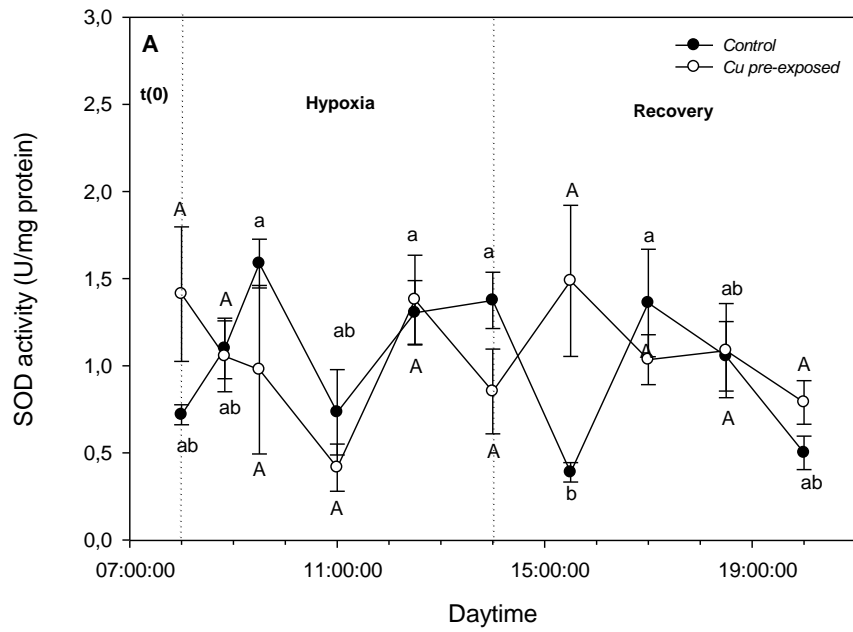


Figure 3

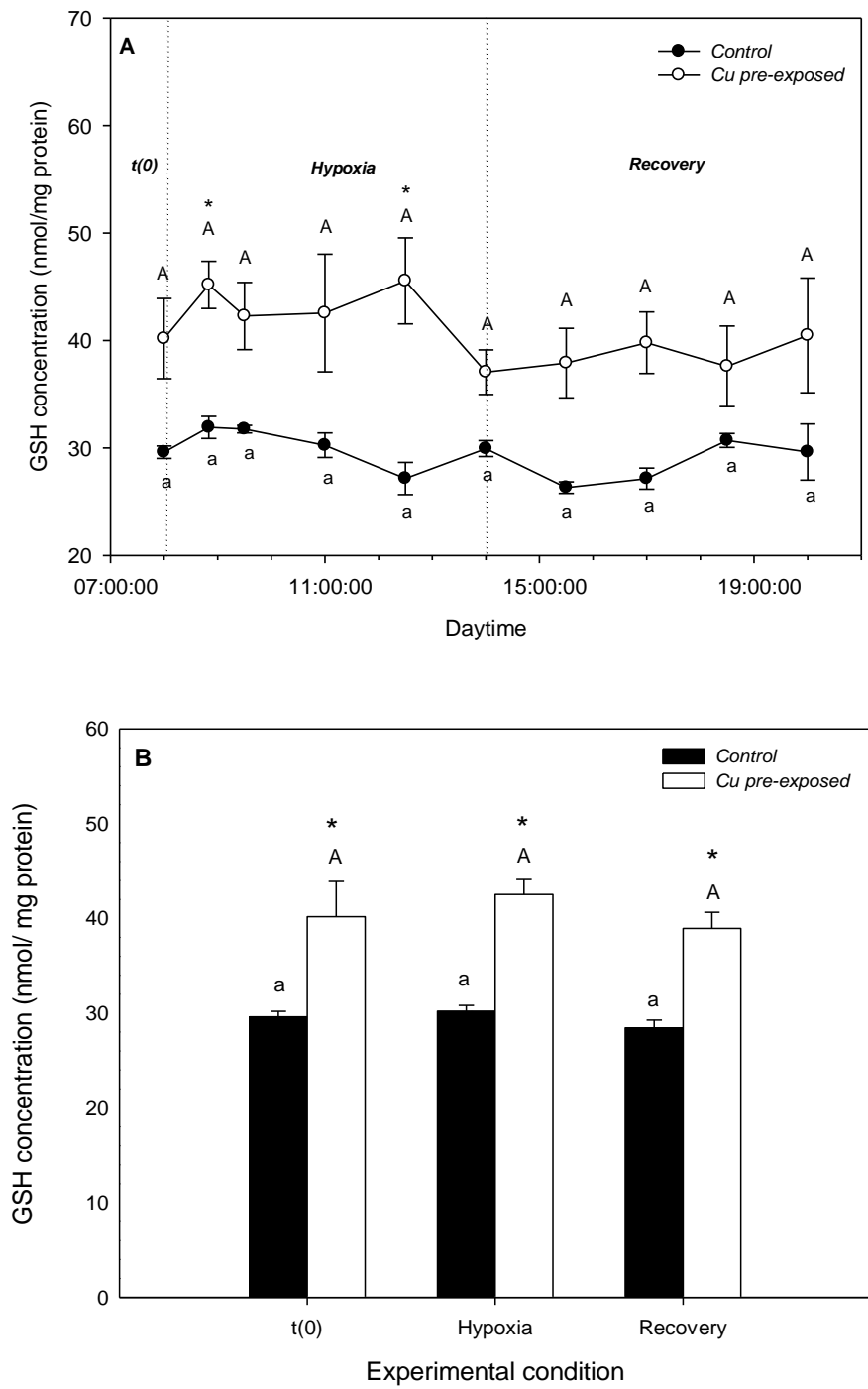


Figure 4

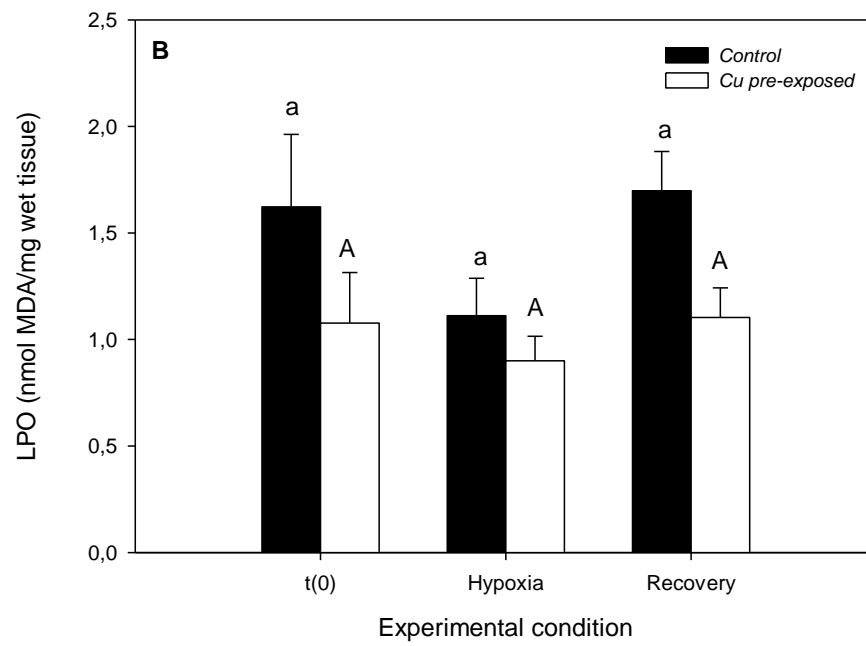
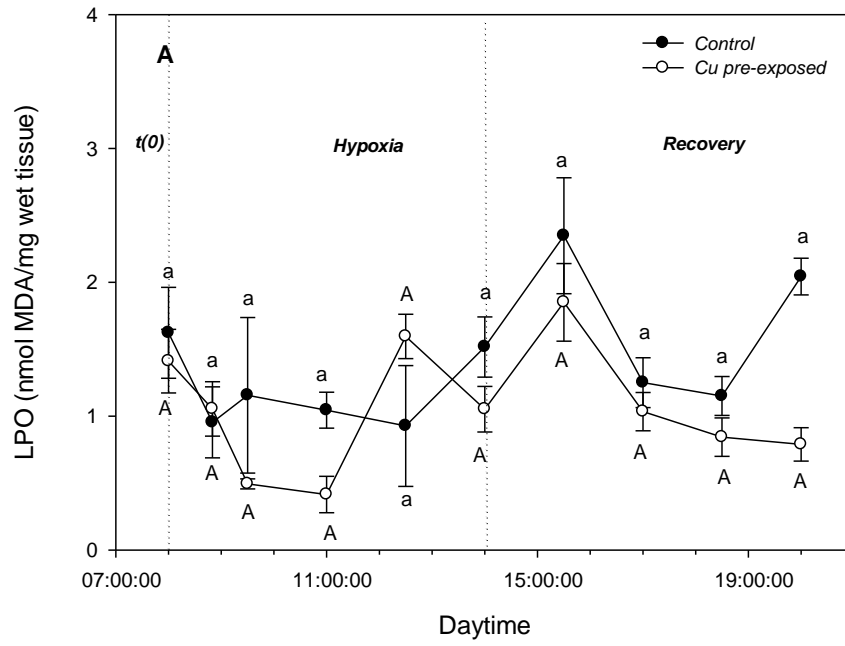


Figure 5

